



HAL
open science

Inventaire et analyse chimique des exsudats des plantes d'utilisation courante au Congo-Brazzaville

Arnold Murphy Elouma Ndinga

► **To cite this version:**

Arnold Murphy Elouma Ndinga. Inventaire et analyse chimique des exsudats des plantes d'utilisation courante au Congo-Brazzaville. Chimie analytique. Université Paris Sud - Paris XI; Université Marien-Ngouabi (Brazzaville), 2015. Français. NNT : 2015PA112023 . tel-01269459

HAL Id: tel-01269459

<https://theses.hal.science/tel-01269459>

Submitted on 5 Feb 2016

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.



Comprendre le monde,
construire l'avenir®



UNIVERSITE MARIEN
NGOUABI



UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 470:
CHIMIE DE PARIS SUD

Laboratoire d'Etude des Techniques et d'Instruments d'Analyse Moléculaire (LETIAM)

THÈSE DE DOCTORAT

CHIMIE

par

Arnold Murphy ELOUMA NDINGA

INVENTAIRE ET ANALYSE CHIMIQUE

DES EXSUDATS DES PLANTES D'UTILISATION COURANTE

AU CONGO-BRAZZAVILLE

Date de soutenance : 27/02/2015

Directeur de thèse : M. Pierre CHAMINADE, Professeur des Universités (France)

Co-directeur de thèse : M. Jean-Maurille OUAMBA, Professeur Titulaire CAMES (Congo)

Composition du jury :

Président : M. Alain TCHAPLA, Professeur Emérite, Université Paris-Sud

Rapporteurs : M. Zéphirin MOULOUGUI, Directeur de Recherche INRA, INP-Toulouse

M. Ange Antoine ABENA, Professeur Titulaire CAMES, Université Marien Ngouabi

Examineurs : M. Yaya MAHMOUT, Professeur Titulaire CAMES, Université de N'Djaména

Mme. Myriam BONOSE, Maître de Conférences, Université Paris-Sud

A mon père ELOUMA NDINGA, cette thèse est pour toi.

A ma mère Gabrielle ESSASSA, c'est le fruit de tes sacrifices.

A mes sœur et frères qui m'ont toujours poussé en avant. Voilà l'aboutissement de vos efforts.

A mes frères et sœurs de CHARISMA, église chrétienne, pour avoir cru en moi plus que moi-même.

A mes étudiants qui m'ont aidé dans cette tâche difficile. Je vous dédie ce travail en guise de ma gratitude et de ma reconnaissance.

A mes amis et collègues

A tous ceux qui m'ont encouragé et soutenu.

Témoignage de ma profonde affection.

Remerciements

Ces travaux de recherche, réalisés dans le cadre d'une convention internationale de cotutelle de thèse entre l'Université Marien NGOUABI et l'Université Paris-Sud, sont le fruit d'une collaboration entre l'Unité de Chimie du Végétal et de la Vie de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Marien NGOUABI (Congo), siège du Pôle d'Excellence Régional de l'Agence Universitaire de la Francophonie « *formation et recherche sur la Pharmacopée et la Médecine Traditionnelles Africaines* » et de la Formation Doctorale « *Ecotechnologie, Valorisation du Végétal et bio-Santé* » (PER-AUF-PMTA/UC2V/FD-SEV), et le Laboratoire d'Etude des Techniques et d'Instruments d'Analyse Moléculaire (LETIAM), membre du Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud (GCA).

Avec l'accompagnement du Professeur Jean-Maurille OUAMBA, Responsable du PER-AUF-PMTA/UC2V/FD-SEV et Doyen de la Faculté des Sciences et Techniques de Brazzaville, j'ai bénéficié d'une bourse du Gouvernement Français (BGF) à travers le Service de Coopération et d'action culturelle (SCAC) de l'ambassade de France au Congo placée sous la gestion de Campus France. Cette bourse m'a permis d'effectuer des séjours de formation à la recherche, alternativement entre l'UC2V et le LETIAM.

Je tiens tout d'abord à remercier respectivement Madame Marine de HEAULME qui m'avait octroyé cette bourse, et Dominique ANOUILH actuellement attachée de coopération et d'action culturelle auprès de l'ambassade de France au Congo, pour la continuité du programme qui a été mis en place.

Je tiens à remercier :

- le Professeur Pierre CHAMINADE, Directeur du groupe de Chimie analytique de l'Université Paris-Sud (France), qui s'est engagé à diriger ce travail de thèse. Veuillez accepter l'expression de mes sentiments respectueux et de ma profonde gratitude.
- le Professeur Jean-Maurille OUAMBA, Responsable du PER-AUF-PMTA/UC2V/FD-SEV, qui s'est engagé à diriger ces travaux, à négocier et obtenir pendant toute la durée de la thèse l'appui de la coopération française, me donnant l'opportunité de me former à la chimie analytique instrumentale et au développement des techniques d'analyse des exsudats des plantes du Congo ;

- le Professeur Fathi MOUSSA, Directeur du LETIAM, qui a accepté de me recevoir et de mettre à ma disposition l’environnement technique de son laboratoire.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Alain TCHAPLA, Professeur Emérite de l’Université Paris-Sud (France), pour son aide, ses nombreux conseils et encouragements, et qui a aimablement accepté de présider ce jury.

Que le Professeur Pierre CHAMINADE, Directeur du groupe de Chimie analytique de l’Université Paris-Sud (France) et directeur de thèse, accepte l’expression de mes sentiments respectueux et de ma profonde gratitude.

Je remercie vivement le Docteur Myriam BONOSE, Maître de Conférences de l’Université Paris-Sud, qui s’est investie dans l’encadrement de ces travaux pendant les périodes de séjours au LETIAM, mais a suivi aussi mes activités quotidiennes à Brazzaville.

C’est un plaisir de travailler avec elle : toujours disponible et dynamique. Merci pour vos précieux conseils et l’attention particulière que vous avez manifestée pour ce travail. Merci aussi pour toutes les démarches administratives effectuées pour moi.

J’exprime ma profonde gratitude :

- à Monsieur le Docteur Zéphirin MOULOUNGUI, Directeur de recherche INRA, INP de Toulouse (France), qui a fait le déplacement pour participer à ce jury en qualité de rapporteur externe. Qu’il veuille trouver ici l’expression de ma reconnaissance.
- à Monsieur le Professeur Ange Antoine ABENA de l’Université Marien NGOUABI (Congo) qui me fait l’honneur de participer au jury et de juger ce travail en qualité de rapporteur interne. Je tiens à lui témoigner ma reconnaissance et ma respectueuse gratitude.
- à Monsieur le Professeur Yaya MAHMOUT, Recteur de l’Université de Moundou, enseignant-chercheur permanent de l’Université de N’Djaména (Tchad), qui a accepté

de faire partie du jury. Qu'il veuille trouver ici, l'expression de ma profonde reconnaissance.

Mes remerciements vont également :

- au Docteur Jean BLETON pour sa disponibilité et le savoir-faire qu'il a mis à notre disposition tout au long de cette thèse ;
- au Docteur Sylvie HERON, Maître de Conférences-HDR de l'Université Paris-Sud, pour son accueil, ses remarques, encouragements et pour les cartes de Paris qui m'ont aidées à ne pas me perdre lors de mon arrivée en France ;
- au Docteur Jean-Marie MOUTSAMBOTE, Maître de Conférences-CAMES de Botanique tropicale à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et de Foresterie (ENSAF) de l'Université Marien NGOUABI qui a identifié les espèces végétales faisant l'objet de ce travail ;
- au Docteur NSIKA MIKOKO, Maître Assistant de Botanique systématique à la Faculté des Sciences et Techniques (FST) de l'Université Marien NGOUABI qui a identifié les espèces végétales faisant l'objet de ce travail ;

Je remercie aussi toute l'équipe du LETIAM (Marine de PERSON et Nathalie LEVEQUE) et mon très cher Philippe MEJANELLE pour leur disponibilité permanente par rapport à mes multiples sollicitations.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à Yvonne PAOLI, Célestine NKOUNKOU, Pierre GUIBAL, GOUOLLALY TSIBA, Adolphe Christian NGAKEGNI LIMBILI, Séverin MBAHOUGADOBE, Chris MAYANDA, Jean-Noël KOANE, Naïra VASQUEZ, Paul NGAISONA, Dorra HMIDA, Vodi MAWUNYEGA, Nadine SOME, Ardèche SAMBA, Fergie Romance Myriama BIMVOUKOULOU, Vicem Ornella TSATI LEMBE, Joseph Edgard TSIMA et Arnaud TAMBA pour leur aide très précieuse, leur sympathie et pour la bonne ambiance qu'ils ont créée autour de moi. Je garde un très bon souvenir de tous nos moments forts et aussi de déprimés !!

Communications scientifiques

Certains aspects de ces travaux de recherche ont été partiellement publiés ou présentés lors de congrès internationaux sous forme de communications orales ou de posters.

Articles scientifiques originaux

Elouma Ndinga A.M., Bonose M., Bleton J., Tchaplà A., Ouamba J-M., Chaminade P. (Sous presse). Characterization of volatile compounds from the gum-resin of *Mangifera indica* L. trunk bark using Hs-SPME-GC/MS. *Revue CAMES - Série Pharm. Méd. Trad. Afr.*

Communication orale

Elouma Ndinga A.M., Bonose M., Bleton J., Tchaplà A., Ouamba J-M., Chaminade P. Mise au point d'une méthodologie d'analyse de quelques exsudats de plantes du Congo. Communication présentée aux Rencontres de la Société Chimique d'Afrique Centrale et des Grands Lacs (SOCACGL), 1^{er} Atelier International de Chimie, 13-17 décembre 2011, Brazzaville, Congo.

Elouma Ndinga A.M., Bonose M., Bleton J., Tchaplà A., Ouamba J-M., Chaminade P. Mise en place d'une méthodologie d'analyse d'un exsudat de type copal d'origine botanique Congolaise. Communication présentée au Congrès AFSEP Club Jeune, 4 juin 2013, Paris, France.

Elouma Ndinga A.M., Bonose M., Bleton J., Nkounkou Loumpangou Tchaplà A., Ouamba J-M., Chaminade P.. Mise en place d'une méthodologie d'analyse d'un exsudat de type copal d'origine botanique Congolaise. Communication présentée au JED de Paris sud, 1-2 octobre 2014, Orsay, France.

Posters

Elouma Ndinga A.M., Bonose M., Bleton J., Nkounkou Loumpangou C., Mahmoud Y., Tchaplà A., Ouamba J-M., Chaminade P. (2012, septembre). Development of a methodology for analysis of copal type exudate used traditionally in the Republic of Congo. Paper presented at the 29th International Symposium on Chromatography. Toruń, Poland.

Elouma Ndinga A.M., Bonose M., Bleton J., Nkounkou Loumpangou C., Mahmoud Y., Tchaplà A., Ouamba J-M., Chaminade P. (2013, juin). Mise en place d'une méthodologie d'analyse d'un exsudat de type copal d'origine botanique Congolaise. Communication présentée au 13^{ème} Congrès SEP, juin, Paris (France).

Table de matières

Remerciements	ii
Liste des figures	ix
Sigles et abréviations	xiv
Sigles et abréviations (suite).....	xv
INTRODUCTION GENERALE	1
PARTIE I : GENERALITES SUR LES EXSUDATS DES PLANTES ET LEUR CARACTERISATION	4
Chapitre I : Les exsudats des plantes	5
Introduction	6
I.1. Les tissus conducteurs et sécréteurs des plantes vasculaires	6
I.1.1. Tissus conducteurs.....	6
I.1.2. Tissus sécréteurs	7
I.2. Phénomènes d'exsudation chez les arbres	7
I.2.1. Origine	7
I.2.2. Rôles	8
I.3. Les différents types d'exsudats des plantes.....	9
I.3.1. Latex	9
I.3.2. Gomme.....	10
I.3.3. Exsudats résineux	10
I.3.3.1. Exsudats résineux terpéniques	11
I.3.3.1.1. Exsudats de conifères.....	11
I.3.3.1.2. Elémis	12
I.3.3.1.3. Mastics	13
I.3.3.1.4. Copals	13
I.3.3.1.5. Ambres.....	15
I.3.3.2. Exsudats résineux phénoliques	16
I.3.4. Exsudats résineux obtenus sous forme de mélange	16
I.4. Composition chimique et métabolites des exsudats des plantes	17
I.4.1. Structures et classes de quelques composés isolés dans les latex	17
I.4.2. Composition chimique et classification des exsudats gommeux	19
I.4.3. Composition chimique et métabolites des exsudats résineux.....	20
I.4.3.1. Origine et voie de synthèse des composés d'exsudats résineux.....	20
I.4.3.2. Composition chimique des exsudats résineux terpéniques	20
I.4.3.2.1. Composition chimique des exsudats résineux de conifères	20
I.4.3.2.2. Composition chimique des élémis	23
I.4.3.2.3. Composition chimique des Mastics	27
I.4.3.2.4. Composition chimique des copals	29
I.4.3.2.5. Composition chimique des ambres	30
I.4.3.3. Composition chimique des exsudats résineux phénoliques	31
I.4.4. Composition chimique des exsudats obtenus sous forme de mélange.....	32
I.5. Propriétés physico-chimiques de quelques exsudats des plantes.....	33
I.5.1. Propriétés physico-chimiques des latex	33
I.5.2. Propriétés physico-chimiques des exsudats gommeux	34
I.5.3. Propriétés physico-chimique des exsudats résineux	34

I.6. Utilisations des exsudats des plantes	35
I.6.1. Latex	35
I.6.2. Exsudats gommeux	35
I.6.3. Exsudats résineux	35
Conclusion.....	36
Chapitre II : Les techniques analytiques utilisées pour la caractérisation des exsudats des plantes	38
Introduction	38
II.1. Techniques de traitement d'échantillon	40
II.1.1. Techniques d'extraction des composés volatils	41
II.1.1.1. Procédés d'extraction des huiles essentielles.....	41
II.1.1.1.1. Procédés d'extraction conventionnels	41
II.1.1.1.2. Procédés d'extraction innovants.....	43
II.1.2. Techniques d'extraction des composés peu volatils	50
II.1.2.1. Procédés d'extraction conventionnels	50
II.1.2.2. Procédés d'extraction innovants	51
II.1.3. Méthodes de dérivation en chromatographie en phase gazeuse (CPG)	53
II.1.3.1. Méthylation.....	54
II.1.3.2. Silylation	54
II.1.3.3. Méthanolyse acide suivie d'une réaction de silylation.....	55
II.1.4. Pyrolyse et dérivation « on line »	56
II.1.4.1. Principe.....	56
II.1.4.2. Dérivation « on line » pour Py-CPG-SM	57
II.2. Techniques physico-chimiques d'analyse des exsudats des plantes.....	58
II.2.1. Techniques spectroscopiques	58
II.2.1.1. Spectrométrie de masse directe.....	58
II.2.1.2. Spectroscopie du moyen et du proche infrarouge	59
II.2.1.3. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire	62
II.2.2. Techniques chromatographiques	63
II.2.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	63
II.2.2.2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	64
II.2.2.3. Chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle (GCxGC)	67
II.2.2.4. Chromatographie en phase liquide (CPL)	71
Conclusion.....	73
Références Bibliographiques (partie I).....	75
PARTIE II : MATERIELS ET METHODES	85
Chapitre III : Méthodologie de l'inventaire des plantes à exsudats du Congo	86
Introduction	86
III.1. Méthodologie	86
III.1.1. Recherche bibliographique	86
III.1.2. Enquêtes ethnobotaniques.....	87
III.2. Description du lieu d'enquête	87
III.3. Déroulement des entretiens.....	88
III.4. Zones de récolte	88
Conclusion.....	90
Chapitre IV : Matériels et méthodes relatifs à la caractérisation des exsudats	91
IV.1. Description des échantillons	92
IV.1.1. Les exsudats des plantes analysés	92
IV.1.3. Les substances de référence.....	93
IV.2. Protocoles de traitement des échantillons.....	93
IV.2.1. Préparation de pastilles de KBr pour les analyses en moyen infrarouge.....	93

IV.2.2. Procédés d'extraction de la fraction volatile des exsudats des plantes.....	94
IV.2.3. Procédés d'extraction de la fraction peu volatile des exsudats des plantes	95
IV.2.4. Méthodes de dérivation	95
IV.2.5. Pyrolyse avec dérivation «en ligne».....	96
IV.3. Appareillage et conditions analytiques.....	97
IV.3.1. Spectroscopie de proche infrarouge (SPIR).....	97
IV.3.2. Spectroscopie de moyen infrarouge (SMIR)	97
IV.3.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	97
IV.3.4. Chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse (GCxGC-MS).....	99
IV.4. Caractérisation des colonnes capillaires courtes par chromatographie en phase gazeuse avec détection FID.....	100
IV.4.1. Colonnes capillaires caractérisées.....	100
IV.4.2. Instrumentation CPG-FID et solution injectée.....	101
IV.4.3. Protocole expérimental suivi pour exécuter le test de Grob	102
IV.4.4. Evaluation de l'épaisseur de film des phases stationnaires	105
IV.4.5. Evaluation de l'homogénéité de la phase stationnaire le long de la colonne.....	107
IV.5. Applications en GCxGC-MS après caractérisation des colonnes capillaires	108
IV.6. Traitements des données	109
IV.6.1. Prétraitement des données spectrales	109
IV.6.2. Prétraitement des données chromatographiques	110
IV.6.3. Analyses statistiques des données.....	111
IV.6.4. Comparaison de deux séries de mesures (étude des colonnes courtes).....	111
Références bibliographiques (partie II).....	112
PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION	114
Chapitre V : Résultats et discussion sur l'inventaire des plantes à exsudats du Congo.....	115
V.1. Plantes à exsudats du Congo inventoriées d'après la littérature	115
V.2. Utilisation des exsudats inventoriés d'après la littérature.....	123
V.3. Plantes à exsudats inventoriées à partir des enquêtes ethnobotaniques	127
V.4. Monographies des plantes à exsudats les plus citées.....	130
Chapitre VI : Etude analytique des exsudats des plantes	136
VI.1. Analyses spectroscopiques	137
VI.1.1. Analyses en spectroscopie du proche infrarouge (SPIR)	137
VI.1.2. Analyses en spectroscopie du moyen infrarouge (SMIR)	140
VI.2. Analyses par CPG-SM	149
VI.2.1. Composition chimique de la fraction peu volatile des exsudats étudiés.....	149
VI.2.2. Composition chimique de la fraction volatile des exsudats étudiés	168
VI.3. Apport de la GCxGC-MS dans la caractérisation des exsudats.....	182
VI.3.1. Analyse de la fraction volatile d'exsudat de <i>G. demeusei</i> (Harms) J. par GCxGC-MS.....	183
VI.3.2. Caractérisation des colonnes capillaires courtes et applications en GCxGC-MS	184
Références Bibliographiques (partie III).....	193
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	200
Conclusion générale.....	201
Perspectives	207
ANNEXES	208

Liste des figures

PARTIE I : GENERALITES SUR LES EXSUDATS DES PLANTES ET LEUR CARACTERISATION

Figure 1. 1. Canaux résinifères chez les pins [Nabors, 2009]	7
Figure 1. 2. Illustration des différents rôles des exsudats chez un arbre [Santiago-blay & Lambert, 2007]	9
Figure 1. 3. Nodule de gomme arabique [Poda et al., 2009].....	10
Figure 1. 4. Un insecte piégé dans de l'ambre [Nabors, 2009]	16
Figure 1. 5. Structure des peptides isolés du latex de <i>Croton gossypifolius</i> Müll. Arg. et de <i>Jatropha integerrima</i> Jacq.	17
Figure 1. 6. Structure de cinq xanthonés isolés du latex de <i>Garcinia cowa</i> Roxb.	18
Figure 1. 7. Structure d'un alcool triterpénique isolé du latex d' <i>Euphorbia peplus</i> L.....	19
Figure 1. 8. Les différentes voies de biosynthèse de composés terpéniques et phénoliques présents dans les exsudats résineux de végétaux.....	20
Figure 1. 9. Structure de base de trois diterpènes présents dans les exsudats de Conifère	21
Figure 1. 10. Structures des acides diterpéniques des exsudats résineux de la famille de Pinaceae	22
Figure 1. 11. Quelques acides diterpéniques identifiés dans les exsudats des conifères à Damar.....	23
Figure 1. 12. Quelques structures chimiques des composés triterpéniques identifiés dans les élémis	26
Figure 1. 13. Quelques structures chimiques des composés triterpéniques identifiés dans les mastics	28
Figure 1. 14. Quelques structures des composés identifiés dans les vrais copals	30
Figure 1. 15. Structure de base des polymères d'exsudats résineux fossiles [Langenheim, 2003]	31
Figure 1. 16. Quelques principaux constituants aromatiques et triterpéniques des exsudats phénoliques.	32
Figure 1. 17. Quelques structures de molécules isolées des exsudats obtenus sous forme de mélange de type (gomme-résine)	33
Figure 2. 1. Dispositif de type Clevenger	42
Figure 2. 2. Dégradation de l'hydrate de sabinène au cours de l'hydrodistillation [Bruneton, 2002].....	42
Figure 2. 3. Schéma de principe de deux procédés d'extraction innovants d'une huile essentielle extracteurs	44
Figure 2. 4. Présentation schématique de la fibre SPME et ses différents éléments constitutifs.....	45
Figure 2. 5. Différents modes d'extraction en SPME : (a) extraction directe, (b) extraction de l'espace de tête, (c) extraction par immersion avec une membrane de protection	46
Figure 2. 6. Procédures d'extraction et de désorption en Hs-SPME	47
Figure 2. 7. Silylation du groupement carboxylique par application de BSTFA	55
Figure 2. 8. Schéma d'un pyrolyseur à point de Curie installé sur l'injecteur d'un chromatographe en phase gazeuse	57
Figure 2. 9. Les différents domaines infrarouges.....	59
Figure 2. 10. Principe de la réflexion totale atténuée (ATR)	61
Figure 2. 11. Développement d'un chromatogramme.....	63
Figure 2. 12. Schéma du principe d'un CPG-SM (ionisation en mode impact électronique)	66
Figure 2. 13. Schéma du principe de la GCxGC.....	68
Figure 2. 14. Schéma du principe d'un modulateur à double jet cryogénique de CO ₂ avec les différentes étapes de la modulation	70
Figure 2. 15. Visualisation des chromatogrammes obtenus par retraitement du signal	70

PARTIE II : MATERIELS ET METHODES

Figure 3. 1. Carte du Congo montrant le trajet effectué de Brazzaville à Owando [Google Earth]	87
Figure 3. 2. Paysage typique des forêts périodiquement inondées de la Cuvette congolaise (ici en bordure de la rivière Kouyou).....	88
Figure 3. 3. Carte montrant les différents sites de prospections botaniques [Google Earth].....	89
Figure 3. 4. Prospection en forêt dans la zone d'Owando : (a) observation des feuilles d'un arbre à exsudat ; (b) traversée de la rivière Kouyou	89
Figure 4. 1. Description et origine des échantillons d'exsudats analysés.....	93
Figure 4. 2. Montage d'hydrodistillation (extracteur de type Clevenger)	94
Figure 4. 3. Montage de la microextraction sur phase solide en espace de tête (Hs-SPME)	95
Figure 4. 4. Montage du pyrolyseur à point de Curie.....	96
Figure 4. 5. Phases stationnaires des colonnes caractérisées de 0,25 mm de diamètre interne	100
Figure 4. 6. Schéma montrant la démarche de coupe des colonnes capillaires à caractériser	101
Figure 4. 7. Phases stationnaires des colonnes caractérisées de 0,1 mm de diamètre interne.	101
Figure 4. 8. Nomogramme de Grob (1978). Abscisses : épaisseur de film. Ordonnées : différence de température de rétention ΔT_R	106

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Figure 5. 1. Pourcentages d'exsudats ayant une utilisation par famille.....	123
Figure 5. 2. Fréquence de citation des exsudats en fonction de la pathologie ou de l'utilisation.....	127
Figure 5. 3. Monographie simplifiée de <i>Coelocaryon botryoides</i> Vermeesen	130
Figure 5. 4. Monographie simplifiée de <i>Dacryodes edulis</i> (G. Don) Lam.	131
Figure 5. 5. Monographie simplifiée de <i>Guibourtia demeusei</i> (Harms) J. Leonard	132
Figure 5. 6. Monographie simplifiée de <i>Harungana madagascariensis</i> Lam. ex Poir.	133
Figure 5. 7. Monographie simplifiée de <i>Pycnanthus angolensis</i> (Welw.) Warb.	134
Figure 6. 1. Projections des 45 individus sur le premier plan factoriel (ACP) avec une limite de confiance (T2 de Hotelling) de 95%.....	137
Figure 6. 2. Spectres en proche infrarouge des exsudats obtenus après correction par une méthode SNV.....	138
Figure 6. 3. ACP obtenue après élimination respective des échantillons d'exsudats solides ou liquides visqueux de la matrice de départ.....	140
Figure 6. 4. Spectres infrarouges d'exsudat de <i>G. demeusei</i> (Harms) J. Leonard ; a) en transmission à partir d'une pastille de KBr ; b) en réflexion totale atténuée (ATR)	141
Figure 6. 5. Superposition des spectres infrarouges d'exsudat de <i>G. demeusei</i> (Harms) J. Leonard et du copal kauri obtenus en transmission.....	143
Figure 6. 6. Spectre IRTF-ATR des exsudats de <i>D. edulis</i> (G. Don) K.J. Lam des Groupes I, III et V	145
Figure 6. 7. Spectre IRTF-ATR des exsudats de <i>D. edulis</i> (G. Don) K.J. Lam des sous-groupes II-a et II-b.....	146
Figure 6. 8. Spectre IRTF-ATR des exsudats de <i>D. edulis</i> (G. Don) K.J. Lam des sous-groupes	147
Figure 6. 9. Superposition des spectres infrarouges d'exsudats de trois espèces de la famille des Burseraceae.....	148
Figure 6. 10. Chromatogramme de l'exsudat résineux de <i>D. edulis</i> (G. Don) K.J. Lam obtenu par CPG-SM, échantillon de Boko village 17	149

Figure 6. 11. Spectre de masse du composé 1 (3-épi-β-amyrine, α-OTMS éther) et les différents fragments obtenus en impact électronique.....	150
Figure 6. 12. Schéma de fragmentation en impact électronique du composé 3 supposé.....	151
Figure 6. 13. Structure probable des composés 8 et 9 détectés dans les exsudats de <i>D. edulis</i> (G. Don).....	152
Figure 6. 14. Chromatogramme de l'échantillon d'exsudat résineux de <i>D. edulis</i> (G. Don) K.J. Lam (Boko village 17)	152
Figure 6. 15. Spectre de masse du composé 5 et les différents fragments obtenus en impact électronique	153
Figure 6. 16. Variance expliquée cumulée.....	155
Figure 6. 17. Projection des 48 individus sur le plan factoriel (ACP) correspondant aux limites de confiance à 90 %	156
Figure 6. 18. Profil chromatographique de l'exsudat de <i>D. edulis</i> (G. Don) K.J. Lam de Mbémbé et de l'échantillon de l'exsudat de référence (gomme élémi).....	157
Figure 6. 19. Variance expliquée cumulée sur le deuxième ACP	158
Figure 6. 20. Tracé des scores obtenus en ACP des profils chromatographiques des exsudats de <i>D. edulis</i> (G. Don) K.J. Lam après élimination des échantillons GE, GE BIS et DE Mbémbé (D ₀).....	159
Figure 6. 21. Graphe covariante/corrélation (X, t).....	160
Figure 6. 22. Profil chromatographique des exsudats de <i>D. edulis</i> (G. Don) Lam des deux extrémités de l'axe R2X[1]	161
Figure 6. 23. Profil chromatographique des exsudats de <i>D. edulis</i> (G. Don) K.J. Lam des deux extrémités de l'axe R2X[2].....	162
Figure 6. 24. Classification hiérarchique ascendante des exsudats de <i>D. edulis</i> (G. Don) K.J. Lam	163
Figure 6. 25. Chromatogramme de l'extrait à l'éther de pétrole du copal Mbaka après dérivation au TMS-diazométhane.	164
Figure 6. 26. Chromatogramme obtenu après pyrolyse de l'échantillon de copal Mbaka	167
Figure 6. 27. Projection des 48 individus sur le premier plan factoriel (ACP) avec une limite de confiance de 78,9 %	172
Figure 6. 28. Chromatogrammes des échantillons D5 et D11 de <i>D. edulis</i> (G. Don) K.J. Lam.....	173
Figure 6. 29. Chromatogrammes des autres échantillons d'exsudats de <i>D. edulis</i> (G. Don) K.J. Lam.....	174
Figure 6. 30. Contribution des variables des échantillons d'exsudats de <i>D. edulis</i> (G. Don) K.J. Lam aux deux premières composantes	175
Figure 6. 31. Hiérarchisation des extraits volatils d'exsudat de <i>D. edulis</i> (G. Don) K.J. Lam de différentes zones	177
Figure 6. 32. Profils chromatographiques de la fraction volatile de copal Mbaka ; a) sous forme d'huile essentielle ; b) en extrait par Hs-SMPE.....	179
Figure 6. 33. Profil chromatographique de l'huile essentielle de copal Mbaka en GCxGC-MS.....	183
Figure 6. 34. Profil chromatographique de l'huile essentielle de copal Mbaka en GCxGC-MS.....	184
Figure 6. 35. Cartes chromatographiques de l'extrait par Hs-SPME d'exsudat de <i>G. demeusei</i> (Harms) J. Léonard en GCxGC-MS obtenues en utilisant 2 colonnes équivalentes.....	189
Figure 6. 36. Cartes chromatographiques d'un échantillon d'huile essentielle de citronnelle	190

Liste des tableaux

PARTIE I : GENERALITES SUR LES EXSUDATS DES PLANTES ET LEUR CARACTERISATION

Tableau I. 1. Les principaux composés identifiés dans les exsudats de quelques espèces du genre <i>Canarium</i>	24
Tableau I. 2. Composés triterpéniques identifiés dans l'exsudat résineux de <i>Pistacia lentiscus</i> var. <i>Chia</i> [Assimopoulou & Papageorgiou, 2005].....	27
Tableau II. 1. Caractéristiques de quelques revêtements disponibles sur le marché	49
Tableau II. 2. Avantages et inconvénients de chaque système d'injection [Tranchant, 1995].....	65

PARTIE II : MATERIELS ET METHODES

Tableau IV. 1. Conditions expérimentales d'analyse de la fraction volatile d'exsudat de type copal	98
Tableau IV. 2. Conditions expérimentales d'analyse de la fraction volatile des exsudats de <i>D. edulis</i> (G. Don) K. J. Lam.....	98
Tableau IV. 3. Condition expérimentale d'analyse de la fraction peu volatile des exsudats de <i>D. edulis</i> (G. Don) K. J. Lam.....	98
Tableau IV. 4. Conditions expérimentales d'analyse de la fraction peu volatile d'exsudat de type copal (G. <i>demeusei</i> (Harms) J. Léonard).....	99
Tableau IV. 5. Conditions expérimentales d'analyse par pyrolyse de la fraction peu volatile d'exsudat de type copal de G. <i>demeusei</i> (Harms) J. Léonard.....	99
Tableau IV. 6. Conditions expérimentales d'analyse de la fraction volatile d'exsudat de type copal	100
Tableau IV. 7. Temps du non retenu et rampe de programmation de température en fonction de la longueur de colonne [Grob, 1978].....	102
Tableau IV. 8. Différence d'épaisseur de film (Δe_f) qui entraîne une différence de température (ΔTR) de 1°C sur la valeur de la température de rétention	106
Tableau IV. 9. Conditions expérimentales d'analyse de la fraction volatile extrait par Hs-SPME de G. <i>demeusei</i> (Harms) J. Léonard en GCxGC-MS	109
Tableau IV. 10. Conditions expérimentales d'analyse de l'huile essentielle de la citronnelle en GCxGC-MS ..	109

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau V. 1. Plantes à exsudats du Congo inventoriées d'après la littérature	117
Tableau V. 2. Utilisations des exsudats d'après la littérature	124
Tableau V. 3. Résultats des enquêtes ethnobotaniques de plantes à exsudats	129
Tableau VI. 1. Principales bandes observées dans le cas de l'exsudat de G. <i>demeusei</i> (Harms) J. Léonard avec leur attribution structurale	142
Tableau VI. 2. Principales bandes observées dans le cas de l'exsudat de <i>D. edulis</i> (G. Don) K.J. Lam avec leur attribution structurale.....	144
Tableau VI. 3. Différents échantillons de <i>D. edulis</i> (G. Don) K.J. Lam analysés en IRTF-ATR et leurs aspects	144

Tableau VI. 4. Tableau récapitulatif des noms et ions caractéristiques des composés annotés en figure 6.10 ...	154
Tableau VI. 5. Composés identifiés dans la fraction peu volatile de copal Mbaka et leurs ions caractéristiques en impact électronique	166
Tableau VI. 6. Rendements et caractéristiques physiques des huiles essentielles extraites des exsudats de <i>D. edulis</i> (G. Don) K.J. Lam	168
Tableau VI. 7. Composition chimique des huiles essentielles extraites des exsudats de <i>D. edulis</i> (G. Don) K. J. Lam.....	169
Tableau VI. 8. Comparaison des principaux constituants de l'huile essentielle des exsudats résineux et de différentes parties de <i>Dacryodes</i> selon leurs origines.	170
Tableau VI. 9. Composés identifiés dans la fraction volatile du copal Mbaka obtenue par hydrodistillation et par Hs-SPME	180
Tableau VI. 10. Valeurs de températures de rétention, d'épaisseurs de film et du « coating efficiency » obtenues pour des portions de colonnes de diamètre interne 0,25 mm.....	187
Tableau VI. 11. Valeurs de températures de rétention, d'épaisseurs de film et de coating efficiency de portions de colonnes de diamètre interne 0,10 mm.....	188
Tableau VI. 12. Temps de rétention sur la deuxième colonne des composés annotés sur les cartes chromatographiques de la fraction volatile du copal Mbaka	190
Tableau VI. 13. Temps de rétention sur la deuxième colonne des composés annotés sur les cartes chromatographiques de l'huile essentielle de citronnelle.....	191
Tableau VI. 14. Valeurs de températures de rétention de référence pour des colonnes de 0.15µm d'épaisseur de film	191

Sigles et abréviations

Ala : alanine

ACP: Analyse en Composantes Principales

APCI : Atmospheric Pressure Chemical Ionization (Ionisation chimique à pression atmosphérique)

APPI : Atmospheric Pressure Photo-Ionization

ASE : Accelerated Solvent Extraction (Extraction accélérée par solvant)

Asn : Asparagine

ATP : Adénosine Triphosphate

ATR : Attenuated Total Reflection (Réflexion totale atténuée)

BSA : N, O-Bis (trimethylsilyl)acétamide

BSA : N,O-bis-triméthylsilyl-acétamide

BSTFA : N, OBis (trimethylsilyl) trifluoroacétamide

CAMD : Compressed Air Microwave Distillation

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CE : Coating Efficiency (Efficacité d'imprégnation)

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CPG-SM: Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

CPL : Chromatographie en phase liquide

CPL-SM : Chromatographie en phase liquide couplé à la spectrométrie de masse

DAD : Diode Array Detector (Détecteur à barrette de diodes)

DE-MS : Exposure-Mass Directe Spectrometry

DI-MS : Inlet-Mass direct Spectrometry

DMCS : Diméthylchlorosilane

DRC : Dry Ruber Content

DTGS : Deuterated TriGlycide Sulfate

DTMS : Direct Temperature Resolved Mass Spectrometry

E12 : Dodécanoate de méthyle

FID : Flamme Ionization Detector (Détecteur à ionisation de flamme)

GCxGC : Chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle

GGPP: Géranyl Géranyl Pyrophosphate

Gly : Glycine

HMDS : Hexamethyldisilane

HP : Hewlett-Packard

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance

Hs- SPME : Microextraction sur phase solide en espace de tête

IC: Ionisation Chimique

IE : Impact Electronique

IRTF : Spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier

Leu : Leucine

MAE : Extraction assistée par micro-ondes

MALDI : Matrix Assisted Laser Désorption Ionisation

MASE : Extraction par solvant assistée sous micro-ondes

Sigles et abréviations (suite)

MHG : Microwave Hydrodiffusion and Gravity

MSTFA : N-methy-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide

MSTFA : N-méthyl-N-triméthylsilyl-trifluoroacétamid

MTHD : Microwave Turbo Hydrodistillation

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

Phe : Phénylalanine

PSE : Pressurized Solvent Extraction (Extraction pressurisée par solvant)

Py : Pyrolyse

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

Ser : Sérine

SFE : Extraction par fluide supercritique

SM : Spectrométrie de masse

SMIR : Spectroscopie du moyen infrarouge

SNV: Standard Normal Variates

SPIR : Spectroscopie du proche infrarouge

SPME : Solid Phase Micro Extraction

t-BDMCS : ter-tbutyldimethylchlorosilane

TMAH : Tétraméthylammonium

TMS : Trimethylsilyl

tr : temps de rétention

T_R : température de rétention

UAE : Extraction assistée par ultrasons

VMHD : Vacuum Microwave Hydro Distillation

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Le Congo, par sa position géographique est l'un des points d'Afrique où la flore est la plus diversifiée ; ceci tient du fait qu'il constitue un important foyer d'endémicité [Bouquet, 1969]. Dans cette zone se développent différentes espèces parmi lesquelles diverses plantes aromatiques, alimentaires et médicinales, dont certaines secrètent des exsudats. Ces substances sont largement utilisées notamment comme « colle » et pour soigner diverses maladies. Cependant, un nombre restreint de ces substances a fait l'objet d'étude scientifique. Il s'agit des exsudats qui ont donné lieu à un commerce important vers l'Europe comme la gomme arabique produite par le genre *Acacia*. Au Congo, une grande majorité de ces substances est encore mal connue puisqu'aucun inventaire ni aucune étude chimique sur les exsudats n'ont été réalisés.

L'analyse d'extraits d'exsudats de plantes du Congo présente un intérêt majeur dans l'amélioration de la connaissance de ces substances et de leurs valorisations. Leur étude permet d'établir une collaboration entre divers spécialistes tels que les botanistes, chimistes, tradipraticiens et analystes afin d'obtenir des informations pour une identification et une certification des origines botaniques des exsudats. Elles permettent ainsi une meilleure compréhension, un développement de leurs usages et une appréhension de l'évolution moléculaire de la substance.

Le sujet de cette thèse, s'inscrit dans une perspective de valorisation de la médecine traditionnelle africaine en général et congolaise en particulier. Il se situe dans le champ de recherche de la chimie analytique instrumentale et de l'ethnobotanique. Ce travail consiste à inventorier les plantes à exsudats du Congo et à mettre au point une méthodologie d'analyse physico-chimique permettant la caractérisation des exsudats d'arbres d'origine botanique certifiée. Compte-tenu de la complexité chimique des exsudats, la stratégie que nous développons est multi-analytique et adaptée à la nature de l'échantillon. Elle s'appuie sur diverses techniques de traitements d'échantillons et d'analyses (spectroscopiques et séparatives).

Dans ce manuscrit de thèse, les travaux de recherche sont présentés en trois grandes parties, chacune subdivisée en deux chapitres :

- dans la première partie, nous exposons une étude bibliographique consacrée aux exsudats des plantes et aux différentes techniques analytiques utilisées pour leur caractérisation ;

- dans la seconde partie, nous décrivons le matériel employé et les méthodes développées pour améliorer la connaissance des exsudats des plantes du Congo.
- enfin, la troisième partie présente les résultats obtenus et les discussions qui en découlent aussi bien sur le plan ethnobotanique que sur le plan analytique.

PARTIE I : GENERALITES SUR LES EXSUDATS DES PLANTES ET LEUR CARACTERISATION

Chapitre I : Les exsudats des plantes

**Chapitre II : Les techniques analytiques utilisées
pour la caractérisation des exsudats
des plantes**

Chapitre I : Les exsudats des plantes

Introduction	6
I.1. Les tissus conducteurs et sécréteurs des plantes vasculaires	6
I.1.1. Tissus conducteurs	6
I.1.2. Tissus sécréteurs	7
I.2. Phénomènes d'exsudation chez les arbres	7
I.2.1. Origine	7
I.2.2. Rôles	8
I.3. Les différents types d'exsudats des plantes	9
I.3.1. Latex	9
I.3.2. Gomme	10
I.3.3. Exsudats résineux	10
<i>I.3.3.1. Exsudats résineux terpéniques</i>	<i>11</i>
<i>I.3.3.1.1. Exsudats de conifères</i>	<i>11</i>
<i>I.3.3.1.2. Elémis</i>	<i>12</i>
<i>I.3.3.1.3. Mastics</i>	<i>13</i>
<i>I.3.3.1.4. Copals</i>	<i>13</i>
<i>I.3.3.1.5. Ambres</i>	<i>15</i>
<i>I.3.3.2. Exsudats résineux phénoliques</i>	<i>16</i>
I.3.4. Exsudats résineux obtenus sous forme de mélange	16
I.4. Composition chimique et métabolites des exsudats des plantes	17
I.4.1. Structures et classes de quelques composés isolés dans les latex	17
I.4.2. Composition chimique et classification des exsudats gommeux	19
I.4.3. Composition chimique et métabolites des exsudats résineux	20
<i>I.4.3.1. Origine et voie de synthèse des composés d'exsudats résineux</i>	<i>20</i>
<i>I.4.3.2. Composition chimique des exsudats résineux terpéniques</i>	<i>20</i>
<i>I.4.3.2.1. Composition chimique des exsudats résineux de conifères</i>	<i>20</i>
<i>I.4.3.2.2. Composition chimique des élémis</i>	<i>23</i>
<i>I.4.3.2.3. Composition chimique des mastics</i>	<i>27</i>
<i>I.4.3.2.4. Composition chimique des copals</i>	<i>29</i>
<i>I.4.3.2.5. Composition chimique des ambres</i>	<i>30</i>
<i>I.4.3.3. Composition chimique des exsudats résineux phénoliques</i>	<i>31</i>
I.4.4. Composition chimique des exsudats obtenus sous forme de mélange	32
I.5. Propriétés physico-chimiques de quelques exsudats des plantes	33
I.5.1. Propriétés physico-chimiques des latex	33
I.5.2. Propriétés physico-chimiques des exsudats gommeux	34
I.5.3. Propriétés physico-chimiques des exsudats résineux	34
I.6. Utilisations des exsudats des plantes	35
I.6.1. Latex	35
I.6.2. Exsudats gommeux	35
I.6.3. Exsudats résineux	36
Conclusion	36

Introduction

Les exsudats sont des substances qui suintent des pores d'un tissu malade ou endommagé d'une plante. D'après [Lambert \(2013\)](#), ce sont des mélanges complexes de composés organiques qui sont secrétés dans la matrice extracellulaire et qui apparaissent normalement à la surface de la plante. Ces substances ont été récoltées et utilisées à travers l'histoire par exemple comme adhésifs et revêtements, épaississants, ingrédients de cosmétiques,... Les Mayas récoltaient déjà, 1600 ans avant J.C., du latex à partir d'arbres pour en faire de grosses balles de caoutchouc dont ils se servaient pour sécuriser l'assemblage entre la tête et le manche des haches [\[Nabors, 2009\]](#). De plus, les hiéroglyphes égyptiens attestent l'usage ancien des exsudats notamment la gomme arabique qui fait l'objet d'un commerce depuis au moins 4000 ans [\[Bruneton, 2002\]](#). Certains exsudats par contre ont été appréciés pour leurs usages médicaux, en particulier pour leurs propriétés antiseptiques et anti-inflammatoires [\[Veiga et Pinto, 2002\]](#).

Ce chapitre donne une idée générale sur les tissus conducteurs et sécréteurs des plantes avant d'aborder le phénomène d'exsudation, les différents types d'exsudats, suivis de leurs propriétés physico-chimiques, leurs constituants chimiques et leurs utilisations. Ces informations sur les tissus des plantes devenus de plus en plus disponibles grâce au progrès de l'anatomie végétale et de la microscopie électronique, apportent des éléments nécessaires pour comprendre leur origine. Elles fournissent aussi des critères permettant de mieux les définir et de mieux les différencier afin de minimiser la confusion qui entoure ces substances exsudées par les plantes.

I.1. Les tissus conducteurs et sécréteurs des plantes vasculaires

Les tissus sont des groupements de cellules plus ou moins différenciées, ayant perdu le pouvoir de se diviser et qui remplissent une fonction déterminée. Ils se forment à partir de jeunes cellules indifférenciées appelées méristèmes.

I.1.1. Tissus conducteurs

Les tissus conducteurs qui constituent un système continu de tissus dans la plante, assurent la conduction de l'eau, des sels minéraux et des substances nutritives. On en distingue deux sortes :

- le xylème (ou bois), qui assure le transport de la sève minérale ou sève brute (solution aqueuse très diluée de sels minéraux puisés dans le sol). Les éléments caractéristiques du xylème sont, selon les cas, les trachéides ou les vaisseaux ligneux.

- le phloème (ou libère) qui assure le transport de la sève élaborée depuis les feuilles vers le reste de la plante. Le phloème des plantes à fleurs est composé de cellules à parois transversales percées de pores appelées cellules criblées.

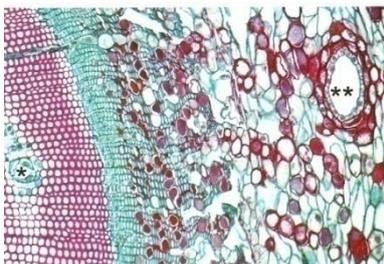
I.1.2. Tissus sécréteurs

Les tissus sécréteurs se produisent chez la plupart des plantes vasculaires. Ils sont très variés, et inégalement répartis entre les familles végétales. Les cellules sécrétrices ne forment pas un tissu au sens strict du mot. Elles n'ont pratiquement jamais d'origine commune et il n'y a pas entre elles de continuité morphologique. Seule la fonction identique de ses éléments permet de définir un tissu sécréteur [Ghestem *et al.*, 2001].

On distingue les catégories suivantes :

- les cellules épidermiques ;
- les poils sécréteurs ;
- les cellules sécrétrices internes
- les canaux sécréteurs ;
- les laticifères

Dans la très grande majorité des cas, les substances résineuses, en tant que produits physiologiques, prennent naissance et s'amassent dans des organes sécréteurs internes, désignés, suivant leurs caractères et leurs dimensions, sous le nom de poches sécrétrices ou de canaux sécréteurs [Cordemoy, 1911]. Par exemple, certaines gymnospermes, parmi lesquelles les pins, produisent des exsudats résineux qui recouvrent les blessures, protégeant les arbres contre les détériorations et les maladies. La figure 1.1 montre les canaux résinifères dans lesquels circulent les exsudats résineux.



La résine circule dans les canaux résinifères présents dans le xylème (*), le phloème et le périoderme (**)

Figure 1. 1. Canaux résinifères chez les pins [Nabors, 2009]

I.2. Phénomènes d'exsudation chez les arbres

I.2.1. Origine

Le phénomène d'exsudation est très fréquent à la fois dans l'espace, dans le temps et à travers le monde végétal [Santiago-blay & Lambert, 2007]. Cependant ce phénomène est toujours

difficile à expliquer de façon certaine ; il est par conséquent mal connu. Les exsudats peuvent avoir une double origine. Le plus souvent ils prennent naissance, dans les conditions normales de la végétation, comme de véritables produits de sécrétion localisés dans certains tissus ou accumulés, en quantité relativement faible, dans des organes spéciaux, différenciés au double point de vue anatomique et physiologique [Cordemoy, 1911]. Par exemple les travaux réalisés par Vassal (1972) ont montré la présence des exsudats gommeux dans le cytoplasme, ce qui laisse croire qu'il s'agit bien des produits d'excrétion d'origine naturelle. Ces substances exsudées se forment également par destruction d'éléments histologiques et s'écoulent, quelquefois en abondance, au niveau des blessures ou plaies accidentelles, ou encore par des incisions ou «saignées» faites au niveau du tronc, de la tige ou de la racine, de la plante [Cordemoy, 1911].

I.2.2. Rôles

Le rôle physiologique joué par les exsudats des plantes au sein de la plante n'est pas encore bien défini. Selon Santiago-blay & Lambert (2007), l'exsudation est un mécanisme naturel dont se servent les plantes pour cicatriser leurs blessures. De plus, certains auteurs le considèrent comme une protection en réponse des lésions mécaniques ou d'invasion microbienne [Marques & Xavier-Filho, 1991].

L'implication de certains exsudats, notamment ceux du type latex dans les interactions plantes-insectes et dans la défense contre les agents microbiens ainsi que des insectes herbivores ont été rapportées [Lewinsohn 1991 ; Ramos et al., 2010 ; Komno, 2011]. Par exemple, les protéines trouvées dans le latex de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. ont fait preuve d'effets néfastes très importants sur la croissance et le développement de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) [Ramos et al., 2010].

La figure 1.2 ci-après illustre les différents rôles que peuvent avoir un exsudat résineux au sein d'un arbre. La résine exsudée par les arbres sert à combler d'éventuelles fissures dans le bois (a), ou entre l'arbre et l'écorce (b). Elle crée des poches à l'intérieur du tronc (c) ou de l'écorce (d). La résine sert aussi de pansement pour le bois (e), et elle a la particularité de s'épancher sur le tronc (f) ou de s'étaler en couche autour du tronc (g). La résine qui goutte forme des «glaçons» (h), des renflements (i) ou encore des «stalactites» (j).

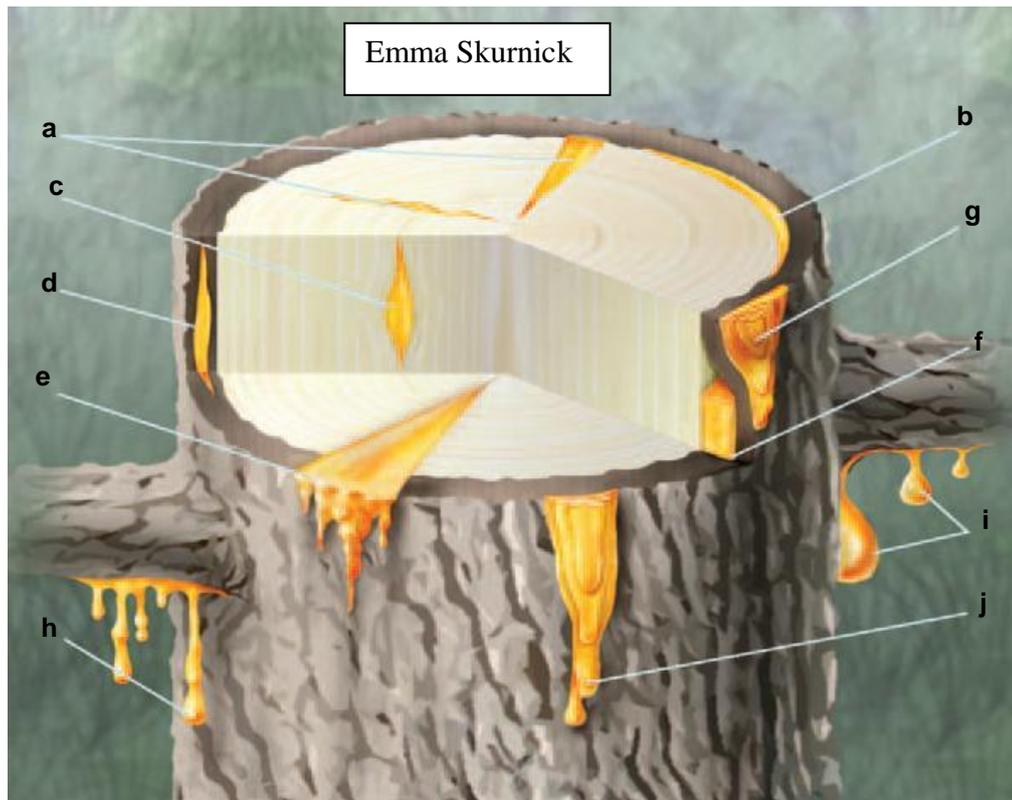


Figure 1. 2. Illustration des différents rôles des exsudats chez un arbre [Santiago-blay & Lambert, 2007]

I.3. Les différents types d'exsudats des plantes

Le monde merveilleux et fascinant des plantes n'a pas encore fini de nous livrer ses secrets. Les exsudats de plantes eux aussi ne nous ont pas encore tout dit. Ces substances complexes dont l'origine exacte reste encore un mystère peuvent être subdivisées en 4 groupes.

A savoir :

- les latex,
- les gommes,
- les exsudats résineux,
- les exsudats résineux obtenus sous forme de mélange (gommes-résines).

I.3.1. Latex

Les latex sont des substances à aspect le plus souvent laiteux, sécrétées par les cellules spécialisées appelées cellules laticifères (vraies ou anastomosées). Ils ont la particularité de se solidifier au contact de l'air. Plus de 20.000 espèces de plus de 40 familles des angiospermes exsudent un latex [Lewinsohn, 1991]. Les latex sont des émulsions complexes de composition variable suivant les espèces. Ils contiennent une variété de produits chimiques et de protéines. Les plus rencontrés sont : les terpénoïdes, les alcaloïdes, les isoprénoïdes et les polyisoprènes

(caoutchouc), les cardénolides et des enzymes telles que les protéases, les chitinases et les glucosidases [Konno, 2011].

Les latex sont généralement blancs mais peuvent être jaunes, oranges ou rouges. Certaines familles végétales comme celle des Euphorbiaceae sont caractérisées par la présence d'un latex blanc.

I.3.2. Gomme

Selon Bruneton (2002), les gommes sont des produits qui s'écoulent à l'extérieur du végétal après un traumatisme et sont constitués de molécules complexes (majoritairement des macromolécules osidiques), toujours hétérogènes et ramifiées, contenant des acides uroniques. Les gommes sont produites par les arbres et arbustes appartenant à un certain nombre de familles, mais surtout des Anacardiaceae, Combretaceae, Léguminosae, Rosaceae, Rutaceae, et Sterculiaceae [Greenish, 1933]. En 1911, Cordemoy écrivait que c'est sur le continent africain que se récolte la majeure partie des gommes du commerce. De nos jours, les gommes les plus connues sont :

- la gomme arabique (figure 1.3) produite à partir des espèces de plantes du genre *Acacia* africains dont le plus important, en tant que valeur économique, est certainement *Acacia senegal* Willd ;
- la gomme adragante, encore appelée tragacathe ou gomme de dragon, qui résulte d'une gommose progressant vers l'intérieur du tronc d'arbres du genre *Astragalus* ;
- la gomme ghatti ou indienne provenant de *Anogeissus latifolia* Wallich ;
- la gomme karaya récoltée en Inde est un exsudat d'arbre de la famille des Sterculiaceae, principalement de *Sterculia ureus* Roxburgh ;



Figure 1. 3. Nodule de gomme arabique [Poda et al., 2009]

I.3.3. Exsudats résineux

Les substances résineuses, comme les gommes, sont produites par un nombre considérable d'espèces végétales, appartenant aussi bien à la flore des climats chauds qu'à celle des pays tempérés [Cordemoy, 1911]. Bien que la littérature sur les exsudats résineux, soit relativement

abondante, l'utilisation exacte du terme résine est très confuse, ce qui reflète la complexité du monde des résines [Langenheim, 2003]. Le terme résine n'a pas de signification bien précise; il s'applique soit à de véritables oléorésines (résine d'écicéa, de sapin), soit à des oléorésines durcies par la suite de transformations chimiques ou de l'évaporation de constituants liquides. Selon la norme NFT75-006, une résine est le résidu de la distillation d'une oléorésine naturelle [Bruneton, 2002]. Dans ce chapitre nous utiliserons le terme exsudats résineux pour désigner aussi bien les résines que des oléorésines des plantes. Les exsudats résineux sont des mélanges liposolubles de composés terpénoïdes volatils et non volatils et/ou de composés phénoliques, qui sont sécrétés dans les structures spécialisées localisées soit à l'intérieur ou soit à la surface des organes de la plante [Colombini & Modugno, 2009]. Les exsudats résineux sécrétés par les plantes peuvent être classés en deux sous-groupes : les exsudats résineux terpéniques et phénoliques.

I.3.3.1. Exsudats résineux terpéniques

Ces exsudats peuvent être soit fluides ou durs. Leur aspect physique dépend de la forte ou faible proportion de terpènes volatils. Ces exsudats sont particulièrement abondants chez les conifères et dans certaines familles de Dicotylédones, notamment les Anacardiaceae (térébenthine de Chio et mastic des *Pistachia*) mais aussi des Burseraceae (élémi de Manille, qui est un exsudat résineux terpénique fourni par un arbre des Philippines, *Canarium luzonicum* Miq. A. Gra) ; et des Dipterocarpaceae (produits du gurjun, qui sont obtenus à partir des sécrétions de divers *Dipterocarpus* du sud-est asiatique). D'autres par contre proviennent des Cesalpiniaceae (le copahu des *Copaifera* spp. provenant de l'Amérique du Sud) [Bruneton, 2002].

I.3.3.1.1. Exsudats de conifères

Les conifères sont les seuls gymnospermes qui produisent des oléorésines et comptent environ 800 espèces réparties en 8 familles. Les plus connues pour leurs oléorésines sont celles de la famille des Pinaceae (8 genres), des Cupressaceae (16 genres) et Araucariaceae (2 genres).

a) Conifères à térébenthines

Les conifères de la tribu des Abietineae fournissent les oléorésines communément désignées sous le nom de « térébenthines » [Cordemoy, 1911]. Ces substances proviennent des arbres du genre *Pinus*, térébenthine de Landes ou de Bordeaux (*Pinus Pinaster* Solander ; syn. *P. maritima* Lam.), du genre *Abies*, térébenthine de Canada connu sous le nom impropre de « baume de Canada » (*Abies balsamea* Mill.), et du genre *Larix*, térébenthine de Venise ou la térébenthine du Mélèze (*Larix decidua* Mill.).

b) Conifères à sandaraques

La sandaraque ou sandarac est un exsudat résineux terpénique extrait des arbres de la famille des Cupressaceae et appartenant au genre *Callitris*. Deux espèces de *Callitris* donnent les deux seules variétés connues de sandaraque. L'une pousse au Nord de l'Afrique *Tetraclinis reticulata* (Vahl) Mast. (*Callitris quadrivalvis* Vent. ou *Thuya articulata* Desf.), appelée vulgairement thuya de Barbarie. L'autre provient d'Australie *Callitris verrucosa* Robert Brown (*Frenela robusta*, var. *verrucosa* A. Cunn) [Cordemoy, 1911].

c) Conifères à Damars (faux copals)

Les damars sont obtenus à partir de diverses espèces d'arbres du genre *Agathis* (Araucariaceae). Bien que ces exsudats soient généralement appelés copals, ceux de certaines espèces ont été appelés par damar [Langenheim, 2003]. L'une d'entre elles, *Agathis australis* (D. Don) Steud. (syn. *Dammara australis* Lamb.), se rencontre en Nouvelle-Zélande. Les Maoris le nomment kauri ou kaori, et c'est le célèbre producteur du copal kauri. Cet exsudat se fossilise et se trouve encore en abondance, accumulé dans le sol. Dans ces dépôts fossiles, il forme des masses résineuses, très dures dont la coloration varie de la nuance ambrée au jaune foncé [Cordemoy, 1911]. L'autre espèce très réputée pour son exsudat, appelée copal de Manille est *Agathis dammara* (Lamb.) Rich. (syn. *Dammara alba* Rumph.).

I.3.3.1.2. Elémis

En général, les élémis sont des exsudats résineux obtenus à partir des arbres de la famille des Burseraceae, particulièrement du genre *Canarium*, *Dacryodes*, *Protium*, et *Bursera* [Langenheim, 2003].

a) Elémis du genre *Canarium*

Le genre *Canarium* regroupe une centaine d'espèces d'arbres de la famille des Burseraceae originaires des régions tropicales d'Afrique et d'Asie. Malgré la variété des usages donnés aux exsudats résineux des Burseraceae, seulement un certain nombre d'espèces a été étudié de façon systématique [Cruz-Canizares et al., 2005]. Les élémis connus sous le nom d'élémi de Manille ont été longuement rapportés dans la littérature [Cordemoy, 1911 ; Langenheim, 2003 ; Cruz-Canizares et al., 2005 ; Colombini & Modugno, 2009]. Le plus connu d'élémi de Manille provient d'espèces des îles Philippines, particulièrement de *Canarium luzonicum* (Blume) A.Gray.

b) Elémis du genre *Dacryodes*

Le genre *Dacryodes* regroupe environ 70 espèces distribuées dans les forêts tropicales humides de l'Asie du Sud, de l'Afrique et d'Amérique tropicale. Le bassin du Congo en Afrique centrale et la forêt atlantique de la Guinée en Afrique de l'Ouest sont les principaux domaines de distribution du genre *Dacryodes* [Onana, 2008]. Les substances exsudées par ces plantes ont été très peu étudiées.

c) Elémis du genre *Protium*

Le genre *Protium* compte environ 150 espèces réparties en Amérique du Sud, en Afrique et dans la région tropicale indo-asiatique. Les plantes appartenant à ce genre sont très connues pour leur capacité à produire des oléorésines. Depuis fort longtemps, en Amérique intertropicale, ces oléorésines ont été connues sous le nom de «Tacamaques». L'espèce *Protium heptaphyllum* (Aubl.) des Antilles françaises donne une substance résineuse de couleur blanche, appelée encens blanc ou élémi du Brésil [Cordemoy, 1911].

d) Elémis du genre *Bursera*

Le genre *Bursera* regroupe environ une centaine d'espèces d'arbustes et d'arbres. Ces espèces sont originaires des régions tropicales d'Amérique, du sud-ouest des Etats-Unis au Pérou [Langenheim, 2003]. Ces plantes sont très résineuses et libèrent une odeur caractéristique de pin-citronnée quand une feuille ou une branche est cassée.

I.3.3.1.3. Mastics

Les mastics sont des exsudats résineux obtenus par incision de l'écorce des tiges et des branches des plantes de la famille des Anacardiaceae. Les Mastics les plus étudiés sont ceux d'espèces appartenant au genre *Pistacia*. Le lentisque ou *Pistacia lentiscus* L. a été la principale source de mastic depuis le Moyen Age [Cordemoy, 1911]. Quatre autres espèces sont aussi connues : *P. atlantica* Desf., *P. khinjuk* Stocks, *P. Vera* L. et *P. terebinthus* L.

I.3.3.1.4. Copals

Le mot copal est sujet d'une très grande controverse dans la littérature. C'est un terme issu du *nahuatl* (langue parlée dans plusieurs pays d'Amérique du Nord et d'Amérique centrale par les Nahuas) *copalli* par les Espagnols [Langenheim, 2003]. Ce terme a été employé pour désigner divers types de résines aussi bien les exsudats de la famille des Burseraceae, notamment ceux du genre : *Protium* et *Bursera* [Case et al., 2003 ; Langenheim, 2003]. Cependant, nous considérerons comme vrais copals, ceux produits par des espèces ligneuses, africaines ou américaines, de la famille des Légumineuses [Léonard, 1950]. Cette idée est reprise par Salgues (1956) qui propose une définition la plus simple semble-t-il, s'appliquant

aux authentiques copals d'Afrique et d'Amérique. Ces copals africains comme ceux d'Amérique sont produits par la sous-famille des Caesalpinioideae à appareil sécréteur appartenant à la Tribu des Detarieae. Il apparaît nécessaire, pour l'étude, d'en faire deux grands groupes : les copals d'Afrique et ceux d'Amérique.

a) Les copals d'Afrique

L'origine botanique de certains copals africains reste à nos jours, encore douteuse. Cordemoy écrivait dans son livre intitulé « plante à gomme et à résine » ceci: *Cette histoire des copaliers et des copals d'Afrique de l'ouest est complexe, et offre encore bien des points obscurs, du moins en ce qui concerne les espèces végétales productrices*. Cette difficulté vient du fait que la plupart des copals sont recueillis après être détachés naturellement de l'arbre. De même Léonard (1950) rapporte que « En effet, on s'est fréquemment basé sur les dires des indigènes pour rattacher des échantillons de copal à des espèces botaniques données sans toujours prendre le soin de contrôler la récolte simultanée de copal frais et d'échantillons d'herbier du producteur ». Cette difficulté a été aussi rapportée par Salgues (1965) « *Le jour où la demande du produit exigerait l'exploitation systématique de copaliers vivants, ce serait tout le problème de la composition chimique qui serait à reprendre, avec fixation de normes nouvelles* ». Parmi les travaux considérés comme dignes de foi sur ce sujet, [Léonard \(1950\)](#), écrit « *une mention spéciale revient aux études d'Aubréville sur les copaliers de l'Afrique occidentales françaises (1933) et surtout sur les copaliers d'Afrique équatoriale française (1948)* ». Les recherches bibliographiques entreprises nous ont amenés à recenser, en Afrique 12 genres producteurs de copals vrais. Les plus importants sont : *Colophospermum*, *Copaifera*, *Daniellia*, *Gossweilerodendron*, *Guibourtia*, *Hymenaea* (syn. *Trachylobium*), *Oxystigma* et *Tessmannia*. Si plusieurs espèces africaines appartenant au genre *Copaifera* produisent des copals, ceux d'espèces américaines fournissent, spontanément ou par saignée, une oléorésine connue sous le nom de baume de copahu qui, pendant les siècles, eut une réputation mondiale dans les traitements de la gonorrhée [[Léonard, 1950](#)]. En Afrique centrale quatre (04) espèces de *Copaifera* sont bien connues. Il s'agit de : *C. baumiana* Harms., *C. mildbraedii* Harms., *C. religiosa* J. Leonard et *C. salikounda* Heckel.

La République du Congo et la République Démocratique du Congo (ex-Zaire ou Congo belge) ont très longtemps produit des copals dont l'origine botanique est presque entièrement inconnue. Ces copals sont connus sous le nom de copal du Congo. Ils se présentent sous des formes irrégulières et de dimensions variables. Ils sont transparents ou opaques et de couleurs blanc cristal à jaune ou parfois rougeâtre ou même noir. Une grande partie de ces copals est

exclusivement fossile et leur récolte à lieu presque uniquement dans les forêts marécageuses ou périodiquement inondées de la cuvette congolaise. Selon les études de [Léonard \(1950\)](#) sur les copaliers du Congo-Belge, il est inconcevable d'attribuer, l'origine des copals Congo particulièrement à *Guibourtia demeusei* (Harms) J. Léonard.

En Afrique orientale et à Madagascar, le copalier par excellence, dans toute cette région est, *Hymenaea verrucosa* Gaertn (syn.*Trachylobium verrucosum* (Gaertn.) Oliv.) [[Cordemoy, 1911](#)]. C'est un grand arbre tropical originaire d'Afrique Orientale et de Madagascar et répandu comme arbre d'ornement jusqu'en Afrique occidentale [[Hugel et al., 1965](#)]. L'écorce, les racines, et les fruits de l'espèce secrètent une résine qui fournit un copal dur fossile. Ce copal est connu sous le nom de copal de Zanzibar ou copal de Mozambique [[Salgues, 1956](#)]. Cet exsudat résineux fossile constitue aujourd'hui des gisements en des territoires où les arbres producteurs ont entièrement disparu.

b) Les copals d'Amérique

Ils proviennent des Légumineuses du genre *Hymenaea* et sont distribués dans les îles Caraïbes, du Mexique au Brésil. Ces exsudats sont de couleur jaune pâle ou presque blanche souvent opaque (parfois translucide). Ils sont communément connus sous le nom brésilien « jutaisica » (ou jutahyica), signifiant arbre de fruits durs). Ils sont également connus par ailleurs sous le nom de Copal du Brésil ou encore de résine Jatobá [[Doménech-Carbó et al., 2009](#)]. Diverses espèces sont la source de copals commercialisés (*H. courbaril*, *H. oblongifolia* Huber, et *H. parvifolia* Huber). Toutefois une grande partie de ces copals a été attribuée à l'espèce la plus connue et la plus répandue (*Hymenaea courbaril* L.). Une espèce voisine, *Hymenaea stilbocarpa* Hayne, qui se rencontre plus particulièrement au Brésil, où son nom vulgaire est jatoba, paraît donner un exsudat peu différent de celui de *H. Courbaril* L. [[Cordemoy, 1911](#)].

I.3.3.1.5. Ambres

Les ambres sont des exsudats résineux fossiles produits par des gymnospermes et les angiospermes [[Rivallain et al., 1995](#)]. Les ambres contiennent parfois des fossiles de plantes, d'insectes (voir figure 1.4) et même de vertébrés terrestres vieux de centaines de millions d'années. Ces inclusions furent piégées dans l'exsudat résineux de très anciens arbres, qui est ensuite devenu de l'ambre [[Santiago-Blay & Lambert, 2007](#)]. Il existe beaucoup d'espèces et de variétés d'ambre. Les ambres les plus connus sont l'ambre de la Baltique, l'ambre dominicain ainsi que l'ambre sicilien [[Teodor et al., 2009](#)].



Figure 1. 4. Un insecte piégé dans de l'ambre [Nabors, 2009]

I.3.3.2. Exsudats résineux phénoliques

Il s'agit ici essentiellement des exsudats balsamiques encore appelés baumes. Ils sont caractérisés par la présence de molécules ayant un noyau benzénique. Ce noyau benzénique porte le plus souvent un groupe hydroxyle libre ou engagé dans une fonction ester, éther ou hétéroside. Les différents baumes connus sont :

- le baume du Pérou dont l'espèce productrice est un arbre d'Amérique centrale (*Myroxylon balsamum* (L.) Harms) ;
- le benjoin du Laos, également dénommé benjoin de Siam, est la résine balsamique obtenue par incision du tronc de *Styrax tonkinensis* (Pierre) ;
- le benjoin de sumatra, quant à lui est obtenu à partir de *Styrax benjoin* Dryander croissant en Indonésie ;
- les storax obtenus à partir des arbres du genre *Liquidambar* dont trois espèces sont très réputées (*L. orientalis*, *L. styraciflua*, et *L. formosana*).

I.3.4. Exsudats résineux obtenus sous forme de mélange

Ce sont essentiellement des exsudats gommeux et résineux (terpénique et/ou phénolique). Dans ce groupe on trouve :

a) Encens ou oliban

Il s'agit d'une sécrétion recueillie après incision de l'écorce de tronc de plusieurs espèces d'arbres appartenant au genre *Boswellia* de la famille de Burseraceae. Ce genre comprend environ 43 espèces différentes signalées en Inde, dans la péninsule arabe et en Afrique du Nord.

b) Opopanax (myrrhe bisabol)

Ces exsudats sont voisins de l'encens, et sont fournis par un arbuste somalien (*Boswellia erythraea* Engl. Var *glabrescens* Engl.) [Bruneton, 2002].

c) Myrrhe

Les espèces productrices sont des plantes appartenant au genre *Commiphora* (*Commiphora myrrha* (Nees) Engl., *Commiphora schimperi* (O. Berg.) Engl.).

d) Galbanum

Cette sécrétion est recueillie après incision de la partie supérieure des racines (au niveau du sol) d'une espèce iranienne du genre *Ferula*, *F. gummosa* Boiss [Bruneton, 2002].

I.4. Composition chimique et métabolites des exsudats des plantes

I.4.1. Structures et classes de quelques composés isolés dans les latex

De nombreux métabolites ont été identifiés dans les latex de différentes plantes. La crotogossamide (figure 1.5) un peptide cyclique de masse 817 g/mol dont la formule brute est $C_{37}H_{56}N_{10}O_{11}$ a été isolée du latex de *Croton gossypifolius* Müll. Arg. Il est constitué de 9 acides aminés (Gly, Ala, Ser, Gly, Leu, Asn, Gly, Ile, Phe). Deux nouveaux heptapeptides cycliques, integerrimides A et B (figure 1.5) ont été isolés à partir du latex de *Jatropha integerrima* Jacq., [Mongkolvisut et al., 2006 ; Quintyne-Walcott et al., 2007].

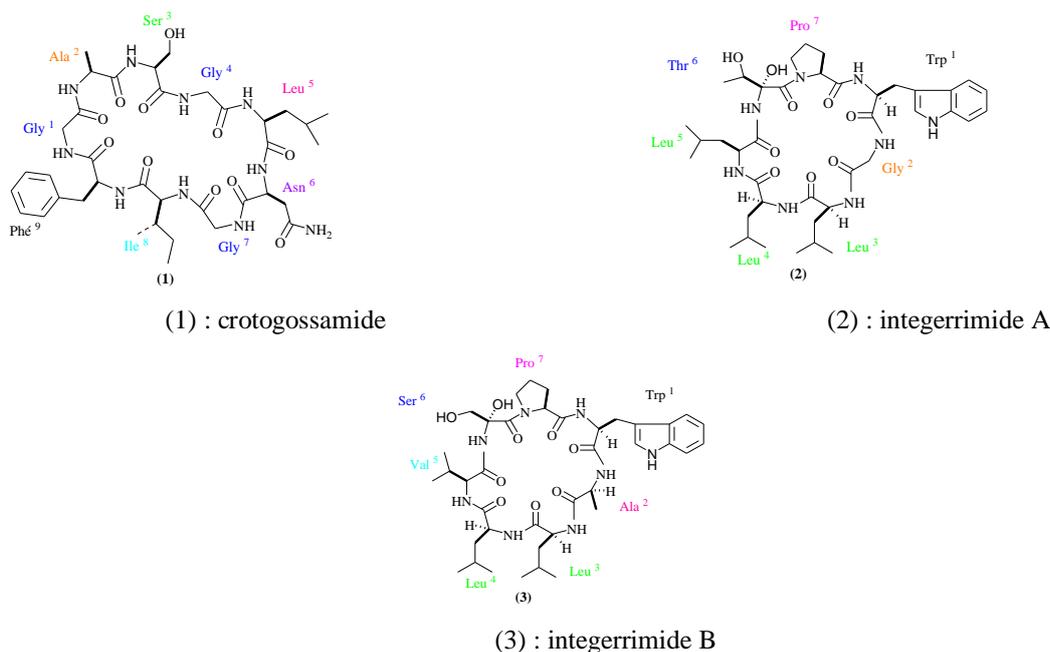
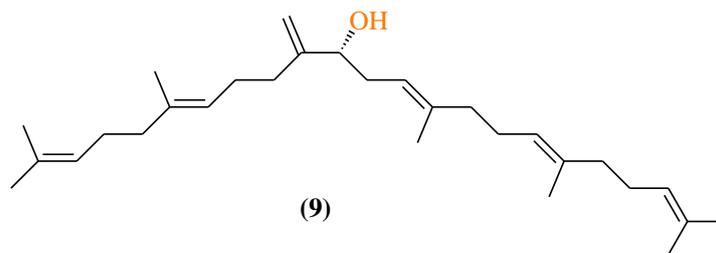


Figure 1. 5. Structure des peptides isolés du latex de *Croton gossypifolius* Müll. Arg. et de *Jatropha integerrima* Jacq.

Une étude chimique effectuée à partir du latex jaune visqueux de *Garcinia cowa* Roxb a révélé la présence de cinq xanthones nommés cowagarcinone A-E (figure 1.6) [Mahabusarakam, 2005]. D'autres études chimiques, notamment celles effectuées sur le latex



(9) : Peplusol

Figure 1. 7. Structure d'un alcool triterpénique isolé du latex d'*Euphorbia peplus* L.

I.4.2. Composition chimique et classification des exsudats gommeux

Du point de vue chimique, les exsudats gommeux sont des polysaccharides hétérogènes et ramifiés, comprenant des groupements acides (uroniques) et parfois des groupements méthoxyles ou acétyles. Soumises à une action hydrolysante énergique et prolongée, toutes ces matières sont capables de fournir un sucre en C-5 ou en C-6 qui constitue le noyau fondamental de leurs molécules élémentaires [Serier, 1986]. La composition des exsudats gommeux est caractéristique d'une espèce, mais elle fluctue légèrement en fonction de l'origine géographique et des facteurs environnementaux. Leur masse moléculaire varie de 2×10^4 à 10^6 .

D'après Bruneton (2002), l'analyse de la structure et de la répartition des gommages dans le règne végétal a conduit certains auteurs à les classer en quatre groupes :

- le groupe A, auquel appartiennent les gommages d'Acacia, est fondé sur une ossature de type galactane substituée par les unités de L-arabinose et par les oligosides ramifiés contenant un autre sucre (L-rhamnose, D-xylose) et de l'acide D-glucuronique. Le polysaccharide est fréquemment associé à une protéine ;
- le groupe B, comprend des gommages proches des pectines : chaînes d'acides D-galacturoniques liés (1 \longrightarrow 2) substituées par des courtes chaînes comprenant du L-arabinose et des acides D-glucuroniques et D-galacturoniques. La chaîne principale peut être interrompue par du L-rhamnose, parfois un sucre sur deux, c'est le cas de la gomme de *sterculia*. Dans quelques cas rares, les deux types de molécules (type A et type B) coexistent ;
- le groupe C, peu fréquent, est constitué de xylanes liés 1 \longrightarrow 4- β et fortement substitué par des sucres très divers (L-arabinose, L-galactose, etc) ;
- le groupe D, dans lequel, la chaîne centrale résulte de l'alternance (1 \longrightarrow 4-1 \longrightarrow 2) d'acide D-glucuronique et de D-mannose. Les hydroxyles en C-3

de la plupart des mannoses sont substitués par des séquences analogues à celles du groupe A. La gomme ghatti est un exemple de ce type de structure.

I.4.3. Composition chimique et métabolites des exsudats résineux

I.4.3.1. Origine et voie de synthèse des composés d'exsudats résineux

Les composés des exsudats résineux prennent leur origine grâce à la photosynthèse. Le processus d'utilisation de l'énergie lumineuse pour convertir le CO₂ et l'H₂O en sucres se compose de deux séries de réactions : les réactions lumineuses et le cycle de Calvin. Le cycle de Calvin utilise l'ATP et le NADPH produits par les réactions lumineuses et le CO₂ de l'air pour produire de molécules sucres-phosphates à trois atomes de carbones qui deviennent les éléments de construction de molécules plus complexes [Nabors, 2009]. Les composés terpénoïdes et phénoliques des exsudats résineux sont ensuite synthétisés via différentes voies métaboliques (figure 1.8).

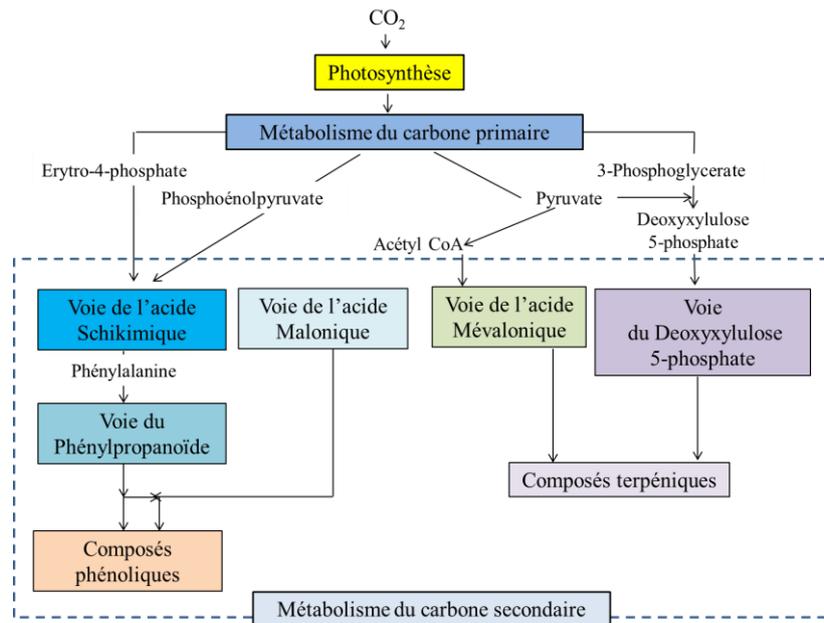


Figure 1. 8. Les différentes voies de biosynthèse de composés terpéniques et phénoliques présents dans les exsudats résineux de végétaux

I.4.3.2. Composition chimique des exsudats résineux terpéniques

I.4.3.2.1. Composition chimique des exsudats résineux de conifères

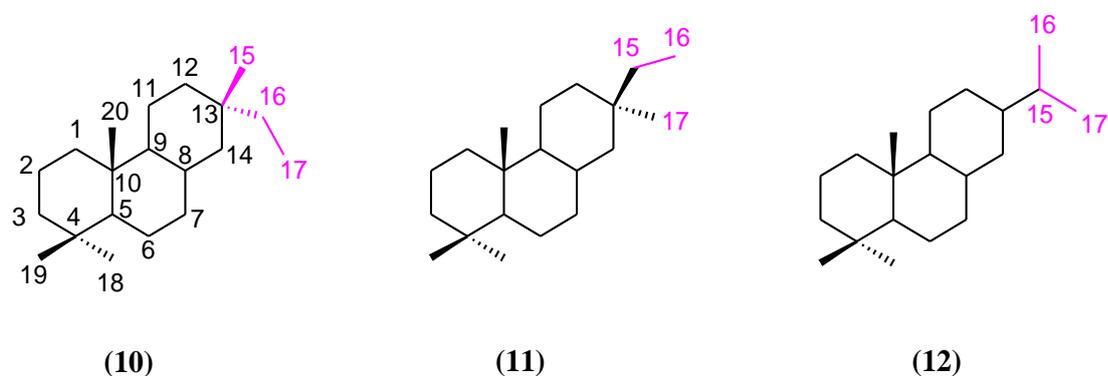
a) Conifères à térébenthines

La fraction volatile (20-50%) constitue l'essence de térébenthine. Elle est prédominante en monoterpène (C₁₀), mais toutefois on retrouve aussi quelques sesquiterpène (C₁₅).

L'étude de l'huile essentielle de l'oléorésine de *Pinus oocarpa* Schiede par exemple, a montré que l' α -pinène, le β -pinène et l'heptane sont les constituants majeurs [Velasquez et al., 2000]. Les résultats rapportés par Cannac et al. (2009) ont permis d'identifier trente-trois composés dans la fraction volatile de l'oléorésine de *Pinus nigra* subsp. Laricio. Le principal constituant des fractions volatiles est l' α -pinène (66,9-75,6%). Les autres composés majeurs sont le limonène (4,4-14,2%), le β -pinène (4,1-5,1%), le myrcène (3,6-4,3%) et le camphène (2,6-3,2%).

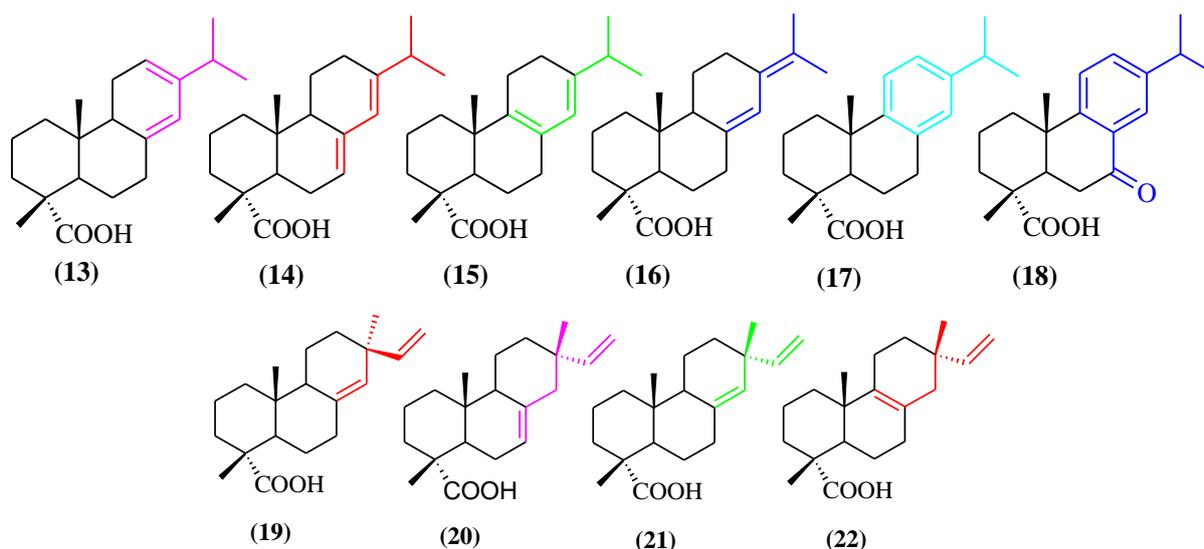
L'analyse de la térébenthine de Venise par Hs-SPME a montré la présence de nombreux monoterpènes dont les plus abondants sont l' α -pinène et le β -pinène. Les sesquiterpènes tels que : le longifolène et le β -caryophyllène et quelques diterpènes (sandaracopimaradiène et l'épimanool) ont été également trouvés [Vo Duy, 2007].

La fraction peu volatile est une résine appelée la colophane, riche en acides diterpéniques (C_{20}) tricyclique de la famille des isopimaranes, des pimaranes et des abiétanes (figure 1.9). Il s'agit essentiellement des acides tels que l'acide abiétique, déhydroabiétique, isopimarique, $\Delta 8$ -isopimarique, lévopimarique, néoabiétique, 7-oxodéhydroabiétique, palustrique, pimarique, et les acides sandaracopimarique (figure 1.10) [Regert, 1996 ; Cartoni et al., 2004]. Ces acides diterpéniques cycliques proviennent d'un précurseur commun, le géranylgeranyl pyrophosphate (GGPP). Toutefois, on peut noter que la térébenthine de Venise présente un trait distinctif par rapport aux autres colophanes. Cette distinction vient du fait qu'on retrouve une importante quantité des composés diterpéniques bicycliques de type labdane (comme épimanool, larixol et l'acétate de larixyle). Les deux derniers ne sont pas trouvés dans les autres résines diterpéniques et agissent comme des marqueurs d'analyse de cette substance [Romero-Noguera et al., 2008].



(10) : isopimaranes ; (11) : pimaranes ; (12) : abiétanes

Figure 1. 9. Structure de base de trois de diterpènes présents dans les exsudats de Conifère



(13) : acide levopimarique ; (14) : acide abiétique ; (15) : acide palustrique ; (16) : acide néoabiétique ; (17) acide déhydroabiétique ; (18) : acide 7-oxodéhydroabiétique ; (19) : acide pimarique ; (20) : acide isopimarique ; (21) : acide sandaracopimarique ; (22) acide Δ 8-isopimarique

Figure 1. 10. Structures des acides diterpéniques des exsudats résineux de la famille de Pinaceae

b) Conifères à sandaraques

Le principal monomère diterpénoïde est l'acide sandaracopimarique (21), accompagné de petites quantités de l'acide 12-acetoxysandaracopimarique. Les phénols, y compris le totarol, ont été également retrouvés. La fraction polymérique représentant environ 70% est constituée d'unité d'acide communiqué (25) [Colombini & Modugno, 2009].

Les travaux réalisés par [Cartoni \(2004\)](#) dans le cadre de la caractérisation des résines terpéniques naturelles employées dans les œuvres d'art en CPG-SM l'ont emmené à analyser la sandaraque. Il a trouvé que la fraction soluble dans le chlorure de méthylène était caractérisée par des quantités élevées de composés de type labdane notamment l'épi-torlusol, l'épitorreferol, l'acide daniellique, l'acide agathique et l'acide agatholique. Le constituant le plus abondant retrouvé était l'acide sandaracopimarique.

c) Conifères à Damar (faux copals)

Les exsudats résineux d'*Agathis* contiennent des diterpènes de type labdadiénique. Par exemple, le sandaracopimaradiénol, l'acide sandaracopimarique, agathique, agatholique, nor-19-anticopalique, nor-18-anticopalique, et acétoxyagatholique ont été isolés à partir d'exsudat de *Agathis lanceolata* Lindley ex Marburg provenant de Nouvelle-Calédonie [Manh et al., 1983].

L'autre espèce très réputée pour son exsudat, appelée copal de Manille est *Agathis dammara* (Lamb.) Rich. (syn. *Dammara alba* Rumph.). La présence des acides sandaracopimarique et

agathique ainsi que de patchoulane ont été signalée dans le copal de Manille. [Cartoni et al., 2004]. En utilisant la méthode de pyrolyse, suivie d'une dérivation en ligne Osete-Cortina (2005) a identifié en plus, de l'acide cis et trans-communiqué, les acides agatholique, methyl agathique, et acetoxyagatholique dans ce copal (figure 1.11).

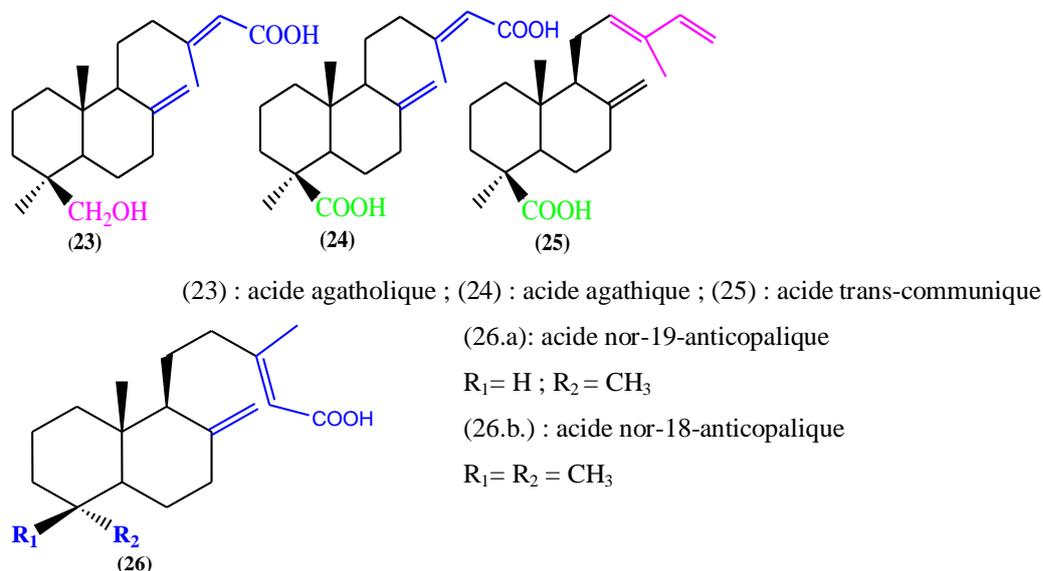


Figure 1. 11. Quelques acides diterpéniques identifiés dans les exsudats des conifères à Damar

I.4.3.2.2. Composition chimique des élémis

Les analyses chimiques effectuées sur ces exsudats ont montré qu'ils sont constitués d'une partie volatile (mono et sesquiterpènes) et d'une fraction résinique (constituée de triterpènes). Les analyses publiées reflètent une grande diversité de composition, variant en fonction de l'origine botanique et géographique.

a) Elémis du genre *Canarium*

Suite à plusieurs travaux sur la composition chimique de ces exsudats, plusieurs chercheurs indiquent que les fractions résiniques et volatiles de ces substances comportent différents constituants (tableau I.1).

Tableau I. 1. Les principaux composés identifiés dans les exsudats de quelques espèces du genre *Canarium*

<i>Fraction volatile</i>	<i>Fraction peu volatile</i>	<i>Espèces</i>	<i>Références</i>
terpinéol		<i>Canarium album</i> (Lour.) Raeusch	[Bandaranayake, 1980]
élemicine	acide canarique		[Cruz-Canizares et al., 2005 ; Bandaranayake, 1980]
élemol	α -amyrine		
γ -eudesmol	β -amyrine		
β -eudesmol	α -amyrénone	<i>Canarium luzonicum</i>	
	β -amyrénone	(Blume) A.Gray	
	oléan-9(11),12-dièn-3-ol		
	ursa-9(11),12-dièn-3-one		
	ursa-9(11),12-dièn-3-ol		
octylacetate (E)-nerolidol		<i>Canarium schweinfurthii</i> Engl	[Koudou et al., 2005]
carvone	α -amyrine		[Bandaranayake, 1980]
élémente	β -amyrine		
β -phellandrène	α -amyrénone		
α -pinène	β -amyrénone		
limonène	3 β -hydroxyurs-12-èn-11-one	<i>Canarium zeylanicum</i>	
	3 β -hydroxyoléan-12-èn-11-one	(Retz.) Blume	
	oléan-12-ène-3,11-dione		
	urs-12-ène-3,11-dione		
	sitostérol		
	taraxérol,		

b) Elémis du genre *Dacryodes*

Du point de vue chimique, très peu d'éléments de ce genre ont fait l'objet d'étude chimique. Parsons et al. (1991) ont étudié l'exsudat résineux de *Dacryodes normandii* Aubrév. & Pellegr du Gabon. Ils ont identifié deux nouveaux triterpénoïdes, l'acide 21-oxo-3,4-seco-oléan-4(23),12-dièn-3-oïque et l'acide 21-oxo-3,4-seco-ursan-4(23),12-dièn-3-oïque. L'huile essentielle obtenue à partir de l'exsudat de *Dacryodes buettneri* H.J. Lam rapportée par Obame et al. (2007), était caractérisée par une forte proportion de terpinène-4-ol (27,3%) avec du p-cymène (19,0%), de l' α -pinène (13,2%), du sabinène (4,4%) et de l'isoascaridol (4,0%). L'huile essentielle de celui de *Dacryodes edulis* G. Don a montré comme principaux constituants le sabinène (21,7%), le terpinène-4-ol (19,8%), l' α -pinène (17,5%) et le p-cymène (11,3%). Malgré le nombre restreint des études sur la chimie des éléments de

Dacryodes, il semble que leurs fractions volatiles soient constituées essentiellement de monoterpènes, avec des concentrations élevées, en p-cymène, terpinèn-4-ol et α -pinène. Les fractions résiniques quant à elles sont constituées essentiellement des triterpènes de type oléanane et ursane.

c) Elémis du genre *Protium*

[Susunaga et al. \(2001\)](#) ont étudié la fraction neutre de l'exsudat résineux de *Protium heptaphyllum* (Aubl.). L' α - et la β -amyrine étaient présents, avec des quantités non négligeables de maniladiol et de 3- β ,16- β -dihydroxy-oléan-12-ène (brein). Les composés mineurs ont été le 3- β ,24-dihydroxy-urs-12-ène, le 3-oxo-20S-hydroxytaraxastane et le 3- β ,20S-dihydroxytaraxastane. De même, [Siani et al. \(2012\)](#) ont également rapporté la présence de β -amyrine, β -amyrénone, α -amyrénone, α -amyrine, de maniladiol, et de brein, dans plusieurs espèces. Par ailleurs, les analyses des huiles essentielles de six espèces de *Protium* ont montré qu'elles étaient riches en monoterpène. Les auteurs ont signalé une prédominance de p-cymène, de l' α et β -phellandrène. Ils ont également constaté une augmentation du taux de l' α -pinène et du p-menthane dans les exsudats frais [[Ramos et al., 2000](#)]. De plus les analyses qualitatives et quantitatives des huiles essentielles des exsudats issues de deux sous-espèces de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) ont été rapportées par [Marques et al. \(2010\)](#). Les principaux composants étaient respectivement pour la sous-espèce *ulei* (PHU) et *heptaphyllum* (PHH), le terpinolène (42,3%) et le p-cymène (39,9%).

d) Elémis du genre *Bursera*

L' α - et la β -amyrine ainsi que le lupéol font partie des triterpènes rapportés par [Peraza-Sánchez et al. \(1995\)](#) dans l'exsudat résineux de *B. simaruba* (L.) Une étude des exsudats résineux de différentes espèces du genre *Bursera* a permis d'identifier leurs constituants sous forme de dérivés TMS. Les composés identifiés sont: le 3-épi- β -amyrine- α -OTMS, le 3-épi- α -amyrine- α -OTMS, le 3-épi lupéol- α -OTMS, le β -amyrénone, l' α -amyrine- β -OTMS, l' α -amyrénone, la β -amyrine- β -OTMS, le lupéol β -OTMS et le lupénone [[Lucero-Gómez et al., 2013](#)]. La figure 1.12 nous donne un aperçu des structures des composés identifiées dans les élémis de différents genres de la famille des Burseraceae.

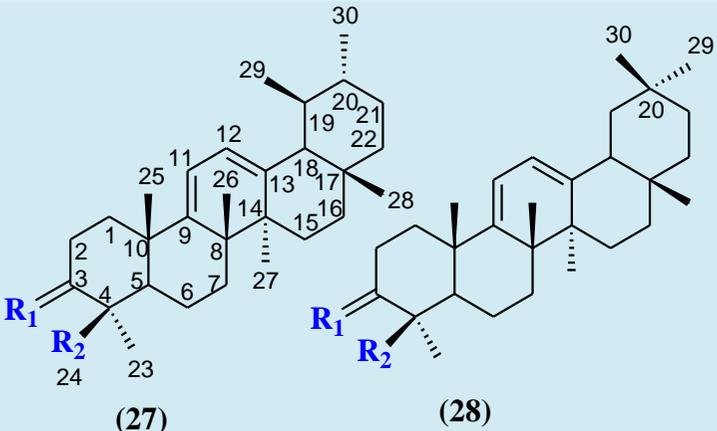
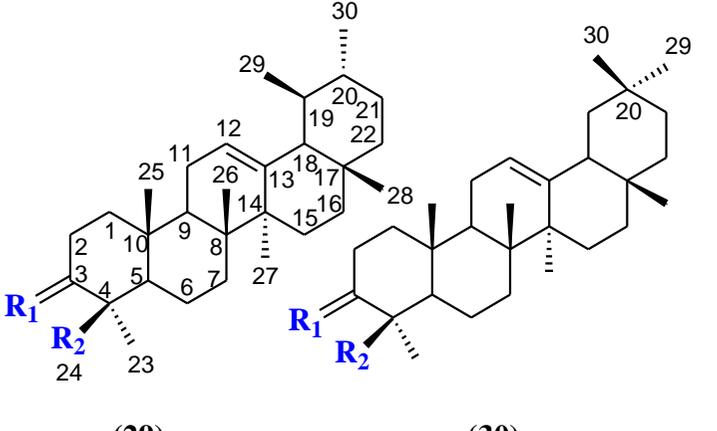
Structure de base	R ₁	R ₂	Nom	Ion caractéristique
 <p>(27) : ursane-9(11)-diène (28) : oléane-9(11), 12-diène</p>	OTMS	CH ₃	(28.a) : ursane-9(11),12-diène-3-ol, TMS	73(100) 147(34) 189(26) 207(22) 255(23) 295(11) 391(21) 496 (73)
	O	CH ₃	(27.a): ursane-9(11),12-diène-3-one	73(55) 133(24) 207(25) 255(38) 269(28) 28(19) 422 (100)
	α-H, β-OTMS	CH ₃	(28.b):oléane-9(11),12-diène-3-ol, TMS	73(49) 147(18) 189(13) 207(10) 255(13) 391(11) 281(12) 496 (100)
 <p>(29) : ursane-12-ène (30) : oléane-12-ène</p>	O	CH ₃	(30.a): oléane-12-ène-3-one (β-amyronone)	55(20) 73(38) 107(22) 147(24) 189(40) 203(100) 218(62) 409(9) 424 (9)
	α-H, β-OTMS	CH ₃	(30.b): 3β-hydroxy-oléane-12-ène-3-ol, β-OTMS éther (β-amyrine, TMS)	73(80) 107(27) 147(35) 189(60) 203(100) 218(70) 408(5) 483(5) 498 (6)
	O	CH ₃	(29.a) : ursane-12-ène-3-one (α-amyronone)	55(31) 73(24) 107(47) 147(46) 189(57) 203(63) 218(100) 409(25) 424 (27)
	α-H, β-OTMS	CH ₃	(29.a) : 3β-hydroxy-ursane-12-ène-3-ol, β-OTMS éther (α-amyrine, TMS)	73(54) 107(23) 147(36) 189(62) 203(43) 218(100) 408(4) 483(2) 498 (9)

Figure 1. 12. Quelques structures chimiques des composés triterpéniques identifiés dans les élémis

Confère l'article de Mathe et al. (2004 ; 2009) [Mathe C., Archier P., Nehme L. and Vieillescazes C. (2009). The study of nabataean organic residues From madâ'in sâlih, ancient Hegra, by gas Chromatography – mass spectrometry. *Archaeometry* 51(4): 626–636.

I.4.3.2.3. Composition chimique des Mastics

Du point de vue composition chimique, la fraction volatile de mastic de *Pistacia lentiscus* L. représente environ 24,0% de ces exsudats. Le constituant le plus abondant est l' α -pinène, accompagné de faible quantité de β -myrcène, de limonène, de camphène, et de β -pinène [Langenheim, 2003]. De même l'analyse de l'huile essentielle obtenue à partir d'exsudat de *P. Vera* L. a montré qu'elle contenait environ 89,7% de monoterpènes, 8,1% de monoterpènes oxygénés et 1,2% de diterpènes.

Tableau I. 2. Composés triterpéniques identifiés dans l'exsudat résineux de *Pistacia lentiscus* var. Chia [Assimopoulou & Papageorgiou, 2005]

<i>Fraction neutre</i>	<i>Fraction acide</i>
β -amyrine	acide oléanonique
3-acétoxy-hydroxy-dammarenone	acide masticadiénolique
tirucallol	acide moronique
diptérocarpol	acide isomasticadiénolique
β -amyrénone	acide 3-O-acétyl-3-épi (iso) masticadiénolique
lupéol	acide 3,4-seco-28-noroléan-12-èn-3-oïque
aldéhyde oléanolique	acide 18- α -H-oléanolique
germanicol	acide 3-épi-(iso) masticadiénolique
norlupeone	acide masticadiénolique
nor- β -amyrénone	acide oléanolique
3-méthoxy-28-noroléan-12-ène	
3-hydroxy-28-noroléan-12-ène	
3-oxo-28-norlup-20(29)-ène	
nor- β -amyrine	
28-noroléan-17-èn-3-one	
(20S)-3 β -acétoxy-20-hydroxydammar-24-ène	
dammaradiénone	
hydroxy-dammarénone	
20,24-époxy-25-hydroxy-dammarèn-3-one	
28-noroléan-18-èn-3-one	

Les composés majeurs identifiés ont été l' α -pinène (75,6%), le β -pinène (9,5%), le trans-verbenol (3,0%), le camphène (1,4%), trans-pinocarveol (environ 1,2%), et le limonène (1,0%) [Alma et al., 2004]. Par contre l'étude de la fraction peu volatile des mastics a montré qu'ils possèdent de nombreux constituants en commun avec les dammars et les élémis [Colombini & Modugno, 2009]. Les principaux dérivés méthyliques des triterpénoïdes de la fraction neutre et de la fraction acide de *Pistacia lentiscus* var. Chia ont été rapportés par Assimopoulou & Papageorgiou (2005) (tableau I.2 et figure 1.13 et).

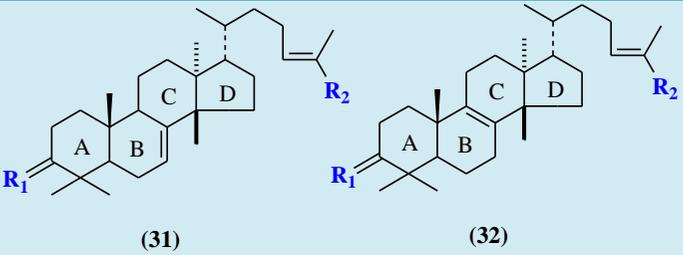
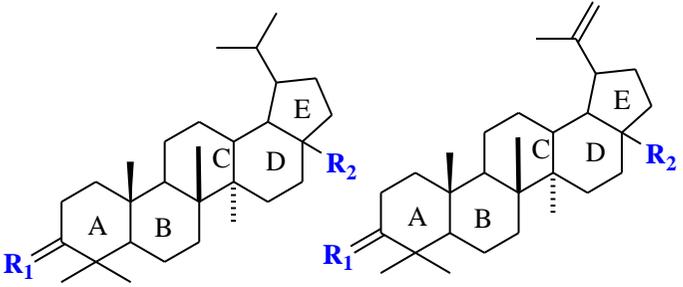
Structure de base	R ₁	R ₂	Nom	Ion caractéristique
 <p>(31) (32)</p>	O	COOCH ₃	(31.a) : méthyl masticadienonate	95,127, 173, 189, 227, 245, 271, 355,393, 421, 453, 468 (M ⁺)
(31) : Δ ⁷ -tirucallene	O	COOCH ₃	(32.a): méthyl isomasticadienonate	95,119, 121, 147, 159, 187, 271, 435, 453, 468 (M ⁺)
(32) : Δ ⁸ -tirucallene	OH/H(α-)	COOCH ₃	(32.b): méthyl-3-épi- isomasticadienolate	95, 119, 121,147, 161, 189, 205, 229, 249, 281, 313, 339, 437, 455, 470 (M ⁺)
 <p>(33) (34)</p>	O	CH ₃	(33.a): lupénone	69, 107, 133,149, 177, 205, 231, 281, 327, 355, 424 (M ⁺)
(33) : lupane	O	H	(33.b): norlupénone	119, 163,189, 203, 207, 234, 249, 281, 327, 355, 410 (M ⁺)
(34) lupen-20-ène	OH/H(α-)	CH ₃	(34.a): lupéol	119, 163,189, 203, 207, 234, 249, 281, 327, 355, 410 (M ⁺)

Figure 1. 13. Quelques structures chimiques des composés triterpéniques identifiés dans les mastics

Confère l'article Assimopoulou & Papageorgiou (2005) [Assimopoulou A.N. and Papageorgiou V.P. (2005). GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpènes from resins of Pistacia species. Part II. *Pistacia terebinthus* var. Chia. *Biomed. Chromatogr.* **19**: 586–605]

I.4.3.2.4. Composition chimique des copals

a) Copals d'Afrique

Les études portant sur l'analyse chimique des copals du Congo d'origine botanique certifiée sont rares. Néanmoins l'analyse chimique d'un copal Congo provenant du genre *Daniellia* a été rapportée par [Bevan et al. \(1968\)](#). Il suggère que la fraction polymérique de ce copal est constitué d'acide polyozique. De même il a été rapporté aussi que la fraction polymérique était significative et constituée d'acide polyozique, de l'ozol et de l'énantio-biformène. De plus les acides libres tels que les acides éperuique, labd-8-èn-15-oïque, cativique, copalique et kovalénique [[van den Berg et al., 1999](#)] ont été signalé.

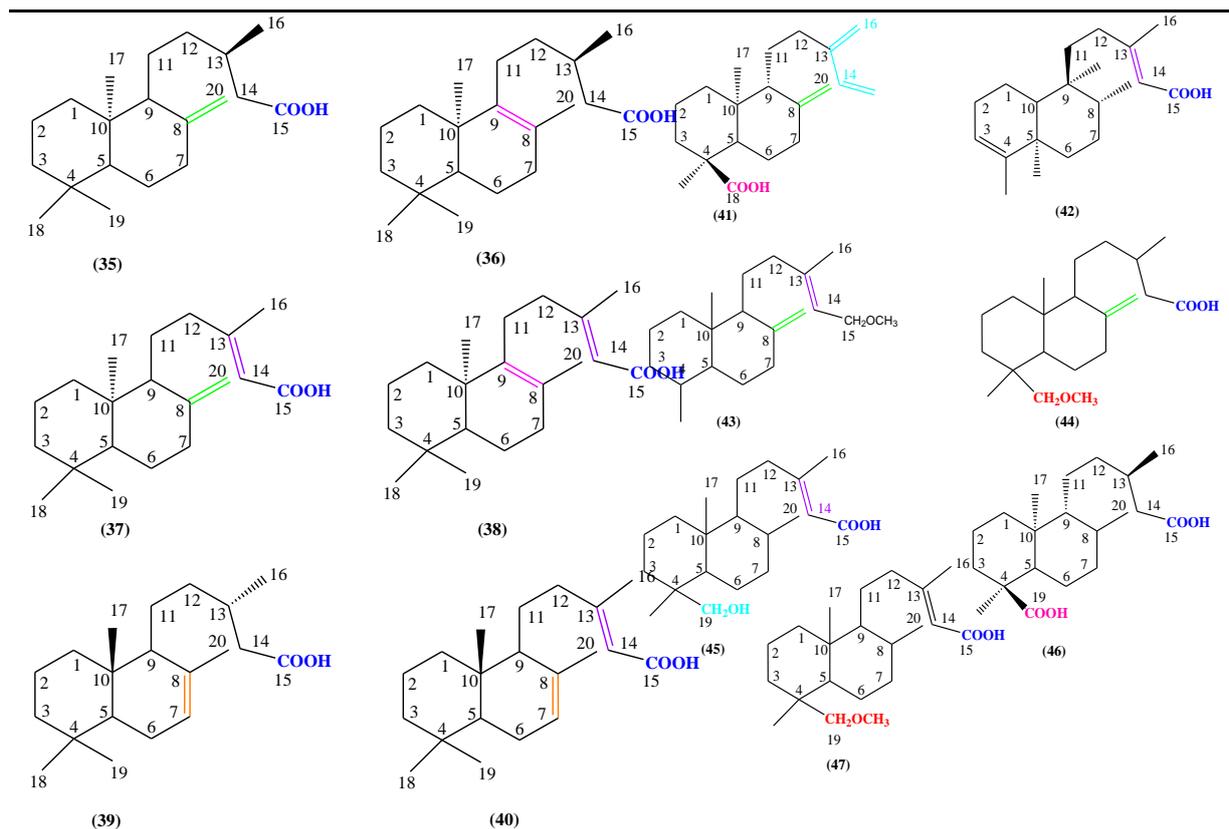
Une autre étude rapporte que les échantillons des copals du Congo sont dominés par les acides ent-labd-8(20)-èn-15-oïque, les isomères de l'acide ent-labdan-8-ol-15-oïque et des acides kovaléniques. Des composés ayant des groupes fonctionnels supplémentaires, en C-18 sont également présents en faibles quantités. Les composés typiques sont l'acide éperuique, l'acide ent-labd-8-èn-15-oïque, l'acide kovalénique, l'acide labdanolique, les acides ent-labdane et ent-labdène 18 oxygénés. Par contre, les copals de Sierra-Leone avaient montré une composition différente des copals Congo. Ils sont dominés par différents acides ent-labdanes hydroxylés et méthoxylés. On a retrouvé également des acides nor-ent-labdanes et l'acide ent-labd-8(20)-èn-18-oïque. Les acides éperuique et copalique ont été retrouvés, en très faibles quantités [[Steigenberger, 2013](#)].

Les travaux de [Hugel et al. \(1996\)](#) ont permis de montrer la présence de grandes quantités d'acide copalique, du 13 épimère de l'acide ent-éperuique, de l'acide ent-pinifolique, de l'acide ent-labdanolique, de l'acide Δ 13 déhydro-labdanolique, de l'énantiomère de l'acide labd-8(20)-èn-18-ol-15-oïque et de l'énantiomère de l'acide 18-acétoxy-labd-8(20)-èn-15-oïque dans cet exsudat résineux.

b) Copals d'Amérique

L'acide éperuique et ses isomères (Δ 7 et Δ 8) ainsi que l'acide copalique ont été signalés comme étant les principaux constituants du copal de *Hymenaea stigonocarpa*, alors que les composants mineurs sont les acides kolavénique, iso-ozique, et épi-pinifolique [[Doménech-Carbó et al., 2009](#)].

La figure 1.14 montre quelques structures d'acides diterpéniques identifiés dans les échantillons de vrais copals.



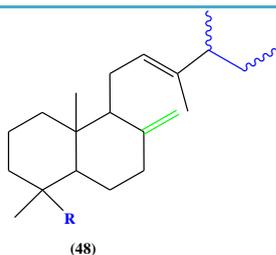
(35) : acide labd-8(20)-èn-15-oïque (acide éperuique) ; (36) : acide labd-8-èn-15-oïque ; (37) : acide labd-8(20), 13-dièn-15-oïque (acide copalique) ; (38) : acide labd-8,13-dièn-15-oïque ; (39) : acide labd-7-èn-15-oïque (acide cativique) ; (40) : acide labd-7,13-dièn-15-oïque ; (41) : acide épi-8(20),13(16),14-labdatrièn-18-oïque (acide iso-ozique) ; (42) : acide cléroda-3,13-dièn-15-oïque (acide kolavénique) ; (43) : cis/trans 15-méthoxyméthyl-19-norlabda-8(20),13-diène ; (44) : acide 19-méthoxyméthyl-labd-8(20)-èn-15-oïque ; (45) : acide épi-19-hydroxyméthyl-labd-8(20),13-dièn-15-oïque ; (46) : acide épi-labd-8(20)-èn-15,18-dioïque (acide épi-pinifolique) ; (47) : acide 19-méthoxyméthyl-labd-8(20),13-dièn-15-oïque

Figure 1.14. Quelques structures des composés identifiés dans les vrais copals

I.4.3.2.5. Composition chimique des ambres

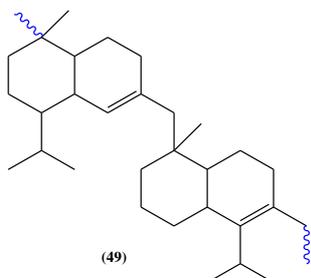
Plusieurs auteurs affirment que l'ambre est composée de deux fractions principales: une fraction qui est insoluble dans les solvants organiques et vraisemblablement composée d'un matériau polymérique (voir figure 1.15), et une fraction soluble composée de petites molécules organiques [Mills *et al.*, 1984 ; Langenheim, 2003].

Structure de base du polymère

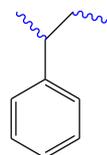


(48) : Polyabdanoïde

R = CH₃
R = CH₂OH
R = COOH



(49) : Polycadinène



(50) : Polystyrène

Figure 1. 15. Structure de base des polymères d'exsudats résineux fossiles [Langenheim, 2003]

I.4.3.3. Composition chimique des exsudats résineux phénoliques

Les exsudats résineux phénoliques sont composés principalement d'esters aromatiques.

a) Baume du Pérou

Cet exsudat contient environ 6-8% d'acides benzoïque et cinnamique libres et 50 à 60% de « cinnaméine », mélange de benzoate et de cinnamate de benzyle, de cinnamate de cinnamyle. Il renferme également des alcools (terpéniques et benzylique), de la vanilline et une fraction résineuse [Bruneton, 2002].

b) Benjoin du Laos

Chimiquement, le baume contient 60-80% de benzoate de coniféryle, 10-20% d'acides benzoïques libres, du cinnamate de benzyle, de la vanilline, et des triterpènes [Bruneton, 2002].

c) Storax

Ces exsudats sont considérés comme de véritables baumes en raison de leur prédominance en composés phénoliques. Le terme storax tire son origine de la langue arabe assitirax, ce qui signifie une exsudation odorante [Langenheim, 2003]. Les storax renferment une forte proportion d'acide benzoïque et d'acide cinnamique libres, l'acide cinnamique étant très largement majoritaire (jusqu'à 80%). On note également la présence d'esters (benzoates, cinnamates), de triterpènes dérivés de l'acide oléanolique, et de vanilline [Bruneton, 2002]. Ces divers baumes ont été soigneusement étudiés et leurs principaux constituants sont le

cinnamate de cinnamyle, le cinnamate du 3-phénylpropanyle, avec des quantités importantes d'acides benzoïque et cinnamique, et du 3-phényl-propanol et de l'alcool cinnamique (voir figure 1.16). La teneur en matières volatiles est très faible et quelques triterpènes ont également été retrouvés dans la fraction peu volatile, notamment les acides oléanonique, 3-épi-oléanolique et ambronovique [Colombini & Modugno, 2009].

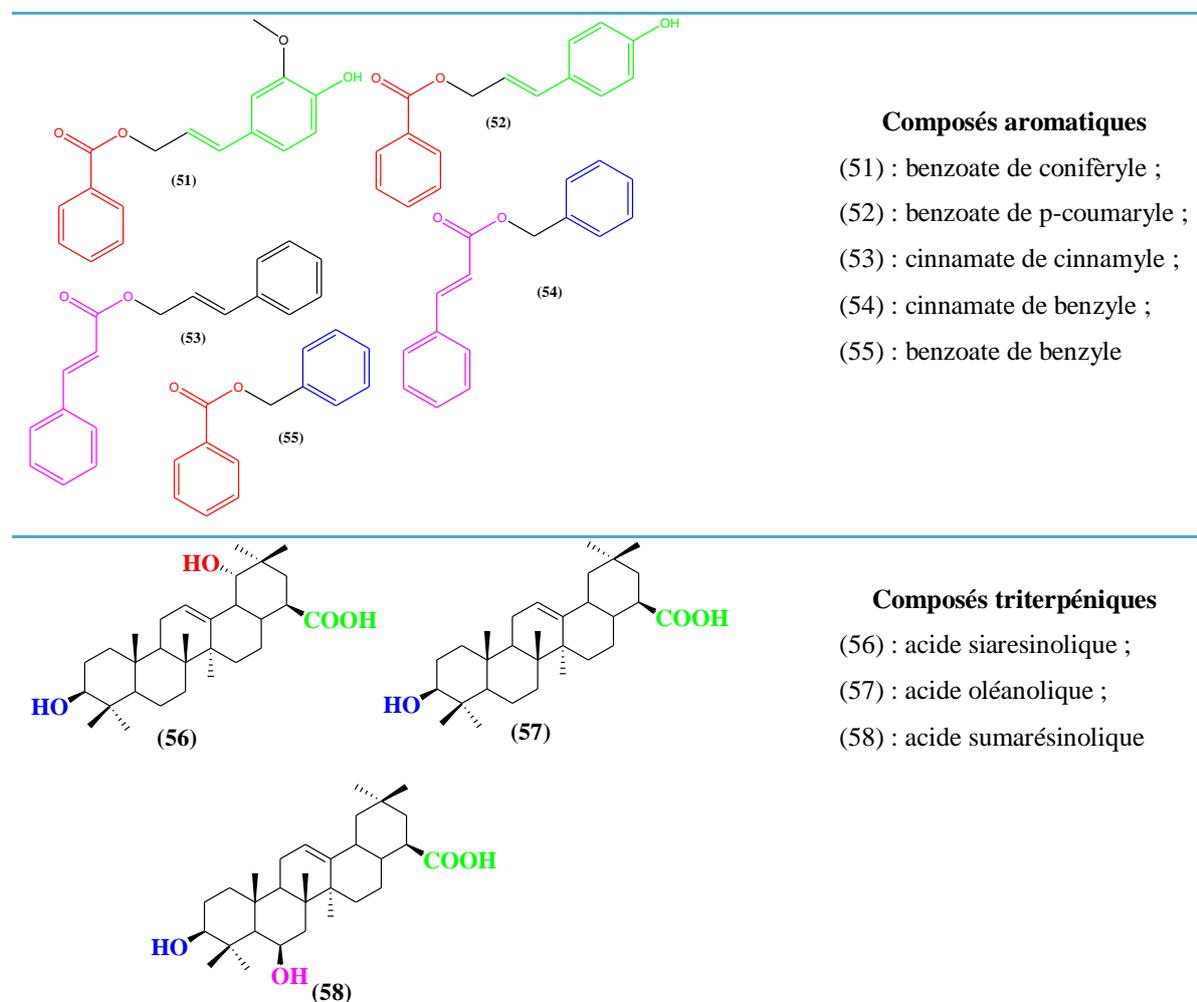


Figure 1. 16. Quelques principaux constituants aromatiques et triterpéniques des exsudats phénoliques.

I.4.4. Composition chimique des exsudats obtenus sous forme de mélange

a) Encens ou oliban

Cet exsudat est un mélange complexe contenant une partie gomme (polysaccharides) et une partie résine (mono, sesqui, di et triterpénoïdes) [Banno et al., 2006 ; Vo Duy, 2007]. Les analyses publiées reflètent une grande diversité de composition chimique (échantillons d'origines variées). On remarque que l'oléorésine renferme des diterpènes de type cembreane (incensol, cembrene, etc., près de 30% dans certains échantillons de *Boswellia carteri* [Bruneton, 2002].

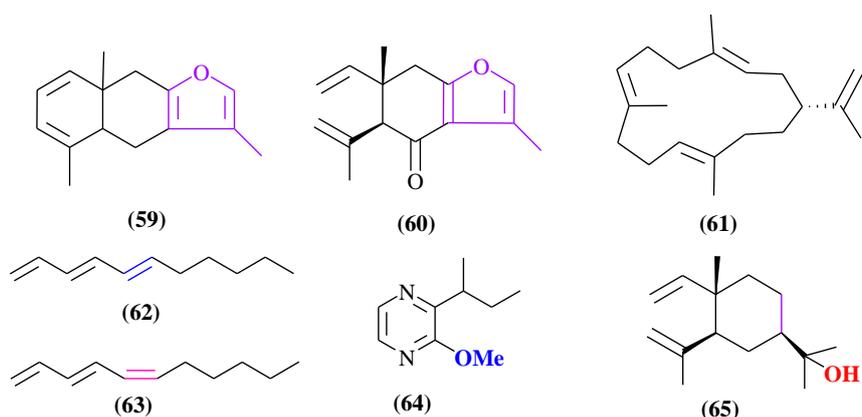
b) Myrrhe

La fraction volatile de la drogue doit son odeur caractéristique à des furanosesquiterpènes (voir figure 1.17) [Bruneton, 2002 ; Bleton & Tchaplà, 2009].

c) Galbanum

La fraction volatile contient essentiellement des carbures terpéniques : α -pinène (7-21%), β -pinène (45-65%), Δ^3 -carène (2,5-16%). Elle doit son odeur marquée à des composés spécifiques : le (3E, 5Z)-1,3,5-undécatriène (0,4-1,5%), et son isomère 3E ;5E (leur rapport varie de 2 à 5,5), le dérivé azoté (2-méthoxy-3-isobutylpyrazine) et les dérivés soufrés (S-sec-butyl-3-méthyl-2-butène-thioate, méthylallyl-et propényldisulfures) [Bruneton, 2002].

Bleton & Tchaplà (2009) ont également rapporté la présence du cis-guai-9-èn-11-ol, du β -dihydroagarofuran et de l'oxyde d'épi-ligulyle.



(59) : furanoeudesma-1,3-diène ; (60) : curzérénone ; (61) : cembrène ; (62) et (63) : undéca-1,3,5-triènes (galanolènes) ; (64) : 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine ; (65) : élemol

Figure 1. 17. Quelques structures de molécules isolées des exsudats obtenus sous forme de mélange de type (gomme-résine)

I.5. Propriétés physico-chimiques de quelques exsudats des plantes

I.5.1. Propriétés physico-chimiques des latex

Le poids spécifique du latex est la résultante de celui du sérum, il est le plus souvent compris entre 0,974 et 0,991. Sa viscosité est fonction de sa DRC (*Dry Rubber Content*), qui n'est rien d'autre que la teneur en caoutchouc sec du latex. Par exemple, la viscosité d'un latex frais à 35% de DRC est comprise entre 12 et 15 centipoises. Par contre, le pH du latex fraîchement récolté est proche de la neutralité et évolue rapidement après la saignée sous l'action des

microorganismes et des enzymes présents, cela a pour conséquence l'acidification du milieu. Les propriétés chimiques du latex sont dues, essentiellement aux éléments organiques présents, qui représentent 90% de la matière sèche du latex [Compagnon, 1986].

I.5.2. Propriétés physico-chimiques des exsudats gommeux

Les gommages sont insolubles dans l'alcool, l'éther, etc. [Greenish, 1933]. Les propriétés fondamentales d'une gomme, qui la rendent unique parmi les polysaccharides, sont généralement la solubilité et la viscosité élevée. Sa solubilité peut être influencée par son âge et par le temps durant lequel elle est restée attachée à l'arbre [Nussinovitch, 2010]. Mises au contact de l'eau, elles se comportent de trois manières différentes: les unes se gonflent sans se dissoudre; les autres ne sont solubles qu'en partie; d'autres enfin se dissolvent complètement en formant des solutions épaisses, visqueuses, parfois très adhésives [Cordemoy, 1911].

Les solutions gommeuses sont fermentescibles et généralement, précipitent par addition de l'éthanol [Serier, 1986 ; Bruneton, 2002 ; Nussinovitch, 2010]. Elles ne précipitent pas avec l'acétate neutre de plomb. Ces solutions dévient le plan de polarisation de la lumière et donc sont dites lévogyres ou dextrogyres [Cordemoy, 1911; Serier, 1986]. La valeur de leur pouvoir rotatoire est un élément important pour leur identification [Bruneton, 2002].

I.5.3. Propriétés physico-chimique des exsudats résineux

Les exsudats résineux se présentent sous forme de liquides épais qui, tantôt gardent plus ou moins leur fluidité, tantôt, et plus fréquemment, se concrètent à l'air en masses de consistance variable [Cordemoy, 1911]. En effet ces exsudats ne cristallisent pas, mais se brisent néanmoins en fragments conchoïdaux, parce qu'ils sont formés de couches successives déposées lors de l'épanchement [Serier, 1986]. Ceux de consistance liquide se dissolvent plus ou moins dans les solvants organiques. Après évaporation de la fraction volatile et/ou polymérisation oxydative partielle de certains composants, ils durcissent et deviennent dans la plupart des cas insolubles dans les solvants usuels. L'insolubilité de ces exsudats résineux rend leur analyse difficile. Chimiquement, les exsudats résineux sont des produits complexes constitués par des hydrocarbures, surtout des hydrocarbures terpéniques (monoterpènes, sesquiterpènes, di, et triterpènes) et/ou phénoliques. On trouve aussi quelques hydrocarbures non terpéniques de la série grasse et de la série aromatique, associés à des composés ternaires oxygénés provenant de l'oxydation ou de l'hydratation des hydrocarbures [Cordemoy, 1911]. Ces exsudats sont totalement insolubles dans l'eau. Par contre, ceux obtenus sous forme de mélange se dissolvent partiellement dans l'eau du fait qu'ils ont une partie gommeuse.

I.6. Utilisations des exsudats des plantes

I.6.1. Latex

Le latex des plantes est très utile pour l'homme en tant que base de l'industrie du caoutchouc et source de produits pharmaceutiques [Nabors, 2009]. Plusieurs latex ont fait l'objet de nombreuses utilisations :

- le latex de *Euphorbia laterifolia* Schum est utilisé comme un remède contre la teigne et, en solution aqueuse diluée, comme purgatif [Fakunle et al., 1989] ;
- le latex de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. a une activité protéolytique de type cystéine [Dubey et Jagannadham 2003] ;
- le latex de *Garcinia cowa* Roxb a été utilisé en tant que agent antipyrétique [Nattalung et al., 1994].

I.6.2. Exsudats gommeux

Ces produits naturels ont été utilisés dans le passé comme constituant des encres métallo-galliques, onguents égyptiens pour la momification [Proefke et al., 1992] à cause de leur très grande hydrophilie.

Aujourd'hui ils continuent d'être utilisés et trouvent de nombreuses applications :

- en **thérapeutique** [Ghestem et al., 2001] en tant que : laxatifs doux jouant principalement un rôle mécanique ; protecteurs des muqueuses digestives intestinales et gastriques ; émoullissants, adoucissants de la peau et des muqueuses irritées ;
- en **pharmacie galénique**, dans la préparation des sirops, des pastilles, des pâtes, pour tenir les poudres en suspension, dans les préparations liquides, pour solidifier les pilules [Sériér, 1986] ;
- dans le **domaine alimentaire**, ils sont employés comme stabilisant et épaississant dans la fabrication de glaces, de mayonnaises, de fromages et de bières.
- en **industrie minière et du papier**, ces exsudats gommeux sont utilisés comme des agents de floculation et de flottation.

I.6.3. Exsudats résineux

Parmi les différentes substances qui ont été utilisées dans l'antiquité, les exsudats résineux prennent une place d'honneur, en raison de leurs nombreuses propriétés (adhésives, médicales, et aromatiques).

En Archéologie par exemple, ils ont été utilisés comme vernis et liants dans la fabrication des œuvres d'arts. Ils ont aussi d'autres applications technologiques, par exemple, la térébenthine

extraite des bois tendres des pins est utilisée pour fabriquer des peintures, des diluants, des encres, des laques, des savons et des cires. Les ambres quant à eux sont très employés en joaillerie alors que la colophane est employée comme résine dentaire et adhésif. Les dammars ont été utilisés pour la fabrication de lampes à huile, de torches, de bougies, d'allume-feu et pour se protéger contre les attaques d'insectes [Appanah *et al.*, 1998]. Les danseurs s'en servent aussi pour améliorer leur adhérence au sol. Enfin, certains exsudats résineux sont également employés pour les instruments à cordes frottées afin d'améliorer la mise en vibration des cordes [Nabors, 2009].

D'autres sont appréciés aussi pour leurs usages médicaux en particulier pour leurs propriétés antiseptiques et anti-inflammatoires [Basile *et al.*, 1988 ; Veiga et Pinto, 2002 ; Banno *et al.*, 2006], analgésique, antimicrobiens, antitumoraux et émollient dans les emplâtres et les pommades [Appanah *et al.*, 1998].

D'autres par ailleurs ont été utilisés en parfumerie, cosmétologie et agroalimentaire [Ghestem *et al.*, 2001].

Conclusion

Nous avons voulu montrer dans ce chapitre que les exsudats produits par les plantes sont des substances naturelles complexes. Les lecteurs peuvent être surpris du nombre d'exsudats sécrétés par les plantes. Cette diversité rend leur classification difficile. Aujourd'hui, les progrès de l'anatomie végétale et de la microscopie électronique ont montré que ce sont des substances secrétées par des cellules et /ou organes spécialisés. De plus ces données fournissent aussi des critères permettant de mieux les définir, de les différencier mais aussi de comprendre leur origine. Il paraît donc clair au regard de ces informations, que les exsudats n'ont rien de commun avec la sève. En effet la sève circule dans des vaisseaux différents des vaisseaux et cavités où sont sécrétés les exsudats. Plusieurs substances exsudées par les plantes ont fait l'objet d'usages et de commerce depuis des millénaires. Cela a conduit de nombreux chercheurs à porter un intérêt particulier à ces substances. Elles ont été étudiées dans le domaine archéologique, agroalimentaire, cosmétique et médical. Cependant, le rôle physiologique joué par les exsudats des végétaux au sein de la plante n'est pas encore bien défini. En tenant compte de leur composition chimique, on peut distinguer : les latex, les exsudats gommeux, les exsudats résineux (oléorésines, élémis, mastics, copals, ambres...) et les exsudats résineux obtenus sous forme de mélange (essentiellement les gommés-résines). Plusieurs métabolites (mono, sesqui, di, triterpènes, polysaccharides, esters aromatiques,

peptides, xanthones...) ont été identifiés et certains isolés dans ces exsudats. Toutefois, la complexité de ces exsudats rend leur analyse difficile.

Chapitre II : Les techniques analytiques utilisées pour la caractérisation des exsudats des plantes

Introduction	38
II.1. Techniques de traitement d'échantillons	40
II.1.1. Techniques d'extraction des composés volatils	41
II.1.1.1. Procédés d'extraction des huiles essentielles	41
II.1.1.1.1 Procédés d'extraction conventionnels	41
II.1.1.1.2 Procédés d'extraction innovants	43
II.1.2. Techniques d'extraction des composés peu volatils	50
II.1.2.1. Procédés d'extraction conventionnels	50
II.1.2.2. Procédés d'extraction innovants	51
II.1.3. Méthodes de dérivation en chromatographie en phase gazeuse (CPG)	53
II.1.3.1. Méthylation	54
II.1.3.2. Silylation	54
II.1.3.3. Méthanolyse acide suivie d'une réaction de silylation	55
II.1.4. Pyrolyse et dérivation « on line »	56
II.1.4.1. Principe	56
II.1.4.2. Dérivation « on line » pour Py-CPG-SM	57
II.2. Techniques physico-chimiques d'analyse des exsudats des plantes	58
II.2.1. Techniques spectroscopiques	58
II.2.1.1. Spectrométrie de masse directe	58
II.2.1.2. Spectroscopie du moyen et du proche infrarouge	59
II.2.1.3. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire	62
II.2.2. Techniques chromatographiques	63
II.2.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	63
II.2.2.2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	64
II.2.2.3. Chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle (GCxGC)	67
II.2.2.4. Chromatographie en phase liquide (CPL)	71
Conclusion	73

Introduction

Les exsudats des végétaux sont des mélanges complexes. Cette complexité rend leur analyse chimique difficile. Aujourd'hui, l'évolution des technologies a permis la réalisation d'instruments très performants, apportant des possibilités nouvelles, notamment avec l'introduction des méthodes couplées et des méthodes non destructives. Ces méthodes se contentent de petits échantillons ne nécessitant pas, ou très peu de préparation préalable à la mesure. Cet avantage peut s'avérer être un inconvénient, lorsque le choix de la méthode, de la technique, et du procédé relatif à l'extraction et au prélèvement ne tient pas compte de la nature de l'échantillon à analyser. En effet, la composition chimique de ces substances ne dépend non seulement de l'origine botanique et géographique mais également du procédé d'extraction utilisé avant l'analyse. Pour tirer le maximum d'informations possibles (nature, composition et structure des composés présents) pour chaque type d'exsudat, plusieurs

techniques analytiques ont été utilisées de façon complémentaire et rapportées dans la littérature. Les techniques spectroscopiques, le plus souvent simples à mettre en œuvre ont été utilisées pour obtenir les premières informations structurales, afin de déterminer le type d'exsudat concerné (gomme, résine, gomme-résine, latex...). Parmi ces techniques, les plus rapportées ont été la spectroscopie du moyen infrarouge (SMIR), la spectroscopie Raman et la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) du solide [Lambert *et al.*, 1985 ; Tchapla *et al.*, 1999 ; Brody *et al.*, 2001 ; Guiliano *et al.*, 2007]. Par ailleurs, la spectrométrie de masse (SM) a été aussi utilisée en tant que technique d'analyse dans la caractérisation préliminaire de certains exsudats. La SM par désorption/ionisation de l'échantillon dans la source du spectromètre (après introduction directe) permet d'obtenir des spectres de masse intéressants, caractéristiques de la substance exsudée. Les travaux de Colombini & Modugno (2009) illustrent bien cela. Cependant, l'identification de leurs constituants moléculaires a été réalisée à partir des techniques séparatives couplées à la spectrométrie de masse, et particulièrement la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) [Méjanelle, 1996 ; Tchapla *et al.*, 1999 ; Chiavari *et al.*, 2002 ; Scalarone *et al.*, 2003 ; Vo Duy, 2007 ; Regert *et al.*, 2008 ; Doménech-Carbó *et al.*, 2009 ; Lucero-Gómez *et al.*, 2013]. En outre, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CPL-SM) peut se montrer particulièrement utile et complémentaire, car elle permet de réaliser des analyses à température ambiante ou proche de celle-ci. De plus, la CPL-SM est adaptée à l'analyse des composés thermosensibles, et à la séparation des composés peu volatils et/ou polaires. La CPL-SM offre également la possibilité d'étudier la composition chimique des exsudats sans avoir à pratiquer de réactions de dérivation des composés non volatils. En revanche, l'identification des composés n'est pas aussi facile qu'en CPG-SM, car les banques de données spectrales commercialisées n'existent pas.

Nous traiterons dans ce deuxième chapitre, les différentes techniques de caractérisation des exsudats de plantes décrites dans la littérature. Cependant, avant toute analyse instrumentale, une étape de préparation de l'échantillon est nécessaire. Il apparaît donc logique que la première partie, beaucoup plus exhaustive, porte sur les techniques de traitement d'échantillon. Cette étape représente à elle seule plus de 60 % du travail de l'analyste. Ces techniques de traitement d'échantillon englobent les techniques d'extraction et de dérivation. Les techniques d'extraction ont pour but l'élimination des interférents potentiels, la séparation des constituants d'intérêt de la matrice, et la concentration des analytes pour une meilleure

détection. Les techniques d'extraction développées ici, concernent aussi bien les composés volatils que peu volatils. Elles ont été classées en deux catégories : les procédés conventionnels et ceux modifiés, surtout dans le but de réduire la consommation de solvants et d'énergie, qualifiés de procédés innovants. L'apport de chaque procédé et leur principe ont été brièvement

exposés. Par la suite, nous aborderons les méthodes de dérivations spécifiques à la CPG. Il s'agit essentiellement de la silylation, la méthylation et de la méthanolyse acide.

La deuxième partie, moins exhaustive, aborde les techniques d'analyses physico-chimiques. Il s'agit essentiellement des techniques spectroscopiques et chromatographiques. Les techniques spectroscopiques utilisées apportent les premières informations concernant la nature de l'exsudat et par conséquent, orientent le choix de la technique chromatographique et de leurs couplages. Les principales méthodes chromatographiques que nous exposons sont la CCM, la CPL-SM, la CPG-FID, la CPG-SM, et la GCxGC-MS.

II.1. Techniques de traitement d'échantillon

La première étape de l'analyse des exsudats consiste souvent à extraire les analytes de la matrice. En chromatographie en phase gazeuse, la deuxième étape qui intervient fréquemment est la transformation chimique des composés non volatils en dérivés volatils. Nous aborderons ici les différentes techniques d'extraction des composés volatils, peu volatils et les différentes techniques de dérivation utilisées en CPG dans la caractérisation chimique des exsudats des plantes.

Les techniques d'extraction visent à séparer de façon plus sélective et complète les substances présentes dans un mélange complexe. Le transfert de substances à analyser dans la phase d'extraction (gaz, liquide ou solide) va dépendre des propriétés chimiques des analytes :

- la volatilité ;
- la solubilité (hydrophobie) et la polarité;
- le poids moléculaire ;
- le pKa.

Les analytes sont alors distribués entre deux phases non miscibles. Le partage des solutés est en effet un processus dynamique et peut être décrit en termes d'équilibre entre ces phases. Par contre, les techniques de dérivation en CPG modifient la structure chimique de ces composés, permettant ainsi l'obtention de dérivés plus volatils, moins polaires et beaucoup plus facilement séparables.

II.1.1. Techniques d'extraction des composés volatils

II.1.1.1. Procédés d'extraction des huiles essentielles

La norme [AFNOR NF T 75-006](#) définit l'huile essentielle comme un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicerpe de Citrus, soit par distillation sèche. Selon [Bruneton \(2002\)](#), cette définition est restrictive car elle exclut tous les produits obtenus par extraction à l'aide de solvant, que ceux obtenus par tout autre procédé. Les deux méthodes de distillation principalement utilisées sont donc l'entraînement à la vapeur et l'hydrodistillation.

II.1.1.1.1. Procédés d'extraction conventionnels

L'entraînement à la vapeur et l'hydrodistillation sont deux procédés conventionnels d'extraction des huiles essentielles. Ces deux techniques ont un même principe : la distillation hétéroazéotrope.

a) Entraînement à la vapeur d'eau

Il consiste à injecter de la vapeur d'eau fournie par une chaudière à travers la matière végétale située au-dessus d'une grille. Lors du passage de la vapeur à travers la matière végétale, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Ce procédé a l'avantage de favoriser le traitement de matières végétales sensibles qui pourraient souffrir d'une longue ébullition.

b) Hydrodistillation

L'hydrodistillation, technique très ancienne, est la technique de référence dans l'étude des composés volatils des huiles essentielles. Le principe de cette technique est basé sur celui de la distillation des mélanges binaires [[Bourquet et Augé, 2008](#)]. L'échantillon à distiller se trouve en contact direct avec l'eau. Selon sa densité et sa quantité de matière, il peut flotter ou être complètement immergé. Ce mélange est ensuite porté à ébullition. La vapeur d'eau produite entraîne les composés volatils. Après condensation par refroidissement, on obtient l'hydrolat qui est un mélange d'huile essentielle et d'eau. L'huile essentielle se sépare de l'eau par différence de densité. Par contre, lorsque les densités de ces deux phases sont très proches, il se forme une émulsion, l'huile essentielle est alors extraite par solvant. Plusieurs dispositifs d'extraction des huiles essentielles sont commercialisés. Le dispositif de type Clevenger (figure 2.1) est de loin le plus utilisé.

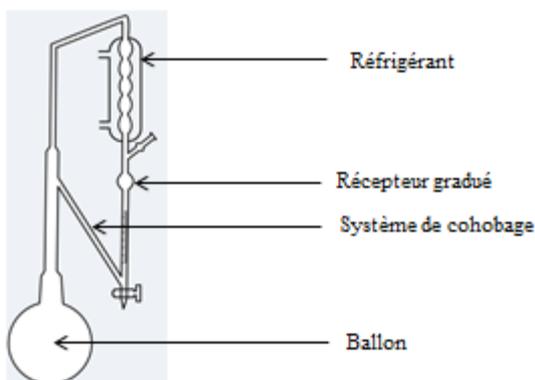


Figure 2. 1. Dispositif de type Clevenger

L'hydrodistillation a été utilisée par plusieurs auteurs pour extraire les huiles essentielles des oléorésines, des gomme-résines et des gomme-oléorésines [Ramos *et al.*, 2000 ; Siani *et al.*, 2004 ; Koudou *et al.*, 2005 ; Al-Harrasi and Al-Saidi, 2008]. Les techniques conventionnelles d'extraction des huiles essentielles présentent l'avantage d'être simples, efficaces et nécessitent un appareillage peu coûteux. Cependant, ces techniques posent des problèmes en matière de rendement, de durée d'extraction mais également quant à la préservation des molécules thermosensibles. Le contact avec l'eau, le chauffage et le pH du milieu peuvent entraîner des modifications chimiques (hydrolyse, déprotonation, hydratation, cyclisation et isomérisation). L'un des exemples illustrant ce fait est le cas du *cis*-hydrate de sabinène et de son acétate (figure 2.2). L'autre inconvénient de cette technique est la perte en huile essentielle due à la condensation dans le réfrigérant.

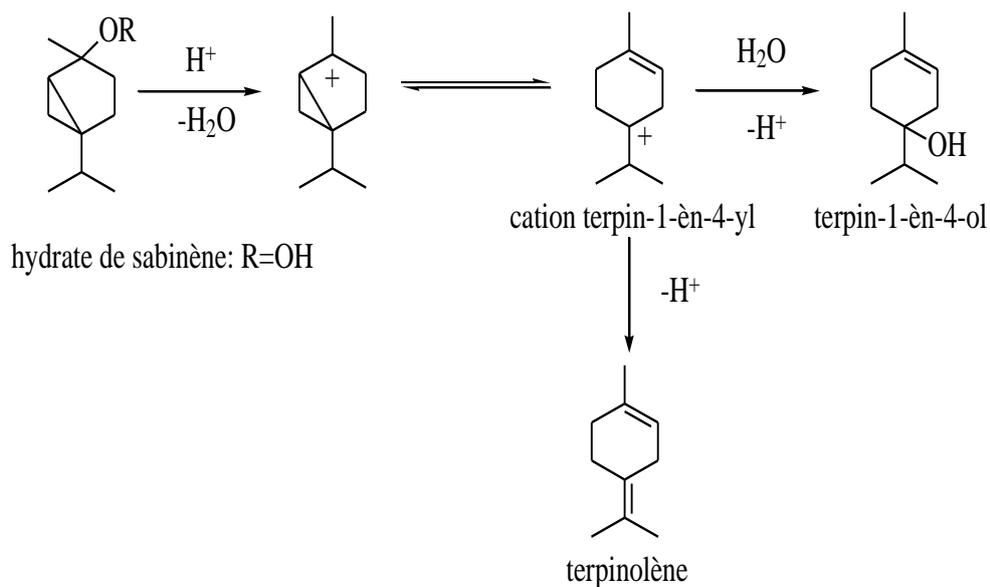


Figure 2. 2. Dégradation de l'hydrate de sabinène au cours de l'hydrodistillation [Bruneton, 2002]

II.1.1.1.2. Procédés d'extraction innovants

a) Techniques de distillation assistées par micro-ondes

Les avancées technologiques ont fait naître plusieurs techniques innovantes d'obtention des huiles essentielles. Par exemple, les micro-ondes et les ultrasons peuvent contribuer à accélérer les réactions par sélectivité de leurs actions mécanique et/ou thermique. Ces procédés d'extraction innovants permettent de limiter les inconvénients précédemment décrits et visent à réduire la consommation de solvant et la diminution de l'énergie [Poux et al., 2010]. Parmi ces techniques, on peut citer :

- l'hydrodistillation assistée par micro-ondes sous vide pulsé (VMHD, *Vacuum Microwave HydroDistillation*). Ce procédé a été élaboré et breveté, en 1994 par la société Archimex [Mengal & Mompon, 1994]. Il est basé sur l'utilisation conjointe des micro-ondes et d'un vide pulsé. Les micro-ondes accélèrent le transfert des molécules vers le milieu extérieur, le vide pulsé permet de réaliser l'entraînement azéotropique à une température inférieure à 100°C ;
- la turbo hydrodistillation assistée par micro-ondes (MTHD, *Microwave Turbo Hydrodistillation*). Le matériel végétal est placé dans un réacteur micro-ondes puis immergé dans un bain d'eau. Le dispositif est équipé d'une turbine à lame qui broie et agite continuellement la matière végétale. Ce procédé permet un meilleur transfert thermique ainsi qu'une augmentation de la surface de vaporisation [Périno-Issartier et al., 2013];
- l'entraînement à l'air assisté par micro-ondes (CAMD, *Compressed Air Microwave Distillation*). Ce procédé, proposé par Craveiro et al. (1989), repose sur le principe classique de l'entraînement à la vapeur et utilise de l'air comprimé à la place de la vapeur pour extraire les composés volatils de l'échantillon. L'air est injecté dans le réacteur de façon à permettre un entraînement de l'huile essentielle [Poux et al., 2010] ;
- l'hydrodiffusion/gravité sous micro-ondes (MHG, *Microwave Hydrodiffusion and Gravity*). C'est un procédé simple qui fait appel à la gravité pour ôter de la matrice la phase aqueuse et la phase huileuse, après extraction de l'échantillon sous l'action des micro-ondes, et ce, sans solvant (voir figure 2.3) [Poux et al., 2010 ; Périno-Issartier et al., 2013].

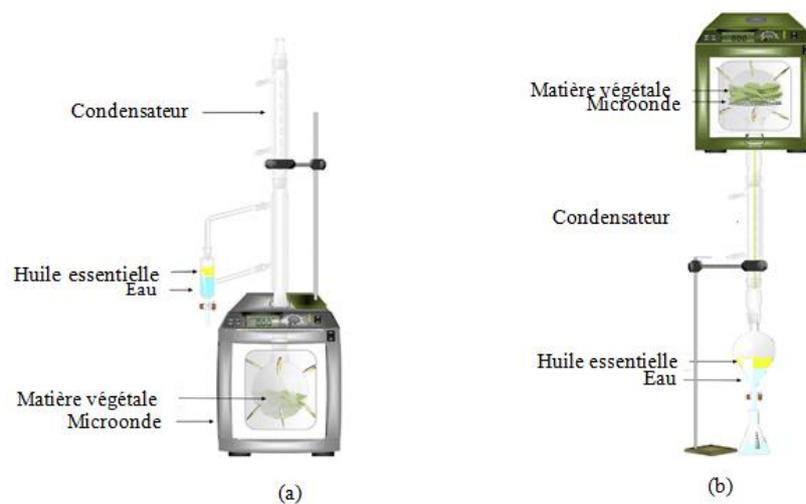


Figure 2. 3. Schéma de principe de deux procédés d'extraction innovants d'une huile essentielle extracteurs (a) Hydrodistillation sans solvant sous micro-ondes, (b) Hydrodiffusion/gravité sous micro-ondes [Périno-Issartier et al., 2013].

Périno-Issartier (2013) a étudié les huiles essentielles de lavandin (*Lavandula intermedia* var. Grosso) obtenues via différents procédés d'extractions (classiques et innovants). Les travaux rapportés montrent que le procédé MHG donne un meilleur rendement. De plus, l'huile essentielle obtenue par cette technique était d'excellente qualité (faible dégradation) et d'odeur naturelle. Même si à notre connaissance aucune application sur les exsudats n'a été rapportée dans la littérature, ils peuvent être appliqués à l'étude des exsudats résineux.

b) Microextraction sur phase solide (SPME, *Solid Phase Micro Extraction*)

C'est une méthode d'extraction sans solvant, proposée au début des années 1990 par Arthur et Pawliszyn [Arthur & Pawliszyn, 1990], sa commercialisation date de 1993 par Supelco (Bellefonte, PA, USA) (pour les fibres et les supports) et son automatisation de 1996 par Varian (passeur automatique d'échantillons). La microextraction sur phase solide permet l'extraction de composés de matrices liquides, solides ou gazeuses [Pawliszyn, 1997]. La mise en œuvre de fibres enrobées, incorporées dans une micro seringue (figure 2.4) a permis le développement de cette technique.

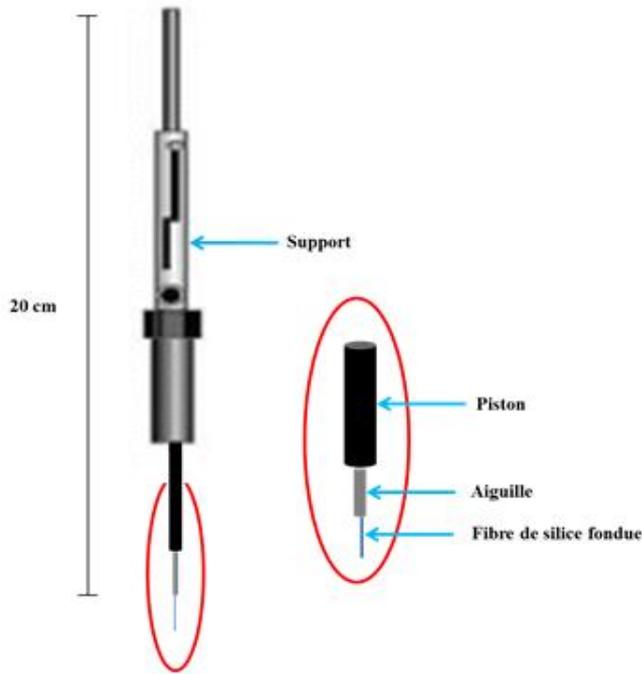
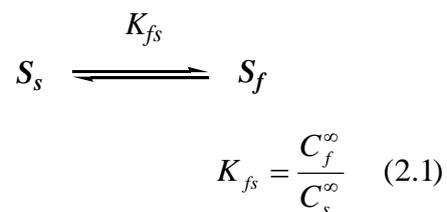


Figure 2. 4. Présentation schématique de la fibre SPME et ses différents éléments constitutifs

Le principe de base de la SPME repose sur le transfert des composés d'intérêt de la matrice vers une phase polymérique spécifique, supportée par une fibre de silice fondue. Ce transfert débute dès que la phase polymérique est exposée à l'échantillon et s'achève une fois que l'équilibre est atteint entre la matrice et le polymère. La concentration des composés dans les deux phases devient alors constante. La condition d'équilibre de la substance S avec les deux phases est définie dans l'équation (2.1) par une constante de partage ou de distribution notée K_{fs} .



Avec :

C_f^∞ : Concentration de la substance S dans la fibre à l'équilibre,

C_s^∞ : Concentration de la substance S dans la matrice à l'équilibre,

V_s : Volume de la matrice,

V_l : Volume du revêtement de la fibre.

D'après la loi de conservation de la matière on peut écrire :

$$C_o V_l = C_f^\infty V_f + C_s^\infty V_s \quad (2.2)$$

Avec

C_o : Concentration initiale de la substance S

La loi de conservation de la matière, équation (2.2) combiné à l'équation (2.1) permet d'établir une relation entre la quantité du composé extrait par la fibre à l'équilibre et sa concentration initiale C_o dans la matrice :

$$n_f = \frac{K_{fs} V_f V_s C_o}{K_{fs} V_f + V_s} \quad (2.3)$$

Si $K_{fs} V_f$ est $\ll V_s$, l'équation (2.3) devient :

$$n_f = K_{fs} V_f C_o \quad (2.4)$$

L'équation (2.4) est intéressante, car elle montre que la quantité d'analyte extraite correspond directement à sa concentration dans la matrice, sans être tributaire du volume de l'échantillon. En pratique, ce qui signifie que le volume de l'échantillon n'a pas besoin d'être précisément mesuré [Pawliszyn, 1997]. Cela permet de limiter ainsi les erreurs liées à la manipulation des échantillons.

Trois modes d'extraction peuvent être effectués en utilisant la SPME: l'extraction en espace de tête, l'extraction directe ou par immersion et l'extraction par immersion avec une membrane de protection (figure 2.5).

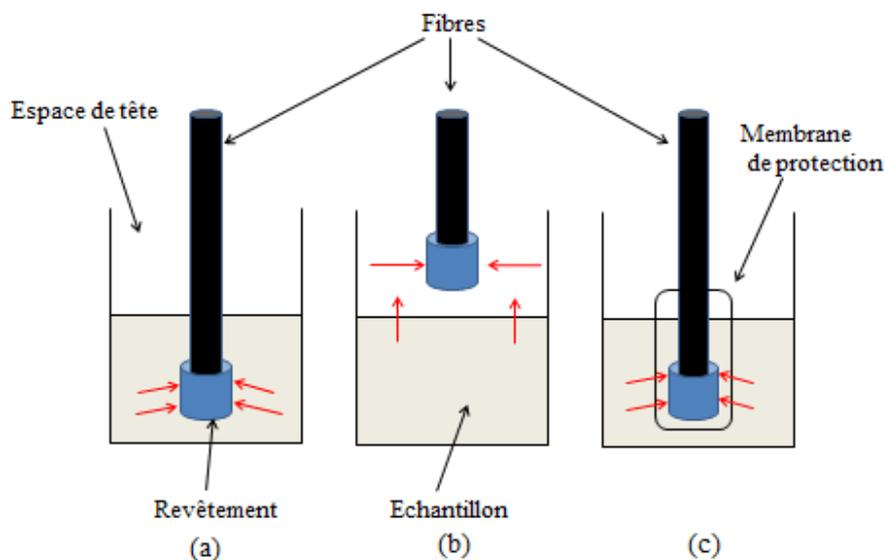


Figure 2. 5. Différents modes d'extraction en SPME : (a) extraction directe, (b) extraction de l'espace de tête, (c) extraction par immersion avec une membrane de protection

La SPME a été développée pour éviter l'étape de préparation d'échantillons souvent, fastidieuse et nécessitant l'utilisation de solvants, de réactifs, donc coûteuse en temps et en argent. Le mode d'extraction utilisé en SPME dans l'étude des exsudats des plantes est l'espace de tête. C'est pour cette raison que nous ne développerons que la microextraction sur phase solide en espace de tête.

- **Brève présentation du processus d'échantillonnage par Hs-SPME**

Les techniques de l'espace de tête ou headspace sont basées sur la volatilité des analytes recherchés dans une matrice complexe non chromatographiable. Le processus de la Hs-SPME se déroule en deux étapes :

1^{ère} étape : extraction des composés organiques volatils

Après avoir été conditionnée, la fibre est plongée dans l'espace de tête (au-dessus de l'échantillon). Les analytes vont être progressivement adsorbés par la phase stationnaire. Après un temps suffisant appelé temps d'équilibrage, il s'établit un équilibre de partage entre la phase solide constituée par la fibre et la phase gazeuse. L'échantillon peut être chauffé pour favoriser le passage des composés volatils dans la phase gazeuse, et leur adsorption sur la fibre. La fibre est ensuite rétractée dans l'aiguille et retirée de l'échantillon.

2^{ème} étape : désorption des analytes

L'aiguille est alors introduite à l'intérieur d'un injecteur et les analytes sont désorbés thermiquement et élués en fonction de la technique analytique utilisée (figure 2.6).

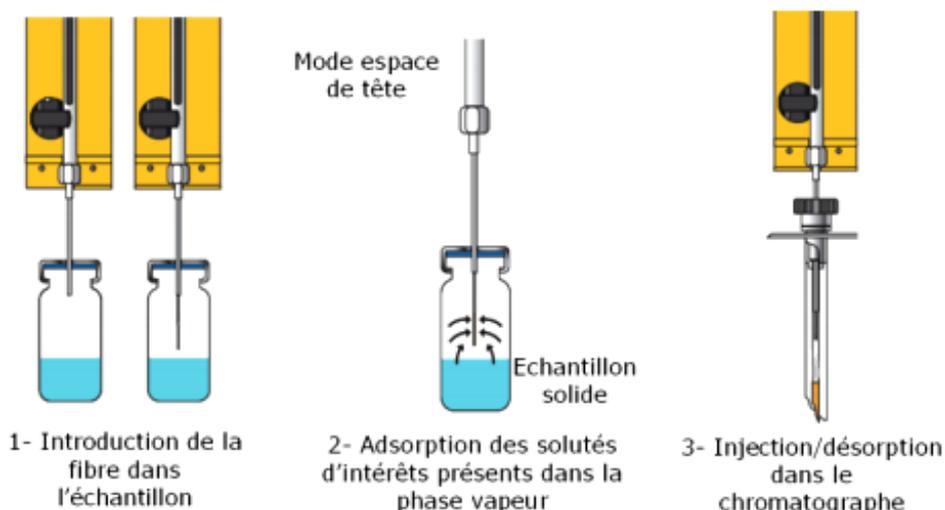


Figure 2. 6. Procédures d'extraction et de désorption en Hs-SPME

L'espace de tête comme mode d'extraction a été appliqué avec succès à la caractérisation des exsudats résineux terpéniques présents dans les objets archéologiques [Hamm *et al.*, 2003 ; 2004 ; 2005 ; Regert *et al.*, 2006].

- **Paramètres expérimentaux affectant l'efficacité d'extraction en Hs-SPME**

La théorie de la thermodynamique prédit les effets de la modification de certaines conditions d'extraction sur la distribution des analytes entre les deux phases et indique les paramètres à contrôler pour une meilleure reproductibilité. Les principaux paramètres qui affectent le rendement d'extraction et donc son efficacité sont:

- concentration initiale de l'échantillon

Pawliszyn (1997) a montré que la quantité d'analyte adsorbée par la fibre dépend directement de sa concentration dans la matrice. Théoriquement cela est démontré par les équations (2.3) et (2.4).

- température

Selon l'équation (2.5) ci-dessous, l'augmentation de la température de T_1 à T_2 favorise la vaporisation des composés et leur passage de la matrice vers l'espace de tête. Mais, cette augmentation de température provoque la diminution de la constante d'équilibre. La conséquence est que les composés restent plus facilement dans l'espace de tête.

$$K_{fs} = K_1 \exp \frac{-\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \quad (2.5)$$

Avec

K_{fs} et K_1 constantes de distribution de l'échantillon entre le polymère et la matrice respectivement à la température T_2 et T_1 ,

ΔH et R respectivement la variation d'enthalpie molaire accompagnant le passage de l'échantillon de la fibre à la matrice et la constante des gaz parfaits.

Il apparait donc important pour extraire en mode espace de tête des analytes d'une matrice, moins riche en composés volatils, de chauffer afin d'entraîner plus de composés vers l'espace de tête.

- pH et force ionique de l'échantillon

Ils jouent le même rôle que dans d'autres procédés d'extraction (extraction solide/liquide ou liquide/liquide). En pratique, des sels comme NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2CO_3 et Na_2SO_4 peuvent être ajoutés pour augmenter le rendement d'extraction, en particulier pour des analytes polaires et volatils.

- Constante d'équilibre

Pour augmenter la sensibilité de la méthode, il est possible d'augmenter la constante d'équilibre en changeant la nature du polymère. Il apparaît donc important de choisir la nature du polymère en tenant compte de la nature des composés, cela est aussi important que le choix de solvants organiques dans l'extraction liquide-liquide.

- **Choix et nature du revêtement en SPME**

Le choix du revêtement de fibres est un facteur essentiel, car le type et la quantité de composés qui sont extraits de l'échantillon dépendent des caractéristiques physico-chimiques de la phase stationnaire de la fibre et de son épaisseur. Quatre critères sont généralement à prendre en compte. Il s'agit du rapport poids moléculaire/taille de l'analyte, de la polarité des analytes, du niveau de concentration des analytes et de la complexité de la matrice de l'échantillon à analyser.

A l'heure actuelle, plus de 30 types de fibres sont disponibles dans le commerce. Les plus fréquemment utilisés sont rassemblés dans le tableau II.1.

Tableau II. 1. Caractéristiques de quelques revêtements disponibles sur le marché

Nature du revêtement	Epaisseur (µm)	Phase	Nature du composé
PDMS	100	non-greffée	volatil (arômes, parfums, additifs alimentaires)
PDMS	30	non-greffée	
PDMS/DVB	7	greffée	semi-volatil à non volatil, substance de haute masse moléculaire non polaire
PDMS/DVB	65	réticulée	polaire volatil
Polyacrylate (PA)	85	réticulée	polaire semi-volatil
CAR[®]/PDMS	75	réticulée	gaz et traces de composés volatils
CW[®]/DVB	65	réticulée	Polaire (alcools), cétone nitré
DVB/PDMS/CAR[®]	50/30	hautement réticulée	volatil et semi-volatil

La SPME offre les avantages suivants :

- une technique simple, pratique, facilement automatisable ;
- requière de faibles quantités d'échantillons et limite l'observation d'artéfacts,
- une réduction du temps de préparation des échantillons ;
- l'absence d'utilisation de solvant;
- un coût d'utilisation réduit car chaque fibre peut être réutilisée au moins une cinquantaine de fois ;
- une sélectivité liée au choix du polymère.

Parmi les inconvénients nous pouvons citer :

- la difficulté de choisir la fibre idéale lorsque l'échantillon contient à la fois des composés très polaires et non polaires ;
- la durée de vie et la fragilité des fibres ;
- la limitation d'usage aux composés volatils ou semi-volatils ;
- la reproductibilité, qui diminue avec le vieillissement de la fibre ou lorsqu'elle est détériorée par l'action des sels, des pH extrêmes ou de solvants au cours de l'extraction par immersion ;
- la difficulté de faire de l'analyse quantitative rigoureuse lors de l'extraction en mode espace de tête, car la composition gazeuse est fortement influencée par les conditions opératoires.

La microextraction sur phase solide est un outil complémentaire des autres méthodes d'extraction des composés volatils et semi-volatils. Elle présente l'avantage de regrouper toutes les étapes de la préparation d'un échantillon (extraction, concentration, et transfert des analytes) en un seul procédé.

II.1.2. Techniques d'extraction des composés peu volatils

Le choix de la technique d'extraction dépend de la nature de l'échantillon à analyser. Dans l'étude des exsudats des plantes, vu que l'échantillon est généralement solide, l'extraction solide-liquide est une technique généralement utilisée. C'est une opération unitaire visant à la séparation, à l'aide d'une phase liquide (solvant), d'un ou plusieurs composés (solutés) contenus dans une matrice solide [Bauer *al.*, 2010]. On emploie plus généralement des procédés d'extraction continus. La pulvérisation de l'échantillon solide permet d'augmenter la surface d'échange et, par conséquent, la vitesse de transfert des solutés de la matrice vers le solvant d'extraction [Bourquet & Augé, 2008].

II.1.2.1. Procédés d'extraction conventionnels

Dans la littérature, différentes techniques d'extraction telles que la macération, la percolation, la décoction, l'infusion, l'extraction par reflux et l'extraction au Soxhlet ont été rapportées. Ces techniques, quoique simples, demandent souvent de grands volumes de solvants. De plus, le processus d'extraction est souvent long d'où le risque de dégradation possible des composés thermosensibles.

a) Extraction solide-liquide par Soxhlet

Cette technique a été inventée en 1879 par Franz von Soxhlet [Soxhlet, 1879]. Elle a déjà été décrite dans la littérature comme une technique d'extraction des composés peu volatils des substances gomme-oléoresines provenant de *Ferula gummosa* Boiss [Jalali et al., 2011], du latex de *Euphorbia officinarum* [Daoubi et al., 2007], des gommés et résines des plantes mexicaines [De Rodriguez & Kuruvadi, 1999].

L'appareillage comporte un ballon dans lequel le solvant est chauffé et vaporisé, un réfrigérant qui condense les vapeurs, et un extracteur de Soxhlet. Le produit à extraire est placé dans une cartouche en matière poreuse et introduite dans le corps du Soxhlet. Le solvant condensé dans le réfrigérant retombe sur la cartouche contenant la matière à extraire. Un siphon permet de vider périodiquement l'extracteur de la solution obtenue, puis le solvant retombe dans le ballon où se concentrent les extraits. L'avantage de cette méthode réside dans le fait que la filtration de l'extrait à la fin de l'extraction n'est pas nécessaire. Cependant, elle n'est pas sans inconvénient car les extraits sont chauffés et il en résulte des risques d'altération.

b) Extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide parfois appelée extraction par solvant consiste à transférer un ou plusieurs solutés contenus dans une solution liquide vers un autre liquide non miscible (le solvant). La concentration finale du soluté dans chaque phase dépend de sa solubilité dans les liquides mis en jeu. Le solvant s'enrichit en soluté et est appelé extrait; la solution de départ s'appauvrit en soluté, elle est alors appelée raffinat. C'est une technique simple à mettre en œuvre et qui permet d'extraire des composés de polarités différentes. Cependant, elle présente plusieurs inconvénients, le temps d'extraction est souvent long. Elle présente des difficultés d'automatisation, la nécessité de précautions de manipulation à cause de l'utilisation des quantités énormes de solvants, la nécessité de concentrer les extraits par évaporation du solvant.

II.1.2.2. Procédés d'extraction innovants

Ils ont pour objectifs d'améliorer les techniques existantes ou de répondre aux critères de la chimie verte. Ils permettent ainsi :

- de réduire la consommation d'énergie par augmentation des vitesses d'extraction : pression, température, agitation pour faciliter le transfert de matière ...
- d'utiliser des solvants alternatifs : liquides ioniques, eau ou les agrosolvants (exemple le D-limonène) ;

- de mettre en œuvre des procédés sûrs et respectueux pour l’environnement ;
- d’augmenter la sélectivité et la qualité des extraits.

Parmi ces techniques, on peut citer : l’extraction assistée par micro-ondes (MAE), l’extraction assistée par ultrasons (UAE), l’extraction accélérée par solvant (ASE), l’extraction pressurisée par solvant (PSE) et l’extraction par fluide supercritique (SFE).

a) Extraction par solvant assistée par micro-ondes (MASE ou MAE, *Microwave Assisted Extraction*)

Cette technique a été introduite par [Paré & Bélanger \(1990\)](#). La matière solide est immergée dans un solvant chauffé par micro-ondes. En utilisant successivement des liquides dont le pouvoir solvant vis-à-vis des constituants de la phase solide est différent, on réalise une dissolution fractionnée. Dans le contexte de développement de procédés plus propres, la technologie de chauffage par micro-ondes paraît être une alternative intéressante puisqu’elle permet l’utilisation de faibles quantités de solvant et des temps de traitement plus courts. Néanmoins, c’est une technique d’extraction qui nécessite une étape de filtration et/ou de centrifugation pour éliminer les particules solides après extraction. Le rendement d’extraction reste toujours comparable à celui obtenu avec des méthodes classiques [[Poux et al., 2010](#)].

b) Extraction assistée par ultrasons (UAE, *Ultrasonic Assisted Extraction*)

L’extraction par solvant assistée par ultrasons consiste à traiter sous ultrasons un solide, sec ou humide, en contact avec un solvant. Ces techniques permettent d’augmenter le rendement et/ou la qualité des extraits, d’accélérer les cinétiques d’extraction en favorisant la diffusion des substances dissoutes à l’intérieure de la cellule vers le milieu d’extraction [[Poux et al., 2010](#)]. L’extraction des triterpènes par solvant assistée par ultrasons à partir des résines naturelles a été rapportée par [Hovaneissian et al. \(2006\)](#).

c) Extraction accélérée par solvant (ASE, *Accelerated Solvent Extraction*)

L’extraction accélérée par solvant est un procédé qui consiste à extraire les composés d’intérêt d’une matrice solide par un solvant organique porté à haute température et à haute pression. Il en résulte des faibles quantités de solvant et des temps d’extraction plus rapide (12-20 min) par rapport à des techniques d’extraction classique telle que le Soxhlet. Elle présente aussi l’avantage d’être automatisée (DIONEX Corporation, Sunnyvale, CA). Aujourd’hui elle est largement utilisée dans plusieurs domaines, environnemental, pharmaceutique, agro-alimentaire,... [Pearson \(2013\)](#) a utilisé cette technique pour extraire le caoutchouc naturel et la fraction résineuse des échantillons du latex de Guayule (*Parthenium argentatum* Gray).

d) Extraction pressurisée par solvant (PSE, *Pressurized Solvent Extraction*)

L'extraction pressurisée par solvant ressemble beaucoup à une extraction par Soxhlet. La seule différence est que les solvants sont utilisés à proximité de leur région supercritique, ce qui augmente leurs propriétés d'extraction. Cette technique d'extraction est avantageuse car on utilise de faible volume de solvant (15-40 ml) et une courte durée d'extraction. Cette technique peut s'adapter à l'extraction des analytes présents dans les exsudats.

II.1.3. Méthodes de dérivation en chromatographie en phase gazeuse (CPG)

On retrouve souvent dans les exsudats des plantes, des molécules qui ont des groupements polaires (COOH, OH, NH...). Ces molécules sont difficiles à chromatographier en phase gazeuse. La présence de ces groupements élève leur point d'ébullition et crée des interactions fortes avec les phases stationnaires polaires. On ne peut néanmoins trop élever la température des colonnes car la stabilité thermique de ces produits est en général limitée [Tranchant, 1995]. Pour obtenir des chromatogrammes exploitables de composés polaires, non volatils, une étape de dérivation avant leur analyse est nécessaire. Ces réactions ont pour buts :

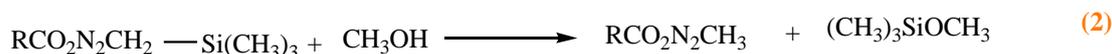
- l'abaissement de la température d'ébullition. En effet, les groupements polaires présents dans une molécule ont tendance à former des liaisons hydrogènes intermoléculaires qui réduisent ainsi leur volatilité et les rendent difficilement analysables en GPG ;
- l'augmentation de la stabilité car certains composés qui subissent une dégradation partielle sont stabilisés par dérivation, c'est notamment le cas des hormones stéroïdiennes (exemple du cholestérol) ;
- la réduction des traînées des pics qui sont dues aux phénomènes d'adsorption des fonctions polaires par exemple, la transformation d'acide gras en esters méthyliques ;
- l'amélioration de la sensibilité et la spécificité de la détection, par formation de dérivés halogénés permettant la détection par capture d'électrons.

Un bon réactif de dérivation doit respecter un certain nombre de critères. Il doit produire plus de 95% du composé de dérivation souhaité, il ne doit pas donner lieu à des réactions de réarrangements et doit produire un dérivé qui est stable dans le temps. Les réactions de dérivation utilisées en CPG sont généralement des réactions d'alkylation, de silylation, d'estérification et d'acylation.

La méthylation et la silylation sont de loin les réactions de dérivation les plus couramment utilisées en CPG pour l'analyse des exsudats résineux [Assimopoulou & Papageorgiou, 2005 ; Vo Duy, 2007 ; Regert 2008 ; Doménech-Carbó et al., 2009 ; Mathe et al., 2009].

II.1.3.1. Méthylation

C'est le remplacement d'un atome d'hydrogène labile présent dans un composé par un méthyle. Dans le cas de l'étude d'exsudats des plantes, le principal usage chromatographique de cette réaction est la conversion des acides organiques en esters méthyliques. Cette réaction est rapide, fournit des esters méthyliques avec de très bons rendements. A cet effet, plusieurs techniques utilisant le triméthylsilyldiazométhane ont été décrites dans la littérature [Hashimoto et al., 1981 ; Aldai et al., 2006]. Le mécanisme de réaction envisagé est le suivant [Seyferth et al., 1972].



La méthylation au TMS-diazométhane n'a aucun effet sur les groupements hydroxyles. Si le composé contient à la fois les groupements acides et hydroxyles, il faut passer par une étape de silylation ultérieure [Scalarone et al., 2002], ce qui rend le protocole assez lourd. Une double dérivation entraîne des risques de perte d'échantillon.

II.1.3.2. Silylation

Elle a pour but de fixer un groupe triméthylsilyl (TMS) sur une molécule en le substituant à un hydrogène labile des fonctions $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}$ et $-\text{SH}$ (figure 2.7). Les réactifs les plus utilisés sont le N,O-bis triméthylsilyltrifluoroacétamide (BSTFA), le N,O-bis-triméthylsilyl-acétamide (BSA), le diméthylchlorosilane (DMCS), l'hexaméthylidisilazane (HMDS), le N-méthyl-N-triméthylsilyl-trifluoroacétamide (MSTFA)... L'identification des composés des exsudats des plantes sous forme de dérivés triméthylsilylés a largement été rapportée par plusieurs auteurs [Bleton et al., 1996 ; Regert, 1996 ; Chiavari et al., 2002 ; Osete-Cortina et al., 2005].

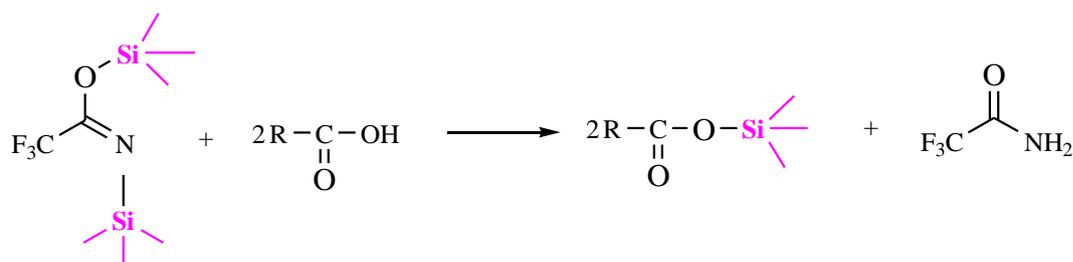


Figure 2. 7. Silylation du groupement carboxylique par application de BSTFA

Cette technique de silylation directe est efficace sur tous les groupements acides et hydroxyles. Cependant, les dérivés silylés obtenus sont peu représentés dans les banques de données telles que la « NIST » et moins stables dans le temps.

II.1.3.3. Méthanolyse acide suivie d'une réaction de silylation

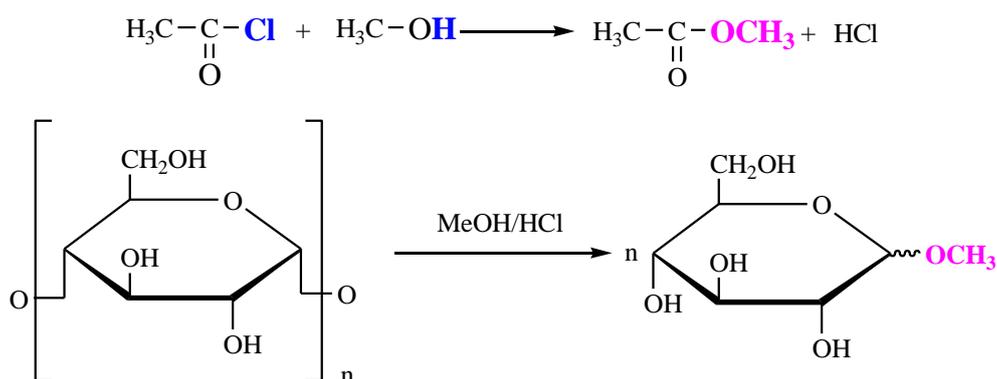
La méthanolyse acide suivie d'une silylation permet, en une seule analyse, d'obtenir un bon aperçu des différentes familles de composés présentes dans ce type d'échantillon.

Elle se déroule en deux étapes :

1^{ère} étape : la méthanolyse acide

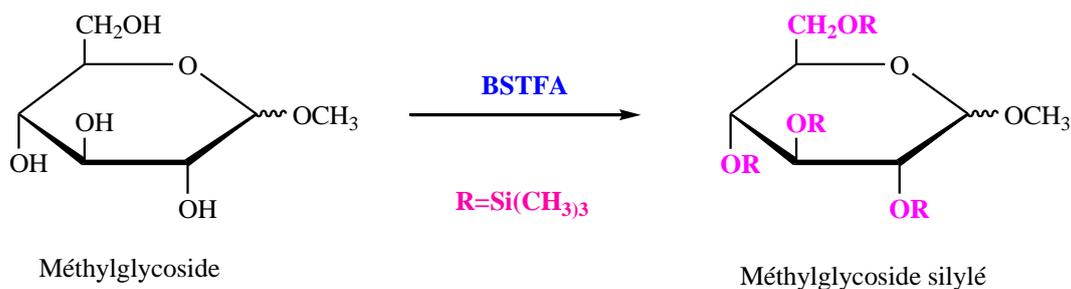
Elle permet de dépolymériser des polysaccharides présents dans des exsudats gommeux. Cette réaction conduit à la formation de méthylglycosides par la fixation d'un groupement méthoxy sur le carbone 1, grâce à l'utilisation du chlorure d'acétyle (CH_3COCl) méthanolique. Cette réaction s'effectue à 80°C dans un bain d'huile pendant 24h. [Vo Duy, 2007].

Les réactions correspondantes sont décrites ci-dessous :



2^{ème} étape : la silylation

Les groupements OH qui ne sont pas affectés par la méthanolyse acide sont alors silylés. Cette silylation permet d'augmenter la volatilité de ces molécules et d'en diminuer la polarité, donc les risques d'adsorption parasite [Méjanelle, 1996].



Lors de l'analyse en CPG après ce traitement, il se peut que qu'on observe la perte des terpènes volatils (monoterpènes). La disparition de ces composés peut être attribuée à l'évaporation qui intervient lors des 2 étapes du protocole.

II.1.4. Pyrolyse et dérivation « on line »

Le problème crucial pour l'analyse des exsudats polymériques comme ceux du type copal en CPG-SM est la faible volatilité, et très souvent l'insolubilité de ces exsudats dans les solvants usuels. A partir de techniques d'introduction spécifiques bien contrôlées comme la pyrolyse, la structure des polymères peut être identifiée. Cette technique de traitement d'échantillons a été appliquée avec succès dans la caractérisation des résines naturelles polymériques [Chiavari et al., 1995 ; 2002 ; Scalarone et al., 2003 ; Doménech- Carbó et al., 2009], des laques asiatiques [Raffaëly et al., 2005 ; Lu et al., 2006] et des polysaccharides [Fabbri and Chiavari, 2001].

Les différents types de pyrolyseurs ainsi que leur fonctionnement avec leurs avantages et leurs inconvénients ont été décrits dans la littérature [Tranchant, 1995]. Nous aborderons ici, le principe de fonctionnement de l'appareil dont nous disposons au laboratoire : le pyrolyseur à point de Curie.

II.1.4.1. Principe

Le pyrolyseur à point de Curie (figure 2.8) peut être fixé directement sur l'injecteur d'un chromatographe. Il comprend principalement l'injecteur de pyrolyse, constitué d'une chambre en verre terminée par une aiguille métallique, d'un tube de quartz et d'un porte-échantillon ferromagnétique, et une bobine inductive créant un champ magnétique fort. Une vanne à trois voies permet de faire circuler le gaz vecteur dans le système au moment de la pyrolyse, et d'entraîner les analytes vers la tête de colonne. Quand le porte-échantillon est soumis au champ magnétique puissant créé par la bobine inductive, sa température s'élève instantanément pour atteindre une valeur qui dépend de la nature de l'alliage. La température élevée provoque la dépolymérisation ou la décomposition thermique de l'échantillon. Les produits de la dépolymérisation ou de la décomposition entrent dans l'injecteur puis dans la

colonne du chromatographe [Whittenburg *et al.*, 1995; Stankiewicz, *et al.*, 1998; Vo Duy, 2007].

II.1.4.2. Dérivation « on line » pour Py-CPG-SM

Une dérivation « on line », peut être employée en parallèle avec le dispositif de pyrolyseur à point de Curie. Les bases d'hydroxyde d'ammonium quaternaire servent de réactifs de méthylation, le plus utilisé est l'hydroxyde de tétraméthylammonium (TMAH) [Asperger *et al.*, 2001; Chiavari *et al.*, 2003 ; Scalarone *et al.*, 2003]. Pour la silylation, on utilise soit le HMDS [Fabbri *et al.*, 2001 ; Chiavari *et al.*, 2002 ; Chiavari *et al.*, 2003] soit le BSTFA [Osete-Cortina *et al.*, 2005]. De manière pratique, un excès de réactif est introduit directement dans le porte-échantillon en même temps que l'échantillon. Les produits obtenus par pyrolyse réagissent immédiatement avec le réactif pour former des dérivés méthylés ou silylés.

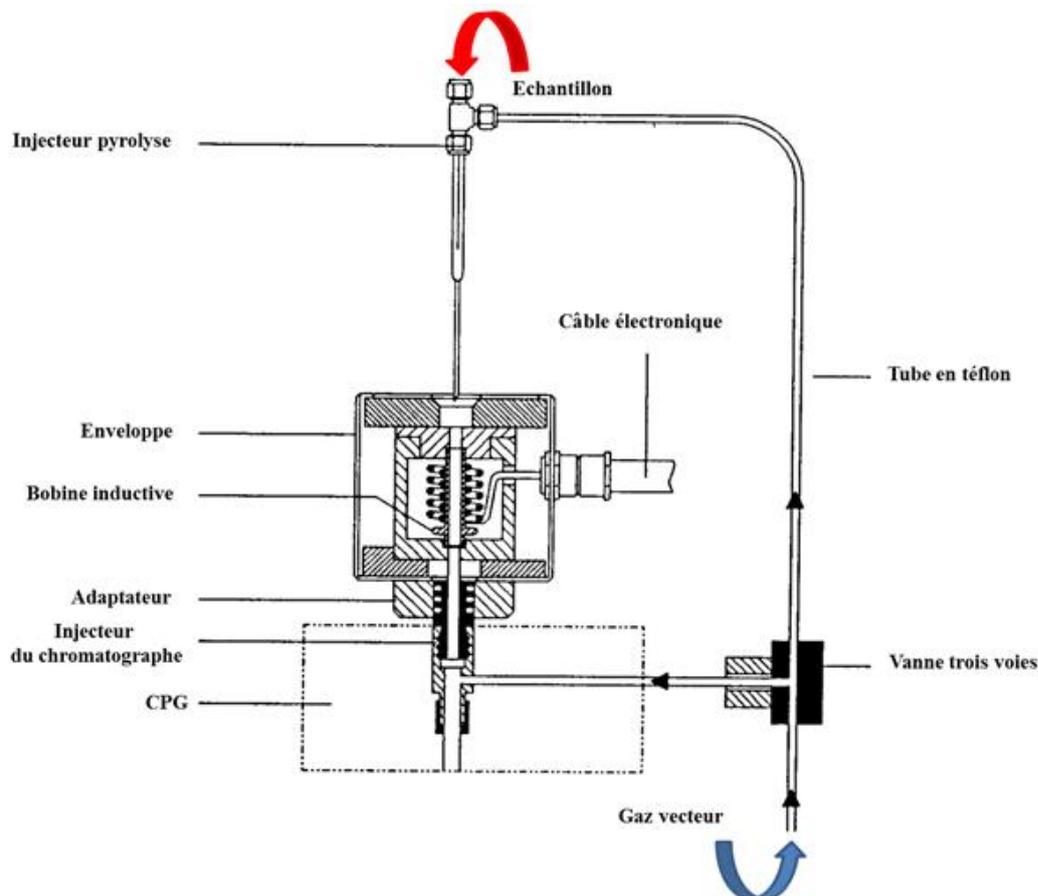


Figure 2. 8. Schéma d'un pyrolyseur à point de Curie installé sur l'injecteur d'un chromatographe en phase gazeuse

II.2. Techniques physico-chimiques d'analyse des exsudats des plantes

II.2.1. Techniques spectroscopiques

Certaines techniques analytiques telles que la spectrométrie de masse, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été utilisées pour caractériser les exsudats des plantes. Ces techniques simples et rapides à mettre en œuvre sont susceptibles de nous apporter les premières indications quant à la nature de l'exsudat. Il permet par la suite, d'orienter le choix de la technique de traitement d'échantillons et de la méthode d'analyse chromatographique.

II.2.1.1. Spectrométrie de masse directe

D'un point de vue analytique, la spectrométrie de masse présente deux qualités essentielles : la sélectivité et la sensibilité. Les méthodes d'introduction des échantillons dans le spectromètre de masse sont nombreuses et peuvent revêtir des formes variées.

Certaines techniques d'introduction directe en spectrométrie de masse (*Inlet-Mass direct Spectrometry* : DI-MS, *Exposure-Mass Direct Spectrometry* : DE-MS et *Direct Temperature Resolved Mass Spectrometry* : DTMS) ont démontré leur potentialité dans la caractérisation des substances résineuses dans le domaine archéologique et d'étude des œuvres d'art [Modugno et al., 2006 ; Ribechini et al., 2009].

Le principe de base de la spectrométrie de masse consiste à transformer une très petite quantité du composé à analyser en ions par un moyen adapté (ionisation, par impact électronique, chimique, par désorption...). Les ions formés sont séparés en fonction de leur rapport masse/charge, grâce à l'action, soit d'un champ magnétique, soit d'un champ électrique, soit d'une combinaison des deux. Après séparation, les ions terminent leur course en venant frapper le capteur d'un détecteur dont le signal est proportionnel aux charges des ions reçus.

Techniques de désorption-ionisation

Les techniques de désorption d'ions ont été développées pour analyser les composés de très faible tension de vapeur et thermosensibles. Ces techniques, notamment la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI, *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*) a été utilisée par [Scalarone et al. \(2005\)](#) pour caractériser les résines di- et triterpénoïdes naturelles utilisées comme vernis de peinture. Pour cette technique l'ionisation est provoquée par un faisceau laser (normalement un laser à l'azote). Une matrice est utilisée afin de protéger l'échantillon de la destruction par un faisceau direct et de faciliter la vaporisation et l'ionisation. C'est une technique alternative à la pyrolyse, les échantillons à analyser sont

directement introduits dans le spectromètre de masse (sans passer par une technique séparative). Elle permet une ionisation lente, les composés étant désorbés et pyrolysés pour les plus grosses molécules.

Les techniques d'introduction directe en spectrométrie de masse présentent plusieurs avantages. Elles sont:

- simples à mettre en œuvre ;
- rapides, (quelques minutes pour chaque analyse);
- sensibles (quelques nanogrammes d'échantillon suffisent pour acquérir de bons spectres);

L'un des inconvénients de ces techniques est que les spectres de masse obtenus sont complexes et souvent difficiles à interpréter. Toutefois, l'identification des ions spécifiques de certaines classes de métabolites secondaires peuvent donner une première idée concernant la composition chimique de l'exsudat. Ces techniques permettent clairement de différencier des exsudats résineux diterpénoïdes des triterpénoïdes [Ribechini, 2009].

II.2.1.2. Spectroscopie du moyen et du proche infrarouge

La spectroscopie infrarouge étudie les vibrations des molécules lorsqu'elles sont irradiées par une onde électromagnétique de fréquence adéquate. C'est une technique analytique utilisée dans la caractérisation des substances exsudées par les plantes, elle permet d'obtenir un spectre qui est la signature de l'échantillon à analyser [Guiliano et al., 2006 ; Daher et al., 2010]. Les radiations électromagnétiques du domaine infrarouge se subdivisent en trois zones (proche infrarouge, moyen infrarouge et lointain infrarouge) comme le montre la figure 2.9.



Figure 2. 9. Les différents domaines infrarouges

Principe

La SIR repose sur le principe que chaque groupement chimique présent dans une molécule absorbe différemment des radiations électromagnétiques de nombres d'ondes variables et avec des intensités différentes. Une fois l'énergie vibrationnelle absorbée ; les groupements chimiques présents dans la molécule se mettent à vibrer. De plus, si ces vibrations provoquent une variation rythmique du moment dipolaire de la molécule, on enregistre alors un spectre de vibration qui apparaît donc sous forme de bande.

La SPIR est une technique récente découverte en 1964, par le chercheur américain Karl Norris. En proche infrarouge, les produits absorbent beaucoup moins d'énergie que dans le moyen infrarouge. Les bandes d'absorption obtenues sont dues aux vibrations harmoniques et de combinaisons. L'utilisation de cette technique s'est largement répandue dans un grand nombre d'industries donnant lieu à des applications analytiques très diverses : industrie agroalimentaire, industrie pharmaceutique, industrie des polymères... [Ducauze, 2014].

La SPIR offre plusieurs avantages :

- mesures rapides, précises et non destructives ;
- possibilité d'analyser grand nombre d'échantillons sous différentes formes
- possibilité d'analyser les échantillons en mode transmission et réflexion
- pas de préparation de l'échantillon ;
- pas de problème avec le flaconnage en verre ;
- possibilité d'analyser en mode réflexion sans contact (peu d'influence du CO₂ ou de H₂O atmosphérique) ;
- coût de l'analyse modeste

Parmi les inconvénients nous pouvons citer :

- manque de corrélation structurale (difficultés pour l'interprétation des spectres) ;
- nécessité de calibrage pour les mélanges ;
- nécessité d'utilisation de méthode chimiométrique pour le traitement des données ;
- manque de bibliothèques de spectres diversifiées.

Dans le moyen infrarouge, l'énergie des photons modifie le terme vibrationnel et rotationnel. Les spectres obtenus sont les spectres de vibration-rotation [Rouessac, 2004]. L'un des avantages les plus significatifs de la SMIR est le fait qu'elle donne des spectres plus riches en informations structurales des échantillons examinés. C'est pour ce fait que dans le domaine infrarouge, elle reste la technique la plus utilisée pour la caractérisation des exsudats des plantes.

En spectroscopie infrarouge, les spectres des échantillons examinés sont alors acquis soit par transmission, soit par réflexion.

a) Transmission

Les exsudats résineux des plantes peuvent être analysés avec cette technique. Cependant, les analyses en transmission nécessitent une préparation préalable de l'échantillon. C'est une technique destructive. En effet, les exsudats résineux solides sont d'abord broyés et réduits en

poudre fine puis dispersés dans un milieu transparent en infrarouge (KBr, ZnSe, CaF₂, BaF₂...). Lorsqu'on utilise le KBr, le mélange est broyé dans un mortier en agate puis comprimé sous forme d'un petit disque translucide à l'aide d'une presse hydraulique ou manuelle (pression de 5 à 8 t.cm⁻²). Le faisceau infrarouge traverse l'échantillon et l'énergie provenant de ce dernier est mesurée. La transmission T est donc une mesure de l'atténuation d'un faisceau lumineux monochromatique. Elle est basée sur la comparaison entre l'intensité du faisceau lumineux transmis (I) et l'intensité du faisceau lumineux incident (I₀) selon l'équation (2.6) :

$$T = \frac{I}{I_0} \text{ ou } \%T = \frac{I}{I_0} \times 100 \quad (2.6)$$

Cette méthode est bien adaptée aux échantillons gazeux, liquides et solides. Cependant, le broyage et le pressage peuvent modifier la nature physico-chimique de l'échantillon examiné. De plus, il s'applique difficilement aux échantillons très absorbants ou ne pouvant pas être broyés.

b) Réflexion Totale Atténuée (ATR, *Attenuated Total Reflection*)

Le principe de cette méthode est l'utilisation d'un cristal dont l'indice de réfraction doit être supérieur à celui de l'échantillon. Lorsque la lumière est totalement réfléchie à l'interface cristal-échantillon, une onde évanescente est créée. C'est cette onde qui pénètre dans l'échantillon comme le montre la figure 2.10. L'échantillon absorbe plus ou moins l'onde évanescente en fonction de la longueur d'onde λ . Le spectre d'absorption en moyen infrarouge en ATR est donc l'évolution de la réflectance R en fonction du nombre d'onde σ .

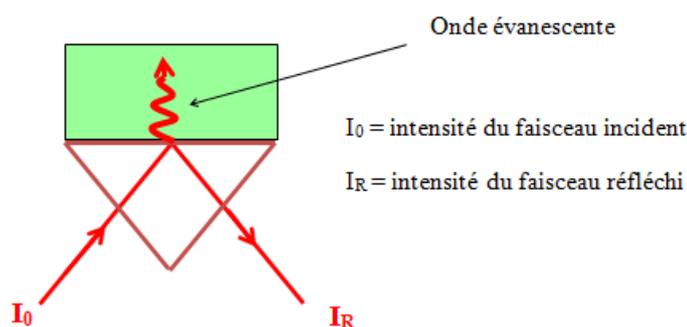


Figure 2. 10. Principe de la réflexion totale atténué (ATR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) utilisant la technique de l'ATR est une méthode de choix pour la caractérisation des différents types d'exsudats notamment pour trois raisons principales :

- elle permet d'analyser aussi bien des échantillons solides, liquides et pâteux ;

- elle nécessite des quantités d'échantillons très faibles ;
- elle est très rapide et ne nécessite pas de mise en forme particulière de l'échantillon.

C'est une technique reproductible.

L'inconvénient de la technique de réflexion totale atténuée est souvent, la qualité du contact entre le cristal et l'échantillon, jouant un rôle important sur la qualité du spectre; un mauvais contact réduit la réflexion totale atténuée et favorise des artefacts comme des lignes de base irrégulières et entraîne l'observation de peu de bandes vibrationnelles.

c) Réflexion Diffuse

Dans cette méthode, le faisceau infrarouge est focalisé sur un matériau constitué de fines particules, le faisceau incident pénètre dans le matériau. Il en résulte une diffusion de la lumière. C'est la réflexion diffuse qui résulte de multiples réflexions, réfractions et diffractions sur des particules orientées de façon aléatoire. Cette méthode rapide est bien adaptée à l'étude des échantillons organiques. Cependant, l'un de ces inconvénients c'est le risque de distorsion des bandes d'absorption.

II.2.1.3. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) est un outil de caractérisation et d'identification de différentes substances organiques. Elle permet l'étude des composés en solution ou à l'état solide, et est très vite devenue une méthode spectroscopique polyvalente irremplaçable dans divers secteurs de la chimie. Cette technique étudie l'absorption moléculaire dans le domaine des fréquences radio, de l'ordre du méga hertz (MHz).

Les spectres RMN des exsudats des plantes correspondent à la somme des spectres individuels de chacun des composants du mélange pondéré par leur abondance relative. Cela mène à des spectres en général, difficilement interprétables. Cependant, l'analyse par spectroscopie RMN des matières exsudées par les plantes a été rapportée par plusieurs auteurs [Tchapla *et al.*, 1999 ; Lambert *et al.*, 2005 ; Santiago-Blay & Lambert, 2007]. Par exemple, la RMN ^{13}C à l'état solide a été utilisée pour spécifier les types d'exsudats (gomme, résine, gomme-résine, latex...) [Lambert *et al.*, 2005]. En rapprochant les signatures spectrales des résines anciennes de celles des exsudats de plantes actuelles obtenues en RMN ^{13}C et RMN ^1H , Santiago-Blay & Lambert (2007) ont montré qu'il est possible de déterminer la famille botanique de la plante à l'origine d'un ambre ancien.

II.2.2. Techniques chromatographiques

Plusieurs techniques chromatographiques ont été utilisées pour la séparation, l'identification et/ou la quantification des différents constituants des exsudats des plantes. Parmi ces techniques on peut citer la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle (GCxGC) et la chromatographie en phase liquide (CPL).

II.2.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une technique sensible et peu coûteuse. Les principaux mécanismes mis en jeu sont le partage et l'adsorption. La phase stationnaire de faible épaisseur (100-200 μm) est déposée de façon homogène sur un support plan (verre, aluminium, plastique). La phase mobile ou éluant se déplace alors uniquement par l'effet de capillarité. Après le dépôt de l'échantillon, l'entraînement par la phase mobile et la révélation post-chromatographique, la plaque présente alors autant de tâches que de composés séparés (figure 2.11).

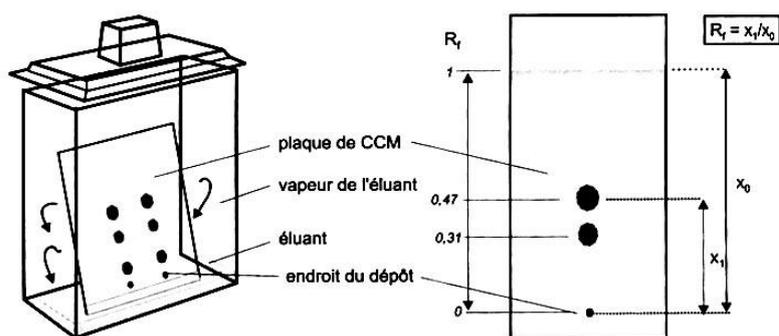


Figure 2. 11. Développement d'un chromatogramme

Pour chaque composé, on définit le rapport frontal (R_f) par la formule ci-dessous :

$$R_f = \frac{x_1}{x_2} \quad (2.7)$$

Avec :

x_1 : la distance parcourue par le soluté ;

x_2 : la distance parcourue par le front de solvant

Aujourd'hui, la chromatographie sur couche mince s'est imposée comme une méthode d'analyse et de contrôle de différents échantillons dans plusieurs domaines. En analyse des extraits des plantes, elle permet de mettre en évidence la présence des différentes classes de métabolites primaires et secondaires, après pulvérisation avec un réactif spécifique.

Cette méthode analytique simple et pratique, a été utilisée pour l'identification sans ambiguïté des résines Oliban provenant du genre *Boswellia* (*Boswellia serrata* Roxb, *Boswellia papyrifera* Hochst et *Boswellia carterii* Birdw) connues pour leurs activités anti-inflammatoire, antimicrobienne et anti-tumorale [Paul et al., 2012].

II.2.2.2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est aujourd'hui, l'une des techniques les plus utilisées en chimie analytique. Elle permet la séparation des composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. De plus elle permet l'analyse de mélanges éventuellement très complexes de nature et de volatilité très diverses. Par ailleurs, le processus de séparation en CPG est basé sur la distribution des constituants du mélange entre deux phases. L'une stationnaire située dans la colonne et l'autre mobile (un gaz, le plus fréquemment: N₂, H₂, He). Une très petite quantité d'échantillon est introduite dans l'injecteur de l'appareil à l'aide d'une seringue. Les constituants du mélange sont ensuite vaporisés au niveau de l'injecteur et entraînés en tête de colonne par un courant de gaz vecteur. Selon leur affinité pour la phase stationnaire, les constituants du mélange, partis en même temps de l'injecteur, vont se détacher les uns des autres dans la course à travers la colonne. Les constituants séparés sont enregistrés par un organe essentiel appelé détecteur, qui évalue en continu la quantité de chacun des constituants séparés.

- **Systèmes d'injection en CPG et leurs intérêts**

En CPG, le mode d'injection doit tenir compte de l'état physique de l'échantillon. Un système d'injection idéal doit remplir un certain nombre de critères. Parmi lesquels :

- assurer une récupération la plus complète possible de l'échantillon, sans discriminer les analytes, selon leurs poids moléculaires ;
- permettre une analyse quantitative en assurant une répétabilité significative ;
- ne pas avoir un volume mort trop important afin d'éviter l'élargissement de bande d'injection ;
- être simple à utiliser

Les types d'injecteurs couramment utilisés dans l'analyse des exsudats sont l'injecteur :

- split (injection avec division) ;
- splitless (injection sans division) ;
- on-column (injection dans la colonne).

Le principe de fonctionnement de ces différents systèmes d'injection a longuement été décrit [Tranchant, 1995]. Le tableau II.2 donne quelques avantages et inconvénients de chaque système d'injection.

Tableau II. 2. Avantages et inconvénients de chaque système d'injection [Tranchant, 1995]

Modes d'injection	Avantages	Inconvénients
Split	possibilité d'analyser les échantillons concentrés sans dilution ; possibilité de faire de l'analyse isotherme rapide ; possibilité de faire varier la quantité à injecter et le rapport de division	impossibilité d'analyser des composés dilués ou à l'état de trace ; possibilité d'entraîner des erreurs de quantification ; dégradations de certains composés.
Splitless	analyse des échantillons dilués sans traitements préalables ; possibilité d'injecter les gaz par la technique de piégeage à froid ; vaporisation très rapide de l'échantillon pas nécessaire.	difficulté de reproduire les temps de rétention des produits situés au début du chromatogramme.
On-column	pas de discrimination due à la vaporisation ; possibilité d'analyser les composés plus lourds ; contrôle avec précision de la quantité d'échantillon injecté ; adapté à l'analyse des constituants thermolabiles ; permet d'injecter de grands volumes de solvants	accumulation des produits non volatils dans la colonne ; ne convient pas à l'analyse des échantillons concentrés

- **Détecteur en CPG**

Le détecteur à ionisation de flamme (*FID : Flame Ionization Detector*) est l'un des détecteurs les plus utilisés. Son principe consiste à ioniser les molécules organiques éluées en les envoyant dans une flamme air/H₂ entre deux électrodes auxquelles est imposée une certaine polarisation. Le FID a l'avantage d'avoir : une grande sensibilité, une bonne linéarité, et un volume mort très faible. De plus, il est non spécifique car il peut déceler pratiquement tous les composés organiques combustibles et facilement ionisables. Malgré ces avantages, les informations apportées par CPG-FID quant à la nature des solutés séparés sont nulles. Elles se réduisent à la valeur du temps de rétention et donc de l'indice de Kovats. L'association de la CPG avec la spectrométrie de masse (CPG-SM) va donc répondre à ce besoin. En CPG-SM, les constituants séparés à la sortie de la colonne, sont introduits sous un vide poussé dans la source du spectromètre pour être ionisés (Figure 2.12). L'ionisation dans ce cas peut se faire suivant deux modes :

1. En impact électronique (IE)

L'ion moléculaire M^+ est formé initialement par collision entre la vapeur du soluté de masse M avec un flux d'électrons (figure 2.12). Les électrons sont émis d'un filament (en tungstène ou en rhénium) chauffé sous vide et accélérés sous une différence de potentiel variable mais en général de 70 V. L'excès d'énergie reçue par les molécules ainsi ionisées, entraîne la rupture de liaisons chimiques et conduit à des fragments chargés. Tous ces ions ainsi formés sont triés en fonction de leur rapport m/z par un système analyseur approprié et ensuite enregistrés. Le tracé du chromatogramme est effectué par l'ordinateur en sommant les intensités des fragments à tout moment. L'IE fournit beaucoup d'informations structurales et pour les composés fragiles, le pic de l'ion moléculaire est souvent absent du spectre de masse. Cet inconvénient peut être évité en utilisant l'ionisation chimique.

2. En ionisation chimique (IC)

L'ionisation chimique est une « ionisation douce ». Elle repose sur des réactions entre ions réactifs tels que CH_5^+ ou NH_4^+ présents en large excès dans la source. Les ions adduits sont extraits de la source au fur et à mesure de leur formation, accélérés et focalisés jusqu'à l'analyseur par un jeu de lentilles électrostatiques.

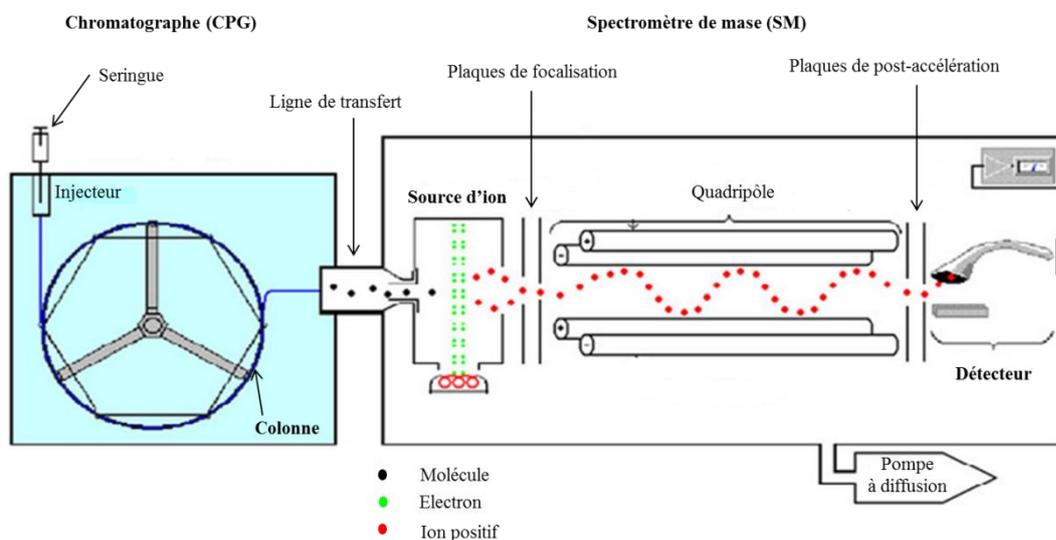


Figure 2. 12. Schéma du principe d'un CPG-SM (ionisation en mode impact électronique)

L'approche analytique la plus largement adoptée pour l'étude des exsudats des plantes, notamment ceux du type résine, est la CPG-SM [Mills & White, 1994 ; Méjanelle, 1996 ; Tchaplal et al., 1999 ; Hamm et al., 2005 ; Vo Duy, 2007 ; Siani et al., 2012], car elle permet

de déterminer la composition chimique de ces mélanges complexes et, par conséquent l'identification des marqueurs potentiels caractéristiques de l'échantillon à analyser.

II.2.2.3. Chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle (GCxGC)

La chromatographie en phase gazeuse est un outil puissant adapté à l'analyse des mélanges complexes [Cordero *et al.*, 2006]. Cela en raison de son potentiel de séparation élevé. Elle peut donc être appliquée à l'analyse des exsudats, car il est souvent difficile de séparer tous les composants de l'échantillon par des techniques classiques (CPG-FID ou CPG-SM). En particulier, des constituants mineurs qui peuvent avoir des propriétés pharmacologiques intéressantes et qui peuvent co-éluer avec des analytes les plus abondants. Pour pallier à ce problème, la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle est un outil intéressant.

Les travaux de Gidding (1967) illustrent parfaitement ce phénomène. Les colonnes capillaires modernes possèdent plus de 100000 plateaux théoriques. Cependant, si on veut séparer entièrement, avec une probabilité de séparation de 99%, un mélange de cent constituants, il est alors nécessaire d'employer une colonne de 500 millions de plateaux [Bartle, 2002].

L'utilisation de détecteurs spécifiques peut, en partie, apporter une solution, mais si l'objectif est d'obtenir un spectre de masse sans pollution pour une analyse qualitative, le problème persiste. Pour le résoudre, la mise en place de deux séparations consécutives sur deux colonnes de nature différente est une alternative intéressante [Fernandez & Breme, 2012].

- **Principe de la GCxGC**

La GCxGC est une technique de séparation en phase gazeuse au cours de laquelle un échantillon est soumis à deux procédés de séparation orthogonaux. Les deux colonnes sont connectées en série via un modulateur. Les composés élués de la première colonne sont piégés par le modulateur, refocalisés et injectés en continu dans la seconde colonne plus courte. La seconde séparation est réalisée dans une durée correspondant à une période de modulation (pendant que la coupe suivante est piégée). La séparation dans cette deuxième colonne extrêmement rapide ne dure que 1 à 10 s alors que la séparation dans la première colonne dure 45 à 120 min [Dallüge *et al.*, 2003]. La figure 2.13 illustre le principe de la GCxGC.

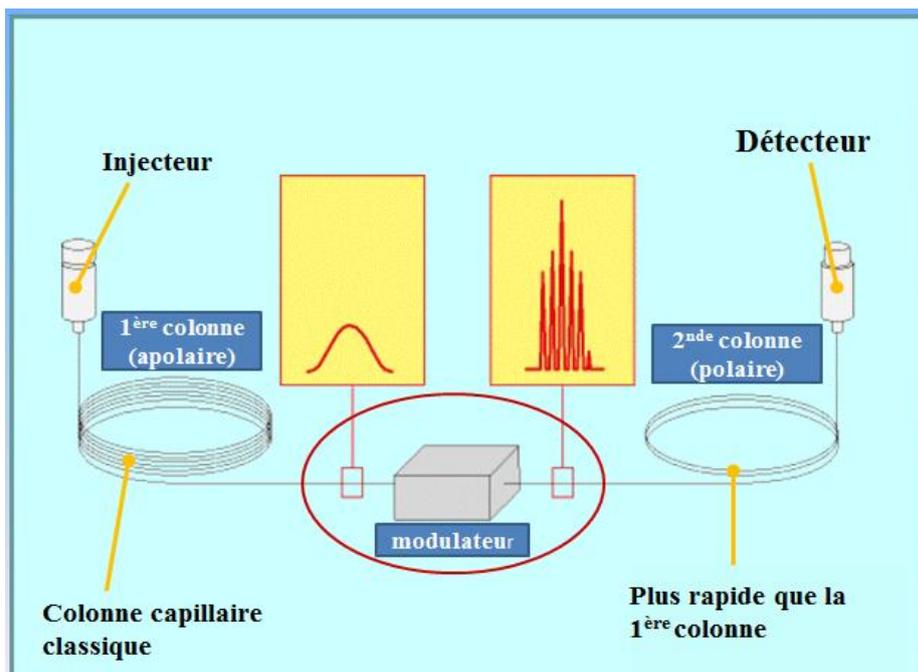


Figure 2. 13. Schéma du principe de la GCxGC

1. Orthogonalité et sélection de colonne

Pour avoir une séparation dite orthogonale dans un système GCxGC, il faut que les mécanismes de rétention dans la première et la deuxième dimension soient indépendants. Pour une séparation en programmation de température, cette condition d'orthogonalité est réalisée par l'utilisation de colonnes dont les phases stationnaires sont de natures chimiques différentes. Généralement, les systèmes de GCxGC associent une première colonne (15-30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) de phase stationnaire apolaire (100% diméthylpolysiloxane, 5% phénylène-95% diméthylpolysiloxane) et une deuxième colonne (1-2 m x 0,1 mm x 0,1 µm) de phase stationnaire polaire. Les phases stationnaires polaires les plus utilisées sont: 35 à 50% phénylène-65 à 50% diméthylpolysiloxane, le polyéthylèneglycol (Carbowax), la carborane (HT-8) et la cyanopropyl-phényl-diméthylpolysiloxane [Dallüge et al., 2003].

En CPG, le facteur de rétention d'un soluté est inversement proportionnel au produit de sa tension de vapeur et de son coefficient d'activité dans la phase stationnaire à dilution infinie. Dans la première colonne de phase stationnaire apolaire, la rétention est gouvernée principalement par la tension de vapeur. Les analytes sont donc séparés par température d'ébullition croissante. Cependant, dans la seconde colonne polaire, la séparation est très rapide et a donc lieu dans des conditions pratiquement isothermes, compte tenu de la faible rampe de température (~2°C/min). La température d'ébullition des analytes n'a plus

d'influence sur la rétention, la séparation dans la deuxième colonne est donc uniquement gouvernée par leur coefficient d'activité. Le chromatogramme est donc structuré selon les propriétés physico-chimiques des analytes de l'échantillon: tension de vapeur et polarité [Bertoncini et al., 2005].

2. Fonctions du modulateur

Le modulateur est considéré comme étant le « cœur » d'un système GCxGC car c'est l'élément principalement responsable d'une bonne séparation orthogonale des analytes de l'échantillon. Le modulateur remplit trois fonctions principales, il permet : (1) d'accumuler en continu ou de retenir l'effluent issu de la première colonne tandis que la première séparation se produit; (2) de focaliser l'effluent collecté pour chaque coupe sur une bande très étroite ; (3) d'injecter des bandes séquentiellement sur la seconde colonne, ce qui entraîne une séparation supplémentaire pour chaque bande injectée.

Pour obtenir une résolution optimale, le critère de Murphy préconise un échantillonnage d'au moins trois fractions par pic de première dimension [Murphy et al., 1998]. En pratique, le modulateur fonctionne à une fréquence constante de 0,1 à 1,0 Hz [Dallüge et al., 2003]. La fréquence d'échantillonnage ou Période de Modulation (P_M) doit être très courte en GCxGC car, tous les composés de la première bande d'éluion doivent être élués avant l'injection de la seconde, afin d'éviter les phénomènes de chevauchement (ou wrap-around).

Il existe différents types de modulateurs. On peut les classer en cinq grands groupes selon la chronologie des avancées technologiques : (1) les modulateurs chauffants mécaniques ; (2) les modulateurs à vanne; (3) les modulateurs cryogéniques mécaniques ; (4) les modulateurs à jets cryogéniques; (5) les systèmes microfluidiques à modulation de flux.

Le modulateur cryogénique à double jets de dioxyde de carbone est celui dont nous disposons au laboratoire, il est couramment utilisé du fait de sa robustesse et de son fonctionnement simple (Figure 2.14). Ce modulateur est constitué de deux électrovannes distantes l'une de l'autre de quelques centimètres, qui fonctionnent en opposition de phases. Dans un premier temps, le jet de CO₂ de droite va permettre le piégeage et la focalisation des analytes par refroidissement de la colonne. Puis le jet se ferme pour permettre aux analytes précédemment piégés d'être injectés dans la seconde colonne. Au même moment, le jet de gauche s'ouvre pour éviter que des fractions de la première colonne interfèrent avec la fraction piégée précédemment. Ensuite, le jet de gauche se referme pour laisser passer les composés jusqu'au jet de droite ouvert. Ainsi commence un nouveau cycle de modulation. Le CO₂ permet de maintenir la température de modulation entre -60°C et -30°C en fonction du diamètre du

capillaire utilisé pour la détente. Un schéma du modulateur à double jet de CO₂ et de son fonctionnement est représenté sur la figure 2.14.

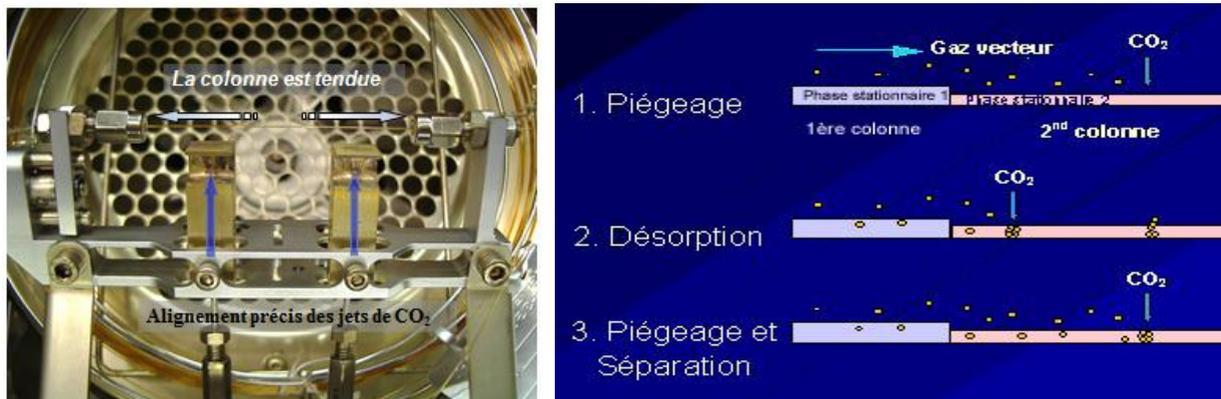


Figure 2. 14. Schéma du principe d'un modulateur à double jet cryogénique de CO₂ avec les différentes étapes de la modulation

La visualisation des résultats est généralement effectuée sous forme de « colour plot » ou par une représentation tridimensionnelle illustrant le pouvoir séparatif de la technique et la structuration par famille des analytes ainsi séparés (figure 2.15).

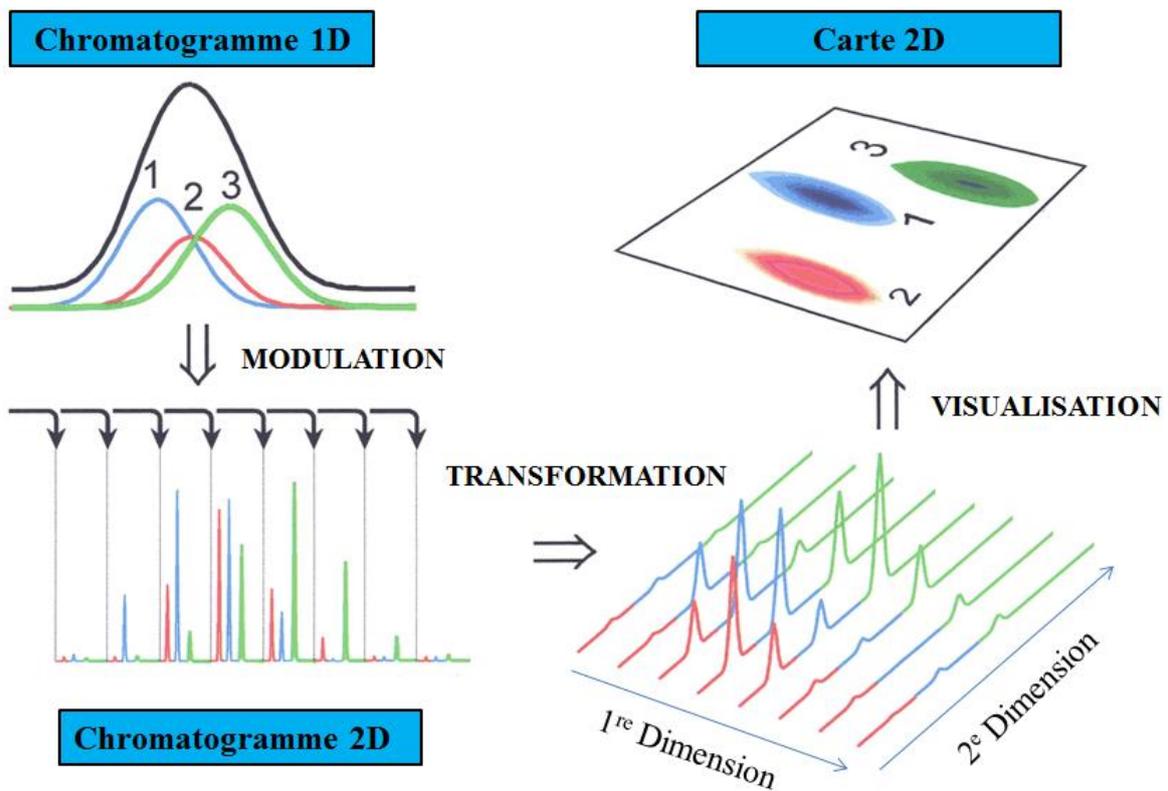


Figure 2. 15. Visualisation des chromatogrammes obtenus par retraitement du signal

- **Détecteur en GCxGC**

Les conditions «fast GC» imposées par la colonne de deuxième dimension et la largeur des pics résultant de la modulation de l'ordre de 100 à 200 ms nécessitent donc l'emploi d'un détecteur à haute fréquence d'acquisition pour obtenir une reconstruction correcte du chromatogramme. Les détecteurs les plus couramment utilisés en chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle sont le détecteur à ionisation de flamme (FID) et le spectromètre de masse de type quadripôle ou à temps de vol. Le FID a l'avantage d'être performant en termes de vitesse d'acquisition car il peut atteindre, suivant les fabricants, des fréquences de l'ordre de 250-300 Hz. Il permet aussi d'obtenir une analyse plus réaliste en termes de quantification relative des analytes par rapport à un spectromètre de masse, mais son inconvénient est qu'il n'apporte aucune information quant à la structure des analytes. L'utilisation d'un détecteur spectrométrique, en particulier un spectromètre de masse quadripôle ou à temps de vol est donc indispensable pour permettre l'identification de nombreux analytes séparés. Beaucoup de systèmes GCxGC sont équipés d'un analyseur de masse quadripolaire car ils sont plus abordables financièrement que le spectromètre à temps de vol. Cependant, un des inconvénients c'est que sa vitesse d'acquisition est modérée. Pour la GCxGC, le spectromètre de masse à temps de vol constitue certainement le système de détection le plus puissant [Dallüge et al., 2002]. Cependant, en raison de leur coût, peu de laboratoires disposent d'un GCxGC-TOFMS. L'avantage du spectromètre à temps de vol est que sa vitesse d'acquisition est plus élevée et donc sa sensibilité accrue. Par contre, son inconvénient c'est qu'il fournit des spectres de masse sensiblement différents, ce qui rend l'identification difficile lorsqu'on utilise des banques de données commerciales.

À notre connaissance, aucune étude portant sur la caractérisation de la fraction peu volatile des exsudats par cette technique n'a été rapportée dans la littérature. Cela peut être dû à la limitation de montée en température imposée par la colonne de deuxième dimension.

II.2.2.4. Chromatographie en phase liquide (CPL)

On trouve dans la littérature quelques travaux en chromatographie en phase liquide [Rhourri-Friha et al., 2012 ; Hovaneissian et al., 2008 ; 2006 ; Mathe et al., 2004]. La CPL offre la possibilité d'agir de manière très précise sur la sélectivité par le choix de la colonne et de la composition de l'éluant [Rouessac, 2004]. Cela augmente les approches séparatives et permet d'éviter les étapes de dérivation qui peuvent s'avérer fastidieuses surtout lorsque le nombre d'échantillons est considérable. De plus, elle est surtout adaptée à l'analyse de composés thermosensibles, peu ou non volatils, de haut poids moléculaire et de polarité élevée que l'on

peut retrouver dans certains types d'exsudats. A cela, il faut ajouter le fait qu'elle offre des possibilités de transposition à l'échelle préparative.

Dans le cas de l'étude des exsudats, la séparation a été faite sur des phases stationnaires de polarité inverse comme LiChroCART Superspher (5 µm 100 RP-18 250 mm x 4 mm), HyPurity C18 (5 µm 250 mm x 4 mm), Hypersil ODS (5 µm 250 mm x 4,6 mm)... Les analytes sont élués avec un mélange eau-méthanol-acides (acide, formiques, trifluoroacétique...). Dans l'étude des exsudats des plantes en chromatographie en phase liquide, plusieurs types de détecteurs ont été utilisés.

Les travaux récents de [Rhourrhi-Friha \(2009\)](#) ont permis de développer une méthode d'analyse de triterpènes présents dans les exsudats résineux des plantes en CPL-SM. Ces résultats ont montré que la source à photoionisation paraît plus sensible que l'APCI pour les triterpènes en mode négatif. Il en ressort de cette étude que les deux sources APPI et APCI sont bien adaptées pour l'analyse des triterpènes dans des matrices végétales.

Par ailleurs, la chromatographie liquide à haute performance associée à un détecteur spectrophotométrique à barrette de photodiodes est une technique de choix utilisée dans la caractérisation des exsudats résineux de type baume. Malgré le fait qu'elle est applicable à l'étude des résines phénoliques, elle reste, cependant sans intérêt majeur pour la caractérisation des résines triterpéniques. En effet la difficulté vient du fait que les seuls groupements chromophores présents dans ces composés absorbent dans les mêmes zones que les solvants utilisés comme éluants. De plus sa sensibilité dépend de la longueur d'onde utilisée. Pour pallier à ce problème, les détecteurs fluorimétriques ont été aussi utilisés. Ces types de détecteurs ont l'avantage d'être plus sensibles que les détecteurs photodiodes. A cela on peut ajouter le fait que l'intensité de fluorescence d'un composé est directement liée à sa concentration, d'où la possibilité de faire de l'analyse quantitative. Cependant, les composés triterpéniques présents dans la plupart des exsudats résineux ne sont pas fluorescents. En effet, l'analyse de ces exsudats par CHPL/Fluorimétrie ne peut se faire que par le biais d'une dérivaison ou d'une association avec une autre molécule fluorescente. On peut greffer par exemple sur les analytes un réactif fluorophore par réaction chimique : c'est la dérivaison de fluorescence. [Aksamija \(2012\)](#) a montré qu'il était possible de caractériser trois types de résines avec cette technique, après réaction avec le chlorure de dansyle.

Conclusion

La caractérisation des substances exsudées par les plantes est un grand défi pour l'analyste. En effet la complexité de leur composition chimique, et le fait qu'elle dépend de leurs origines botanique et géographique rendent ce travail difficile. A cela, il faut également tenir compte du fait que la composition chimique de ces exsudats évolue avec le temps en raison du processus d'oxydation et de polymérisation. De plus, les procédés d'extraction utilisés peuvent modifier leur composition chimique. Dans ce chapitre, il était question de passer en revue les différentes techniques de caractérisation des exsudats des plantes. Les avantages et les inconvénients de chaque technique ont été abordés. Quelques travaux illustrent l'utilisation de certaines techniques évoquées. A l'issue de ce chapitre, il en ressort que la caractérisation totale d'un exsudat avec une seule technique analytique est quasi impossible. La stratégie la plus efficace doit être multi-analytique et adaptée à chaque type d'exsudat.

Références Bibliographiques (partie I)

Articles et revues scientifiques

Aldai N., Osoro K. Barrón L.J., Nájera A.I. (2006). Gas-liquid chromatographic method for analysing complex mixtures of fatty acids including conjugated linoleic acids (cis9trans11 and trans 10 cis 12 isomers) and long-chain (n-3 or n-6) polyunsaturated fatty acids: Application to the intramuscular fat of beef meat. *Journal of Chromatography A*, 1110: 133-139.

Al-Harrasi A., Al-Saidi S. (2008). Phytochemical Analysis of the Essential Oil from Botanically Certified Oleogum Resin of *Boswellia sacra* (Omani Luban). *Molecules* 13: 2181-2189.

Alma M.H., Nitz S., Kollmannsberger H., Digrak M., Tuncayefe F. and Yilmaz N. (2004). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential Oils from the Gum of Turkish Pistachio (*Pistacia vera* L.). *J. Agric. Food Chem.* 52:3911-3914.

Asperger A., Engewald W. and Fabian G. (2001). *Thermally assisted hydrolysis and methylation- a simple and rapid online derivatization method for the gas chromatographic analysis of natural waxes.* *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 61(1-2): 91-109.

Assimopoulou A.N. and Papageorgiou V.P. (2005). GC-MS analysis of penta-and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part II. *Pistacia terebinthus* var. Chia. *Biomed. Chromatogr.* 19: 586-605.

Arthur C.L., Pawliszyn J. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* 62: 2145-2148.

Banno N., Akihisa T., Yasukawa K., Tokuda H., Tabata K. (2006). Anti-inflammatory activities of the triterpene acids from the resin of *Boswellia carteri*. *Journal of Ethnopharmacology* 107: 249-253.

Basile A.C., Sertié J.A.A., Freitas P.C.D., Zanini A.C. (1988). Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *Copaifera*. *J. Ethnopharmacol.* 22: 101-109.

Bevan C., Ekong D., and Okogun J. (1968). "West African Timbers. Part XXI. Extractives from *Daniellia* Species. The Structure of a New Diterpene, Ozic Acid." *J. Chem. Soc. C*: 1063-1066.

Bleton J., Mejanelle P., Sansoulet J., Goursauda S., Tchaplal A. (1996). Characterization of neutral sugars and uronic acids after methanolysis and trimethylsilylation for recognition of plant gums. *Journal of Chromatography A*, 720: 27-49.

- Brody R.H.**, Edwards H.G.M., Pollard A.M. (2001). *A study of amber and copal samples using FT-Raman spectroscopy. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 57(6): 1325-1338.
- Cannac M.**, Barboni T., Ferrat L., Bighelli A., Castola V., Costa J., Trecul D., Morandini F., Pasqualini V. (2009). *Forest Ecology and Management* 257: 1247-1254.
- Cartoni G.**, Russo M.V., Spinelli F., Talarico F. (2004). GC-MS characterisation and identification of natural terpenic resins employed in works of art. *Annali di Chimica* 94: 767-782.
- Case R.J.**, Tucker A.O., Maciarello M.J., and Wheeler K.A. (2003). Chemistry and ethnobotany of commercial incense copals, copal blanco, copal oro, and copal negro, of North America. *Economic Botany* 57: 189-202.
- Chiavari G.** and Prati S. (2003). Analytical pyrolysis as diagnostic tool in the investigation of works of art. *Chromatographia* 58: 543-554.
- Chiavari G.**, Fabbri D. and Prati S. (2002). Characterisation of natural resins by pyrolysis-silylation. *Chromatographia* 55: 611-616.
- Chiavari G.**, Fabbri D., Mazzeo R., Bocchini P., Galletti G.C.(1995). Pyrolysis Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Natural Resins Used for Artistic Objects. *Chromatographia* 41: 273-281.
- Cordero C.**, Rubiolo P., Sgorbini B., Galli M., Bicchi C. (2006). Comprehensive two-dimensional gas chromatography in the analysis of volatile samples of natural origin: A multidisciplinary approach to evaluate the influence of second dimension column coated with mixed stationary phases on system orthogonality. *J Chromatogr A* 1132: 268-279.
- Craveiro A.A.**, Matos F.J.A., Alencar J.W. (1989). *Microwave extraction of an essential oil. Flavour and Fragr. J.* 4: 43-44.
- Cruz-Canizares J.**, Domenech-Carbo M.T., Gimeno-Adelantado J.V., Mateo-Castro R. and Bosch-Reig F. (2005). Study of Burseraceae resins used in binding media and varnishes from artworks by gas chromatography-mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1093: 177-194.
- Daher C.**, Paris C., Le Hô A.S., Bellot-Gurlet L. and Echard J.P. (2010). A joint use of Raman and infrared spectroscopies for the identification of natural organic media used in ancient varnishes. *J. Raman Spectrosc.* 41: 1494-1499.
- Dallüge J.**, Beens J., Brinkman U.A.T. (2003). Comprehensive two-dimensional gas chromatography: powerful and versatile analytical tool. *J. Chromatogr. A* 1000: 69-108.
- Dallüge J.**, Van Rijn M., Beens J., Vreuls R.J.J. and Brinkman U.A.T. (2002). Comprehensive

two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection applied to the determination of pesticides in food extracts. *J. Chromatogr. A* 965: 207-217.

Daoubi M., Marquez N., Mazoir N., Benharref A., Hernandez-Galan R., Munoz E. and Collado I. G. (2007). Isolation of new phenylacetylating derivatives that reactivate HIV-1 latency and a novel spirotriterpenoid from *Euphorbia officinarum* latex. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15 : 4577-4584.

De Rodriguez J.D. & Kuruvadi S. (1999). Comparison of Soxhlet and Homogenizer Extraction Methods to Determine Rubber and Resin Content of Mexican Guayule Plants. *Bioresource Technology* 35: 179-183.

Doménech-Carbó M.T., de la Cruz-Canizares J., Osete-Cortina L., Doménech-Carbó A., Davida H. (2009). Ageing behaviour and analytical characterization of the Jatobá resin collected from *Hymenaea stigonocarpa* Mart. *International Journal of Mass Spectrometry* 284: 81-92.

Dubey V.K., Jagannadham M.V. (2003). Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. *Phytochemistry* 62: 1057-1071.

Fabbri D. and Chiavari G. (2001). Analytical pyrolysis of carbohydrates in the presence of hexamethyldisilazane. *Analytica Chimica Acta* 449: 271-280.

Fakunle C., Connolly J.D. and Rycroft D.S. (1989). The structure of enukokurin, a new jatrophane diterpenoid from the latex of *euphorbia lateriflora*. *Journal of Natural Products* 52: 279-283.

Giddings JC. (1967). Maximum number of components resolvable by gel filtration and other elution chromatographic methods. *Anal. Chem.* 39: 1027-1028.

Giner J., Berkowitz J.D., and Andersson T. (2000). Nonpolar Components of the Latex of *Euphorbia peplus*. *J. Nat. Prod.* 63: 267-269.

Guiliano M., Asia L., Onoratini G., Mille G. (2007). Applications of diamond crystal ATR FTIR spectroscopy to the characterization of ambers. *Spectrochimica Acta Part A* 67: 1407-1411.

Guiliano M., Mille G., Onoratini G., Simon P. (2006). Présence d'ambre dans le Crétacé supérieur Santonien de La Mède à Martigues (S-E de la France) Caractérisation IRTF. *C.R. Palevol* 5: 851-858.

Hamm S., Bleton J., Connan J., Tchaplal A. (2005). A chemical investigation by headspace SPME and GC-MS of volatile and semivolatile terpenes in various olibanum samples. *Phytochemistry* 66: 1499-1514.

- Hamm S.**, Bleton J., Tchaplà A. (2004). Headspace solid phase microextraction for screening for the presence of resins in Egyptian archaeological samples. *J. Sep. Sci.* 27: 235-243.
- Hamm S.**, Lesellier E., Bleton J., Tchaplà A. (2003). Optimization of headspace solid phase microextraction for gas chromatography/mass spectrometry analysis of widely different volatility and polarity terpenoids in olibanum. *J. Chromatogr. A*; 1018: 73-83.
- Hovaneissian M.**, Archier P., Mathe C., Culioli G. and Vieillescazes C. (2008). Analytical investigation of styrax and benzoin balsams by HPLC- PAD-fluorimetry and GC-MS. *Phytochem. Anal.* 19: 301-310.
- Hovaneissian M.**, Archier P., Mathe C., Vieillescazes C. (2006). Contribution de la chimie analytique à l'étude des exsudats végétaux styrax, storax et benjoin. *C.R. Chimie* 9: 1192-1202.
- Hugel G.**, Oehschlager A.C. and Ourisson G. (1966). The structure and stereochemistry of diterpenes from *Trachylobium verrucosum* Oliv. *Tetrahedron Supplement* 8, Part 1: 203-216.
- Hugel G.**, Lods L., Mellor J.M., Theobald O. W. and Ourisson G. (1965). Diterpènes de *Trachylobium*. I. Introduction générale. Isolement de kauranol et de huit diterpènes. *Bulletin de Société Chimique de France* 1965: 2882-2887.
- Jalali H.T.**, Ebrahimian Z.J., Evtuguin D.V., Neto C.P. (2011). Chemical composition of oleogumresin from *Ferula gummosa*. *Industrial Crops and Products* 33: 549-553.
- Konno K.** (2011). Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. *Phytochemistry* 72: 1510-1530.
- Koudou J.**, Abena A.A., Ngaissona P., Bessière J.M. (2005). Chemical composition and pharmacological activity of essential oil of *Canarium schweinfurthii*. *Fitoterapia* 76: 700-703.
- Lambert J.B.**, Donnelly E.W., Heckenbach E.A., Johnson C.L., Kozminski M.A., Wub Y., Santiago-Blay J.A. (2013). Molecular classification of the natural exudates of the rosids. *Phytochemistry*, [http:// dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.06.013](http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.06.013).
- Lambert J.B.**, Wu Y., and Santiago-Blay J.A. (2005). Taxonomic and chemical relationships revealed by nuclear magnetic resonance spectra of plant exudates. *Journal of Natural Products* 68: 635-648.
- Lambert J.B.**, Frye J.S., Poinar G.O. (1985). Amber from the Dominican Republic: analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Archaeometry* 27: 43-51.
- Lewinsohn E.**, Gizen M., and Croteau R. (1991). Defense mechanisms of conifers. Differences in constitutive and wound induced monoterpene biosynthesis among species. *Plant Physiology* 96: 44-49.

- Lu R.**, Kamiya Y., Miyakoshi T. (2006). Applied analysis of lacquer films based on pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Talanta* 70: 370-376.
- Lucero-Gómez P.**, Mathe C., Vieillescazes C., Bucio L., Belio I., Vega R. (2013). Analysis of Mexican reference standards for *Bursera* spp. Resins by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and application to archaeological objects. *Journal of Archaeological Science* doi:10.1016/j.jas.2013.07.021.
- Mahabusarakam W.**, Chairerk P., Taylor W.C. (2005). Structure elucidation Xanthonenes from *Garcinia cowa* Roxb. Latex. *Phytochemistry* 66: 1148-1153.
- Manh D.C.**, Bastard J., Fétizon M., Sévenet T. (1983). Plantes de Nouvelle-Calédonie. LXXVII. Diterpènes d'*Agathis lanceolata*. *J. Nat. Prod.* 46 (2): 262-273.
- Mathe C.**, Archier P., Nehme L. and Vieillescazes C. (2009). The study of nabataean organic residues From madâ'in sâlih, ancient Hegra, by gas Chromatography-mass spectrometry. *Archaeometry* 51(4): 626-636.
- Mathe C.**, Culioli G., Archier P. and Vieillescazes C. (2004). *Characterization of archaeological frankincense by gaschromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr A* 1023: 277-285.
- Mills J.S.**, White R., Gough L.J. (1984). The chemical composition of Baltic amber. *Chem. Geol.* 47: 15-39.
- Modugno F.**, Ribechini E., Colombini M.P. (2006). Aromatic resin characterisation by gas chromatography-mass spectrometry: Raw and archaeological materials. *Journal of Chromatography A* 85: 164-173.
- Mongkolvisut W.**, Sutthivaiyakit S., Leutbecher H., Mika S., Klaiber I., Möller W., Rösner H., Beifuss U. and Conrad J. (2006). Integerrimides A and B, Cyclic Heptapeptides from the Latex of *Jatropha integerrima*. *J. Nat. Prod.* 69: 1435-1441.
- Murphy R.E.**, Schure M.R., Foley J.P. (1998). Effect of Sampling Rate on Resolution in Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 70: 1585-1594.
- Na Pattalung P.**, Thongtheeraparp W., Wiriyaichitra P., Taylor W.C. (1994). Xanthonenes of *Garcinia cowa*. *Planta Med.* 60:365-368.
- Obame L.C.**, Koudou J., Chalchat J.C., Bassolé I., Edou P., Ouattara A.S. and Traore A.S. (2007). Volatile components, antioxidant and antibacterial activities of *Dacryodes buettneri* H. J. Lam. essential oil from Gabon. *Sci. Res. Essays* 2 (11): 491-495.
- Onana J.M.** (2008). A synoptic revision of *Dacryodes* (Burseraceae) in Africa, with a new species from Central Africa. *Kew Bulletin* 63: 3856-400.

Osete-Cortina L., Domenech-Carbo M.T. (2005). Analytical characterization of diterpenoid resins present in pictorial varnishes using pyrolysis–gas chromatography–mass spectrometry with on line trimethylsilylation. *J. Chromatogr. A* 1065: 265-278.

Parsons I.C., Gray A. I., Lavaud C., Massiot G. and Waterman P.G. (1991). Seco ring-A triterpene acids from the resin of *Dacryodes normandii*. *Phytochemistry* 30:1221-1223.

Paul M., Brüning G., Bergmann J. and Jauch J. (2012). A Thin-layer Chromatography Method for the Identification of Three Different Olibanum Resins (*Boswellia serrata*, *Boswellia papyrifera* and *Boswellia carterii*, respectively, *Boswellia sacra*). *Phytochem. Anal.* 23:184-189.

Pearson C.H., Cornish K., Rath D.J. (2013). Extraction of natural rubber and resin from guayule using an accelerated solvent extractor. *Industrial Crops and Products* 43: 506-510.

Peraza-Sánchez S.R., Salazar-Aquilar N.E. and Peña-García L.M.(1995). A new triterpene from the resin of *Bursera simaruba*. *Journal of Natural Products* 58: 271-274.

Périno-Issartier S., Ginies C., Cravotto G., F. Chemat. (2013). A comparison of essential oils obtained from lavandin via different extraction processes: Ultrasound, microwave, turbohydrodistillation, steam and hydrodistillation. *Journal of Chromatography A* 1305: 41-47.

Proefke M.L., Rinehart K.L., Raheel M., Ambrose S.H. and Wisseman S.U. (1992). *Anal. Chem.* 67 105A.

Raffaëly L., Pons E., Lacoudre N., Bleton J., Vo Duy S. et Tchaplà A. (2005). Caractérisation physico-chimique de laques de Mongolie du Ier siècle ap. J.-C. *ArchéoSciences* 29: 69-81.

Ramos M.F.S., Siani A.C., Tappin M.R., Guimaraes A.C. and Lahoz da Silva Ribeiro J.E. (2000). Essential oils from oleoresins of *Protium* spp. of the amazon regions. *Flavour fragr. J.* 150: 383-388.

Ramos M.V., Grangeiro T.B., Freire E.A., Sales MP, Souza D.P., Araújo E.S., Freitas C.D.T. (2010). The defensive role of latex in plants: detrimental effects on insects. *Arthropod-Plant Interact* 4: 57-67.

Rivallain J., Normand D., Sansoulet J., Bleton J. (1995). « En ambre avez-vous dit ? », *Journ. d’Agric. Trad. et Bota. Appl.* 117(1): 59-73.

Regert M., Devière T. and Le Hô A-S. (2008). Reconstructing ancient Yemeni commercial routes during the middle ages using structural characterization of terpenoid resins. *Archaeometry* 50: 668-695.

- Regert M.**, Alexandre V., Thomas N., Lattuati-Derieux A. (2006). Molecular characterisation of birch bark tar by headspace solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry: A new way for identifying archaeological glues. *J. Chromatogr. A* 1101: 245-253.
- Rhourri-Frih B.**, West C., Pasquier L., André P., Chaimbault P., Lafosse M. (2012). Classification of natural resins by liquid chromatography–mass spectrometry and gas chromatography–mass spectrometry using chemometric analysis. *Journal of Chromatography A* 1256: 177-190.
- Romero-Noguera J.**, Bolívar-Galiano F.C., Ramos-Lopez J.M., Fernandez-Vivas M.A., Martín-Sánchez I. (2008). Study of biodeterioration of diterpenic varnishes used in art painting: Colophony and Venetian turpentine. *International Biodeterioration & Biodegradation* 62: 427-433.
- Salgues R.** (1956) Copals en general et copals d’Afrique. Plant Foods for Human Nutrition/Formerly. *Qualitas Plantarum* 2(4): 272-291.
- Santiago-Blay J.** & Lambert J. (2007). Aux sources de l’ambre : l’analyse spectroscopique des matières exsudées par les végétaux actuels constitue le fondement d’une identification chimique et botanique des ambres et des autres résines fossiles. *Pour la science* 356: 70-75.
- Scalarone D.**, Duursma M.C., Boon J.J., and Chiantore O. (2005). MALDI-TOF Mass Spectrometry on Cellulosic surfaces of Fresh and Photo-aged Di- and Triterpenoid Varnish Resins. *J. Mass Spectrom.* 40: 1527-1535.
- Scalarone D.**, Lazzari M., Chiantore O. (2003). Ageing behaviour and analytical pyrolysis characterisation of diterpenic resins used as art materials: Manila copal and sandarac. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 68–69: 115-136.
- Scalarone D.**, Lazzari M., Chiantore O. (2002). Ageing behaviour and pyrolytic characterisation of diterpenic resins used as art materials: colophony and Venice turpentine. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 64: 345-361.
- Serier J.B.** (1986). Les sécrétions d’arbres. *Revue Bois et Forêt des Tropiques* 213: 33-39.
- Seyferth D.**, Menzel H., Dow A.W. and Flood T.C. (1972). Trimethylsilyl-substituted diazoalkanes: I. Trimethylsilyldiazomethane. *Journal of Organometallic Chemistry* 44(2): 279-290.
- Siani A.C.**, Nakamura M.J., Tappin M.R.R., Monteiro S.S., Guimarães A.C. and Ramos M.F.S. (2012).

Chemical Composition of South American Burseraceae Non-volatile Oleoresins and Preliminary Solubility Assessment of their Commercial Blend. *Phytochem. Anal.* 23: 529-539.

Siani A.C., Garrido I.S., Monteiro S.S., Carvalho E.S., Ramosa M.F.S. (2004). *Protium icicariba* as a source of volatile essences. *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 477-489.

Soxhlet F. (1879). Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes, Dingler's. *Polytechnisches Journal* 232: 461-465.

Stankiewicz B.A., Van Bergen P.F., Smith M.B., Carter J.F., Briggs D.E.G., Evershed R.P. (1998). Comparison of the analytical performance of filament and Curie-point pyrolysis devices. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 45(2): 133-151.

Susunaga G.S., Siani A.C., Pizzolatti M.G., Yunes R.A., Delle Monache F. (2001). Triterpenes from the resin of *Protium heptaphyllum*. *Fitoterapia* 72: 709-711.

Tchapla A., Bleton J., Goursaud S., Méjanelle P. (1999). Contribution à la connaissance des substances organiques utilisées en Egypte ancienne. L'apport de techniques physico-chimiques d'analyse. *Encyclopédie religieuse de l'Univers végétale, Croyances phytoreligieuses de l'Egypte ancienne (ERUV)* 1: 445-488.

Teodor E.D., Lițescu S.C., Neacșu A., Truică G., Albu C. (2009). Analytical methods to differentiate Romanian amber and Baltic amber for archaeological applications. *Cent. Eur. J. Chem* 7(3):560-568. doi.: 10.2478/s11532-009-0053-8.

Veiga F.V. and Pinto A.C. (2002). O Gênero *Copaifera* L. *Química Nova* 2: 273-286.

Whittenburg H., King D., and de Harrington B.P. (1995). Injection system designed for online Curie point pyrolysis--gas chromatography using high-resolution capillary columns. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 35(2): 207-219.

Congrès ou colloques

Van den Berg K.J., Van der Horst J., Boon J.J. (1999, auguste): *Recognition of copals in aged resin/oil paints and varnishes*. Paper presented at the ICOM-CC 12th Triennial Meeting, Lyon, France.

Livres ou manuels

Appanah S., Ashton M.S., Bawa K.S., Curtet L., Elouard C., Jantan I., Krishnapillay B., Lee S.S., Maury-Lechon G., Shiva M.P., Tompsett P.B. and Weinland G. (1998) A review of dipterocarps: taxonomy, ecology and silviculture. Appanah S., Turnbull J.W. (Eds.), Bogor.

- Bauer W.J.**, Badoud R., Löliger J., Etournaud A. (2010). *Science et technologie des aliments: principes de chimie des constituants et de technologie des procédés*. Lausanne : Presses polytechniques et universitaires romandes.
- Bleton J.** & Tchapla A. (2009). « *SPME/GC-MS in the Characterisation of Terpenic Resins* » in *Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology*, Wiley-Blackwell, Chichester, Oxford.
- Bourquet E.**, Augé C. (2008). *Les techniques de laboratoire-Purification et analyse des composés organiques*. Paris: Ellipses Ed Marketing S.A.
- Bruneton J.** (2002). *Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales*. Ed. 3, Lavoisier, Paris.
- Colombini M.P.** and Modugno F. (2009). *Organic mass spectrometry in art and archaeology*. Wiley-Blackwell, Chichester, Oxford.
- Cordemoy H.J.** (1911). *Les Plantes à Gommés et à Résines*. Octave Doin et Fils, Paris.
- Fernandez X.** & Breme K. (2012). « *Vers la découverte de nouveaux composés. Méthodes modernes d'analyse* » in *La chimie des huiles essentielles. Tradition et innovation*. Paris : Vuibert.
- Ghestem A.**, Seguin E., Paris M., Orecchioni A.M. (2001). *Le préparateur en pharmacie. Dossier 2, « Botanique-Pharmacognosie, Phytothérapie-Homéopathie »*. Ted & Doc, Paris.
- Greenish H.G.** (1933). *A text book of Pharmacognosy* 6th Ed. J&A Churchill London.
- Langenheim J.H.** 2003. *Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology, and Ethnobotany*. Timber Press, Portland.
- Leonard J.** (1950). *Etude Botanique des Coloaliers du Congo Belge*. Publ. Inst. Nat. Et. Agron. Congo Belge, série Scient. n°45.
- Mills J.S.** & White. (1994). *The Organic Chemistry of Museum Objects*. Oxford: Butterworth-Heinemann Ltd.
- Nabors M.W.** (2009). « *Biologie végétale. Structures, fonctionnement, écologie et biotechnologies* ». Traduction de Sallés G. Pearson Education France, Paris.
- Nussinovitch A.** (2010). *Plant Gum Exudates of the World. Sources, Distribution, Properties, and Applications*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Poda D.**, Zida M., Zoubga S., Béréoudougou H., Lankoandé A., Zoungrana J.E., Tiveau D. (2009). *Manuel pratique de production durable des gommés au Burkina Faso*. CIFOR.
- Poux M.**, Cognet P., Gourdon C. (2010). *Génie des procédés duables « du concept à la concrétisation industrielle »*. Paris : Dunod.

Ribechini E. (2009). *Direct Mass Spectrometric Techniques: Versatile Tools to Characterise Resinous Materials*. In *Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology* Edited by Colombini M.P. and Modugno. John Wiley & Sons; p77-95.

Romero-Noguera J., Bolivar-Galiano F.C., Ramos-Lopez J.M., Fernandez-Vivas M.A.

Rouessac F., Rouessac A. *Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes*. Paris : Ed.,6. Dunod, 2004. 462 p.

Tranchant J., Arpino P., Prevot A., Serpinet J., Vergnol A., Witier P. (1995). *Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse*. Paris: Masson.

Thèses, mémoires ou rapports de fin d'études

Aksamija A. (2012). *Etude chimique des matériaux résineux : oliban, dammar et mastic. application à des prélèvements artistiques et archéologiques*. ThD Chim, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.

Bouquet A. (1969). *Féticheurs et médecines traditionnelles du Congo (Brazzaville)*. Mémoires O.R.S.T.O.M. Paris.

Hashimoto N., Aoyama T. and Shioiri T. (1981). *New methods and reagents in organic synthesis. 14. A simple efficient preparation of methyl esters with trimethylsilyldiazomethane (TMSCHN₂) and its application to gas chromatographic analysis of fatty acids*. Chemical Pharmaceutical Bulletin 29.

Méjanelle P. (1996). *Contribution à l'étude de substances organiques (gommes, résines et corps gras) mises en œuvre pour la réalisation d'objets d'art et d'archéologie: caractérisation par couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse*. ThD, Chim. analytique, Université Paris VI.

Mengal P. & Mompon B. (1994). *Procédé et installation d'extraction sans solvant de produits naturels par micro-ondes*. Brevet international, WO 94/26853, demandeur : Archimex.

Paré J.R. et Bélanger J.M.R. (1990). *Extraction de produits naturels assistée par micro-ondes*. Brevet européen, EP 398798.

Regert M., (1996). *Les composés organiques en préhistoire : nouvelles approches analytiques*. Thèse de doctorat, Université de Paris X.

Rhourri-Frih B. (2009). *Analyse, classification et caractérisation de résines d'origine végétale par chromatographie et spectrométrie de masse*. ThD Chim. analytique, Université d'Orléans.

Steigenberger G. (2013). The Vigani Cabinet-Analysis of historical resinous materials by gas chromatography-mass spectrometry and infrared spectroscopy. Department of Mathematics and Natural Sciences at the Technical, University Dresden, Dresden.

Vo Duy S. (2007). *Mise au point de méthodes analytiques pour la caractérisation de la matière organique constituante d'objets du patrimoine culturel.* ThD Chim. analytique, Université Paris-sud XI.

PARTIE II : MATERIELS ET METHODES

Chapitre III : Méthodologie de l'inventaire des plantes à exsudats du Congo

Chapitre IV : Matériels et méthodes relatifs à la caractérisation des exsudats

Chapitre III : Méthodologie de l'inventaire des plantes à exsudats du Congo

Introduction	86
III.1. Méthodologie	86
III.1.1. Recherche bibliographique	86
III.1.2. Enquêtes ethnobotaniques	87
III.2. Description du lieu d'enquête	87
III.3. Déroulement des entretiens	88
III.4. Zones de récoltes	88
Conclusion	90

Introduction

En Afrique et particulièrement au Congo, de nombreuses substances exsudées par les plantes sont utilisées par une grande majorité de populations. Dans la plupart des cas, elles sont employées en médecine traditionnelle et dans la fabrication de certains objets traditionnels (torche, masque, pirogue, etc.). Malgré ces nombreuses utilisations, les exsudats sécrétés par les plantes restent encore mal connus. L'inventaire de ces plantes et de leur exsudat s'avère indispensable tant du point de vue culturel que médicamenteux.

Cette étude a été réalisée en vue d'établir un listing des plantes à exsudats du Congo. Elle tient compte de la nouvelle révision taxonomique liée à l'utilisation de la génomique, et donne un aperçu général des exsudats et de leurs usages. Il convient de signaler que parmi les plantes à exsudats répertoriées figurent également les plantes introduites considérées comme faisant partie de la flore du Congo.

Dans ce chapitre, nous présenterons la méthodologie adoptée pour l'inventaire des plantes à exsudats du Congo.

III.1. Méthodologie

Pour mener à bien cet inventaire, une méthode associant la recherche bibliographique aux enquêtes ethnobotaniques a été mise en place.

III.1.1. Recherche bibliographique

Nous avons consulté divers documents, livres, encyclopédies, rapports et revues scientifiques, tous présentant un intérêt pour le thème considéré. Nous avons aussi utilisé le site internet The

plant List (<http://www.theplantlist.org>) pour tenir compte des dernières révisions taxonomiques. Lorsque les botanistes ne se sont pas tous accordés sur le nom scientifique d'une espèce, nous avons eu recours à quelques synonymes pour mieux nous repérer.

III.1.2. Enquêtes ethnobotaniques

Les enquêtes ethnobotaniques ont été menées sur le terrain sous forme d'entretiens auprès de personnes détentrices d'un savoir et/ou d'un savoir-faire lié aux plantes considérées. Ce travail résulte de deux séjours à Owando durant les mois de janvier 2010 et 2011. Il a été réalisé dans le cadre des missions de stages d'initiation à l'ethnobotanique.

III.2. Description du lieu d'enquête

Anciennement appelée Fort Rousset, la ville d'Owando est fondée en 1899 par le colonisateur français Rousset. C'est la capitale du département de la Cuvette. Elle est située au Nord de la ville de Brazzaville, à environ 550 km par la route, entre 0°28'60" Sud et 15°54'00" Est (figure 3.1), et borde la rivière Kouyou, un des principaux affluents du fleuve Congo.

On rencontre à Owando principalement les peuples Mbozi, qui constituent le plus grand groupe culturel de la République du Congo Brazzaville. Ce groupe Mbozi est une composante du grand groupe ethnolinguistique Bantu appelé Ngala subdivisé en plusieurs sous-goupes dont les Koyo, les Akwa, les Ngaré, les Mboko, les Mbozi stricto sensu, les Likouba et les Likouala [Itoua, 2007]. Ces populations sont réparties dans huit quartiers (Kindodzoho, Yengo, Ikoumou, Oloho, Okouma, Linengué, Kanguini et Akiendza aujourd'hui appelé quartier Mozart).



En violet le trajet effectué sur la route nationale N°2 (550 Km)

Figure 3. 1. Carte du Congo montrant le trajet effectué de Brazzaville à Owando [Google Earth]

Le climat de cette région est de type guinéen forestier (chaud et humide) avec une température moyenne de 23-27°C. Dans cette zone, les précipitations sont abondantes et peuvent atteindre une moyenne de 1800 mm/an. La saison sèche dure un à trois mois. Le type de végétation

dominant est la forêt. C'est un domaine à peu près exclusif de forêts périodiquement inondées à sous-bois clair et de forêts ombrophiles (figure 3.2).



Figure 3. 2. Paysage typique des forêts périodiquement inondées de la Cuvette congolaise (ici en bordure de la rivière Kouyou)

III.3. Déroulement des entretiens

Après une prise de contact avec les chefs de quartiers 2 (Yengo) et 3 (Ikoumou) de la ville d'Owando, des rencontres de travail ont été organisées par ces derniers. Dans le cadre de nos enquêtes, nous avons adopté la méthode de l'entretien semi-directif ou semi-structuré [Le Grand, 2008]. Trente personnes identifiées comme détentrices d'un savoir et/ou d'un savoir-faire en rapport avec les plantes ou les arbres à exsudat ont été interrogées. Les données suivantes ont été recueillies :

- le nom vernaculaire de la plante en Kôyô ;
- l'utilisation de l'exsudat ;
- les pathologies traitées ainsi que le mode d'administration.

Une campagne de récolte des plantes citées a été organisée en compagnie de la personne ayant livré l'information, et par la suite leurs exsudats ont été recueillis.

III.4. Zones de récolte

Les récoltes ont été effectuées dans cinq (5) sites (figure 3.3) :

- site 1 : Kanguini, situé à environ 2 Km de la ville d'Owando, 0° 29' 24" au Sud de l'équateur et 15° 52' 48" à l'Est du méridien de Greenwich ;
- site 2 : Mombo beach, situé à 2 Km de la ville d'Owando, 0° 28' 47,05" au Sud de l'équateur et 15° 52' 21,40" à l'Est du méridien de Greenwich ;
- site 3: Mbémbé, situé à environ 3 Km d'Owando, 0° 28' 48" au Sud de l'équateur et 15° 51' 36" à l'Est du méridien de Greenwich ;

- site 4 : Okouma, situé à environ 5 Km d'Owando, $0^{\circ} 28' 12''$ au Sud de l'équateur et à $15^{\circ} 51' 0''$ à l'Est du méridien de Greenwich ;
- site 5 : entre Ibonga (situé à environ 2 Km d'Owando, $0^{\circ} 34' 12''$ au Sud de l'équateur et $16^{\circ} 0' 36''$ à l'Est du méridien de Greenwich) et Ombélé (situé à environ 8 Km d'Owando, $0^{\circ} 24' 36''$ au Sud de l'équateur et $15^{\circ} 52' 48''$ à l'Est du méridien de Greenwich).

La figure 3.3 donne une répartition des sites de prospections botaniques.



Figure 3. 3. Carte montrant les différents sites de prospections botaniques [Google Earth]

La figure 3.4 ci-dessous montre les membres de notre équipe de recherche lors de la prospection en forêt.



Figure 3. 4. Prospection en forêt dans la zone d'Owando : (a) observation des feuilles d'un arbre à exsudat ; (b) traversée de la rivière Kouyou

Conclusion

Dans ce chapitre III, nous présentons la méthodologie de recherche de l'inventaire des plantes à exsudats du Congo, afin de lister les différents types d'exsudat sécrétés et leurs utilisations. La méthodologie adoptée s'appuie sur les études bibliographiques et les enquêtes ethnobotaniques menées auprès des populations d'Owando. Cette dernière nous a permis de confirmer quelques résultats obtenus lors de la recherche bibliographique. Cependant, faute de temps, nous n'avons interrogé que trente personnes identifiées comme détentrices d'un savoir et/ou d'un savoir-faire et avons profité de la coopération de certains tradipraticiens, autres que ceux des quartiers 2 (Yengo) et 3 (Ikoumou) de la ville d'Owando. Une autre difficulté à laquelle nous nous sommes heurtés a été le problème de correspondance du mot « exsudat » en langue Kôyô. Cette difficulté a été contournée en formulant la question de la manière suivante :

« Connaissez-vous les arbres qui laissent couler un liquide lorsqu'on réalise une saignée ? », « A quoi sert ce liquide ? », « Soigne t-il ? ». Dans l'avenir, nous allons envisager la possibilité d'étendre cette étude à d'autres quartiers de la ville d'Owando. »

Chapitre IV : Matériels et méthodes relatifs à la caractérisation des exsudats

IV.1.	Description des échantillons	92
IV.1.1.	Les exsudats des plantes analysés	92
	Collecte et conservation des exsudats	92
IV.1.2.	Les substances de référence	93
IV.2.	Protocoles de traitements des échantillons	93
IV.2.1.	Préparation de pastilles de KBr pour les analyses en moyen infrarouge	93
IV.2.2.	Procédés d'extraction de la fraction volatile des exsudats des plantes	94
	IV.2.2.1. <i>Extraction des huiles essentielles</i>	94
	IV.2.2.2. <i>Microextraction sur phase solide en espace de tête (Hs-SPME)</i>	94
IV.2.3.	Procédés d'extraction de la fraction peu volatile des exsudats des plantes	95
IV.2.4.	Méthodes de dérivation	95
	IV.2.4.1. <i>Méthylation au TMS-diazométhane</i>	95
	IV.2.4.2. <i>Silylation au BSTFA/Pyridine</i>	96
IV.2.5.	Pyrolyse avec dérivation «en ligne»	96
IV.3.	Appareillage et conditions analytiques	97
IV.3.1.	Spectroscopie de proche infrarouge (SPIR)	97
IV.3.2.	Spectroscopie de moyen infrarouge (SMIR)	97
IV.3.3.	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	97
IV.3.4.	Chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse (GCxGC-MS)	99
IV.4.	Caractérisation des colonnes capillaires courtes par chromatographie en phase gazeuse avec détection FID	100
IV.4.1.	Colonnes capillaires caractérisées	100
IV.4.2.	Instrumentation CPG-FID et solution injectée	101
IV.4.3.	Protocole expérimental suivi pour exécuter le test de Grob	102
IV.4.4.	Evaluation de l'épaisseur de film des phases stationnaires	105
IV.4.5.	Evaluation de l'homogénéité de la phase stationnaire le long de la colonne	107
IV.5.	Applications en GCxGC-MS après caractérisation des colonnes capillaires	108
IV.6.	Traitements des données	109
IV.6.1.	Prétraitement des données spectrales	109
IV.6.2.	Prétraitement des données chromatographiques	110
IV.6.3.	Analyses statistiques des données	111
IV.6.4.	Comparaison de deux séries de mesures (étude des colonnes courtes)	112

Comme nous l'avons évoqué dans la partie I de cette thèse, les exsudats produits par les plantes sont des substances naturelles complexes et d'une grande diversité de structure physiques et chimiques. De plus, leurs constituants sont souvent difficiles à séparer et à identifier au sein de la matrice du fait de la complexité du mélange et du grand nombre d'isomères qui peuvent être présents dans ces échantillons. La caractérisation de ces substances constitue, donc, un grand défi pour l'analyste et fait appel à plusieurs techniques

de traitement d'échantillons et d'analyses. Ainsi, notre stratégie multi-analytique adaptée à la nature de ces exsudats sera exposée dans ce chapitre IV.

Dans ce chapitre, seront d'abord décrites les substances de travail analysées ainsi que les procédures de traitements d'échantillons employées. Puis l'appareillage et les conditions analytiques appliquées à ces échantillons seront exposés. Les méthodes de traitement de données utilisées clôtureront ce chapitre.

IV.1. Description des échantillons

IV.1.1. Les exsudats des plantes analysés

Des exsudats appartenant à deux familles de plantes (Fabaceae-Caesalpinioideae, et Burseraceae) sont étudiés. Ces exsudats proviennent respectivement de *G. demeusei* (Harms) J. Léonard et de *D. edulis* (G. Don) K. J. Lam.

G. demeusei (Harms) J. Leonard est l'une des espèces productrices du copal dit copal Congo. Peu d'études ont été menées sur l'analyse chimique de copals du Congo d'origine botanique certifiée. Caractériser ces échantillons d'exsudats provenant de *G. demeusei* (Harms) J. Leonard certifiés a donc été une opportunité à saisir.

Compte tenu de la fréquence de citation des exsudats de *D. edulis* (G. Don) K. J. Lam par les tradipraticiens consultés nous avons collecté 15 échantillons de cet exsudat, afin de vérifier s'il y'a une variabilité de sa composition chimique suivant le site de prélèvement (figure 4.1)

IV.1.2. Collecte et conservation des exsudats

Après une exsudation naturelle, les exsudats sont collectés sur un seul arbre par raclage de la surface de l'écorce du tronc. Les exsudats produits par chaque arbre sont alors conservés dans des bocal ambrés étiquetés et hermétiquement fermés immédiatement après la collecte. Ces précautions permettent d'éviter certains phénomènes physiques qui risquent de provoquer certaines modifications de leur composition chimique, notamment l'évaporation de certaines substances volatiles, avant leur transport vers les laboratoires d'analyse.

<p>Exsudat de <i>Guibourtia demeusei</i> (Harms) J. Léonard (Synonyme : <i>Copaifera demeusei</i> Harms) Famille : Fabaceae-Caesalpinioideae</p>	
<p><u>Origine du matériel végétal</u> : forêt périodiquement inondée aux alentours de Mombo beach. <u>Identification botanique</u> : réalisée par Jean-Marie Moutsamboté, maître de conférences, IDR (Institut de Développement Rural/Université Marien Ngouabi, Congo). Spécimen n ° E-028 <u>Date de récolte</u> : Janvier 2010</p>	
<p>Exsudat de <i>Dacryodes edulis</i> (G. Don) K. J. Lam (Synonyme : <i>Pachylobus edulis</i> G. Don.) Famille : Burseraceae</p>	
<p><u>Origine du matériel végétal</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Owando et ses environs : Kanguini, Okouma, Mbémbé ; Mombo beach ; • Boko¹ (sud du Congo) <p><u>Identification botanique</u> : réalisée par Jean-Marie Moutsamboté Spécimen n ° Dx (avec X, le numéro de l'échantillon) <u>Date de récolte des échantillons d'Owando et ses environs</u> : Janvier 2010 <u>Date de récolte des échantillons de Boko</u> : Janvier 2011</p>	

Figure 4. 1. Description et origine des échantillons d'exsudats analysés

IV.1.3. Les substances de référence

Six substances disponibles au Laboratoire d'Etude des Techniques et d'Instruments d'Analyse Moléculaire (LETIAM), et qui ont été étudiées dans le cadre des travaux sur des objets du patrimoine culturel français, sont utilisées comme substances de référence. Il s'agit d'exsudats bien connus d'un point de vue chimique :

- gomme Karaya commercialisée par la société Alland & Robert, France ;
- gomme Damar commercialisée par Sigma Chemical CO., USA ;
- gomme-résine de *Commiphora schimperi* (O. Berg) Engl. Provenant de Tanzanie (Manyara).
- résine de *Burseraceae* : *gum Elemi*, commercialisée par Sigma Chemical CO., USA.
- résine de pin : gum Rosin commercialisée par Sigma Chemical CO., USA.
- copal kauri (origine botanique non certifiée)

IV.2. Protocoles de traitement des échantillons

IV.2.1. Préparation de pastilles de KBr pour les analyses en moyen infrarouge

Les échantillons solides d'exsudat sont broyés de manière homogène dans un mortier en agate avec 150 fois leur poids en bromure de potassium anhydre (SPECAC, Kent). La poudre

¹ Boko : site de prélèvement (hors de la zone d'enquête) des exsudats de *D. edulis* (G. Don) K. J. Lam situé au sud du Congo (4° 47' 12" au sud de l'équateur et à 14° 37' 44" à l'est du méridien de Greenwich)

obtenue est ensuite comprimée sous une pression d'environ 10 t.cm^{-2} , avec une presse manuelle, pour former des pastilles très fines d'aspect translucide.

IV.2.2. Procédés d'extraction de la fraction volatile des exsudats des plantes

IV.2.2.1. Extraction des huiles essentielles

Les exsudats bruts sont débarrassés manuellement des débris fissurés de bois, puis pulvérisés à l'aide d'un mortier en agate, si nécessaire (cas de l'exsudat de type copal de *Guibourtia demeusei* (Harms) J. Léonard). L'extraction à partir de cette poudre, est effectuée par hydrodistillation pendant environ 4 h à l'aide d'un distillateur de type Clevenger (figure 4.2).



Figure 4. 2. Montage d'hydrodistillation (extracteur de type Clevenger)

Le condensât chargé d'huile essentielle et d'eau est recueilli. L'huile essentielle est isolée de la phase aqueuse par extraction à l'éther diéthylique. Après séchage de la phase étherée au sulfate de sodium anhydre et après évaporation de l'éther à l'air libre, l'huile essentielle est récupérée. La teneur en huile essentielle (exprimée en masse/masse) des exsudats a été déterminée. Les extraits sont conservés au congélateur (-4°C). Les huiles essentielles sont diluées ($1\mu\text{l}$ d'huile essentielle dans 1ml d'hexane) avant injection en mode split dans le chromatographe.

IV.2.2.2. Microextraction sur phase solide en espace de tête (Hs-SPME)

Les composés volatils de l'espace de tête des différents types d'exsudats sont extraits par des fibres SPME qui ont été achetées chez Supelco (Bellefonte, PA, USA). Les fibres utilisées sont en PDMS/DVB (Polydiméthylsiloxane /divinylbenzène) (Stable Flex) sur une épaisseur de $65 \mu\text{m}$ pour l'une et en PDMS, avec une épaisseur de film de $100 \mu\text{m}$ pour l'autre. Avant chaque extraction, la fibre est conditionnée à 250°C pendant 10 min. L'extraction est réalisée

dans un flacon en verre d'une contenance de 2 ml équipé d'une capsule à vis septa en PTFE/silicone. La masse de l'échantillon est de 7,5 mg pour l'échantillon d'exsudat de *G. demeusei* (Harms) J. Léonard et de 3 mg pour les échantillons de *D. edulis* (G. Don) K. J. Lam. Les flacons contenant l'échantillon sont immergés dans un bain d'huile de paraffine à 80°C ; puis la fibre introduite dans le flacon via le septum, est exposée à l'espace de tête pendant 30 min (figure 4.3). Après extraction, les analytes sont désorbés thermiquement pendant 5 min dans l'injecteur du chromatographe qui est en mode splitless.



Figure 4. 3. Montage de la microextraction sur phase solide en espace de tête (Hs-SPME)

IV.2.3. Procédés d'extraction de la fraction peu volatile des exsudats des plantes

20 g d'exsudat de *G. demeusei* (Harms) J. Léonard sont extraits à l'éther de pétrole (200 ml) de qualité analytique. L'extraction est réalisée à 80°C pendant 4 heures à l'aide d'un extracteur Soxhlet. Cet extrait est ensuite concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapor R-210 Büchi).

IV.2.4. Méthodes de dérivation

IV.2.4.1. Méthylation au TMS-diazométhane

350 μ l de benzène et 100 μ l de méthanol sont additionnés à 1 mg d'extrait à l'éther de pétrole. 10 μ l de TMS-diazométhane (2,0 M dans l'hexane) sont ajoutés dans le flacon contenant le mélange précédent. Le mélange est continuellement agité pendant 30 minutes à température ambiante. Le flacon reste ouvert pour permettre l'évacuation de l'azote formé pendant la réaction.

IV.2.4.2. Silylation au BSTFA/Pyridine

1 mg de l'extrait à l'éther de pétrole ou d'exsudat brut est mis en réaction avec 200 µl d'une solution de BSTFA/Pyridine (50/50, v/v). La silylation est effectuée à température ambiante pendant 30 minutes, temps au bout duquel la solution est évaporée à sec sous courant d'azote. Le résidu ainsi obtenu est repris dans 1ml d'isooctane pour l'injection directe dans le chromatographe.

IV.2.5. Pyrolyse avec dérivation «en ligne»

L'appareil utilisé est un pyrolyseur à point de Curie de marque Fischer, modèle 0316M. Pour faire une dérivation méthylée, une solution d'hydroxyde de tétraméthylammonium (TMAH) à 25% est préparée par dissolution de 0,68g de TMAH pentahydraté (97%) dans 1g d'eau pure. Environ 0,5 mg d'échantillon d'exsudats de type copal de *G. demeusei* (Harms) J. Léonard sont placés dans le porte-échantillon ferromagnétique. 2 µl de la solution de TMAH sont ajoutés immédiatement et le porte-échantillon est introduit dans la chambre de pyrolyse à l'intérieur d'un tube de quartz. La chambre de pyrolyse est introduite dans le réacteur de pyrolyse chauffé à 250°C et l'aiguille qui la termine pénètre dans l'injecteur du chromatographe, à travers le septum (figure 4.4). Le gaz vecteur commence à circuler dans l'injecteur de pyrolyse et le champ magnétique est activé au bout de 40 secondes. Avec le porte-échantillon choisi, la température monte immédiatement à 590°C et y reste pendant 9 s. Les produits de dépolymérisation sont entraînés vers la colonne grâce à la circulation de gaz vecteur pendant 40 secondes.



Figure 4. 4. Montage du pyrolyseur à point de Curie

IV.3. Appareillage et conditions analytiques

IV.3.1. Spectroscopie de proche infrarouge (SPIR)

Les analyses sont réalisées à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier Büchi NIRFlex N500 (Büchi, Labortechnik AG, Flawil, Suisse), en utilisant une cellule de mesure « Solid XL ». Les flacons contenant les différents échantillons sont introduits directement dans le spectromètre et les spectres sont enregistrés en mode réflexion diffuse. Ces spectres sont acquis sur une gamme de longueur d'onde allant de 1000 à 2500 nm (10000-4000 cm^{-1}), avec une résolution spectrale de 8 cm^{-1} et accumulés sur 64 scans. L'appareil est piloté par le logiciel NIRWare 1.2.3000 Advanced Edition.

IV.3.2. Spectroscopie de moyen infrarouge (SMIR)

Les analyses en moyen infrarouge sont effectuées sur une gamme spectrale allant de 4000 à 650 cm^{-1} avec une résolution de 4 cm^{-1} , à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier Thermo Scientific Nicolet IS10 (Inc., USA). Cet appareil est équipé d'un détecteur DTGS (*Deuterated TriGlycide Sulfate*) et fonctionnant avec le logiciel OMNIC Spectra version 2.0. Le nombre de balayage est de 32 scans. Les échantillons sont analysés, soit en mode ATR, soit en transmission. Les exsudats ont été analysés, sans préparation préalable, en mode ATR, avec l'accessoire Smart performer contenant un cristal en ZnSe. Par contre, leur analyse en transmission requiert un pastillage préalable (voir IV.2.1).

IV.3.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Les analyses par couplage CPG-SM sont réalisées sur deux types d'appareillages. Suivant l'analyse à effectuer, les échantillons sont injectés (1 μl) en mode on-column, splitless (temps de fermeture : 0,5 min) ou split. Tous les spectres de masse ont été enregistrés en mode impact électronique avec une énergie d'ionisation de 70 eV en mode « Fullscan ».

Le premier système est un chromatographe Hewlett Packard 6890 couplé à un spectromètre de masse MS Engine Hewlett Packard 5973 de type quadripolaire. Ce système est équipé d'une colonne capillaire RTX-5MS de marque (Restek), comportant une phase stationnaire de type 5% diphenyl-95% diméthylpolysiloxane d'une épaisseur de 0,25 μm . La longueur de la colonne est de 30 m et son diamètre interne de 0,25 mm. L'appareil est piloté par un logiciel HP GC-MSD ChemStation. Les conditions d'analyse pour chaque exsudat et de leurs extraits sont reportées dans les tableaux IV.1 à IV.3.

Tableau IV. 1. Conditions expérimentales d'analyse de la fraction volatile d'exsudat de type copal

Paramètres du chromatographe			
Gaz vecteur : He ; Débit constant : 1,3 ml/min			
Programmation de température : 40°C (1min)-3°C/min-130°C-3°C/min-250°C			
T _{ligne de transfert} : 250°C	T _{injecteur} : 250°C	Mode d'injection : Split	Débit de split : 50 ml/min
Paramètres du spectromètre de masse			
Gamme de m/z : (29-300) u.m.a	Nombre de scan/s : 2	Tension du multiplicateur d'électron : 1706 V	T _{source} : 150°C

Tableau IV. 2. Conditions expérimentales d'analyse de la fraction volatile des exsudats de *D. edulis* (G. Don) K. J. Lam

Paramètres du chromatographe			
Gaz vecteur : He ; Pression constante: 70 kPa			
Programmation de température (1) : 60°C -3°C/min-240°C			
Programmation de température (2) : 60°C-3°C/min-108°C			
T _{ligne de transfert} : 250°C	T _{injecteur} : 250°C	Mode d'injection: split	Débit de split : 50 ml/min
Paramètres du spectromètre de masse			
Gamme de m/z : (29-300) u.m.a	Nombre de scan/s : 2	Tension du multiplicateur d'électron : 1706 V	T _{source} : 150°C

Tableau IV. 3. Condition expérimentale d'analyse de la fraction peu volatile des exsudats de *D. edulis* (G. Don) K. J. Lam

Paramètres du chromatographe			
Gaz vecteur : He ; Débit constant : 1,3 ml/min			
Programmation de température: 100°C-20°C/min- 240°C-2°C/min-300°C			
T _{ligne de transfert} : 310°C	T _{injecteur} : 300°C	Mode d'injection : Split	Split ratio : 30 ml/min
Paramètres du spectromètre de masse			
Gamme de m/z : (29-700) u.m.a	Nombre de scan/s : 2,21	Tension du multiplicateur d'électron : 1706 V	T _{source} : 200°C

Le deuxième système est un chromatographe Trace GC ultra, équipé d'un injecteur On-column et couplé à un spectromètre de masse DSQ de type quadripolaire. L'appareil est piloté avec le logiciel Xcalibur (version 1.4). Les conditions analytiques pour chaque exsudat et leurs extraits sont reportées dans les tableaux IV.4 et IV.5.

Tableau IV. 4. Conditions expérimentales d'analyse de la fraction peu volatile d'exsudat de type copal (*G. demeusei* (Harms) J. Léonard)

Paramètres du chromatographe			
Colonne : Optima 5-HT (Phase silarylène immobilisée avec une polarité similaire aux phases 5% phényl-méthylpolysiloxane), 30 m x 0,32 mm x 0,10 µm (Macherey-Nagel)			
Gaz vecteur : He ; Débit constant : 2,0 ml/min			
Programmation de température: 80 °C-30 °C/min- 390 °C (8 min)			
T _{ligne de transfert} : 350 °C		Type d'injecteur : on-column	
Paramètres du spectromètre de masse			
Gamme de m/z : (35-1000) u.m.a		Nombre de scan/s : 2,0	Tension du multiplicateur d'électron : 1456 V
			T _{source} : 250 °C

Tableau IV. 5. Conditions expérimentales d'analyse par pyrolyse de la fraction peu volatile d'exsudat de type copal de *G. demeusei* (Harms) J. Léonard

Paramètres du chromatographe			
Colonne : Optima 5-HT (Phase silarylène immobilisée avec une polarité similaire aux phases 5% phényl-méthylpolysiloxane), 30 m x 0,32 mm x 0,10 µm (Macherey-Nagel)			
Gaz vecteur : He ; Débit constant : 2,0 ml/min			
Programmation de température: 40°C (2 min)-20°C/min-390°C (6,5 min)			
T _{ligne de transfert} : 350°C		Type d'injecteur : splitless	
Paramètres du spectromètre de masse			
Gamme de m/z : (35-1000) u.m.a		Nombre de scan/s : 2,0	Tension du multiplicateur d'électron : 1456 V
			T _{source} : 250°C

L'identification des composés est basée sur la comparaison de spectres de masse des composés présents à ceux de la banque de donnée NIST MS Library et/ou avec ceux décrits dans la littérature [Enzell et Ryhage, 1965 ; Pastorova et al., 1997; Scalarone et al., 2003; Assimopoulou and Papageorgiou, 2005 ; Doménech-Carbo et al., 2009; Popova et al., 2010, et NIST MS Library].

IV.3.4. Chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse (GCxGC-MS)

Les analyses en chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle sont réalisées à l'aide d'un système Trace GCxGC couplé à un DSQ II de type quadripolaire de Thermo-Electron Corporation (Courtaboeuf, France). Cet appareil est équipé d'un modulateur à double jets de dioxyde de carbone (modulateur cryogénique) et d'un injecteur split/splitless. Le logiciel de pilotage et d'acquisition est Xcalibur (version 1.4). Le logiciel utilisé pour visualiser les chromatogrammes en 2D et 3D est HyperChrom/Chromcard (version 2.4.1).

Tableau IV. 6. Conditions expérimentales d'analyse de la fraction volatile d'exsudat de type copal

Paramètres du chromatographe			
Colonne (1) : DB-5ms (5% -Phenyl-méthylpolysiloxane), 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, (J&W)			
Colonne (2) : TR-Wax MS (Polyéthylèneglycol), 1 m x 0,1 mmx 0,1 µm (Thermo Electron)			
Gaz vecteur : He ; Pression constante : 70kPa			
Programmation de température: 60°C (2 min)-3°C/min- 250°C (5 min)			
Temps de modulation : 6 s			
T _{ligne de transfert} : 200°C	T _{injecteur} : 250°C	Type d'injecteur : splitless	
Paramètres du spectromètre de masse			
Gamme de m/z : (30-300) u.m.a	Nombre de scan/s : 15,38	Tension du multiplicateur d'électron : 1373 V	T _{source} : 150°C

IV.4. Caractérisation des colonnes capillaires courtes par chromatographie en phase gazeuse avec détection FID

IV.4.1. Colonnes capillaires caractérisées

Des colonnes de 0,25 mm de diamètre interne ont été utilisées pour établir une série de nouvelles références de températures de rétention du dodécanoate de méthyle (E12). Leur nom commercial, leur structure chimique et leur fabricant sont donnés ci-dessous en figure 4.5. Ces colonnes de 30 m de long, 0,25 mm de diamètre interne et de 0,25 µm d'épaisseur de film sont coupées en deux pour obtenir deux colonnes de 15 m. Chaque colonne de 15 m est, à son tour, coupée de manière à obtenir une colonne de 5 m et de 10 m comme indiqué en figure 4.6.

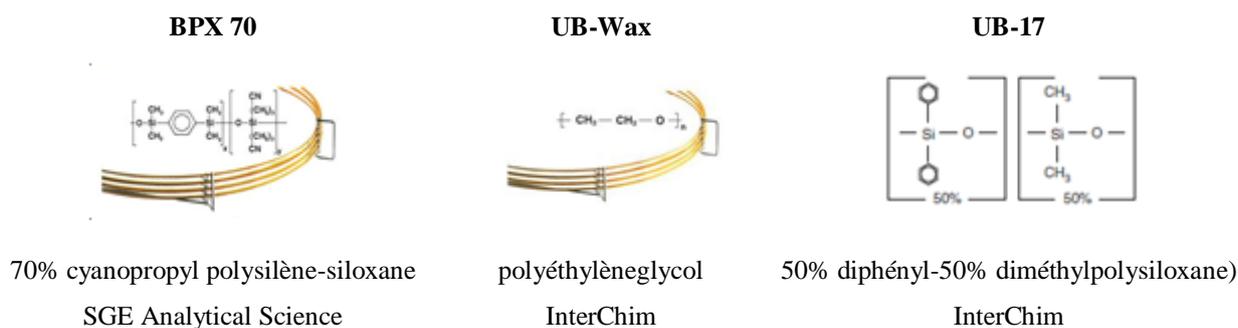
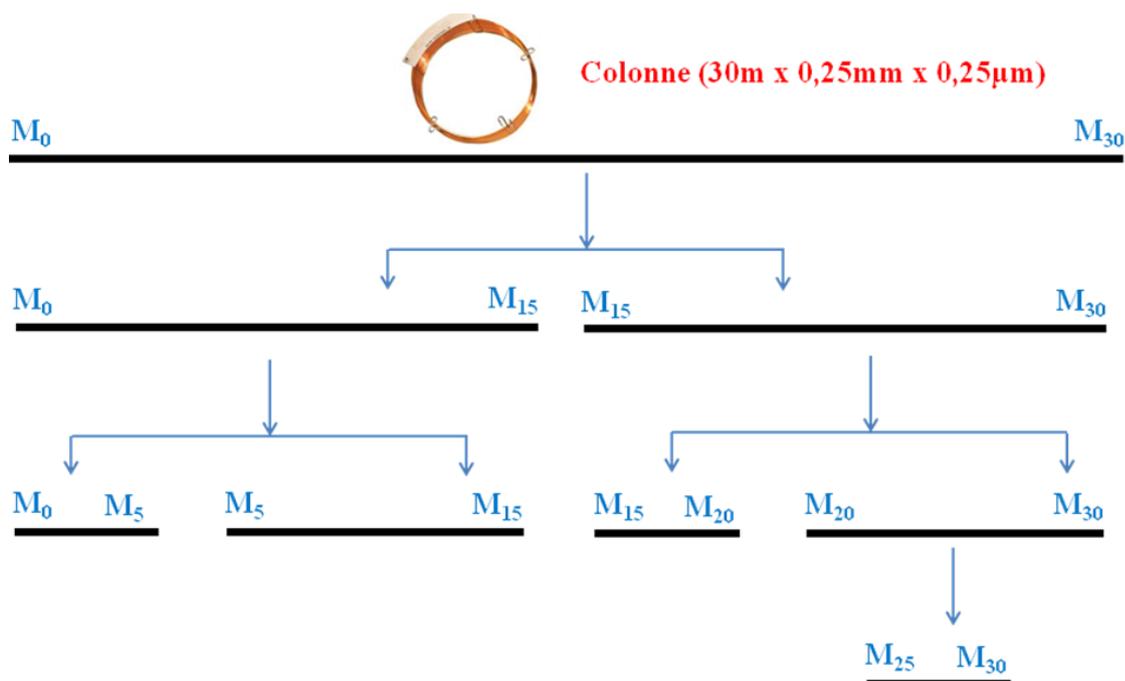


Figure 4. 5. Phases stationnaires des colonnes caractérisées de 0,25 mm de diamètre interne



M_0 : coté injecteur ; M_{30} : coté détecteur

Figure 4. 6. Schéma montrant la démarche de coupe des colonnes capillaires à caractériser

Des colonnes de 0,1 mm de diamètre interne (figure 4.7) ont été caractérisées pour des essais en GCxGC.

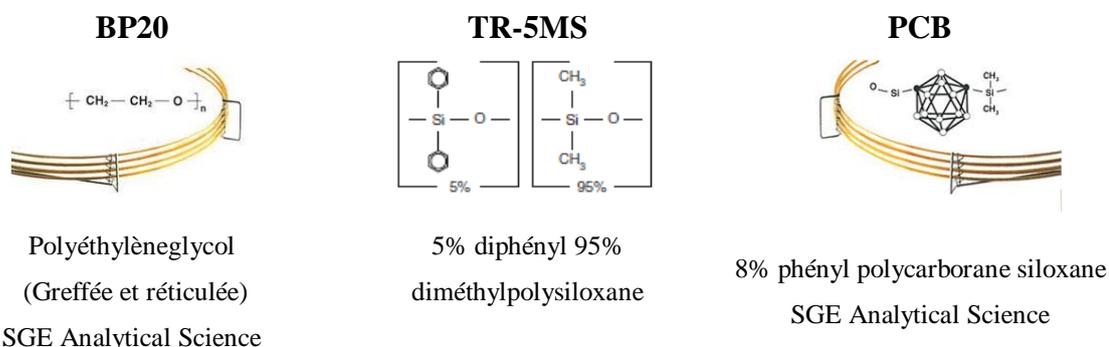


Figure 4. 7. Phases stationnaires des colonnes caractérisées de 0,1 mm de diamètre interne.

IV.4.2. Instrumentation CPG-FID et solution injectée

Les caractérisations de colonnes capillaires courtes ont été effectuées sur un chromatographe GC-2010 Plus Shimadzu équipé d'un injecteur split/splitless, d'un détecteur à ionisation de flamme et piloté par le logiciel AZUR 4.6 (Datalys, Grenoble, France). Les conditions analytiques, décrites par Grob (1978), ont été légèrement modifiées. L'injection a été effectuée en mode split à 220°C, avec un débit de split de 30 ml/min et un rapport de split voisin de 1/30. Le détecteur était chauffé à 230°C. Chaque analyse a été répétée six fois.

1 µl du mélange de Grob, commercialisé par Supelco (Bellefonte, USA), a été injecté. Pour le seul dodécanoate de méthyle (E12) parmi les douze solutés de ce mélange, nous avons :

- a) relevé sa température de rétention en mode programmation de température.
- b) calculé son facteur de rétention et ses hauteurs minimums de plateau théorique en mode isotherme.

Ces grandeurs ont permis respectivement de déterminer l'épaisseur de film moyenne de phases stationnaire des colonnes capillaires et leur efficacité d'imprégnation (coating efficiency ou CE). L'efficacité d'imprégnation est calculée par la méthode de [Ettre et al. \(1963 ; 1998\)](#). Cette valeur donne une idée de l'homogénéité de couverture des parois par la phase stationnaire.

IV.4.3. Protocole expérimental suivi pour exécuter le test de Grob

La température initiale du four a été fixée à 50°C comme rapporté par [Tranchant \(1982\)](#) et la température finale à 140°C. La rampe de programmation de température et la vitesse linéaire de gaz vecteur ont été fixées en fonction de la longueur des colonnes testées, en respectant les consignes de [Grob \(1978\)](#) reportées ci-dessous. La vitesse linéaire de l'hélium a été réglée à 25°C, de telle manière que le temps de sortie du méthane, choisi comme composé non retenu, soit égal aux valeurs données dans le tableau IV.7.

Tableau IV. 7. Temps du non retenu et rampe de programmation de température en fonction de la longueur de colonne [[Grob, 1978](#)]

Longueur de la colonne en m	Gaz vecteur He	
	t ₀ (s)	Rampe (r) de programmation de température (°C/min)
10	35	2,50
15	53	1,65
20	70	1,25
30	105	0,84
40	140	0,63
50	175	0,50

Les analyses ont été réalisées d'une part à pression constante et d'autre part à volume constant.

Plusieurs remarques doivent être faites concernant ces conditions expérimentales:

a) établissement des valeurs de référence

La quantification de l'épaisseur de film d'une colonne requière la détermination de la température de rétention de référence du E12 pour toutes les phases stationnaires. Comme cette température de rétention n'est fonction que de l'épaisseur de film, les températures de références ont été établies initialement avec des colonnes d'épaisseur de film de 0,15 µm. La plupart des phases stationnaires utilisées à l'époque par Grob (1978) n'étaient pas des phases greffées mais des phases enduites. De nos jours un certain nombre de phases stationnaires ont des structures moléculaires modifiées par rapport à celles des années 1970-1980 leur conférant une meilleure stabilité thermique indispensable pour les applications de chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, mais aussi d'obtenir des films minces plus homogènes qu'à cette époque. Dans une telle étude de détermination des épaisseurs de film, il conviendra donc de réactualiser les données de références auxquelles toutes les mesures seront comparées.

Dans la mesure où des mesures directes des épaisseurs de film par microscopie électronique se sont avérées infructueuses, nous serons donc amenés à prendre comme référence la valeur d'épaisseur de film fournies par les fabricants, de colonnes remplies par une méthode statique à partir des concentrations des solutions de phase stationnaire [Tranchant, 1982]. Toutefois, en gardant en mémoire que : lorsqu'on coupe une colonne en deux colonnes d'égale longueur, l'épaisseur de film moyenne risque d'être plus grande pour la colonne issue de la queue de la colonne originelle, que pour la colonne issue de la tête de la colonne originelle. Ceci à cause du processus d'évaporation du solvant.

b) Influence de la précision des mesures

De la précision de mesure de la température de rétention du dodécanoate de méthyle dépend la précision de la valeur de l'épaisseur de film qui en est déduite. Cette température de rétention dépend des paramètres de la programmation de température selon la formule suivante résultante d'un certain nombre d'approximations [Giddings, 1960].

$$T_R = \frac{-\frac{\Delta H}{R}}{\text{Log } \left\{ \frac{k' \Delta H}{RuT_R^2} \right\}} \approx -\Delta H \quad (4.1)$$

où ΔH est l'enthalpie de vaporisation du soluté en solution dans la phase stationnaire

$\Delta H = \Delta H_v + \Delta H_E$ avec ΔH_v enthalpie de vaporisation du soluté pur et ΔH_E enthalpie d'excès

R : la constante des gaz parfaits

r : la rampe de programmation de température

L : la longueur de la colonne

$$k' = (\text{cte } T e^{\Delta S/R})/V_M$$

ΔS : l'entropie de la solution du soluté en phase stationnaire

V_M : le volume moléculaire du soluté

u : la vitesse linéaire du gaz vecteur.

Dans cette publication, Giddings montre qu'en respectant les conditions expérimentales telles que la valeur numérique de l'expression logarithmique du dénominateur soit grande, la température de rétention d'un soluté ne dépend que de son enthalpie de vaporisation ΔH et reste donc constante pour un soluté donné.

b₁) influence du choix de la valeur de la température initiale.

La température initiale préconisée par Grob est de 40°C et non pas 50°C. Les études théoriques de la rétention en programmation de température de Giddings (1960) ont montré que lorsque la différence de température entre la température initiale et la température de rétention est grande, cette dernière n'est pas affectée par la valeur de la première à condition de garder grand et constant le rapport rL/u . En regardant les valeurs de r , t_0 et L du tableau IV.7, il apparaît que ce critère a été respecté par Grob (1978 ; 1981) pour normaliser leur test de qualité des colonnes capillaires en chromatographie gazeuse. Par ailleurs, ces auteurs ont choisi le dodécanoate de méthyle de telle manière que son enthalpie de vaporisation soit grande ($\Delta H_v = 14,85$ kcal/mole) et qu'en conséquence il soit élué dans la rampe de température à une température supérieure d'au moins 50°C à la température initiale, quelles que soient la nature de la phase stationnaire et son épaisseur de film. Le fait d'avoir fixé dans notre étude la température initiale à 50°C au lieu de 40°C n'a donc pas d'influence sur la valeur numérique de la température de rétention du E12 et devrait conduire à une évaluation de l'épaisseur de film correcte.

b₂) D'après Grob (1978 ; 1981), la température de rétention du E12 est répétable à 1° près, si les conditions standardisées préconisées sont gardées constantes dans une limite raisonnable. En terme d'épaisseur de film cela entraîne une variation maximum de 5%. Nous reviendrons sur cette affirmation plus loin dans ce texte, car la précision de mesure est fonction de l'épaisseur de film trouvée. Quant à la répétabilité, ils ne précisent pas si elle concerne les conditions d'appareillage ou s'il s'agit des colonnes testées.

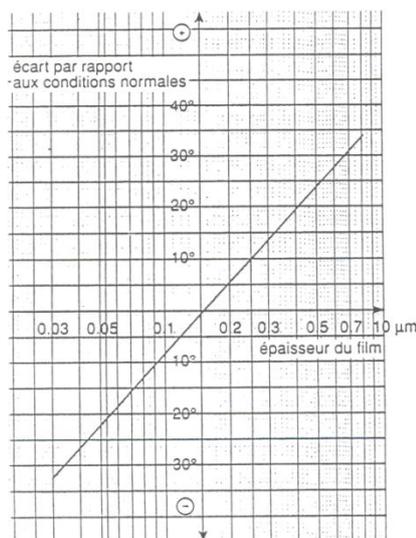
Pour notre part nous avons entrepris une étude de répétabilité liée aux conditions d'appareillage et bien sûr, sur les différentes colonnes courtes obtenues à partir de la coupure d'une colonne initiale de grande longueur.

Une difficulté majeure est apparue pour le réglage des vitesses linéaires de gaz vecteur pour les colonnes courtes, compte-tenu des valeurs numériques à respecter pour la valeur correspondante du t_0 du méthane. Ceci dit, [Grob et al. \(1978 ; 1981\)](#) montrent dans leur travail original que les performances des colonnes restent pratiquement identiques pour une variation de t_0 de 10 %. Les différences de valeurs de t_0 avec lesquelles nous avons travaillé par rapport aux valeurs préconisées par [Grob \(1978 ; 1981\)](#) pour les colonnes courtes ne devraient donc pas affecter la mesure de la température de rétention du E12 dans l'étude comparative que nous avons menée.

IV.4.4. Evaluation de l'épaisseur de film des phases stationnaires

Pour déterminer l'épaisseur de film des phases stationnaires des colonnes étudiées, nous avons utilisé le protocole publié par Grob [[Grob, 1978](#)]. En effet, la température d'élution du dodécanoate de méthyle (E12) dépend de l'épaisseur de film de la phase stationnaire. Les travaux de [Grob \(1978\)](#) ont permis d'établir une série de références de température de sortie du E12 pour différents types de phase stationnaire. Ces références ont été établies pour des épaisseurs de film de 0,15 μm , si la phase stationnaire utilisée a une épaisseur différente; alors on observe une différence de température de sortie du E12. En se basant sur le nomogramme proposé par Grob (figure 4.8), il est possible de relier cette différence de température de sortie du E12 à l'épaisseur de film de la phase stationnaire soit en utilisant le nomogramme soit en utilisant l'équation (4.2).

$$e_f = e^{\left(\frac{\Delta T_R - 37,138}{19,576}\right)} \quad (4.2)$$



Ecarts des températures par rapport aux conditions habituelles dites standard pour des épaisseurs de film autres que 0,15 μm données par Grob.

Figure 4. 8. Nomogramme de Grob (1978). Abscisses : épaisseur de film. Ordonnées : différence de température de rétention ΔT_R

Cette équation ou ce nomogramme permet d'évaluer la différence d'épaisseur de film Δe_f qui entraîne une différence ΔT_R de 1°C sur la valeur de la température de rétention à partir de la valeur théorique d'épaisseur de film donnée par un fabricant quand la colonne est neuve. Compte-tenu de l'échelle logarithmique des ordonnées, cette différence n'est pas proportionnelle à e_f . Elle est arrondie à la deuxième décimale et reportée dans le tableau (IV.8).

Tableau IV. 8. Différence d'épaisseur de film (Δe_f) qui entraîne une différence de température (ΔT_R) de 1°C sur la valeur de la température de rétention

ΔT_R	Δe_f initiale μm	Δe_f μm	$\Delta k/k$ isotherme %
1°	0,10	0,005	5,00
1°	0,15	0,008~ 0,010	5,33
1°	0,25	0,013~0,010	5,20
1°	0,32	0,015	4,70
1°	0,53	0,030	6,00

Les colonnes utilisées pour la chromatographie gazeuse capillaire rapide (fast-GC) ont des géométries variant de 10m x 0,05mm x 0,1 μm et plus rarement à 6m x 0,25mm x 0,25 μm ;

celles pour la chromatographie bidimensionnelle totale en ligne (comprehensive GC 2D) sont beaucoup plus courtes, environ 1m x 0,1mm x 0,01 μ m [Van Lieshout et al., 1998].

En général ce sont des colonnes de petit diamètre (permettant de développer la meilleure efficacité par unité de longueur de la colonne) et d'épaisseur de film mince pour permettre d'avoir des temps de rétention très courts.

En conclusion une variation de 0,01 μ m d'épaisseur de film de ces colonnes conduira à une variation de 1° sur les températures de rétention en mode programmation de température et voisine de 5% sur les facteurs et temps de rétention en mode isotherme.

Du point de vue pratique, deux cas de figures se présenteront lorsqu'on comparera les températures de rétention du E12 sur des colonnes capillaires :

- a) Cas de la comparaison de deux colonnes neuves et de même géométrie : si l'épaisseur de film est régulière, deux colonnes de même longueur doivent conduire à deux valeurs égales de T_R et donc des chromatogrammes reproductibles. Ce sera le cas de notre étude.
- b) Cas de la comparaison d'une colonne usagée avec la même colonne neuve :
 - b₁) Si T_R de la colonne usagée est inférieur à T_R de la colonne lorsqu'elle était neuve cela signifie que par évaporation lente la phase stationnaire a été entraînée. Les chromatogrammes résultant ne seront pas reproductibles en terme de rétention mais reproductibles en terme de sélectivité.
 - b₂) si T_R de la colonne usagée est différent de T_R de la colonne lorsqu'elle était neuve et que les sélectivités sont modifiées, cela signifiera que la phase stationnaire est modifiée soit par adsorption irréversible de solutés très peu volatils des échantillons analysés (dans ce cas la T_R du E12 sera soit augmentée soit inchangée), soit par déshabillage partiel de la paroi de la colonne.

IV.4.5. Evaluation de l'homogénéité de la phase stationnaire le long de la colonne

Pour évaluer la qualité (régularité) du dépôt de film de phase stationnaire le long de la colonne en supposant l'homogénéité de son diamètre tout le long de sa longueur, ou pour comparer les performances des colonnes d'épaisseur de film inférieure ou égale à 0,5 μ m, l'efficacité d'imprégnation (coating efficiency) a été déterminée [Ettre, 1998]. Cette dénomination qui peut amener des confusions a été modifiée sous le nom suivant « Utilisation

de l'efficacité théorique ou UTE% ». Cette efficacité d'imprégnation (CE%) est définie comme étant le rapport de la hauteur équivalente à un plateau théorique minimum, théorique $H_{\min(\text{théor})}$ à la hauteur équivalente à un plateau théorique minimum expérimentale $H_{\min(\text{exp})}$ dans les conditions optimales. Elle est donnée par la formule (4.3).

$$CE = \left(\frac{H_{\text{théor}}}{H_{\text{exp}}} \right)_{\min} = \frac{r \sqrt{\frac{1 + 6k + 11k^2}{3(1+k)^2}}}{\frac{L}{N}} \quad (\%) \quad (4.3)$$

$H_{\min(\text{théor})}$: la hauteur équivalente à un plateau théorique minimum théorique. Cette grandeur est calculée d'après l'équation de [Golay \(1958\)](#)

r : le rayon interne de la colonne capillaire

k : le facteur de rétention

$H_{\min(\text{exp})}$: la hauteur équivalente à un plateau théorique minimum expérimental = L/N

L : la longueur de la colonne

N : le nombre de plateaux théoriques de la colonne = $5.54 (\text{tr}/\omega_{0.5})^2$

Pour déterminer l'efficacité d'imprégnation (CE), $H_{\min(\text{exp})}$ et $H_{\min(\text{théor})}$ du dodécanoate de méthyle sont calculées après analyse en mode isotherme à 110°C.

Le diamètre de la plupart des colonnes modernes donné par les fabricants est de 0,25 mm alors qu'en fait ce diamètre est voisin de 0,23 mm. Cela entraîne une surévaluation de 8% dans le calcul de $H_{\min(\text{théor})}$. Ceci dit, si l'on compare des colonnes de même diamètre les valeurs de CE obtenues même si elles ne sont pas justes permettent leur comparaison. La plus grande difficulté est la mesure précise du t_0 . Compte-tenu que le méthane, marqueur du t_0 , donne des temps de percolation court il convient d'utiliser un soluté dont le facteur de rétention est supérieur à 5, de telle manière que l'influence d'une erreur sur le t_0 n'influe pratiquement pas sur la valeur calculée de k. De même le fait de ne pas travailler dans les conditions de vitesse linéaire optimale ne représente pas un problème majeur lorsque le dihydrogène ou l'hélium sont utilisés comme gaz vecteur. Enfin lorsque des colonnes de caractéristiques différentes (diamètre, épaisseur de film) seront comparées, il conviendra de travailler à facteur de rétention constant même si pour cela il faut changer le soluté de référence.

IV.5. Applications en GCxGC-MS après caractérisation des colonnes capillaires

Des applications en GCxGC-MS ont été menées, en employant, en deuxième dimension, deux portions de 1m de la colonne BP20 (0,1 mm x 0,1 µm). Ces portions de colonne sont notées

M₀M₁ et M₁M₂. Les échantillons analysés ont été la fraction volatile du copal obtenue par Hs-SPME et l'huile essentielle de citronnelle.

Tableau IV. 9. Conditions expérimentales d'analyse de la fraction volatile extrait par Hs-SPME de *G. demeusei* (Harms) J. Léonard en GCxGC-MS

Paramètres du chromatographe			
Colonne (1) : DB-5ms (5%-Phényl-méthylpolysiloxane), 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Agilent Technologies J&W			
Colonne (2) : BP20 (M ₀ M ₁ ou M ₁ M ₂) (Polyéthylèneglycol), 1 m, 0,1 mm, 0,1 µm, SGE Analytical Science			
Gaz vecteur : He ; Pression constante : 70kPa			
Programmation de température: 90°C-3°C/min-240°C			
Temps de modulation : 6 s			
T _{ligne de transfert} : 200°C	T _{injecteur} : 250°C	Type d'injecteur : splitless	
Paramètres du spectromètre de masse			
Gamme de m/z: (30-300) u.m.a	Nombre de scan/s : 15,38	Tension du multiplicateur d'électron : 1373 V	T _{source} : 150°C

Tableau IV. 10. Conditions expérimentales d'analyse de l'huile essentielle de la citronnelle en GCxGC-MS

Paramètres du chromatographe			
Colonne (1) : DB-5ms (5%-Phényl-méthylpolysiloxane), 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Agilent Technologies J&W			
Colonne (2) : BP20 (M ₀ M ₁ ou M ₁ M ₂) (Polyéthylèneglycol), 1 m, 0,1 mm, 0,1 µm, SGE Analytical Science			
Gaz vecteur : He ; Pression constante : 70kPa			
Programmation de température: 90 °C-3 °C/min-173 °C			
Temps de modulation : 6 s			
T _{ligne de transfert} : 200 °C	T _{injecteur} : 250 °C	Type d'injecteur : split	Débit de split : 30 ml/min
Paramètres du spectromètre de masse			
Gamme de m/z: (30-300) u.m.a	Nombre de scan/s : 15,38	Tension du multiplicateur d'électron : 1373 V	T _{source} : 150 °C

IV.6. Traitements des données

IV.6.1. Prétraitement des données spectrales

Les spectres obtenus en proche infrarouge ont d'abord subi un prétraitement avant leur exploitation. Dans le cas de notre étude, le prétraitement retenu est basé sur la normalisation *Standard Normal Variates* (SNV) ou déviation normale standardisée [Barnes et al., 1989]. L'effet de diffusion de la lumière qui domine généralement les spectres en raison des propriétés physiques de l'échantillon met donc en exergue les propriétés chimiques de celui-ci. Ce prétraitement se calcule individuellement pour chaque spectre qui est centré et réduit; les valeurs de réflectance sont diminuées de la réflectance moyenne du spectre et cette différence divisée par l'écart-type de celui-ci. La méthode employée est basée sur la relation qui se traduit par l'équation (4.5):

$$X_{ijSNV} = \frac{X_{ij} - \bar{X}_i}{sd} \quad (4.4)$$

$$sd = \sqrt{\sum_{j=1}^p \frac{(X_{ij} - \bar{X}_i)^2}{p-1}} \quad (4.5)$$

où p est le nombre de pas de la longueur d'onde, $i = 1 \dots n$;

n est le nombre d'observations et \bar{X}_i est la moyenne des observations à la longueur d'onde i .

IV.6.2. Prétraitement des données chromatographiques

En préalable de l'analyse en composantes principales (ACP), les données issues du couplage CPG-SM ont été soumises à un processus d'alignement des pics chromatographiques et de dépliement de la matrice de données. Le traitement des données issues des couplages entre la chromatographie et la spectrométrie de masse nécessite cette étape en raison, d'une part de faibles variations de temps de rétention et/ou de mesure du rapport m/z qui sont inévitables et, d'autre part, pour indiquer comme variable chaque valeur de rapport m/z apparaissant à un temps de rétention donné et présentant une intensité significative. Ce processus est réalisé à l'aide du programme informatique *mzMine* (version 2.10) [Pluskal et al., 2010]. Il se déroule en plusieurs étapes.

La première étape du traitement est de convertir chaque fichier CPG-SM en un ensemble de chromatogrammes extraits pour les valeurs de rapport m/z dépassant un seuil fixé en fonction du bruit de fond moyen des chromatogrammes. Un fichier CPG-SM peut alors être résumé à une liste de pics chromatographiques caractérisés par leur intensité maximale, leur temps de rétention et la valeur du rapport m/z auquel ils correspondent. Dans une seconde étape, en respectant des tolérances aussi bien sur les variations des temps de rétention que de la mesure des rapports m/z , les pics sont regroupés autour des valeurs moyennes mesurées pour les différents échantillons. Cette étape correspond à l'étape d'alignement, elle se concrétise par le fait que les échantillons sont maintenant décrits par un tableau renfermant l'intensité des pics observés pour des couples (temps de rétention, rapport m/z) qui représentent les variables. En ce sens, les données d'origine : un ensemble de profils CPG-SM bidimensionnel (temps, rapport m/z) sont « dépliés » pour constituer une matrice bidimensionnelle comportant autant de lignes qu'il y a d'échantillons et autant de colonnes que de variables issues de l'information CPG-SM.

IV.6.3. Analyses statistiques des données

Les analyses en composantes principales (ACP) ont été effectuées avec le logiciel SIMCA P-11 (Umetrics AB, Umeå, Suède). Cette méthode statistique de description graphique de données permet de représenter la majeure partie de la variance totale dans un espace ayant un nombre de dimensions (axes factoriels) réduit, c'est-à-dire plus petit que celui de l'espace initial des variables (ou facteurs).

L'analyse en composante principale a été effectuée sur 15 échantillons d'exsudat de *Dacryodes edulis* et comparée avec un échantillon de référence, la gomme élémi. Les principaux paramètres utilisés lors de l'étape d'alignement sont un bruit de fond estimé à 1×10^3 (unités arbitraires) et une tolérance de 0,5 unités aussi bien sur les temps de rétention que les rapports m/z. La matrice de données obtenue est constituée de 31 lignes (échantillons) et de 1078 colonnes (variables).

Pour comparer les résultats sur plusieurs séries de mesures sur un même échantillon dans des conditions de répétabilité, le test d'égalité de deux variances (Fisher-Snédecor) et le test d'égalité de deux moyennes (Test de Student) ont été utilisés.

IV.6.4. Comparaison de deux séries de mesures (étude des colonnes courtes)

Pour comparer les résultats de deux séries de données par exemple la température de rétention du E12 sur deux colonnes différentes, le test d'égalité de deux variances (Fisher-Snédecor) et le test d'égalité de deux moyennes (Test de Student) ont été utilisés [Maurice, 1993].

Références bibliographiques (partie II)

Articles scientifiques

Assimopoulou A.N. & Papageorgiou V.P. (2005). GC-MS analysis of penta-and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part II. *Pistacia terebinthus* var. *Chia*. *Biomed. Chromatogr.* 19: 586-605.

Barnes R.J., Dhanoa M.S., and Lister S.J. (1989). Standard Normal Variate Transformation and De-trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra. *Applied Spectroscopy* 43: 772-777.

Doménech-Carbó M.T., de la Cruz-Canizares J., Osete-Cortina L., Doménech-Carbó A., Davida H. (2009). Ageing behaviour and analytical characterization of the Jatobá resin collected from *Hymenaea stigonocarpa* Mart. *International Journal of Mass Spectrometry* 284: 81-92.

Enzell C.R., and Ryhage R. (1965). "Mass spectrometric studies of diterpenes. Carbodicyclic diterpenes". *Arkiv for Kemi* 23: 367-399.

Ettre L.S., Cieplinski E.W., Averill W., (1963) application of open tubular (Golay) columns with larger diameter. *J of Gas Chromatography*, 7 cité par Tranchant J. 207-208

Ettre L.S. (1998) The correct meaning of « Coating Efficiency » vs the « utilization of theoretical Efficiency » *Journal of High Resol Chromatogr* 21: 121-123

Giddings J.C. (1960). Retention times in programmed temperature gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 4: 11-20.

Grob K.Jr., Grob G. and Grob K.J. (1978). Comprehensive, standardized quality test for glass capillary columns. *Journal of Chromatography A* 156 : 1-20.

Chromatogr. 156 1

Grob K., Grob G., Grob K.Jr. (1981). Testing capillary gas chromatographic columns. *Journal of Chromatography A* 219 : 13-20.

Pastorova I., Van der Berg K.J., Boon J.J., Verhoeven J.W. (1997). Analysis of oxidized diterpenoid acids using thermally assisted methylation with TMAH. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 43: 41-57.

Pluskal T., Castillo S., Villar-Briones A., Orešič M. (2010). MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data, *BMC Bioinformatics* 11:395

Popova M.P., Graikou K., Chinou I., Bankova V.S. (2010). GC-MS profiling of diterpene compounds in Mediterranean propolis from Greece. *J Agric Food Chem.* 58: 3167-3176.

Scalarone D., Lazzari M., Chiantore O. (2003). Ageing behaviour and analytical pyrolysis characterisation of diterpenic resins used as art materials: Manila copal and sandarac. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 68–69: 115-136.

Van Lieshout M., Derks R., Janssen H-G ;, Cramers C.A., (1998) Fast Capillary Gas Chromatography : comparison of different approaches *Journal of High Resol Chromatogr* 21: 583-586.

Livres ou manuel

Golay M.J.E., dans Desty D.H. (1958) *Gas Chromatography Amsterdam Symposium*, UK, London, Butterworths 36-55

Itoua J. (2007). *Les Mbosi au Congo: Peuple et civilisation*. France: L'Harmattan.

Maurice J., (1993) *Jugement statistique sur échantillons en chimie*, France, Paris Polytechnica 176-188

Tranchant J., Gardais J-F., Gorin Ph., Prévôt A., Serpinet J., Untz., (1982)

Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse 3° Ed. France, Paris, Masson

Thèses, mémoires ou rapports de fin d'études

Le Grand N. (2008). *Démarche de l'ethnopharmacologie appliquée : plantes antidiabétiques de Madagascar*. Thèse de doctorat, Université de Rennes.

Site internet

Royal Botanic Gardens Kew and Missouri Botanical Garden. (2014). The Plant List. Consulté le 01 juillet 2014 de www.theplantlist.org.

Base de données spectrales

NIST (2005). NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library Version 2.0. Office of the Standard Reference Data Base, National Institute of Standards and Technology. Gaithersburg, Maryland.

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

**Chapitre V : Résultats et discussion sur l'inventaire des plantes
à exsudats du Congo**

Chapitre VI : Etude analytique des exsudats des plantes

Chapitre V : Résultats et discussion sur l'inventaire des plantes à exsudats du Congo

V.1. Plantes à exsudats du Congo inventoriées d'après la littérature	115
V.2. Utilisation des exsudats inventoriés d'après la littérature	123
V.3. Plantes à exsudats inventoriées à partir des enquêtes ethnobotaniques	127
V.4. Monographies des plantes à exsudats les plus citées	130

Ce chapitre présente et discute les résultats de l'inventaire des plantes à exsudats du Congo. Cette étude a permis d'établir un listing des plantes à exsudats, de recenser les exsudats produits et de rapporter leurs différents usages.

V.1. Plantes à exsudats du Congo inventoriées d'après la littérature

Le résultat des recherches bibliographiques sur les plantes à exsudats est présenté dans le tableau V.1. Nous avons pu recenser 135 plantes à exsudats appartenant à 87 genres. Pour chaque espèce citée, nous avons pris le soin de vérifier si elle est présente au Congo. Comme le montre le tableau V.1, certaines familles ne sont pas très connues pour leurs exsudats. Cela peut être dû soit au fait que les plantes de ces familles sont dépourvues d'appareils sécréteurs, soit leurs exsudats n'ont pas été très utilisés et donc peu rapportés. Il semble que cela puisse être dû au fait que leurs espèces ne sont pas très représentées dans cette région du bassin du Congo et particulièrement en République du Congo. Un exemple frappant est le cas de la famille des Achariaceae qui est une famille endémique de la région du Cap en Afrique du Sud dont une seule espèce, *Scottellia klaineana* a été signalée par [Vivien & Faure \(2011\)](#). Nous avons constaté que certaines familles avaient moins d'espèces qui exsudent. C'est le cas de la famille des Annonaceae, des Hypericaceae, des Olaceae, des Rubiaceae, des Sapindaceae et des Sterculiaceae. Par contre, d'autres familles sont bien connues pour leurs exsudats ; c'est le cas de la famille des Anacardiaceae qui renferme plus de 800 espèces tropicales et subtropicales, majoritairement des arbres et des arbustes, ayant un appareil sécréteur à résine dans leur écorce [[Botineau, 2010](#)]. Les exsudats des Anacardiaceae sont qualifiés soit d'exsudats gommeux soit d'exsudats résineux. Nous avons recensé 09 espèces dans cette famille. D'autres exsudats du type résineux (oléorésines, gommés-résines et résines) ont été longuement rapportés dans la famille des Burseraceae et des Fabaceae-Caesalpinioideae.

Nous avons répertorié 07 espèces soient 04 genres (*Aucoumea*, *Canarium*, *Dacryodes*, *Santiria*) dans la famille des Burseraceae et 17 espèces soient 10 genres (*Afzelia*, *Anthothona*, *Aphanocalyx*, *Berlinia*, *Copaifera*, *Daniellia*, *Dialium*, *Erythrophleum*, *Guibourtia*, *Prioria*) dans la famille des Fabaceae-Caesalpinioideae. La majorité des copals africains sont produits par les plantes de la famille des Fabaceae-Caesalpinioideae. Cependant, certaines familles se caractérisent du point de vue botanique par la présence de nombreux canaux laticifères produisant des exsudats de type latex, le plus souvent de couleur blanche. C'est notamment le cas des Apocynaceae, des Euphorbiaceae et des Sapotaceae. Ces latex s'oxydent rapidement à l'air en changeant de couleur mais aussi de composition chimique. Nous avons répertorié 13 espèces soient 11 genres (*Alstonia*, *Baijsea*, *Funtumia*, *Hunteria*, *Landolphia*, *Picralima*, *Pycnobotrya*, *Rauvolfia*, *Saba*, *Tabernaemontana*, *Voacanga*) dans la famille des Apocynaceae. Si les exsudats des espèces de cette famille sont largement cités par [Raponda \(1995\)](#), c'est sans doute par le fait qu'ils ont longtemps servi à falsifier le caoutchouc. Dans la famille des Euphorbiaceae, 14 espèces soient 11 genres ont été identifiées. Dans la famille des Sapotaceae, nous avons répertorié 15 espèces soient 10 genres. La famille des Fabaceae sous-famille des Papilionoideae produit des exsudats de type gomme ou résine. Dans cette sous-famille, 04 espèces soient 03 genres (*Amphimas*, *Millettia*, *Pterocarpus*) ont été trouvées. Par contre, dans la sous-famille des Mimosoideae, 08 espèces ont été recensées soient 05 genres (*Albizia*, *Cylicodiscus*, *Fillaeopsis*, *Newtonia*, *Samanea*).

Les Guttiferae quant à eux, présentent les canaux sécréteurs ou de lacunes sécrétrices schizogènes à exsudats colorés. Les exsudats des plantes de cette famille les plus rencontrés sont de type latex souvent de couleur jaune. Nous avons ainsi inventorié 11 espèces soient 04 genres (*Allanblackia*, *Garcinia*, *Mammea*, *Symphonia*). Cependant, les exsudats du genre *Garcinia* sont qualifiés de gommes-résines par [Botineau \(2010\)](#).

Dans la famille des Meliaceae, 07 espèces soient 04 genres (*Entandrophragma*, *Guarea*, *Lovoa*, *Trichilia*) ont été répertoriées. Les exsudats rencontrés dans cette famille sont des latex ou des gommes.

La famille des Moraceae quant à elle est caractérisée par la présence de latex dans leurs tissus (parenchyme ou collenchyme). Les recherches bibliographiques nous ont permis de répertorier 17 plantes à exsudats réparties en 05 genres (*Antiaris*, *Ficus*, *Milicia*, *Treculia*, *Trilepisium*). Par contre, 05 espèces ont été répertoriées dans la famille des Myristicaceae, soient 03 genres (*Coelocaryon*, *Pycnanthus*, *Staudtia*).

Tableau V. 1. Plantes à exsudats du Congo inventoriées d'après la littérature

Familles		Espèces	Types d'exsudats et caractéristiques	Références
Achariaceae	1	<i>Scottellia klaineana</i> Pierre	gomme	Vivien & Faure, 2011
Anacardiaceae	1	<i>Anacardium occidentale</i> Linn	gomme jaune ou rouge	Raponda-Walker, 1995
	2	<i>Antrocaryon klaineanum</i> Pierre.	exsudat résineux gluant devenant brun à l'air	Bouquet, 1969
	3	<i>Lannea barteri</i> (Oliv.) Engl.	sécrétion gommeuse jaune et visqueuse, devenant vite blanche	Raponda-Walker, 1995
	4	<i>Lannea welwitschii</i> (Hiern) Engl.	sécrétion gommeuse incolore plus ou moins abondante	Raponda-Walker, 1995
	5	<i>Lannea zenkeri</i> Engl. & K. Krause	sécrétion gommeuse abondante	
	6	<i>Mangifera indica</i> Linn	exsudat résineux rougeâtre	
	7	<i>Pseudospondias microcarpa</i> (A.Rich.) Engl.	résine rouge	
	8	<i>Spondias monbin</i> Linn	résine	Vivien & Faure, 2011
	9	<i>Trichoscypha acuminate</i> Engl.	latex blanc abondant	Raponda-Walker, 1995
Annonaceae	1	<i>Cleistopholis glauca</i> Pierre ex Engl.	liquide visqueux transparent à odeur aromatique	Vivien & Faure, 2011
Apocynaceae	1	<i>Alstonia boonei</i> De Wild.	latex blanc poisseux et très fluide	Loupe et al., 2008
	2	<i>Alstonia congensis</i> Engl.	latex blanc abondant	Bouquet, 1969 ; Loupe et al, 2008
	3	<i>Baijsea axillaris</i> (Benth.) Hua	latex	Schmelzer, 2006
	4	<i>Funtumia elastica</i> (Preuss) Stapf	latex	Bouquet, 1969
	5	<i>Hunteria umbellata</i> (K.Schum.) Hallier f.	latex blanc	Boone, 2006
	6	<i>Landolphia owariensis</i> P. Beauv	latex	Anthony, 1995
	7	<i>Picralima nitida</i> (Stapf) T.Durand & H.Durand	latex abondant	Vivien & Faure, 2011
	8	<i>Pycnobotrya nitida</i> Benth.	latex	Bouquet, 1969
	9	<i>Rauvolfia caffra</i> Sond.	latex blanc	Mollet, 2007
	10	<i>Rauvolfia vomitoria</i> Afzel.	latex	Schmelzer, 2007
	11	<i>Saba comorensis</i> (Bojer ex A.DC.) Pichon	latex abondant	Bouquet, 1969
	12	<i>Tabernaemontana crassa</i> Benth.	latex	
	13	<i>Voacanga africana</i> Stapf ex Scott-Elliot	latex abondant	Arbonnier, 2009

Tableau V.1. Plantes à exsudats du Congo inventoriées d'après la littérature (suite 1)

Familles	Espèces	Types d'exsudats et caractéristiques	Références		
Burseraceae	1	<i>Aucoumea klaineana</i> Pierre.	résine blanche à odeur d'encens et de térébenthine	Loupe et <i>al.</i> , 2008	
	2	<i>Canarium schweinfurtii</i> Engl.	résine translucide aromatique à odeur de térébenthine	Raponda-walker	
	3	<i>Dacryodes buettneri</i> (Engl.) H.J. Lam	résine poisseuse à odeur de térébenthine	Todou & Doumenge, 2008	
	4	<i>Dacryodes camerunensis</i> Onana	gomme-résine	Vivien & Faure, 2011	
	5	<i>Dacryodes edulis</i> (G. Don) K. J. Lam.	exsude une résine en très faible quantité	Eyog Matig et <i>al.</i> , 2006	
	6	<i>Dacryodes klaineana</i> (Pierre) H.J.Lam	gomme à odeur de térébenthine	Vivien & Faure, 2011	
	7	<i>Santiria trimera</i> (Oliv.) Aubrev.	résine jaune verdâtre épaisse		
Euphorbiaceae	1	<i>Anthostema aubryanum</i> Baill.	latex blanc abondant très caustique		
	2	<i>Croton haumanianus</i> J. Léonard	exsudat brun poisseux		
	3	<i>Dichostemma glaucescens</i> Pierre	latex blanc très épais et poisseux		
	4	<i>Euphorbia cervicornu</i> Baill.	latex toxique		
	5	<i>Euphorbia drupifera</i> Thonn.	latex abondant et caustique		
	6	<i>Euphorbia hermentiana</i> Lemaire.	latex		
	7	<i>Euphorbia tirucalli</i> L.	latex blanc et toxique		
	8	<i>Gymnanthes inopinata</i> (Prain) Esser	latex		
	9	<i>Macaranga schweinfurthii</i> Pax	gomme		
	10	<i>Plagiostyles africana</i> (Müll.Arg.) Prain	exsudat liquide blanchâtre		
	11	<i>Ricinodendron heudelotii</i> (Baill.) Heckel	latex de couleur rouge		Laird et <i>al.</i> , 1997; Burkill, 1994
	12	<i>Shirakiopsis elliptica</i> (Hochst.) Esser	latex blanc		Vivien & Faure, 2011
	13	<i>Spondianthus preussii</i> Engl.	exsudat rougeâtre		
	14	<i>Tetrorchidium didymostemon</i> (Baill.) Pax & K.Hoffm	liquide rosâtre exsudé lentement		

Tableau V.1. Plantes à exsudats du Congo inventoriées d'après la littérature (suite 2)

Familles	Espèces	Types d'exsudats et caractéristiques	Références	
Fabaceae Caesalpinioideae	1	<i>Afzelia bipindensis</i> Harms	exsudat brun jaunâtre, très aromatique	Gérard & Louppe, 2011
	2	<i>Anthonotha macrophylla</i> P. Beauv.	gomme blanchâtre	Vivien & Faure, 2011
	3	<i>Aphanocalyx cynometroides</i> Oliv.	résine	
	4	<i>Berlinia bracteosa</i> Benth.	gomme poisseuse blanc crème	
	5	<i>Berlinia bruneelii</i> (De wild.) Torre & Hillc.	exsudat résineux	Harris et al., 2011
	6	<i>Berlinia grandiflora</i> (Vahl) Hutch. & Dalz.	exsudat gommeux	Bouquet, 1969
	7	<i>Copaifera mildbraedii</i> Harms	exsudat résineux (copal)	Vivien & Faure, 2011
	8	<i>Copaifera religiosa</i> J. Léonard	résine incolore très poisseuse et odorante	
	9	<i>Copaifera salikounda</i> Heckel	exsudat résineux (copal)	Bouquet, 1969
	10	<i>Daniellia klainei</i> Pierre ex A. Chev.	oléorésine gluante, odorante et translucide	Raponda-walker, 1995
	11	<i>Daniellia ogea</i> (Harms) Rolfe ex Holland	copal	Schmelzer, 2012
	12	<i>Dialium guineense</i> Willd.	exsudat de couleur rouge	Raponda-walker, 1995
	13	<i>Dialium pachyphyllum</i> Harms	gomme-résine	Lemmens et al., 2012
	14	<i>Erythrophleum suaveolens</i> (Guill. & Perr.) Brenan	exsudat incolore ou rougeâtre	Raponda-walker, 1995
	15	<i>Guibourtia demeusei</i> (Harms) J. Léonard	exsudat résineux (copal)	
	16	<i>Prioria buchholzii</i> (Harms) Breteler	résine verdâtre	Vivien & Faure, 2011
	17	<i>Prioria oxyphylla</i> (Harms) Breteler	exsudat résineux de couleur rouge	Raponda-walker, 1995
Fabaceae Mimosoideae	1	<i>Albizia adianthifolia</i> (Schum.)	exsudat résineux	Arbonnier, 2009
	2	<i>Albizia brownei</i> (Walp.) Oliv.	gomme	Loupe et al., 2008
	3	<i>Albizia ferruginea</i> (Guill. & Perr.) Benth.	gomme brun rouge	
	4	<i>Cylicodiscus gabunensis</i> Harms	liquide translucide jaune	
	5	<i>Fillaeopsis discophora</i> Harms	liquide translucide jaune à odeur nauséabonde prononcée	Vivien & Faure, 2011
	6	<i>Newtonia grandifolia</i> Villiers	liquide jaune translucide poisseux blanc grisâtre	
	7	<i>Newtonia leucocarpa</i> (Harms) G.C.C. Gilbert	liquide jaune translucide poisseux blanc grisâtre	
	8	<i>Samanea leptophylla</i> (Harms.) Bren. et Brum.	gomme jaune translucide	

Tableau V.1. Plantes à exsudats du Congo inventoriées d'après la littérature (suite 3)

Familles		Espèces	Types d'exsudats et caractéristiques	Références
Fabaceae Papilionoideae	1	<i>Amphimas ferrugineus</i> Pierre ex Pellegr.	exsudat de couleur rouge	Vivien & Faure, 2011
	2	<i>Amphimas pterocarpoides</i> Harms.	résine de couleur rouge	Tchinda & Tané, 2008
	3	<i>Millettia laurentii</i> De Wild.	exsudat abondant poisseux	Vivien & Faure, 2011
	4	<i>Pterocarpus soyauxii</i> Taub.	liquide rougeâtre qui durcit et devient noirâtre en séchant	
Guttiferae (Clusiaceae)	1	<i>Allanblackia floribunda</i> Oliv.	latex jaune abondant	Vivien & Faure, 2011
	2	<i>Allanblackia staneriana</i> Exell & Mendonça	latex jaune abondant	
	3	<i>Garcinia punctata</i> Stapf.	latex	
	4	<i>Garcinia huillensis</i> Welw.	latex jaune	
	5	<i>Garcinia kola</i> Heckel	latex jaune très collant et peu abondant	
	6	<i>Garcinia lucida</i> Vesque.	latex blanc, résineux	
	7	<i>Garcinia mannii</i> Oliv.	latex jaune, épais, résineux et poisseux	
	8	<i>Garcinia ovalifolia</i> Oliv.	latex gluant jaune	Harris et al., 2011
	9	<i>Garcinia smeathmannii</i> (Planch. & Triana) Oliv.	latex jaune	Bouquet, 1969
	10	<i>Mammea africana</i> G. Don	latex jaune	
		11	<i>Symphonia globulifera</i> L.f.	latex
Hypericaceae	1	<i>Harungana madagascariensis</i> Lam. ex Poir.	gomme rouge- orangé	Boullard, 2001
Meliaceae	1	<i>Entandrophragma angolense</i> (Welw.) C.DC.	exsudat jaune poisseux	Vivien & Faure, 2011
	2	<i>Entandrophragma candollei</i> Harms	exsudat gommeux	
	3	<i>Guarea thompsonii</i> Sprague & Hutch.	latex blanc	
	4	<i>Lovoa trichilioides</i> Harms	gomme jaune peu abondante	
	5	<i>Trichilia gilgiana</i> Harms	latex	
	6	<i>Trichilia tessmannii</i> Harms	latex crème peu abondant	
	7	<i>Trichilia welwitschii</i> C.DC.	latex blanchâtre peu abondant	

Tableau V.1. Plantes à exsudats du Congo inventoriées d'après la littérature (suite 4)

Familles	Espèces	Types d'exsudats et caractéristiques	Références	
Moraceae	1	<i>Antiaris toxicaria subsp. welwitschii</i> (Engl.) C.C.Berg	latex de couleur crème secrété lentement	Loupe et al., 2008
	2	<i>Ficus calyptrata</i> Vahl	latex blanc assez abondant	Vivien & Faure, 2011
	3	<i>Ficus cyathistipula</i> Warb.	latex blanc	Bouquet, 1969
	4	<i>Ficus dryepontiana</i> Gentil	latex blanc	Vivien & Faure, 2011
	5	<i>Ficus elasticoides</i> De Wild.	latex blanc abondant	
	6	<i>Ficus exasperata</i> Vahl	latex incolore collant	
	7	<i>Ficus lutea</i> Vahl	latex blanc abondant	
	8	<i>Ficus mucuso</i> Welw. ex Ficalho	latex blanchâtre	
	9	<i>Ficus saussureana</i> DC.	latex blanc	Bouquet, 1969
	10	<i>Ficus sur</i> Forssk.	latex blanc	Vivien & Faure, 2011
	11	<i>Ficus thonningii</i> Blume	latex	Bouquet, 1969
	12	<i>Ficus trichopoda</i> Baker	latex blanc très gluant	Vivien & Faure, 2011
	13	<i>Ficus wildemaniana</i> Warb.	latex	Bouquet, 1969
	14	<i>Milicia excelsa</i> (Welw.) C.C.Berg	latex blanchâtre très fluide se coagulant à l'air	
	15	<i>Treculia africana</i> Decne. ex Trécul	latex blanchâtre abondant	Vivien & Faure, 2011
	16	<i>Treculia obovoidea</i> N.E.Br.	latex blanchâtre abondant	Bouquet, 1969
	17	<i>Trilepisium madagascariense</i> DC. (Syn. <i>Bosqueia angolensis</i> Ficalho)	latex crème qui en séchant vire en rouge violacé	Bouquet, 1969
Myristicaceae	1	<i>Coelocaryon preussii</i> Warb.	liquide crème abondant	Vivien & Faure, 2011
	2	<i>Coelocaryon botryoides</i> Vermoesen	liquide rouge abondant	
	3	<i>Pycnanthus angolensis</i> (Welw.) Warb.	liquide jaune rosé devenant rougeâtre, très fluide et ne se solidifiant pas	Bouquet, 1969
	4	<i>Pycnanthus marchalianus</i> Ghesq.	exsudat de couleur carmin	Vivien & Faure, 2011
	5	<i>Staudtia kamerunensis</i> Warb.	liquide rouge se coagulant à l'air libre	

Tableau V.1. Plantes à exsudats du Congo inventoriées d'après la littérature (suite 5)

Familles	Espèces	Types d'exsudats et caractéristiques	Références
Olacaceae	1	<i>Coula edulis</i> Baill.	Vivien & Faure, 2011
	2	<i>Strombosiopsis tetrandra</i> Engl.	
Rubiaceae	1	<i>Psydrax subcordata</i> (DC.) Bridson	
	2	<i>Rothmannia lujae</i> (De Wild.) Keay	
Sapindaceae	1	<i>Ganophyllum giganteum</i> (A.Chev.) Hauman	
Sapotaceae	1	<i>Austranella congolensis</i> (De Wild.) A. Chev.	Vivien & Faure, 2011
	2	<i>Baillonella toxisperma</i> Pierre	
	3	<i>Brevia sericea</i> Aubrév. & Pellegr.	
	4	<i>Chrysophyllum africanum</i> A.DC.	
	5	<i>Chrysophyllum lacourtianum</i> De Wild.	
	6	<i>Chrysophyllum beguei</i> Aubrév. & Pellegr.	
	7	<i>Chrysophyllum ubanguiense</i> (De Wild.) Govaerts	
	8	<i>Letestua durissima</i> (A.Chev.) Lecomte	
	9	<i>Manilkara koechlinii</i> Aubrév. & Pellegr.	Bouquet, 1969
	10	<i>Omphalocarpum elatum</i> Miers	Lemmens, 2007
	11	<i>Omphalocarpum lecomteanum</i> Pierre ex Engl.	
	12	<i>Pouteria altissima</i> (A.Chev.) Baehni	Vivien & Faure, 2011
	13	<i>Synsepalum msolo</i> (Engl.) T.D.Penn.	
	14	<i>Tieghemella africana</i> Pierre	
	15	<i>Tridesmostemon omphalocarpoides</i> Engl.	
Sterculiaceae	1	<i>Sterculia tragacantha</i> Lindl.	Vivien & Faure, 2011

V.2. Utilisation des exsudats inventoriés d'après la littérature

Le tableau V.2 donne la liste des plantes à exsudat inventoriées et les utilisations de leurs exsudats. Sur les 135 plantes à exsudats recensées dans la littérature, seule l'utilisation de 50 exsudats a été rapportée soit 37,04%. Ce faible pourcentage peut être dû au fait que dans la littérature on trouve très peu d'études portant sur les plantes à exsudats d'Afrique et encore moins du Congo. Les exsudats utilisés par ces populations appartiennent à la famille des Anacardiaceae, des Apocynaceae, des Burseraceae, des Euphorbiaceae, des Fabaceae (sous famille des Caesalpinioideae et des Mimosoideae), des Guttiferae, des Moraceae, des Myrticaceae et des Sapotaceae. Cependant, nous constatons que les latex des plantes de la famille des Apocynaceae et les exsudats résineux de la famille des Burseraceae sont de loin les plus connus et les plus utilisés (figure 5.1).

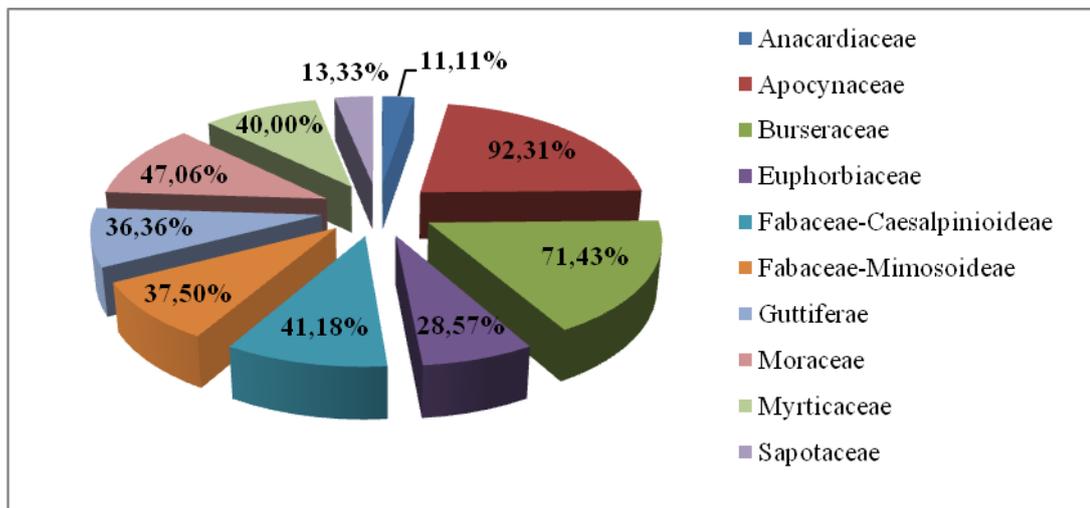


Figure 5. 1. Pourcentages d'exsudats ayant une utilisation par famille

Tableau V. 2. Utilisations des exsudats d'après la littérature

Familles		Espèces	Utilisations des exsudats	Pays ou zones géographiques d'utilisation	Références
Anacardiaceae	1	<i>Mangifera indica</i> Linn	l'oléorésine est regardée comme sudorifique et antisyphilitique	Gabon	Raponda-Walker, 1995
Apocynaceae	1	<i>Alstonia boonei</i> De Wild.	le latex est appliqué sur les morsures de serpent, les maladies de peau et les gonflements provoqués par les filarioses	Afrique de l'ouest et centrale	Loupe et al., 2008
	2	<i>Alstonia congensis</i> Engl.	traitement des affections génito-urinaires (leucorrhées, les troubles ovariens, la blennorragie)	Congo (Brazzaville)	Bouquet, 1969
			traitement de la gale ; utilisé contre les céphalgies, les abcès, bubons et chancres		Loupe et al., 2008
	3	<i>Baiassea axillaris</i> (Benth.) Hua	l'exsudat est ajouté au vin de palme pour en augmenter l'effet enivrant		Schmelzer, 2006
	4	<i>Funtumia elastica</i> (Preuss) Stapf	le latex est employé contre les deshydrèses plantaires, les mycoses cutanées et les plaies.	Congo (Brazzaville)	Bouquet, 1969
	5	<i>Hunteria umbellata</i> (K.Schum.) Hallier f.	l'exsudat rentre dans la composition des poisons de flèches		Boone, 2006
	6	<i>Landolphia owariensis</i> P. Beauv	le latex est un ingrédient de poison de flèche; ajouté au vin il est utilisé contre les vers intestinaux		Irvine, 1961
			le latex est utilisé comme conservateur naturel		Anthony, 1995
	7	<i>Pycnobotrya nitida</i> Benth.	traitement des hématuries	Congo (Brazzaville)	Bouquet, 1969
	8	<i>Rauvolfia caffra</i> Sond.	le latex est utilisé comme glu pour attraper les oiseaux		Mollel, 2007
	9	<i>Rauvolfia vomitoria</i> Afzel.	l'exsudat est utilisé pour cicatriser des plaies		Schmelzer, 2007
	10	<i>Saba comorensis</i> (Bojer ex A.DC.) Pichon	des instillations quotidiennes de latex dans les yeux amélioreraient la vision	Congo (Brazzaville)	Bouquet, 1969
11	<i>Tabernaemontana crassa</i> Benth.	le latex est appliqué sur les plaies comme cicatrisant ainsi que sur les abcès, furoncles et anthrax pour les faire avorter	Congo (Brazzaville)		
		le latex est appliqué comme hémostatique et pour soulager les maux de tête		Mairura & Schmelzer, 2006	
12	<i>Voacanga africana</i> Stapf ex Scott-Elliot	le latex est utilisé pour soigner les plaies et les caries dentaires	Afrique de l'ouest	Arbonnier, 2009	

Tableau V.2. Utilisations des exsudats d'après la littérature (suite 1)

Familles	Espèces	Utilisations des exsudats	Pays ou zones géographiques d'utilisation	Références	
Burseraceae	1	<i>Aucoumea klaineana</i> Pierre.	la résine est utilisée pour soigner les plaies et des abcès superficiels et pour désinfecter l'eau		Loupe <i>et al.</i> , 2008
			la résine sert à fabriquer des flambeaux et pour faire mûrir des abcès	Gabon	Raponda-walker
	2	<i>Canarium schweinfurtii</i> Engl.	la résine est utilisée comme pommade pour cicatriser le nombril d'un nouveau-né		Koni Muluwa & Bostoen, 2008
			la résine aurait des propriétés émoullientes, diurétiques et stimulantes		Raponda-walker
	3	<i>Dacryodes buettneri</i> (Engl.) H.J. Lam	la résine s'applique sur les abcès et fait office de désinfectant et d'astringent	Gabon	Todou & Doumenge, 2008
	4	<i>Dacryodes edulis</i> (G. Don) K. J. Lam.	la résine est utilisée dans le traitement des dermatoses		Eyog Matig <i>et al.</i> , 2006
	5	<i>Santiria trimera</i> (Oliv.) Aubrev.	la résine est utilisée pour soigner les « crow-crow »		
Euphorbiaceae	1	<i>Euphorbia drupifera</i> Thonn.	le latex est purgatif à des doses faibles		Vivien & Faure, 2011
	2	<i>Euphorbia hermentiana</i> Lemaire.	le latex est un puissant purgatif et très dangereux à forte dose		
	3	<i>Gymnanthes inopinata</i> (Prain) Esser	le latex est recommandé comme purgatif		
	4	<i>Ricinodendron heudelotii</i> (Baill.) Heckel	le latex a une action purgative et soigne les filaires		Laird <i>et al.</i> , 1997; Burkill, 1994
Fabaceae Caesalpinioideae	1	<i>Afzelia bipindensis</i> Harms	administré en cas de maux d'estomac		Gérard & Louppe, 2011
	2	<i>Berlinia grandiflora</i> (Vahl) Hutch. & Dalz.	l'exsudat est appliqué sur les plaies comme hémostatique et cicatrisant	Congo (Brazzaville)	Bouquet, 1969
	3	<i>Copaifera religiosa</i> J. Léonard	la résine utilisée localement comme parfum	Afrique centrale	Vivien & Faure, 2011
	4	<i>Daniellia klainei</i> Pierre ex A. Chev.	l'oléorésine s'emploie contre la gale, teigne, les poux et les chiques	Gabon	Raponda-walker, 1995
	5	<i>Daniellia ogea</i> (Harms) Rolfe ex Holland	l'exsudat est utilisé en cosmétique, pour parfumer les vêtements, pour la fumigation des huttes, et pour les traitements médico-magiques. Il est aussi utilisé pour réparer la poterie brisée, pour le tatouage.		Schmelzer, 2012
	6	<i>Dialium pachyphyllum</i> Harms	la gomme-résine est toxique et a été utilisée comme poison d'épreuve et dans la préparation d'un poison de flèche. elle est utilisée aussi comme cicatrisant pour les plaies	Congo (Brazzaville) Congo (Kinshasa)	Lemmens <i>et al.</i> , 2012
	7	<i>Guibourtia demeusei</i> (Harms) J.Léonard	le copal est utilisé dans certains rites fétichistes et pour le calfatage des pirogues	Gabon	Raponda-walker, 1995

Tableau V.2. Utilisations des exsudats d'après la littérature (suite 2)

Familles	Espèces	Utilisations des exsudats	Pays ou zones géographiques d'utilisation	Références
Fabaceae Mimosoideae	1 <i>Albizia adianthifolia</i> (Schum.)	la gomme est employée en cosmétique	Afrique de l'ouest	Arbonnier, 2009
	2 <i>Albizia brownei</i> (Walp.) Oliv.	la gomme utilisée dans l'industrie alimentaire comme stabilisant et dans l'industrie pharmaceutique pour l'enrobage des médicaments		Loupe et al., 2008
	3 <i>Albizia ferruginea</i> (Guill. & Perr.) Benth.	la gomme est employée dans la préparation de poison de flèches	Cameroun	
Fabaceae Papilionoideae	1 <i>Amphimas pterocarpoides</i> Harms.	la résine est employée pour traiter la dysenterie, l'anémie, l'hématurie, la dysménorrhée, la blennorragie, la schistosomiase, les oreillons, et comme antidote de poison		Tchinda & Tané, 2008
Guttiferae (Clusiaceae)	1 <i>Garcinia kola</i> Heckel	le latex est ingéré par voie orale dans le traitement de la gonorrhée		Harley, 1980
	2 <i>Garcinia mannii</i> Oliv.	le latex est employé pour soigner les morsures des serpents		
	3 <i>Garcinia smeathmannii</i> (Planch. & Triana) Oliv.	en instillations oculaires contre les ophtalmies	Congo (Brazzaville)	Bouquet, 1969
	4 <i>Symphonia globulifera</i> L.f.	le latex sert à soigner les abcès, les furoncles ainsi que la gale		
Hypericaceae	1 <i>Harungana madagascariensis</i> Lam. ex Poir.	la gomme est efficace contre les parasites cutanés et affection de la peau (dartres, gales, mycoses, lèpres...)		Boullard, 2001
Moraceae	1 <i>Antiaris toxicaria</i> subsp. <i>welwitschii</i> (Engl.) C.C.Berg	le latex est appliqué sur les coupures, les blessures et les maladies de la peau ; purgatif par voie interne ; poison de pêche ; glu pour attraper les oiseaux		Loupe et al., 2008
	2 <i>Ficus cyathistipula</i> Warb.	le latex est appliqué sur les points névralgiques	Congo (Brazzaville)	Bouquet, 1969
	3 <i>Ficus mucoso</i> Welw. ex Ficalho	le latex est utilisé pour soigner les otites et pour lutter contre les convulsions		
	4 <i>Ficus thonningii</i> Blume	le latex est appliqué dans l'œil en cas de traumatisme du globe oculaire		
	5 <i>Ficus wildemaniana</i> Warb.	ingrédient pour les maladies cardiaques		
	6 <i>Milicia excelsa</i> (Welw.) C.C.Berg	ingrédient pour la fabrication de pommade contre la gale		
	7 <i>Treculia obovoidea</i> N.E.Br.	le latex est utilisé pour soigner les caries dentaires.		
	8 <i>Trilepisium madagascariense</i> DC.	le latex est utilisé contre les ophtalmies		
Myrticaceae	1 <i>Pycnanthus angolensis</i> (Welw.) Warb.	l'exsudat a une action bénéfique sur certaines dermatoses		
	2 <i>Staudtia kamerunensis</i> Warb.	l'exsudat a des propriétés hémostatiques		
Sapotaceae	1 <i>Manilkara koechlinii</i> Aubrév. & Pellegr.	le latex est utilisé pour soigner les douleurs rhumatismales, les maux de reins et les entorses	Congo (Brazzaville)	Bouquet, 1969
	2 <i>Omphalocarpum elatum</i> Miers	le latex a été utilisé comme un adultérant de caoutchouc		Lemmens, 2007

La figure 5.2 montrent que la plupart des exsudats interviennent en médecine traditionnelle africaine. Ces exsudats sont utilisés dans le traitement des affections de la peau, comme cicatrisants pour les plaies mais aussi comme purgatif, malgré le fait qu'ils puissent être toxiques à forte dose. D'autres par contre sont utilisés comme poison pour la chasse, comme allume-feu mais aussi dans l'industrie cosmétique.

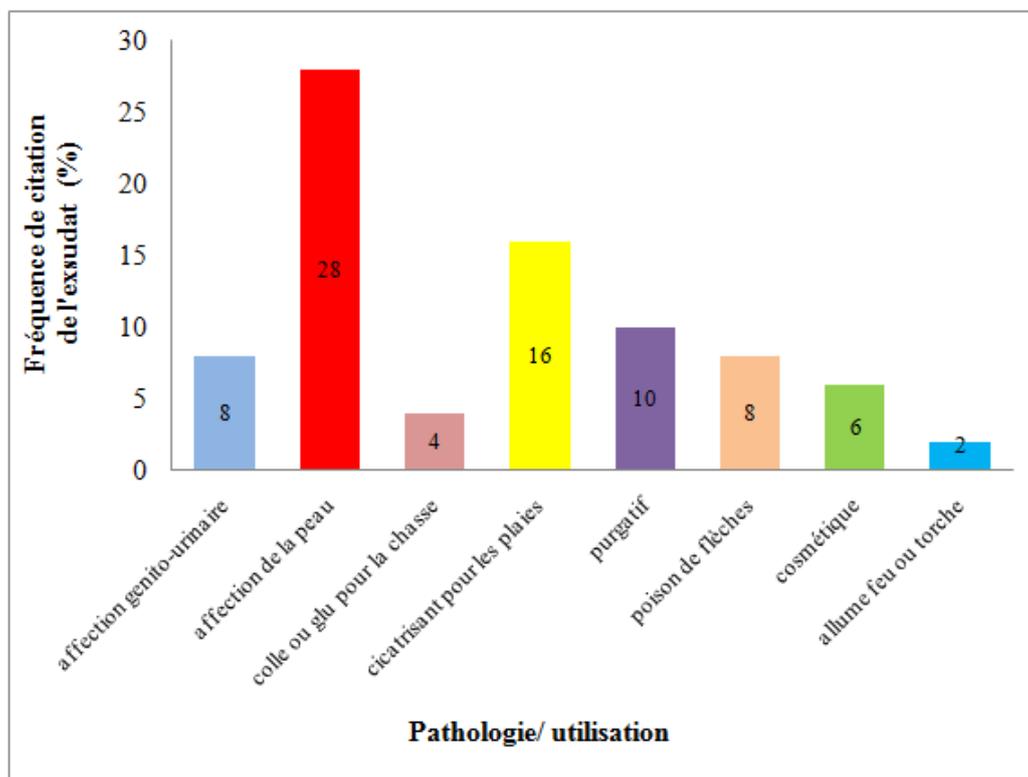


Figure 5. 2. Fréquence de citation des exsudats en fonction de la pathologie ou de l'utilisation

V.3. Plantes à exsudats inventoriées à partir des enquêtes ethnobotaniques

Les enquêtes ethnobotaniques menées auprès de 30 tradipraticiens sélectionnés par les chefs des quartiers 2 et 3 de la ville d'Owando nous ont conduits à l'identification de quatorze plantes à exsudats, appartenant à 13 genres. Ces plantes ont été déjà citées dans la littérature (tableaux V.1) comme étant des plantes à exsudats. Elles sont présentées dans le tableau V.3 par ordre alphabétique de leur nom scientifique. L'examen de ce tableau montre que les exsudats de 5 plantes (*C. botryoides* Vermoesen, *D. edulis* (G. Don) K. J. Lam, *G. demeusei* (Harms) J. Leonard et *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir.) ont une très forte fréquence d'utilisation. Il en ressort que ces 5 exsudats sont bien connus des tradipraticiens consultés. Cependant, nous avons constaté que ces tradipraticiens sont bien conscients de la toxicité et de la causticité de la plupart des latex. De ce fait, ils les utilisent soit dilués en petites quantités dans du vin de palme, soit en mélange avec le jus des feuilles d'autres

plantes. On remarque aussi que la plupart de ces substances sont utilisées par voie cutanée sur les plaies et sur différentes affections de la peau (gale, varicelle, lèpre,...). Ces résultats montrent une concordance avec ceux des recherches bibliographiques que nous rapportons. De plus, d'autres usages (poison pour la chasse, allume-feu et insectifuges) des exsudats des plantes ont été aussi confirmés lors de nos enquêtes ethnobotaniques.

Les informations ainsi collectées pendant nos enquêtes ethnobotaniques, associées aux données bibliographiques, seront utilisées en vue de la sélection des exsudats à caractériser dans le cadre de ce travail.

Tableau V. 3. Résultats des enquêtes ethnobotaniques de plantes à exsudats

Espèces	Nom vernaculaire (Kôyô)	Fréquence d'utilisation de l'exsudat (%)	Utilisations de l'exsudat	Pathologies	Modes d'administration ou d'utilisation
<i>Coelocaryon botryoides</i> Vermoesen	non indiqué	50	l'exsudat est utilisé comme ingrédient pour préparer un poison de flèche		le mélange est appliqué sur les lances
<i>Dacryodes edulis</i> (G. Don) K. J. Lam.	Otsare	66,6	l'exsudat est utilisé comme glu pour attraper les oiseaux l'exsudat est chauffé dans unealebasse et appliqué sur les points douloureux	entorse ; choc ; pied enflés	massage sur les parties douloureuses
<i>Funtumia elastica</i> (Preuss) Stapf	Opomba	13,3	l'exsudat est mélangé à l'huile de palme et appliqué sur les mycoses	Mycoses	appliquer le mélange sur la partie affectée
<i>Garcinia kola</i> Heckel	Letsindo	6,6	le latex est mélangé avec la sève de <i>Musanga cecropioides</i> R.Br. ex Tedlie	maladies sexuellement transmissible	voie orale (2 à 4 gouttes)
<i>Guibourtia demeusei</i> (Harms) J.Leonard	Paka	93,3	le copal est brûlé pour repousser les insectes	insectifuge	fumigène
<i>Harungana madagascariensis</i> Lam. ex Poir.	Ekongo	96,6	la gomme fraîche est frottée directement sur la peau	la gale	voie cutanée
<i>Landolphia owariensis</i> P. Beauv	Itoobi	26,6	le latex est ajouté au vin de palme pour se déparasiter	vers intestinaux	1 verre du mélange pendant trois jours
<i>Mangifera indica</i> Linn		60	l'oléorésine est appliquée sur les plaies	plaie	voie cutanée
<i>Pseudospondias microcarpa</i> (A.Rich.) Engl.	Osaa	20	la résine est utilisée comme allume-feu		
<i>Pycnanthus angolensis</i> (Welw.) Warb.	Olimbé	53,3	l'exsudat est utilisé contre les affections de la peau	gale, varicelle, lèpre	voie cutanée
<i>Rauvolfia caffra</i> Sond.	Ondulé	6,6	glu pour attraper les oiseaux		
<i>Rauvolfia vomitoria</i> Afzel.	Onduli	30	glu pour attraper les oiseaux		
<i>Tetrorchidium didymostemon</i> (Baill.) Pax & K.Hoffm	Ondziendze	3,3	l'exsudat est utilisé pour soigner les plaies de morsures de serpent	plaie et inflammation	voie cutanée
<i>Trichoscypha acuminata</i> Engl.	Mouandza	13,3	le latex est appliqué sur le corps des enfants malades	variole	voie cutanée

V.4. Monographies des plantes à exsudats les plus citées

Les monographies simplifiées de quelques plantes à exsudats les plus citées par les tradipraticiens des quartiers 2 et 3 de la ville d'Owando sont reportées dans les figures 5.3 à 5.7.

<p><i>Coelocaryon botryoides</i> Vermeesen</p> <p>Myristicaceae</p>  <p>Feuille</p>	 <p>Ecorce du tronc</p>
<p>Position systématique</p> <p>Règne : Plantea - plantes, végétaux Embranchement : Spermaphyte Sous embranchement : Magnoliophyta (= Angiospermes) Classe : Magnoliopsida Sous classe : Rosidae Ordre : Magnoliales Famille : Myrticaceae Genre : <i>Coelocaryon</i> Espèce : <i>C. botryoides</i></p>	
<p>Synonymies</p> <p>Non indiqué</p>	
<p>Noms vernaculaires</p> <p>Non signalé</p>	
<p>Site d'échantillonnage</p> <p>Site 4 : entre Ibonga et Ombélé</p>	
<p>Description botanique</p> <p>C'est un arbre pouvant atteindre plus de 30 m de haut. L'écorce brune et rugueuse exsude un liquide rouge. Il est muni de racines échasses de 1 à 2 m. Les feuilles persistances sont alternes et simples. Les fruits sont des drupes ellipsoïde à oblongue ou globuleuse (3,5-4 x 2,5-3 cm), jaunes à maturité, s'ouvrant en 2 valves charnues. Ces fruits contiennent une seule graine, ellipsoïdes (2-3 x 1-1,5 cm), brillante et entourée en partie d'un arille rouge découpé.</p>	
<p>Ecologie et répartition géographique</p> <p><i>Coelocaryon botryoides</i> Vermeesen est répandu dans les forêts marécageuses et pousse habituellement sur des sols bien drainés (au bord de cours d'eau). Son aire de répartition s'étend du sud du Bénin et du Nigeria jusqu'en Centrafrique, et vers le sud jusqu'au Gabon, en République du Congo et en RD Congo.</p>	
<p>Utilisation traditionnelle</p> <p>Exsudat : il est utilisé comme ingrédient pour préparer des poisons de chasse</p>	

Figure 5. 3. Monographie simplifiée de *Coelocaryon botryoides* Vermeesen

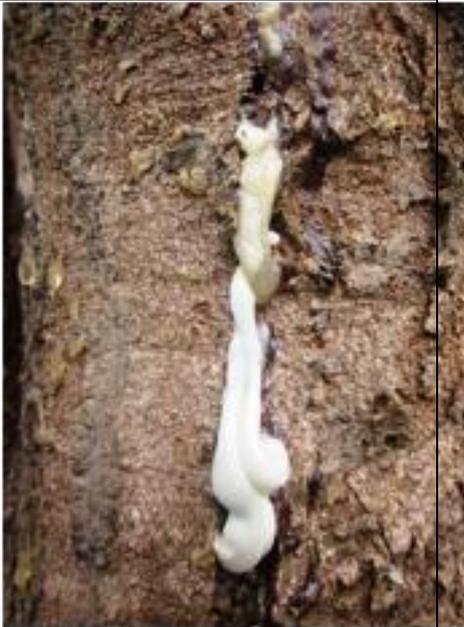
<p><i>Dacryodes edulis</i> (G. Don) Lam.</p> <p>Burseraceae</p>  <p style="text-align: center;">Rameau florifère</p>	 <p style="text-align: center;">Ecorce du tronc</p>
<p>Position systématique</p>	
<p>Règne : Plantae - plantes, végétaux Embranchement : Spermaphyte Sous embranchement : Magnoliophyta (= Angiospermes) Classe : Magnoliopsida Sous classe : Rosidae Ordre : Sapindales Famille : Burseraceae Genre : <i>Dacryodes</i> Espèce : <i>D. edulis</i></p>	
<p>Synonymies</p>	
<p><i>Canarium edule</i> Hook f., <i>Canarium mansfeldianum</i> Engl., <i>Canarium mubafo</i> Ficalho, <i>Canarium saphu</i> Engl,</p>	
<p>Noms vernaculaires</p>	
<p>Kôyô : « Otsare »</p>	
<p>Site d'échantillonnage</p>	
<p>Site 1 : Kanguini à environ 2 Km d'Owando Site 2 : Mbémbé à environ 3 Km d'Owando Site 3 : Okouma à environ 5 Km d'Owando</p>	
<p>Description botanique</p>	
<p><i>Dacryodes edulis</i> (G. Don) K. J. Lam couramment appelé Safoutier ou prunier d'Afrique est un grand et bel arbre à fût cylindrique cultivé par les populations locales. On le rencontre fréquemment aux emplacements des villages abandonnés (Raponda, 1961). Les feuilles sont composées, imparipennées, glabres et très luisantes. Les <i>Dacryodes edulis</i> (G. Don) K. J. Lam sont des arbres dioïques à inflorescences en panicules et à rachis pubérent-ferrugineux. L'espèce comporte 3 types de fleurs: les fleurs mâles, les fleurs femelles et les fleurs hermaphrodites. Elles sont généralement trimères mais quelques cas de fleurs tétramères existent, surtout chez les fleurs femelles.</p>	
<p>Ecologie et répartition géographique</p>	
<p>Cet arbre s'adapte particulièrement bien, on le trouve dans, les forêts pluviales sempervirentes, les forêts galeries et les marais. Il est largement répandu en Afrique tropicale (sud du Nigéria, Gabon, République du Congo, RDC, RCA, Cameroun...)</p>	
<p>Utilisation traditionnelle</p>	
<p>Exsudat : cette résine blanchâtre, à odeur de térébenthine, est utilisée comme « colle »</p>	

Figure 5. 4. Monographie simplifiée de *Dacryodes edulis* (G. Don) Lam.

<p><i>Guibourtia demeusei</i> (Harms) J. Leonard</p> <p>Fabaceae - Caesalpinioideae</p>  <p>Feuilles et inflorescences (1) ; fruit (2)</p>	 <p>Ecorce du tronc</p>
<p>Position systématique</p> <p>Règne : Plantae - plantes, végétaux Embranchement : Spermaphyte Sous embranchement : Magnoliophyta (= Angiospermes) Classe : Magnoliopsida Sous classe : Rosidae Ordre : Fabales Famille : Fabaceae - Caesalpinioideae Genre : <i>Guibourtia</i> Espèce : <i>G. demeusei</i></p>	
<p>Synonymies</p>	
<p><i>Copaifera demeusei</i> Harms <i>Copaifera laurentii</i> De Wild.</p>	
<p>Noms vernaculaires</p>	
<p>Kôyô : « Paka »</p>	
<p>Site d'échantillonnage</p>	
<p>Site 2 : Mbémbé à environ 3 Km d'Owando</p>	
<p>Description botanique</p>	
<p><i>Guibourtia demeusei</i> (Harms) J. Leonard est un arbre de 25 à 40 m de haut dont le diamètre ne dépasse guère 80 à 90 cm. La base de son fût est munie de contreforts aliformes, minces, peu nombreux et élevés. Son écorce est lisse. Le feuillage assez dense est constitué de feuilles alternes composées d'une seule paire de folioles opposées et légèrement arquées. Les folioles de <i>G. demeusei</i> sont criblées de points translucides. Les fruits sont de petites gousses orbiculaires ou elliptiques de 2 à 3 cm, glabres et s'ouvrant en 2 valves minces lisses.</p>	
<p>Ecologie et répartition géographique</p>	
<p>Espèce typiquement des forêts périodiquement inondées, des forêts marécageuses et des galeries forestières. On le trouve en Afrique équatoriale, du Cameroun en République du Congo. <i>G. demeusei</i> est particulièrement abondant dans la cuvette congolaise.</p>	
<p>Utilisations traditionnelles</p>	
<p>Exsudat : ce copal est utilisé comme allume-feu et comme insectifuge (fumée).</p>	

Figure 5. 5. Monographie simplifiée de *Guibourtia demeusei* (Harms) J. Leonard

<p><i>Harungana madagascariensis</i> Lam. ex Poir.</p> <p>Hypericaceae</p>  <p>Partie aérienne</p>	 <p>Ecorce du tronc</p>
<p>Position systématique</p>	
<p>Règne : Plantae - plantes, végétaux Embranchement : Spermaphyte Sous embranchement : Magnoliophyta (= Angiospermes) Classe : Magnoliopsida Sous classe : Rosidae Ordre : Malpighiales Famille : Hypericaceae Genre : <i>Harungana</i> Espèce : <i>H. madagascariensis</i></p>	
<p>Synonymies</p>	
<p><i>Haronga madagascariensis</i> (Lam. ex Poir.) Choisy <i>Harungana paniculata</i> Pers. <i>Haronga pubescens</i> Steud.</p>	
<p>Noms vernaculaires</p>	
<p>Kôyô, Akwa, Mbôsi : « Ekongo »</p>	
<p>Sites d'échantillonnage</p>	
<p>Site 2 : Mbémbé à environ 3 km d'Owando</p>	
<p>Description botanique</p>	
<p>C'est un arbuste buissonnant ou petit arbre de 2 à 8 m de haut muni de larges feuilles opposées, oblongues ou ovales, de couleur rougeâtre en dessous. Les fleurs sont blanches, odorantes à cinq pétales imbriqués. L'entaille de l'écorce (marron et profondément crevassée) laisse exsuder une substance gommeuse, d'abord orange, puis rouge.</p>	
<p>Ecologie et répartition géographique</p>	
<p><i>H. madagascariensis</i> pousse dans les zones à végétation ouverte et sèche. On le trouve à Madagascar, en Ethiopie, en Afrique centrale, au Sénégal, en Afrique du sud...</p>	
<p>Utilisation traditionnelle</p>	
<p><i>Exsudat</i> : il est utilisé dans le traitement de diverses maladies de la peau (gale, dartre, teigne, mycoses)</p>	

Figure 5. 6. Monographie simplifiée de *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir.

<p><i>Pycnanthus angolensis</i> (Welw.) Warb.</p> <p>Myristicaceae</p>  <p>Rameau feuillé, inflorescence et graine</p>	 <p>Ecorce du tronc exsudant</p>
<p>Position systématique</p> <p>Règne : Plantea - plantes, végétaux</p> <p>Embranchement : Spermaphyte</p> <p>Sous embranchement : Magnoliophyta (= Angiospermes)</p> <p>Classe : Magnoliopsida</p> <p>Sous classe : Magnoliidae</p> <p>Ordre : Magnoliales</p> <p>Famille : Myristicaceae</p> <p>Genre : <i>Pycnanthus</i></p> <p>Espèce : <i>P. angolensis</i></p>	
<p>Synonymies</p>	
<p><i>Myristica angolensis</i> Welw., <i>Myristica kombo</i> Baill., <i>Myristica microcephala</i> Benth. & Hook. f., <i>Pycnanthus kombo</i> (Baill.) Warb., <i>Pycnanthus mechowi</i> Warb., <i>Pycnanthus microcephalus</i> (Benth. & Hook. f.) Warb., <i>Pycnanthus schweinfurthii</i> Warb.</p>	
<p>Nom vernaculaire</p>	
<p>Kôyô : « Olimbé »</p>	
<p>Site d'échantillonnage</p>	
<p>Site 4 : entre Ibonga et Ombélé</p>	
<p>Description botanique</p>	
<p>C'est un arbre sempervirent de 25 à 40 m de haut dont le fût est généralement droit et cylindrique. Son écorce externe est brun grisâtre et laisse exsuder après entaille une substance jaune-rosée devenant rougeâtre. Les feuilles persistantes sont alternes et simples, sans stipules de couleur vert foncé sur le dessus. Les fleurs sont unisexuées, régulières, très petites et sessiles. Les fruits sont des drupes oblongues de couleur orange s'ouvrant en 2 valves.</p>	
<p>Ecologie et répartition géographique</p>	
<p><i>P. angolensis</i> pousse dans les zones à sols lourds et légers. Il se rencontre en forêt sempervirente humide et particulièrement abondant dans les forêts secondaires. Il est largement présent dans la zone forestière d'Afrique tropicale, depuis le Sénégal jusqu'en Angola, en passant par la République du Congo et la R.D.C. jusqu'en Ouganda, en Tanzanie et en Zambie.</p>	
<p>Utilisation traditionnelle</p>	
<p><i>Exsudat</i> : il est utilisé contre les affections de la peau</p>	

Figure 5. 7. Monographie simplifiée de *Pycnanthus angolensis* (Welw.) Warb.

En conclusion, la réalisation de l'inventaire des plantes à exsudats s'est appuyée sur les recherches bibliographiques et sur les résultats des enquêtes ethnobotaniques menées auprès de 30 tradipraticiens des quartiers 2 et 3 de la ville d'Owando. Nous avons ainsi pu répertorier 135 plantes à exsudats appartenant à 87 genres. Ces résultats nous donnent rapidement :

- un aperçu des plantes à exsudats rencontrées dans la région d'Owando ;
- les différents types d'exsudat sécrétés par ces plantes ;
- le type d'exsudat sécrété par les plantes d'une même famille
- et leurs utilisations traditionnelles en Afrique et particulièrement au Congo.

Dans ce monde fascinant des plantes à exsudats, le latex est de loin l'exsudat le plus rencontré. C'est notamment le cas des espèces des familles suivantes : Apocynaceae, Euphorbiaceae, Moraceae, Sapotaceae. Cependant, les exsudats résineux, de type oléorésines, gommés-résines et copals ont été retrouvés dans les Anacardiaceae, les Burseraceae et les Fabaceae - Caesalpinioideae.

Il est important de signaler que les enquêtes ethnobotaniques menées à Owando ont présenté trois intérêts majeurs.

- Premièrement, elles ont permis d'identifier les exsudats utilisés par un échantillon de population congolaise (par exemple, les Kôyô) ;
- Deuxièmement, elles ont confirmé quelques utilisations rapportées dans la littérature ; les usages des exsudats par ces populations d'Owando étaient multiples (glu, allume-feu, insectifuge, antidouleurs, anti-inflammatoires et antimicrobiens). Ces propriétés sont également attribuées à plusieurs exsudats par des populations d'autres pays d'Afrique.
- Troisièmement, elles ont conduit à la récolte des échantillons d'exsudats les plus cités et dont l'origine botanique est bien certifiée, en vue de les soumettre à des investigations chimiques.

Chapitre VI : Etude analytique des exsudats des plantes

VI.1.	Analyses spectroscopiques	137
VI.1.1.	Analyses en spectroscopie du proche infrarouge (SPIR)	137
VI.1.2.	Analyses en spectroscopie du moyen infrarouge (SMIR)	140
VI.2.	Analyses par CPG-SM	149
VI.2.1.	Composition chimique de la fraction peu-volatile des exsudats étudiés	149
VI.2.1.1.	<i>Exsudats de D. edulis (G. Don) K.J. Lam</i>	149
VI.2.1.2.	<i>Exsudat de G. demeusei (Harms) J. Léonard</i>	164
VI.2.2.	Composition chimique de la fraction volatile des exsudats étudiés	168
VI.2.2.1.	<i>Exsudats de D. edulis (G. Don) K.J. Lam</i>	168
VI.2.2.2.	<i>Exsudat de G. demeusei (Harms) J. Léonard</i>	178
VI.3.	Apport de la GCxGC-MS dans la caractérisation des exsudats	182
VI.3.1.	Analyse de la fraction volatile d'exsudat de <i>G. demeusei</i> (Harms) J. Léonard par GCxGC-MS	183
VI.3.2.	Caractérisation des colonnes capillaires courtes et applications en GCxGC-MS	184

Les exsudats produits par les végétaux sont des substances naturelles complexes et d'une grande diversité. La caractérisation de ces substances constitue un grand défi pour l'analyste. En effet, leurs constituants sont souvent difficiles à caractériser au sein de la matrice du fait de la complexité du mélange et du grand nombre d'isomères qui peuvent être présents dans ces échantillons. Les études se font, d'abord, par des méthodes spectroscopiques adaptées à l'analyse des solides, sans modification physique de l'échantillon. Puis, sont sollicitées les techniques séparatives qui nécessitent une préparation (extraction ou mise en solution) d'échantillon préalable.

Les résultats de la stratégie multi-analytique que nous avons employée pour l'analyse de ces exsudats sont résumés dans ce dernier chapitre.

Ainsi, dans la première partie de ce chapitre, nous présentons et discutons les résultats obtenus en utilisant les techniques de proche et moyen infrarouge.

La deuxième partie est consacrée aux résultats de chromatographie en phase gazeuse mono- et bi-dimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse de la fraction volatile et peu volatile de quelques exsudats. Une place particulière est faite aux techniques de préparation d'échantillons avant analyse.

La troisième partie, qui est principalement un travail de recherche fondamentale, tente d'apporter des éléments permettant d'interpréter la non-répétabilité des temps de rétention obtenus avec des colonnes courtes (notamment, en GCxGC-MS).

Les spectres en proche infrarouge de ces trois groupes d'exsudats sont différents (figure 6.2). Par conséquent, il en ressort qu'en proche infrarouge l'état physique de l'échantillon influence de manière significative l'information spectrale. L'interprétation des bandes observées n'est pas aisée. La nature des vibrations observées (harmoniques et de bandes de combinaison) rend leur attribution plus ambiguë que dans le moyen infrarouge [Bertand & Dufour, 2006]. Néanmoins, sur la figure 6.2, on distingue trois plages spectrales. De 4000 à 5000 cm^{-1} , où on observe les bandes de combinaison des liaisons de type Y-H (où Y représente ici, l'atome de carbone et/ou d'oxygène). La zone comprise entre 5500-8000 cm^{-1} , est attribuable aux premières harmoniques de ces bandes et enfin celle comprise entre 8000-10000 cm^{-1} , correspond aux deuxièmes harmoniques de ces bandes.

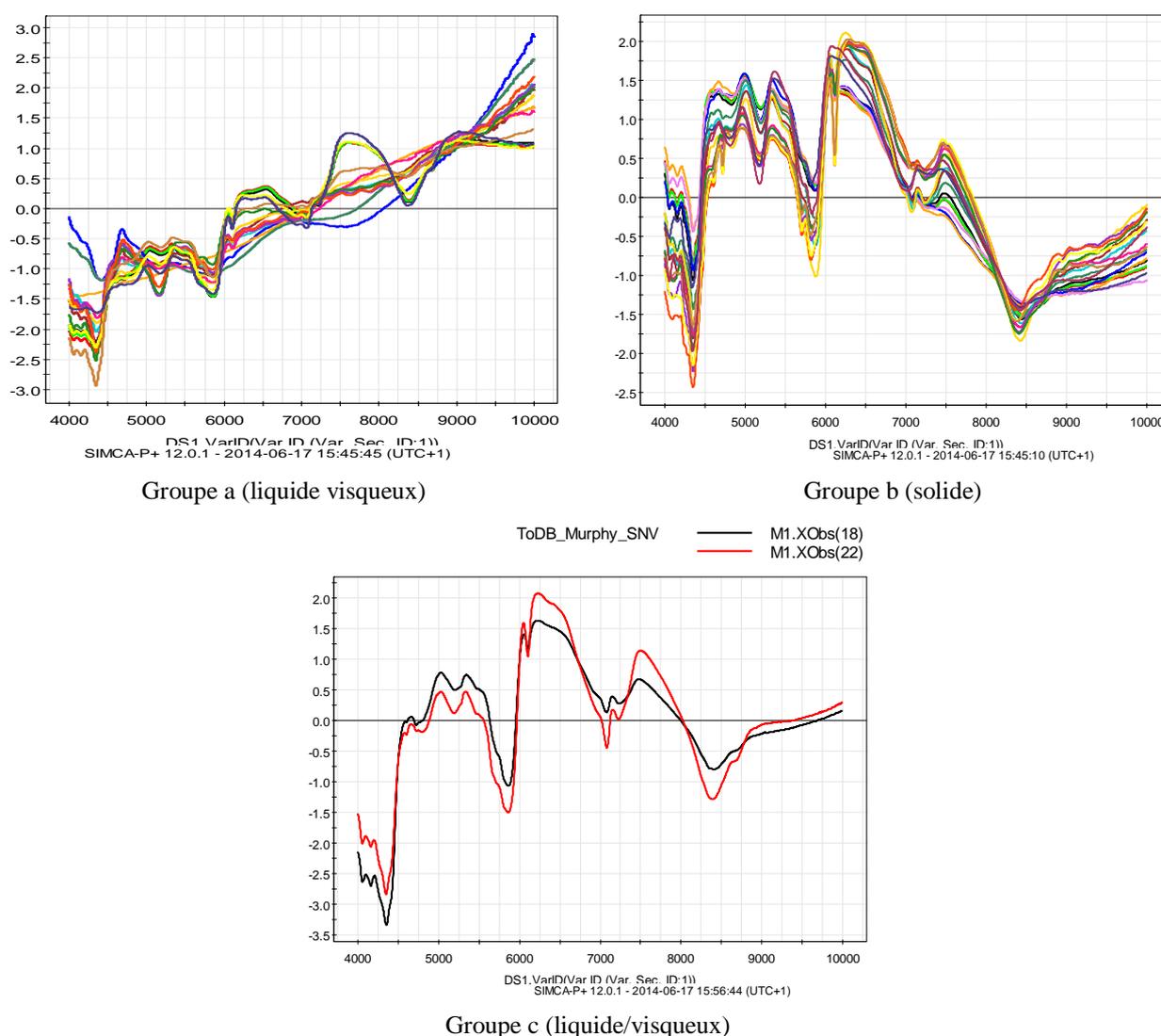
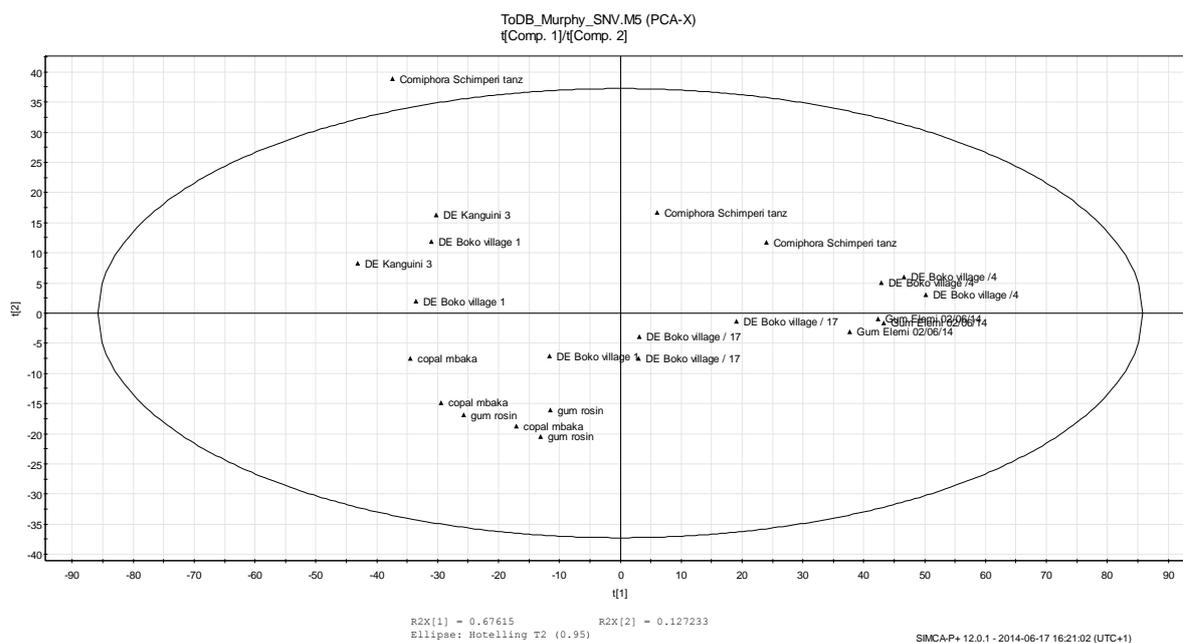


Figure 6. 2. Spectres en proche infrarouge des exsudats obtenus après correction par une méthode SNV

La figure 6.3 représente les ACP respectives des résultats d'analyse des exsudats liquides visqueux (groupe a) et solides (groupe b). L'examen des résultats pour ces échantillons révèle une discrimination en fonction de la masse d'échantillon au fond du tube. Celle-ci n'est donc pas qualitative. Lors de l'examen des résultats, il est apparu que les échantillons sont classés, selon la première composante, en fonction du volume de l'échantillon. Il apparait donc que les quantités disponibles pour l'analyse en réflectance diffuse n'étaient pas suffisantes pour effectuer une mesure fiable sur les différents exsudats.

a) ACP réalisé sur les exsudats solides



b) ACP réalisé sur les exsudats liquides visqueux

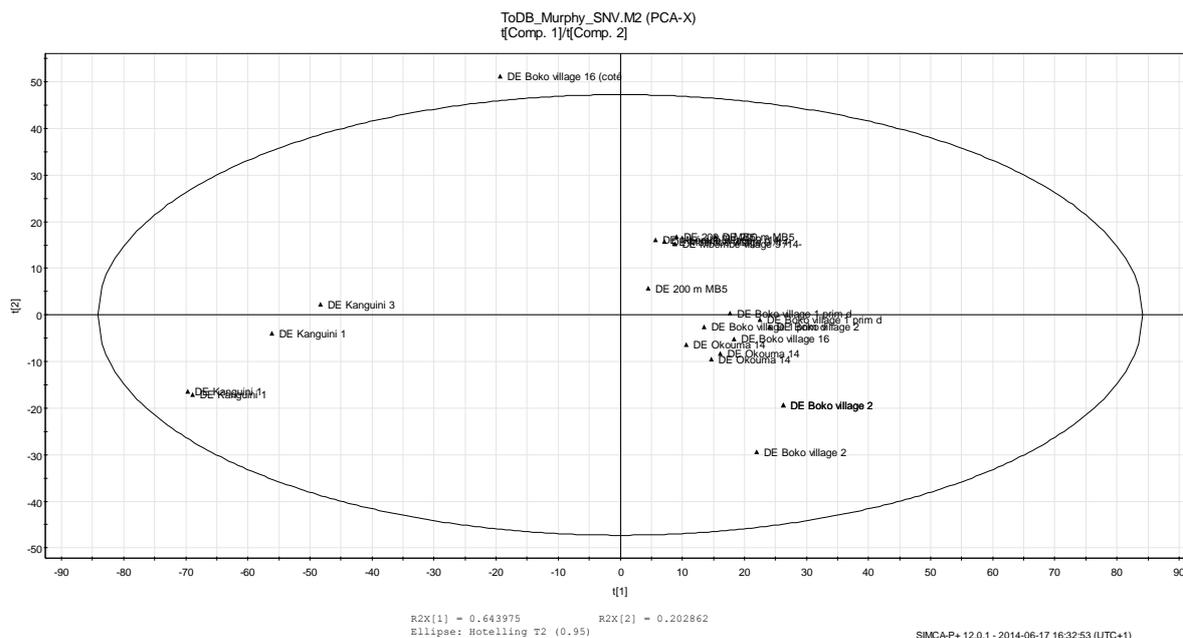


Figure 6. 3. ACP obtenue après élimination respective des échantillons d'exsudats solides ou liquides visqueux de la matrice de départ

Malgré le prétraitement par SNV, les analyses en spectroscopie du proche infrarouge (SPIR) n'ont pas apporté assez d'informations pour permettre la discrimination des exsudats étudiés selon leur nature chimique. Dans les conditions de l'analyse, la masse de l'échantillon et son homogénéité influencent l'information spectrale de façon significative.

VI.1.2. Analyses en spectroscopie du moyen infrarouge (SMIR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) a été utilisée dans le but de spécifier le type d'exsudat en présence et pour identifier les groupements fonctionnels des molécules présentes dans les différents échantillons d'exsudat.

Etude spectrale d'exsudat de *G. demeusei* (Harms) J.Leonard

La figure 6.4 montre les spectres IRTF de *G. demeusei*, selon les deux modes (transmission et ATR). Les spectres sont similaires. Comme attendu, ils ne diffèrent que par la minimisation de l'intensité des bandes aux nombres d'onde compris entre 2500 et 4000 cm^{-1} en ATR et une interférence des bandes liées à l'eau éventuellement piégée dans les pastilles. Les attributions des bandes spectrales sont faites en s'appuyant sur l'ouvrage de [Larkin \(2011\)](#) et sur les données de la littérature [[Derrick et al., 1999](#) ; [Brody et al., 2001](#) ; [Scalarone et al., 2003](#) ; [Guiliano et al., 2006](#) ; [Guiliano et al., 2007](#) ; [Regert et al., 2008](#) ; [Doménech-Carbó et al., 2009](#) ; [Prati et al., 2011](#)]. Les bandes attribuées figurent dans le tableau VI.1. Sur ces spectres, on note la présence d'une bande d'intensité moyenne à 3418 cm^{-1} correspondant à la bande d'étirement des OH des acides carboxyliques. Les trois bandes à 3079, 1643 et 888 cm^{-1} sont caractéristiques de groupements exométhylènes ($\text{C}=\text{CH}_2$). Ces groupements exométhylènes sont probablement ceux des acides diterpéniques de type labdane [[Scalarone et al., 2003](#)]. Par conséquent, il s'agit d'une résine diterpénique.

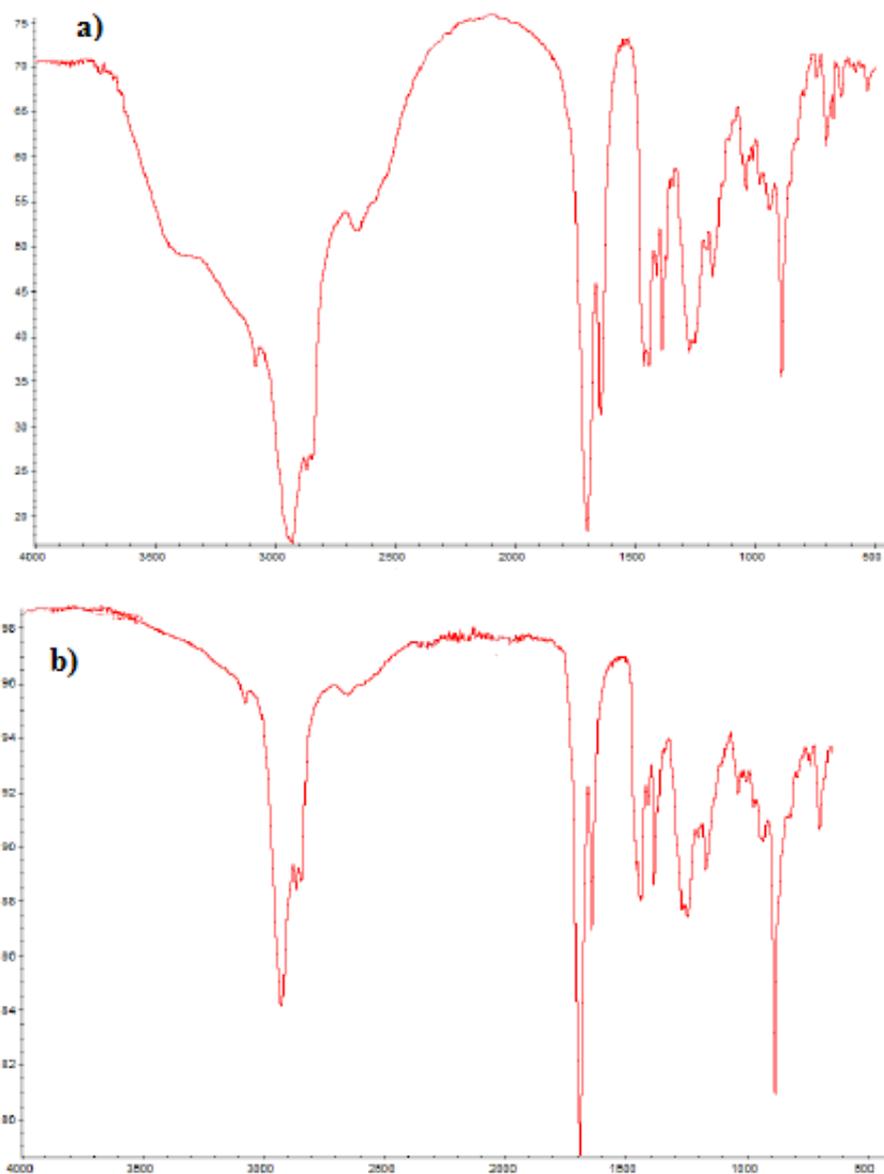


Figure 6. 4. Spectres infrarouges d'exsudat de *G. demeusei* (Harms) J.Leonard ; a) en transmission à partir d'une pastille de KBr ; b) en réflexion totale atténuée (ATR)

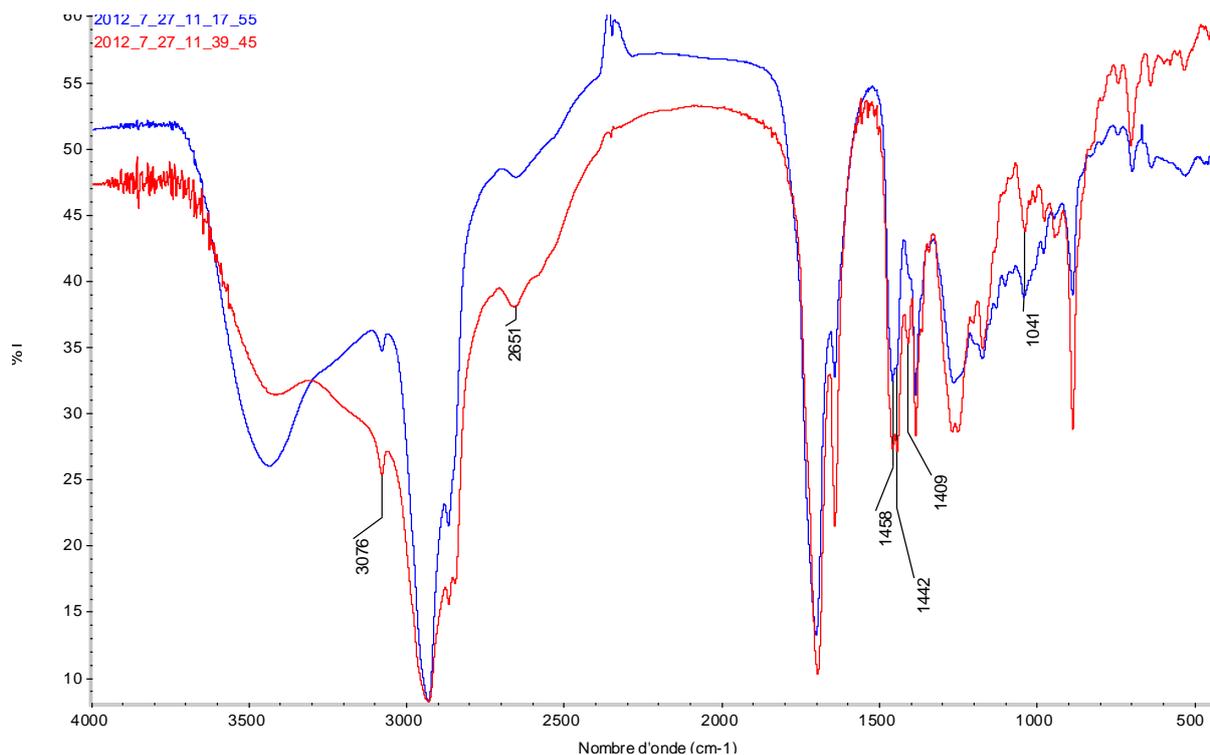
La bande fine et très intense vers 1698 cm^{-1} correspond à l'absorbance du groupement carbonyle de la fonction carboxylique. Les bandes comprises dans la région de $1270\text{-}1110\text{ cm}^{-1}$ sont celles des vibreurs C–O.

Tableau VI. 1. Principales bandes observées dans le cas de l'exsudat de *G. demeusei* (Harms) J. Leonard avec leur attribution structurale

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Groupements	Type de vibration
3418	-OH intermoléculaire	élongation de -OH associée (ν_{OH})
3079	RHC=CH ₂ (vinyl) et R _a R _b C=CH ₂ (alcènes disubstitués géminés)	élongation de H-C= ($\nu_{H-C=}$)
2931	>CH ₂ et/ou -CH ₃	élongation asymétrique (ν_{as}) de C-H
2867		
2846	>CH ₂ et/ou -CH ₃	élongation symétrique (ν_s) de C-H
2659	OH dimérisé d'un groupe carboxyle	élongation de -OH
1698	>C=O de la fonction acide	élongation de C=O ($\nu_{C=O}$)
1643	>C=C< (non conjugué)	élongation >C=C< ($\nu_{C=C}$)
1459	>CH ₂ et/ou -CH ₃	déformation (δ_a) de CH ₂ et/ou CH ₃
1386	-CH ₃	déformation symétrique (δ_s) de CH ₃
1367		
1270	OH des alcools	élongation C-O des alcools $\nu(C-O)$
1252	OH des alcools	élongation C-O des alcools $\nu(C-O)$
888	R _a R _b C=CH ₂	déformation hors du plan de méthylène terminale porté par les C8-C20

Les spectres IRTF de *G. demeusei* présentent un profil relativement proche des copals décrits par Regert (2008) et Guiliano (2007). Toutefois, on constate que, la bande centrée à 2655 cm⁻¹ est un peu plus intense dans cet échantillon, que dans ceux rapportés par ces auteurs.

Le spectre IRTF en mode transmission d'une pastille d'un échantillon de copal kauri est superposé à celui de *G. demeusei* en figure 6.5. Les spectres ont des signatures très similaires, il est alors possible que ces copals soient de compositions moléculaires très proches. Cependant, la superposition des deux spectres montre une différence dans la forme des bandes d'élongation du vibreur OH ainsi qu'au niveau des bandes à 1698 et 888 cm⁻¹. Les bandes caractéristiques des exsudats résineux diterpéniques de type copal sont donc bien observées. Cependant, la grande similarité des deux spectres n'offre que peu de moyens de distinguer les copals par cette technique.



— : Spectre IR copal kauri obtenu en transmission (pastille de KBr)
 — : Spectre IRTF d'exsudat de *G. demeusei* (Harms) J.Leonard B (pastille de KBr)

Figure 6. 5. Superposition des spectres infrarouges d'exsudat de *G. demeusei* (Harms) J.Leonard et du copal kauri obtenus en transmission

Etude spectrale des exsudats de *Dacryodes edulis* (G. Don) Lam

Les résultats d'analyse IRTF-ATR de quinze échantillons d'exsudat de *D. edulis* (G. Don) Lam prélevés sur cinq sites (Boko, Kanguini, Mbémbé, Mombo beach et Okouma) sont reportés dans le Tableau VI.2. Malgré certaines différences, ces exsudats présentent toutes les caractéristiques des exsudats résineux triterpéniques. On peut noter la présence de (s) :

- bande d'élongation vers 3399 cm^{-1} , présence de groupement -OH ;
- bandes d'absorptions intenses à $2943, 2928, 2869, \text{ et } 2723\text{ cm}^{-1}$, correspondant aux mouvements d'élongations du vibrateur C-H de -CH_3 et/ou $\text{-CH}_2\text{-}$;
- bande due au mouvement d'élongation du vibrateur C=O à 1708 cm^{-1} ;
- bandes de déformations entre $1455 \text{ et } 1362\text{ cm}^{-1}$ du vibrateur C-H de -CH_3 et/ou $\text{-CH}_2\text{-}$;
- bande d'absorption vers 1243 cm^{-1} , correspondant à la bande d'étirement du vibrateur C-O.

Tableau VI. 2. Principales bandes observées dans le cas de l'exsudat de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam avec leur attribution structurale

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Groupements	Type de vibration
3420	-OH	élongation de O-H associée (ν _{OH})
3070	RHC=CH ₂ (vinyl) et R _a R _b C=CH ₂ (alcènes disubstitués géminés)	élongation de H-C= (ν _{H-C=})
2943	>CH ₂ et/ou -CH ₃	élongation asymétrique (ν _{as}) de C-H
2926		
2869	>CH ₂ et/ou -CH ₃	élongation symétrique (ν _s) de C-H
1708	>C=O	élongation de C=O (ν _{C=O})
1659	>C=C< (non conjugué)	élongation >C=C<
1456	>CH ₂ et/ou -CH ₃	déformation (δ) de CH ₂ et/ou CH ₃
1380	-CH ₃	déformation symétrique (δ _s) de CH ₃
1362		
1243-1037	OH des alcools	ν(C-O) des alcools

En comparant les spectres MIR des différents échantillons, nous avons montré qu'il est possible de distinguer cinq groupes, définis selon leur signature spectrale (tableau VI.3).

Tableau VI. 3. Différents échantillons de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam analysés en IRTF-ATR et leurs aspects

Groupe	Sous-groupe	Echantillon (Code)	Aspect de l'exsudat
Groupe I		DE Okouma14 (D ₁₁)	Liquide visqueux
		DE forêt de Mbémbe 1 (D ₁₅)	Un peu dur
		DE 200 MB 5 (D ₁₀)	Liquide visqueux
		DE Boko village 1prim (D ₁₂)	Liquide visqueux
		DE Kanguini 1 (D ₉)	Liquide visqueux
		DE Kanguini 3 (D ₁₆)	Dur et cassant
Groupe II	Groupe II-a	DE Boko village17 (D ₆)	Dur et cassant
		DE Boko village 4 (D ₁₄)	Dur et cassant
		DE Boko village 1 (D ₁₃)	Dur et cassant
	Groupe II-b	DE Mbémbe village 9 (D ₈)	Liquide visqueux
		DE Mbémbe (D ₀)	Dur et cassant
Groupe III		DE Kanguini 4 (D ₇)	Liquide visqueux
Groupe IV	Groupe IV-a	DE 350 MB (D ₄)	Liquide visqueux
	Groupe IV-b	DE Boko village 2 (D ₃)	Liquide visqueux
Groupe V	Groupe V	DE Boko centre 16 (D ₂)	Liquide visqueux

En effet, la grande différence se situe souvent dans la région dite des « empreintes digitales ». Cette région la plus souvent complexe, se situe entre 1500 et 500 cm⁻¹. Les échantillons D₁₁ ; D₁₅ ; D₁₀ ; D₁₂ ; D₉ ; D₁₆ dont les spectres MIR sont très proches forment le groupe I. Par contre, le groupe III et le groupe V moins représentatifs comptent chacun un individu, respectivement D₇ et D₂. Nous avons par la suite comparé les spectres IRTF-ATR des individus des groupes I, III et V (figure 6.6).

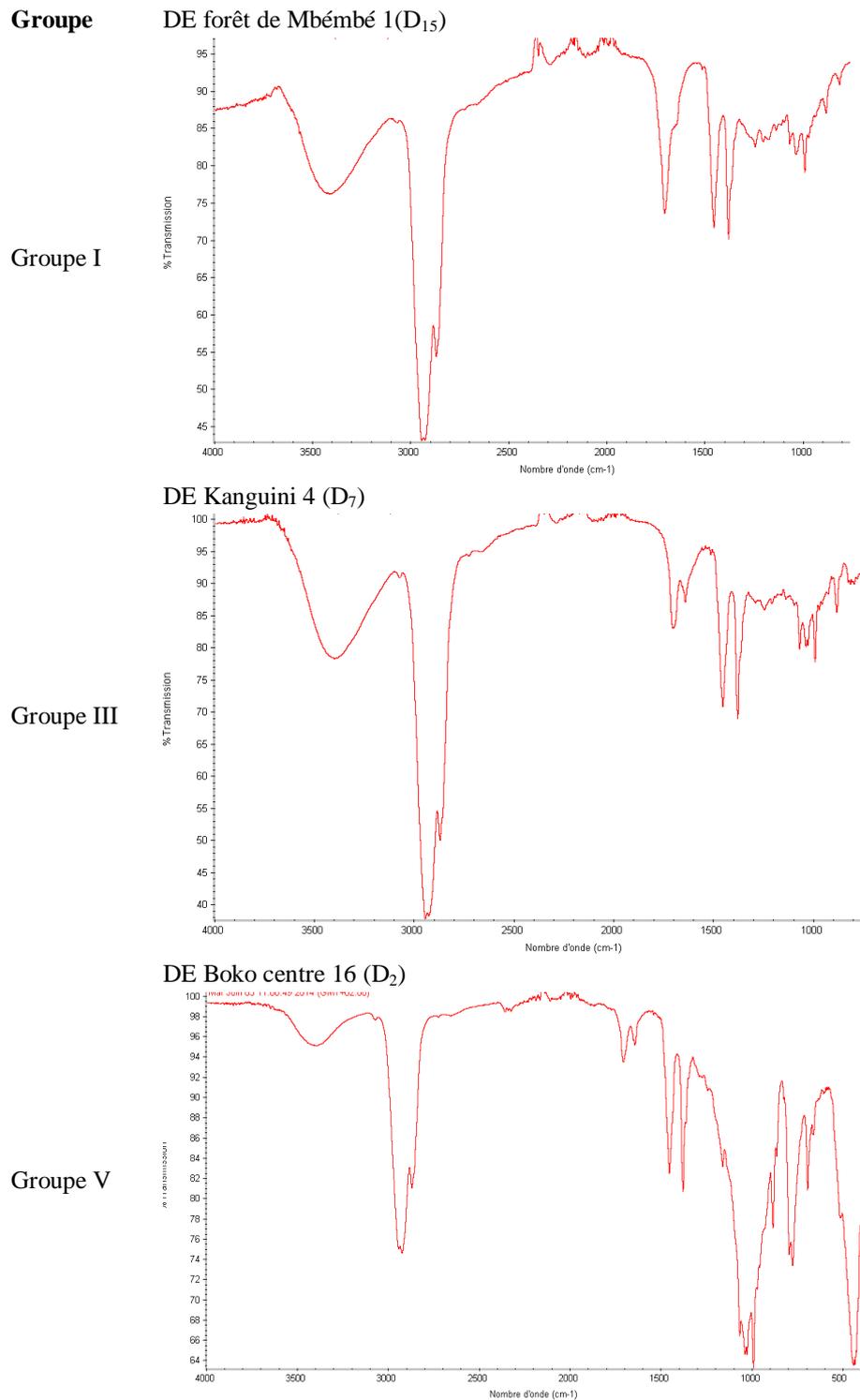


Figure 6. 6. Spectre IRTF-ATR des exsudats de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam des Groupes I, III et V

La différence la plus significative entre les individus du groupe I et ceux du groupe III est la forme et l'intensité des bandes à 1705 et 1650 cm⁻¹, correspondant respectivement aux vibreurs C=O et C=C. Cette différence pourrait être justifiée par le fait que l'exsudat du groupe III soit beaucoup plus frais que celui du groupe I. Il a été démontré que l'oxydation des exsudats résineux s'accompagne d'une modification de l'intensité de certaines bandes

d'élongations de certains vibrateurs. De façon générale, on observe une augmentation de l'intensité de la bande correspondant au vibrateur C=O (des acides carboxyliques ou des esters) et une diminution de l'intensité de la bande du vibrateur C=C [Derrick *et al.*, 1999]. Par contre, le spectre IRTF-ATR de l'exsudat du groupe V, a une signature assez particulière dans la région des « empreintes digitales ». On observe, une série de bandes assez intenses et larges (1161 à 991 cm^{-1}), une bande moyennement intense et fine (885 cm^{-1}), deux bandes larges et d'intensités moyennes (792 et 776 cm^{-1}), une bande fine peu intense (694 cm^{-1}) et une bande intense et assez large à 443 cm^{-1} . Cet exsudat très fluide semble être beaucoup plus proche de la substance d'origine, car les exsudats exposés à l'air et au soleil après exsudation naturelle, subissent des modifications entraînant ainsi la perte de composés volatils. Les spectres des individus des deux sous groupes II-a et II-b qui forment le groupe II sont très proches. Dans le cas du groupe II-a, la bande du vibrateur C-O est plus intense alors que dans le spectre de l'individu du groupe II-b, on note un élargissement et une augmentation de la bande vers 1067 cm^{-1} (figure 6.7).

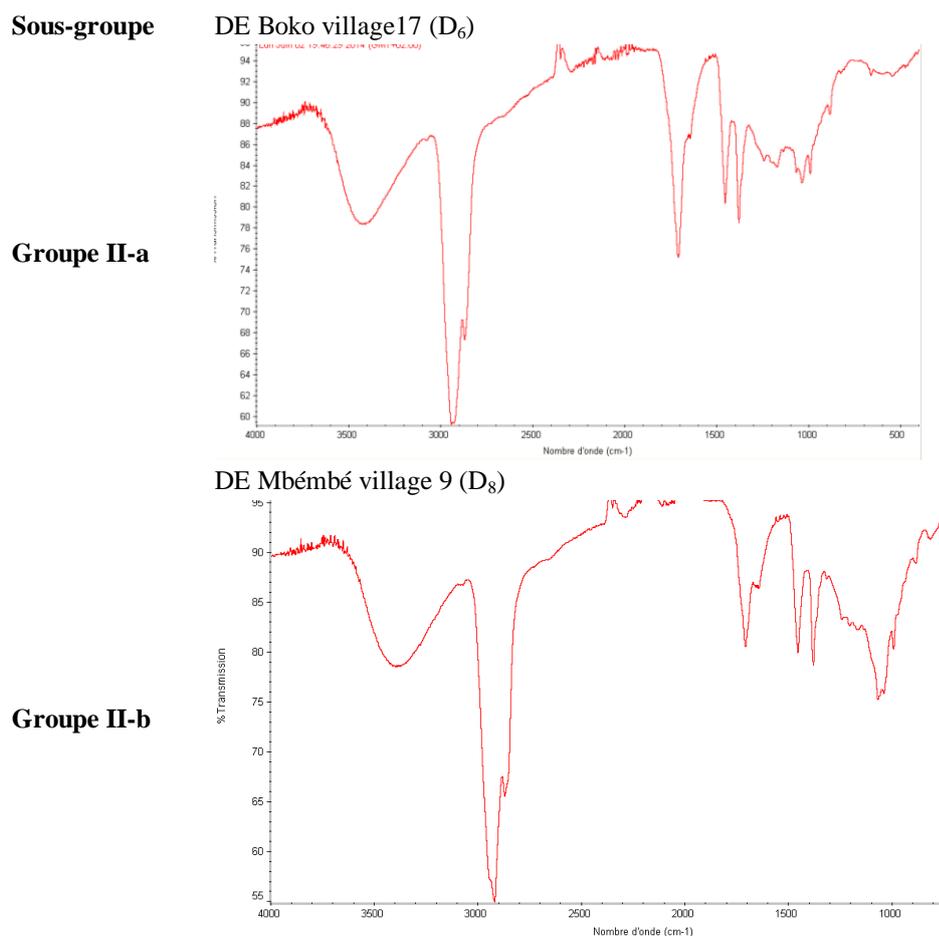


Figure 6. 7. Spectre IRTF-ATR des exsudats de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam des sous-groupes II-a et II-b

Les spectres des individus des sous groupes IV-a et IV-b sont proches. Cependant, la bande d'élongation du vibrateur C=C et la bande vers 886 cm⁻¹ sont un peu plus intenses dans le sous-groupe IV-a que dans le sous groupe IV-b (figure 6.8).

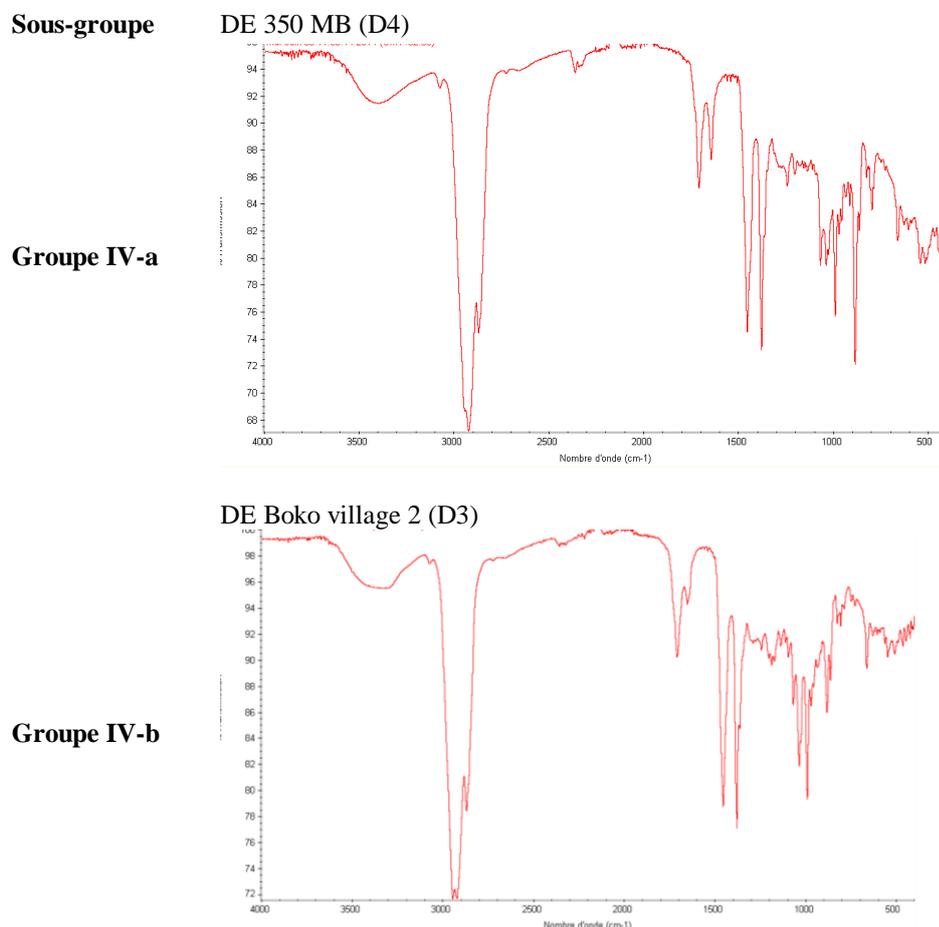
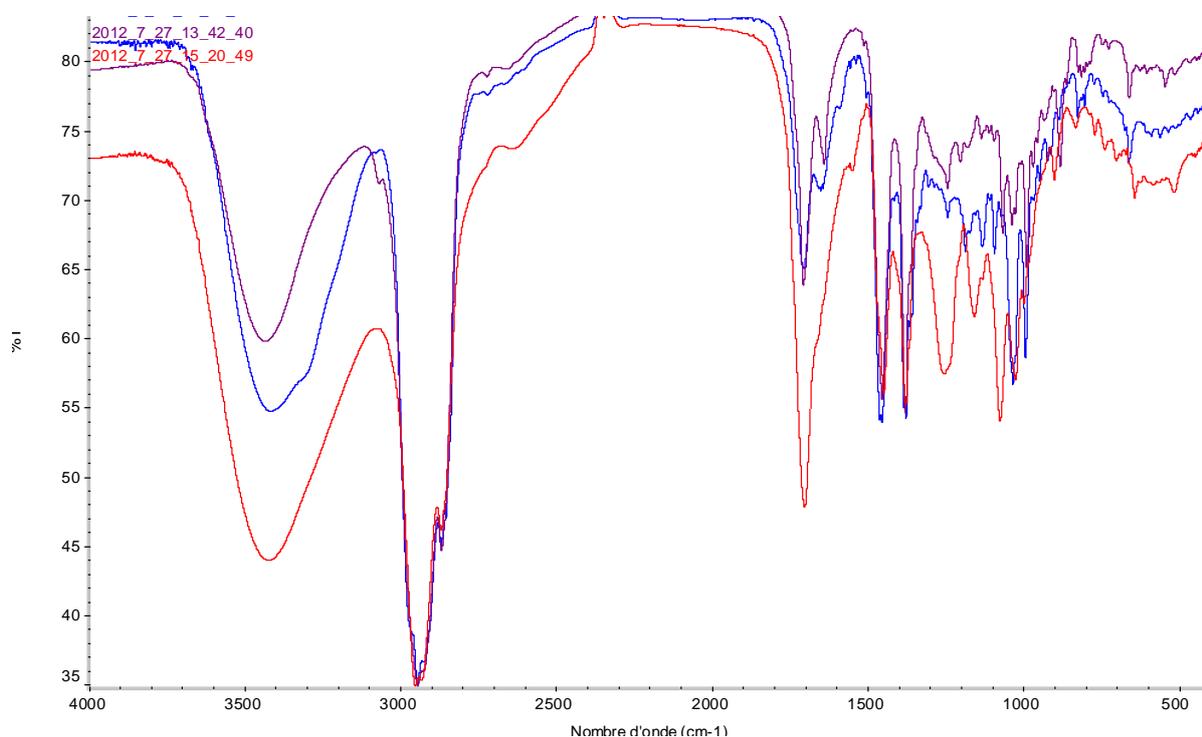


Figure 6. 8. Spectre IRTF-ATR des exsudats de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam des sous-groupes IV-a et IV-b

Nous avons, par la suite comparé le spectre IRFT en mode transmission de l'exsudat de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam du groupe I avec ceux de deux échantillons d'exsudats de références, disponibles dans notre laboratoire et appartenant à la même famille, celle des Burseraceae (*Commiphora schimperi* (O. Berg) Engl. et la gomme élémi). Sur la figure 6.9, on peut observer que les spectres présentent des bandes similaires. Cependant, le spectre appartenant à l'échantillon de *C. schimperi* (O. Berg) Engl. en rouge se distingue des deux autres spectres par la bande large et très intense vers 3425 cm⁻¹ et celles à 1703, 1379, 1256, 1077 et 1027 cm⁻¹ qui montrent qu'il s'agit là d'une gomme-résine triterpénique. Par contre, on constate une similarité remarquable entre les spectres en bleu (gomme élémi) et en violet (*D. edulis* (G. Don) K.J. Lam). Notamment en ce qui concerne la forme et l'intensité de la

bande d'élongation du vibrateur C=O à 1708 cm^{-1} , la bande d'élongation du vibrateur $>\text{C}=\text{C}<$ à 1659 cm^{-1} et les bandes de déformations entre 1455 et 1362 cm^{-1} du vibrateur C-H de $-\text{CH}_3$ et/ou de $-\text{CH}_2-$. Ces exsudats sont donc de même type (exsudats résineux triterpéniques). Il apparaît clairement qu'avec cette technique, on arrive à distinguer une gomme-résine d'une résine. La ressemblance spectrale des deux résines confirme que ces exsudats sont de même type et nous devons nous attendre à retrouver des molécules ayant les mêmes structures de base. Cependant, seule une analyse chromatographique (CPG-SM) pourra nous permettre de confirmer ou non cette hypothèse.



En rouge : spectre IRTF en mode transmission de *C. schimperi* (O. Berg) Engl.

En bleu : spectre IRTF en mode transmission de la gomme Elémi

En violet : spectre IRTF en mode transmission de *Dacryodes edulis* (G. Don) Lam

Figure 6. 9. Superposition des spectres infrarouges d'exsudats de trois espèces de la famille des Burseraceae

En conclusion, la spectroscopie du moyen infrarouge (SMIR) a montré qu'il était possible de distinguer les exsudats de type copal de ceux de type résine triterpénique. De plus, une résine triterpénique se distingue nettement d'une gomme-résine triterpénique. Cette technique nous aide à bien sélectionner la méthode d'analyse secondaire, une fois le type d'exsudat déterminé.

VI.2. Analyses par CPG-SM

VI.2.1. Composition chimique de la fraction peu volatile des exsudats étudiés

VI.2.1.1. Exsudats de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam

15 exsudats de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam ont été analysés en CPG-SM après triméthylsilylation. Les chromatogrammes, dont deux sont donnés en annexe 1, présentent des profils très proches et révèlent la présence d'environ vingt composés triterpéniques élués entre 24 et 30 minutes, comme illustré en figure 6.10.

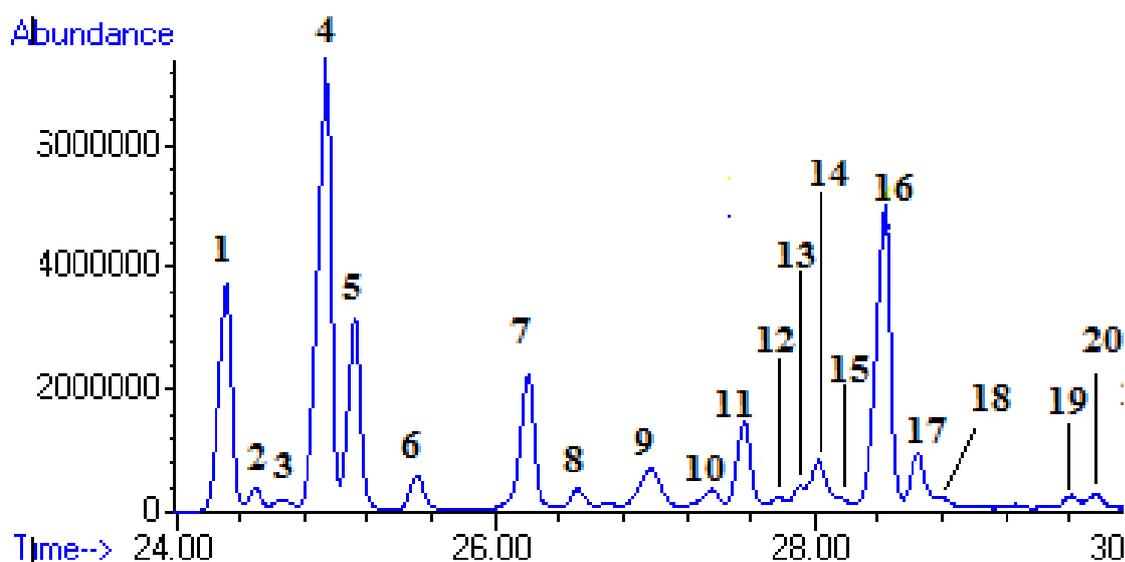


Figure 6. 10. Chromatogramme de l'exsudat résineux de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam obtenu par CPG-SM, échantillon de Boko village 17

Du fait de la présence de nombreux isomères, certains composés ont été identifiés après l'étude de fragmentation de leurs spectres de masse. Les composés **1** et **4** montrent une très grande similitude au niveau de leurs spectres de masse qui laisse penser qu'il s'agit d'isomères de α et β -amyrine. Le composé **1** a été identifié comme étant le 3-épi- β -amyrine, α -OTMS éther (3 α -Hydroxy-olean-12-en-3-ol, α -OTMS éther) en se basant sur son spectre de masse et sur les recherches de [Mathe et al., \(2004\)](#) qui affirment que les composés dont la configuration du C-3 est α sont élués en premier par rapport à ceux ayant une configuration β . Son spectre de masse donné en figure 6.11 met en évidence un clivage de type Rétro Diels Alder (rDA) dû à la présence d'une insaturation dans un cycle à six chaînons (cycle C) et conduisant à la formation de l'ion à m/z 218, qui est le pic de base. Le départ d'un groupement méthyle porté par le C-17 de la molécule correspondant à l'ion à m/z 218 donne l'ion à m/z 203. Par ailleurs, d'après la littérature [[Budzikiewicz et al., 1963](#)], l'ion à m/z 189

a pu se former à partir de l'ion à m/z 279 après la perte d'une molécule neutre (TMSOH). Par déduction des informations précédentes, le composé **4** élué à 24,93 min est identifié comme étant le 3-épi- α -amyrine, α -OTMS éther.

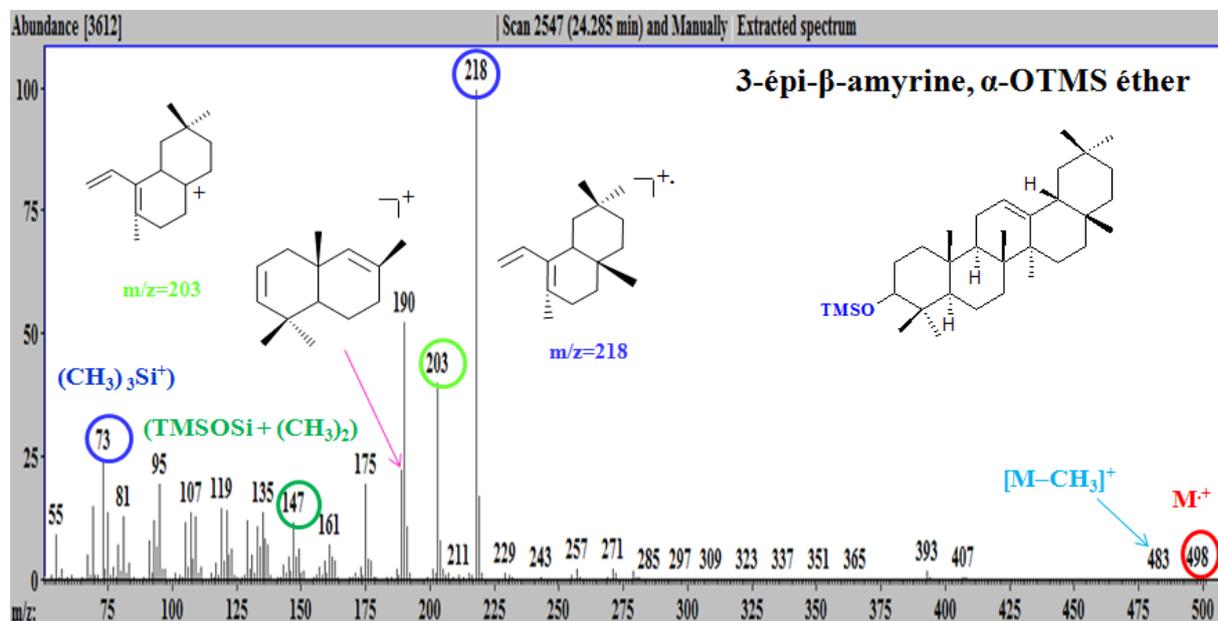


Figure 6. 11. Spectre de masse du composé 1 (3-épi- β -amyrine, α -OTMS éther) et les différents fragments obtenus en impact électronique

Le composé **2**, élué à 24,49 min à un pic moléculaire à m/z 498. Les ions à m/z 483 et 408 résultent respectivement de la perte d'un groupement méthyle et d'une molécule neutre (TMSOH). La présence des ions à m/z 189, 203 et 218 sont typiques de la fragmentation de Δ^{12} -oléanène ou Δ^{12} -ursène après une réaction rDA initiée par la présence d'une double liaison en position 12. En tenant compte de l'intensité des pics des ions à m/z 203 et 189, on peut donc distinguer les triterpènes du type oléananes de ceux de type ursanes [Mathe et al., 2004]. Dans le cas du composé **2**, il s'agit d'un triterpène de type ursane car l'intensité du pic à m/z 189 est supérieure à celle du pic à m/z 203. Par contre, ce composé présente un pic de base à m/z 190 atypique.

Les composés **3**, **8** et **19**, élués respectivement à 24,65 min, 26,52 min et 29,63 min, sont des isomères. Leurs spectres de masse présentent un pic moléculaire à m/z 586. Les autres ions caractéristiques sont les ions à m/z 571, 496 et 481. Ils correspondent respectivement à la perte d'un groupement méthyle, d'une molécule de TMSOH et de (TMSOH + CH_3). Les fragments principaux des spectres de masse de ces trois composés sont les fragments à m/z 207 et 306. La présence de l'ion à m/z 207 indique que le carbone en position 3 porte une

fonction alcool [Budzikiewicz *et al.*, 1963 ; Assimopoulou and Papageorgiou, 2004]. Le composé **3** est probablement un triterpène de type oléanane car l'intensité du pic à m/z 203 est supérieure à celle du pic à m/z 189. La structure proposée et le schéma de fragmentation du composé **3** sont donnés ci-dessous (figure 6.12).

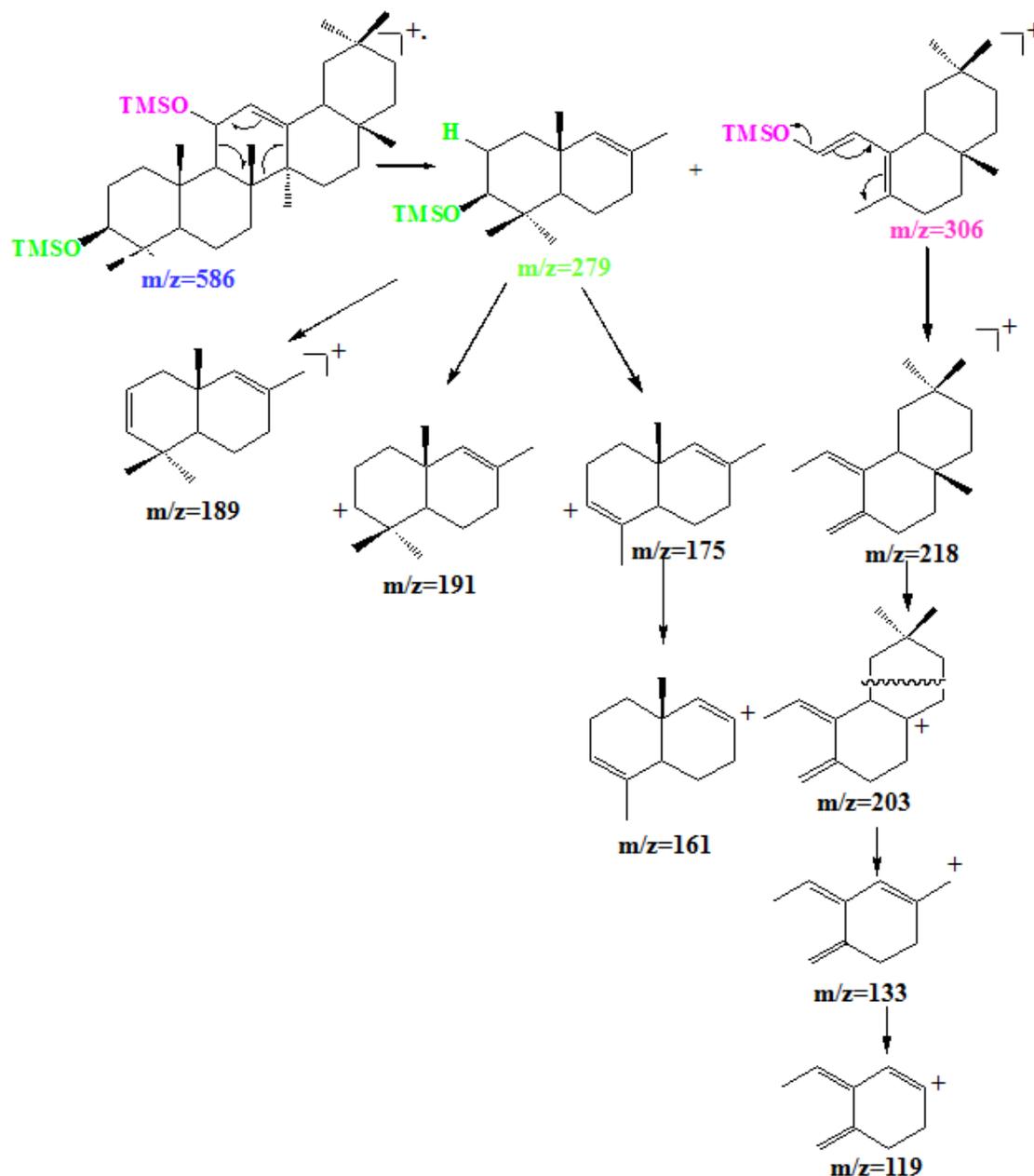


Figure 6. 12. Schéma de fragmentation en impact électronique du composé **3** supposé

Les composés **8** et **19** présentent des spectres de masse très similaires à celui du composé **3**. Ce sont probablement des isomères. Compte-tenu de l'ordre d'éluion des isomères des différents types de triterpènes (oléanane, ursane et lupane), il s'agit probablement de

composés dont les structures sont proposées en figure 6.13, isomères Δ^{12} -ursène et lupane du composé **3**.

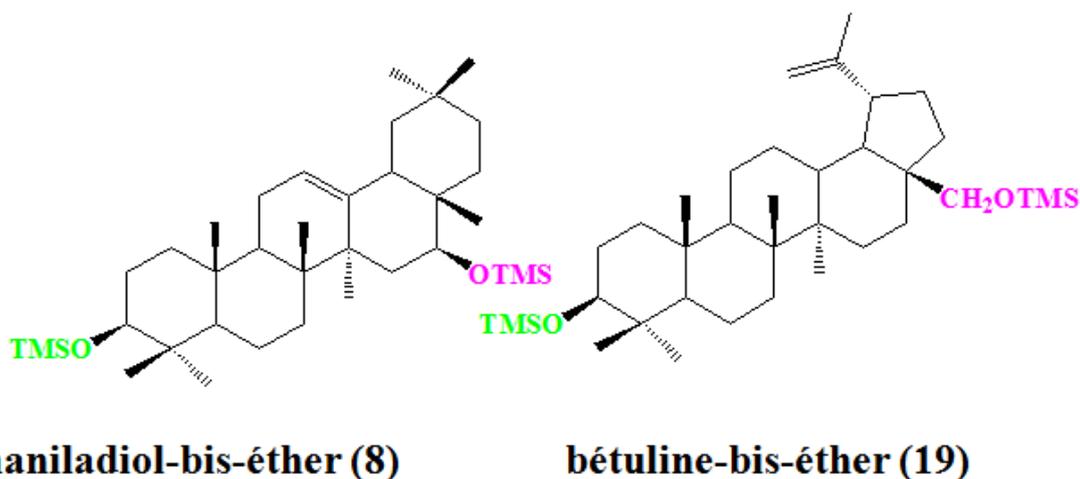
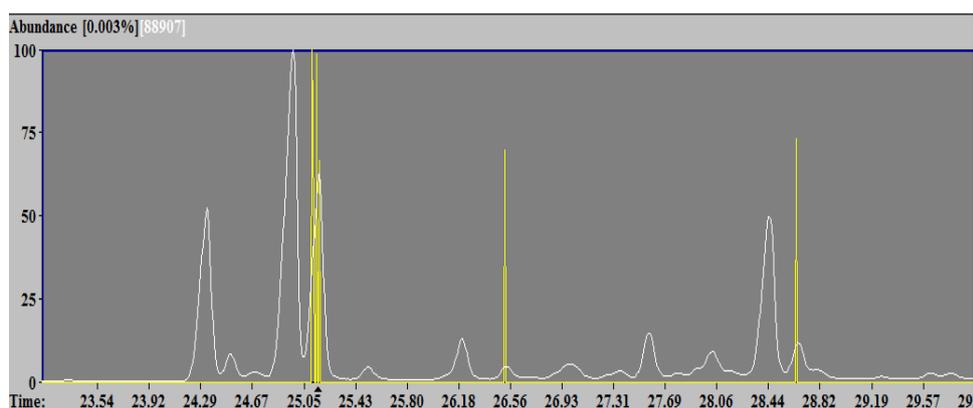


Figure 6. 13. Structure probable des composés 8 et 9 détectés dans les exsudats de *D. edulis* (G. Don)

Le composé **5** élué à 25,10 min a un spectre de masse avec un pic moléculaire à m/z 498. Les ions à m/z 483 et 408 résultent respectivement du départ d'un groupement méthyle et d'une molécule neutre (TMSOH). La présence d'un pic de base à m/z 189 et des autres ions à m/z 203 et 218 est caractéristique de la structure de base de type lupane. De plus, le spectre de masse de ce composé montre l'ion à m/z 457 (figure 6.14) correspondant à une perte de 41 u.m.a. $[M-41]^+$, caractéristique de la perte d'un groupement isoprényle [Assimopoulou and Papageorgiou, 2004]. Ceci suggère que ce composé est un triterpène portant un groupement isoprényle sur le C-19 se trouvant sur le cycle E.



En jaune le chromatogramme de l'ion à $m/z=457$ extrait à partir du logiciel AMDIS32 et en blanc le TIC
Figure 6. 14. Chromatogramme de l'échantillon d'exsudat résineux de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam (Boko village 17)

Le composé **5** est probablement le 3-épi-lupéol, α -OTMS éther dont le spectre de masse et les différents fragments composent la figure 6.15.

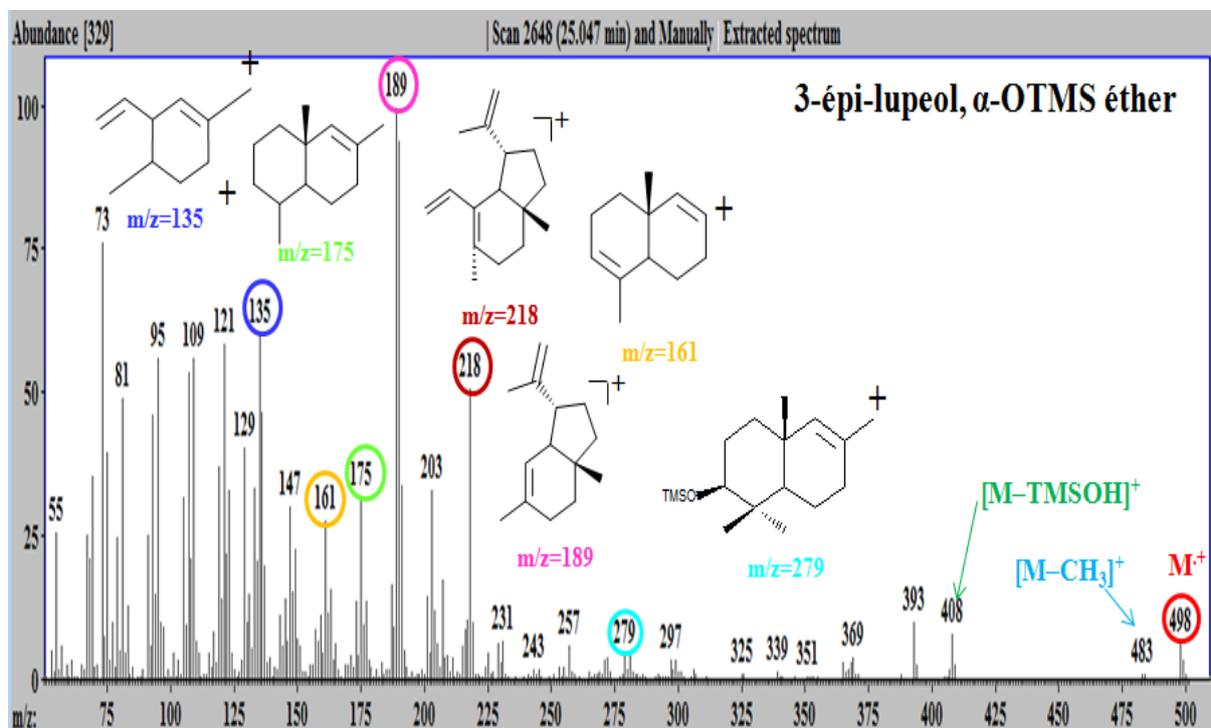


Figure 6. 15. Spectre de masse du composé **5** et les différents fragments obtenus en impact électronique

De même, les composés **10** et **17** élués respectivement à 27,31 et 28,66 min ont le même spectre de masse que le composé **5** et ont été identifiés comme étant lupéol, β -OTMS éther et un de ses isomères.

Les ions caractéristiques des spectres de masse des composés détectés, identifiés ou non, sont résumés dans le tableau VI.4 suivant.

Tableau VI. 4. Tableau récapitulatif des noms et ions caractéristiques des composés annotés en figure 6.10

N°	tr (min)	Composés	m/z
1	24,31	3-épi- β -amyrine, α -OTMS éther	73 ; 129 ; 147 ; 190 ; 203 ; 218 ; 279 ; 393 ; 498
2	24,49	dérivé d'olean-12-ène ou urs-12-ène non identifié	73 ; 109 ; 135 ; 161 ; 175 ; 190 ; 203 ; 218 ; 257 ; 281 ; 393 ; 498
3	24,65	triterpène (structure proposé)	73 ; 129 ; 157 ; 177 ; 195 ; 218 ; 306 ; 345 ; 381 ; 496 ; 586
4	24,93	3-épi- α -amyrine, α -OTMS éther	73 ; 119 ; 135 ; 175 ; 190 ; 218 ; 279 ; 393 ; 483 ; 498
5	25,10	3-épi-lupéol, α -OTMS éther	73 ; 95 ; 121 ; 136 ; 175 ; 189 ; 203 ; 229 ; 257 ; 279 ; 297 ; 408 ; 498
6	25,51	triterpènes non identifié	73 ; 95 ; 119 ; 145 ; 173 ; 203 ; 218 ; 257 ; 281 ; 339 ; 367 ; 415 ; 469 ; 497 ; 512
7	26,19	triterpène non identifié	73 ; 107 ; 135 ; 161 ; 189 ; 215 ; 231 ; 267 ; 161 ; 293 ; 339 ; 367 ; 431 ; 469 ; 512
8	26,53	maniladiol-bis-TMS-éther	73 ; 95 ; 129 ; 147 ; 175 ; 207 ; 229 ; 255 ; 281 ; 306 ; 347 ; 381 ; 406 ; 496 ; 586
9	26,99	triterpène non identifié	73 ; 95 ; 121 ; 147 ; 171 ; 189 ; 218 ; 257 ; 277 ; 339 ; 380 ; 407 ; 453 ; 481 ; 512
10	27,34	isomère du lupéol, β -OTMS éther	73 ; 95 ; 121 ; 136 ; 175 ; 189 ; 203 ; 218 ; 257 ; 279 ; 297 ; 408 ; 498
11	27,56	β -amyrine, β -OTMS éther	73 ; 95 ; 119 ; 135 ; 161 ; 189 ; 203 ; 218 ; 279 ; 297 ; 393 ; 498
12	27,78	triterpène non identifié	69 ; 95 ; 109 ; 129 ; 147 ; 173 ; 271 ; 393 ; 408 ; 483 ; 498
13	27,92	α -amyrenone	55 ; 69 ; 81 ; 95 ; 107 ; 119 ; 133 ; 147 ; 161 ; 175 ; 189 ; 203 ; 218 ; 253 ; 281 ; 393 ; 409 ; 424
14	28,03	triterpène non identifié	55 ; 73 ; 95 ; 109 ; 119 ; 134 ; 149 ; 173 ; 189 ; 219 ; 245 ; 259 ; 274 ; 313 ; 393 ; 408 ; 424 ; 483 ; 498
15	28,19	triterpène non identifié	55 ; 73 ; 95 ; 109 ; 135 ; 159 ; 187 ; 207 ; 229 ; 253 ; 281 ; 319 ; 393 ; 483 ; 498
16	28,43	α -amyrine, β -OTMS éther	73 ; 147 ; 218 ; 297 ; 393 ; 498
17	28,65	isomère du lupéol, β -OTMS éther	73 ; 95 ; 109 ; 135 ; 161 ; 189 ; 203 ; 218 ; 257 ; 279 ; 299 ; 369 ; 393 ; 483 ; 498
18	28,82	triterpène non identifié	69 ; 109 ; 135 ; 161 ; 187 ; 207 ; 229 ; 253 ; 281 ; 311 ; 393 ; 483 ; 498
19	29,62	bétuline-bis-TMS-éther	73 ; 129 ; 207 ; 281 ; 306 ; 345 ; 391 ; 496 ; 571 ; 586
20	29,77	triterpène non identifié	73 ; 109 ; 147 ; 191 ; 207 ; 229 ; 281 ; 342 ; 393

en gras : pic de base ; en gras et souligné : pic moléculaire

La composition, ci-dessus, de la fraction peu volatile des exsudats résineux de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam est en accord avec celle décrite, par ailleurs, dans d'autres résines des espèces appartenant à la famille [Susunaga et al., 2001 ; Cruz-Canizares et al., 2005 ; Siani et al., 2012 ; Rüdiger and Veiga-Junior, 2013 ; Lucero-Gómez et al., 2013]. Les constituants majeurs de ces exsudats sont des épimères de l' α -amyrine et de la β -amyrine, contrairement à ceux observés pour la gomme élémi analysée. Selon la littérature, les triterpènes de type α et β -amyrine et le lupéol ont une activité anti-inflammatoire [Geetha et Varalaxmi, 2001 ; Susunaga et al., 2001]. Ceci pourrait donc justifier l'utilisation des exsudats résineux de *D.*

edulis (G. Don) K.J. Lam par les populations locales, en application sur les points douloureux (entorse ; pied enflés).

Etude statistique des échantillons d'exsudats de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam

L'analyse en composante principale effectuée sur 15 échantillons d'exsudats de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam et d'un échantillon de gomme élémi de référence montre qu'il faut 4 composantes pour décrire 90% des sources de variance dans les données (figure 6.16).

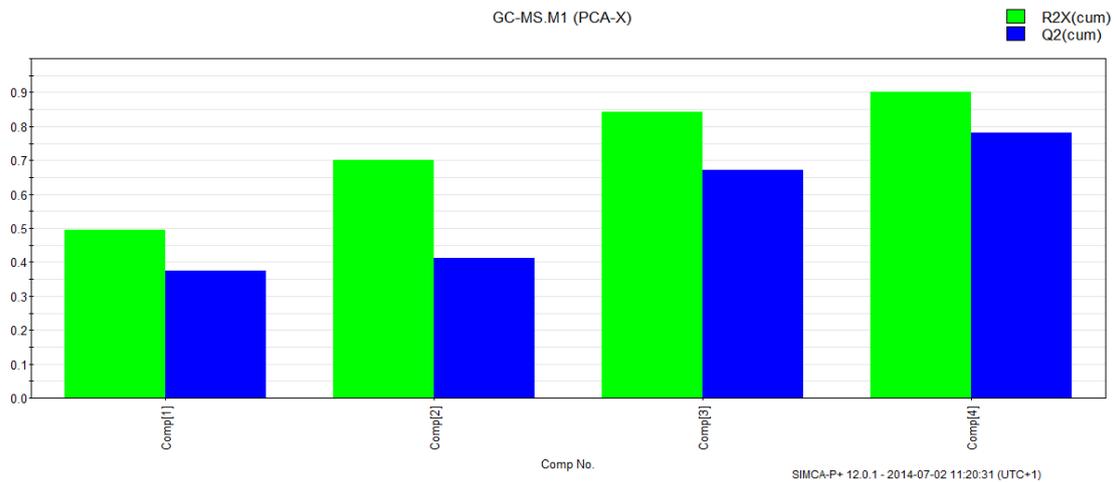


Figure 6. 16. Variance expliquée cumulée

Le tracé des scores (figure 6.17) donne, la projection des 48 individus sur le premier plan factoriel formé par les deux premiers axes R2X[1] et R2X[2], qui représentent respectivement 49,4 % et 20,7 % de la variance totale.

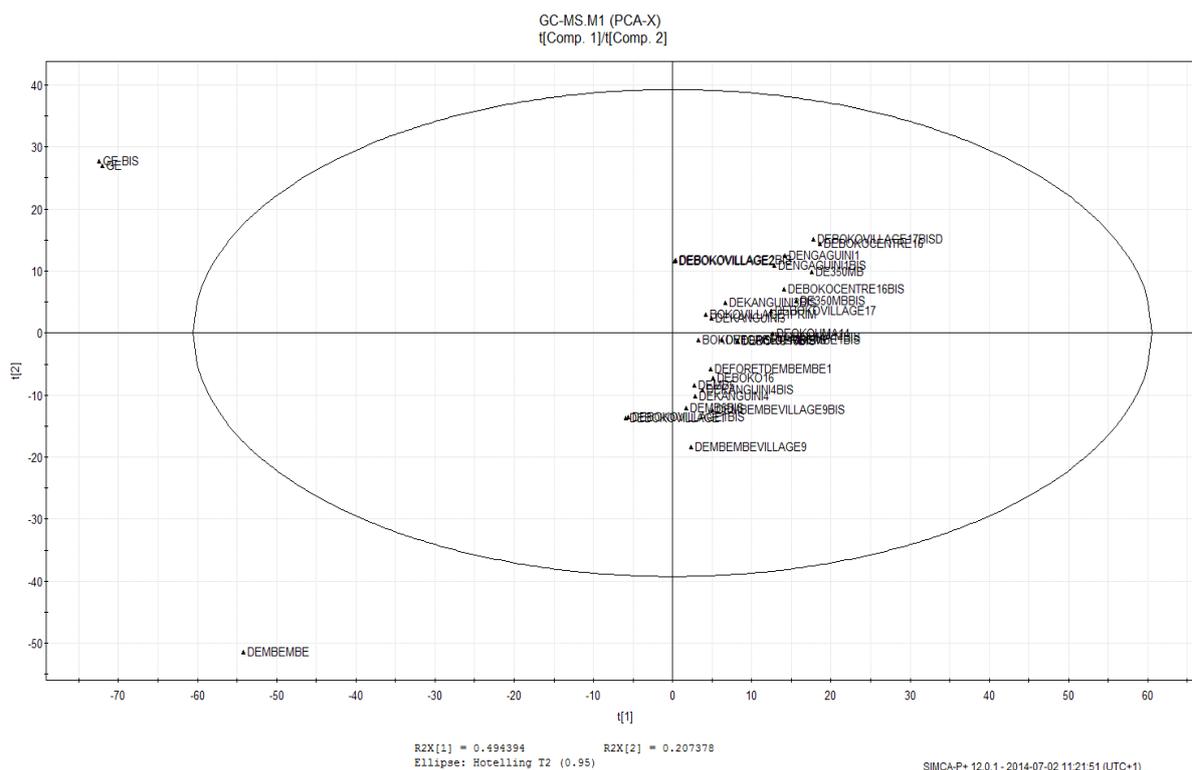
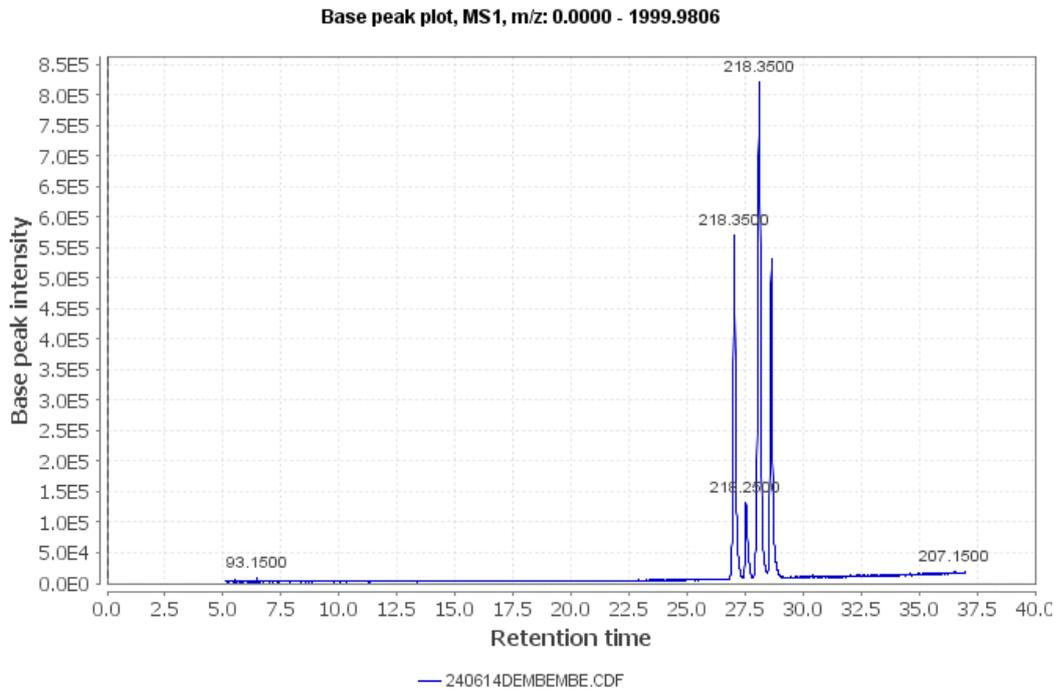


Figure 6. 17. Projection des 48 individus sur le plan factoriel (ACP) correspondant aux limites de confiance à 90 %

Le tracé des scores ci-dessus (figure 6.17) montre que les échantillons de la gomme élémi (GE/GE BIS) et de l'échantillon de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam de Mbémbé (DEMEMBE) sont significativement différents des autres échantillons de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam. Ces échantillons ont un profil chromatographique (figure 6.18) très différent des autres. Les exsudats de la gomme élémi (GE/GE BIS) sont les seuls à présenter des pics en début de chromatogramme, correspondant à des monoterpènes. De plus, on constate que les triterpènes (α -et β -amyrine,) sont des composés majeurs dans les échantillons de la gomme élémi alors que ce sont des composés mineurs dans les échantillons des exsudats de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam.

Par contre, la dissemblance sur l'ensemble des résultats (figure 6.17), pour l'échantillon de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam de Mbémbé (DEMEMBE) est plus surprenante. Une étude approfondie du profil chromatographique met en évidence une faille au niveau de la réaction de silylation pour cet échantillon.

a) Chromatogramme de l'échantillon d'exsudat de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam de Mbémbe



b) Chromatogramme de l'échantillon de la gomme élémi

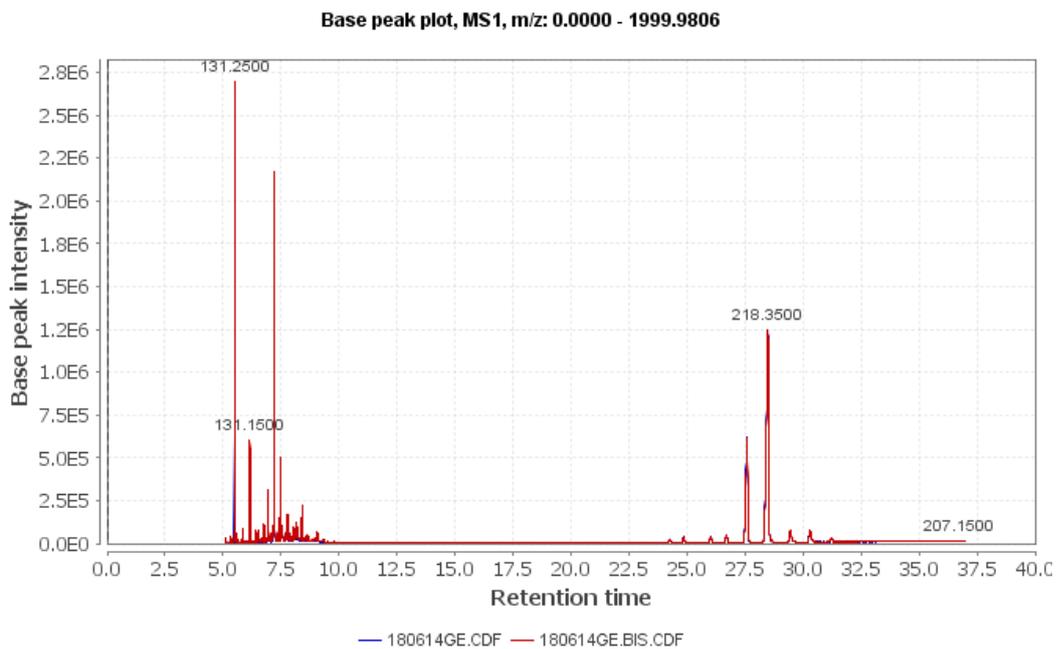


Figure 6. 18. Profil chromatographique de l'exsudat de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam de Mbémbe et de l'échantillon de l'exsudat de référence (gomme élémi)

Les échantillons de la gomme élémi (GE/GE BIS) et de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam de Mbémbe (DEMEMBE) ont donc été supprimés du lot de données pour une nouvelle analyse par composantes principales. Pour celle-là, 5 composantes (figure 6.19) décrivent les sources

de variance : les deux premières représentent 60% de la variance totale. Les projections en 2D ou 3D ne représentent donc qu'une part des différences présentes dans les données.

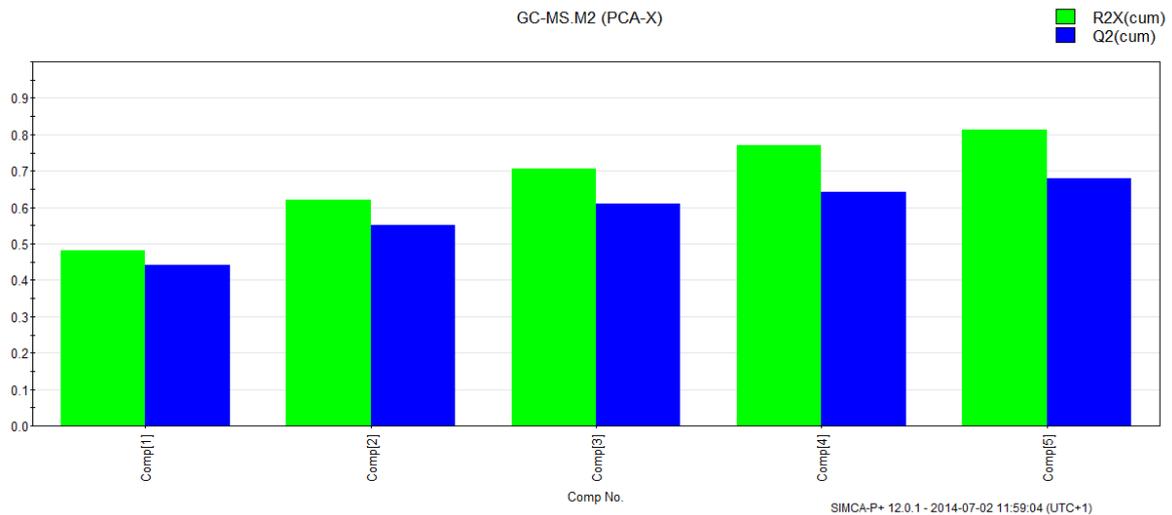


Figure 6. 19. Variance expliquée cumulée sur le deuxième ACP

Le tracé des scores (figure 6.20) montre que les analyses sont répétables, en général, les distances séparant les répliquas sont plus faibles que celles séparant les échantillons. Les échantillons à l'extrémité positive de l'axe R2X[1] sont : DE Boko village 17 Bis (D₆) et DE Boko centre 16 (D₂). Par contre, ceux à l'extrémité négative de l'axe R2X[1] sont DE Mbémbé village 9 et DE Boko village 1 et Boko village 1 Bis.

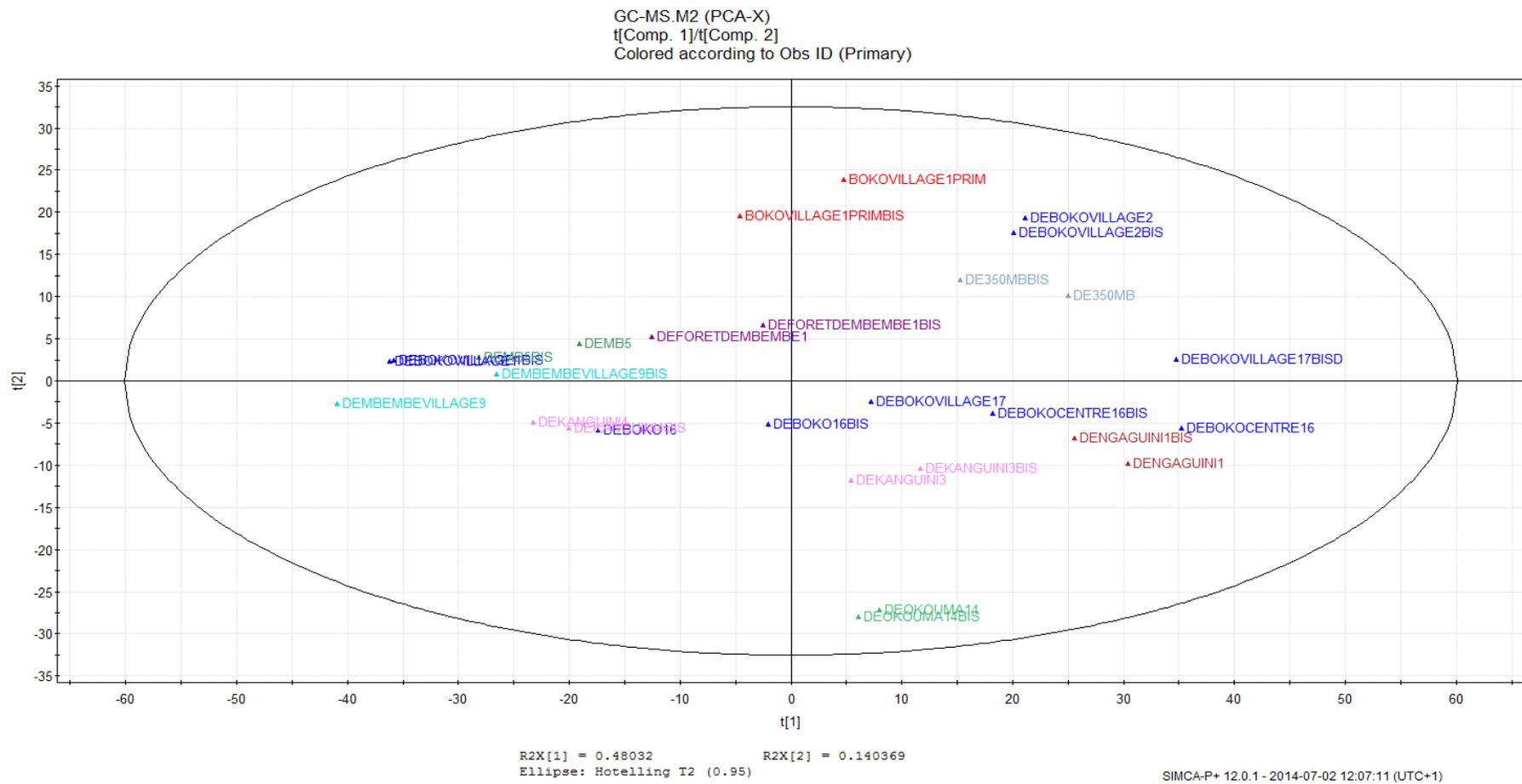


Figure 6. 20. Tracé des scores obtenus en ACP des profils chromatographiques des exsudats de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam après élimination des échantillons GE, GE BIS et DE Mbémbé (D₀)

La figure 6.21 exprime la covariance et la corrélation entre les X (variables d'origine) et t (les scores). En effet, elle exprime l'importance des variables d'origine (l'intensité des différences) sur la structuration du modèle par analyse en composantes principales. [Wiklund et al., 2008]. Les points dans la figure 6.21 représentent les 1078 variables de la matrice dépliée et alignée. Les variables situées aux extrémités sont celles qui ont le plus d'importance dans la structuration du modèle par analyse en composantes principales.

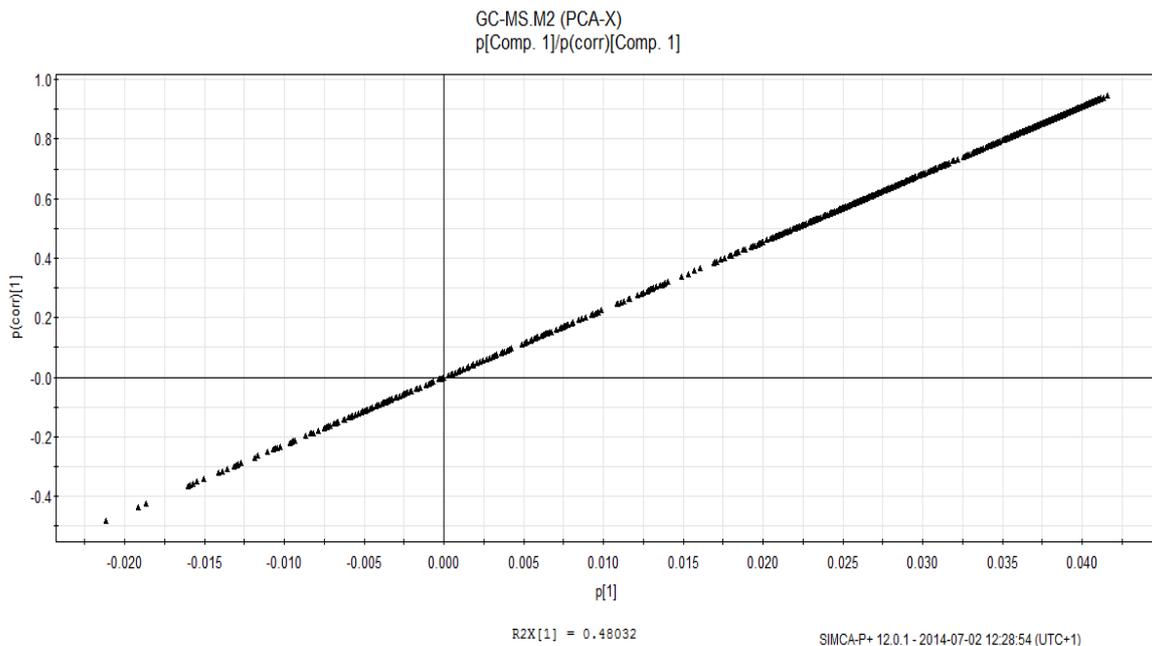
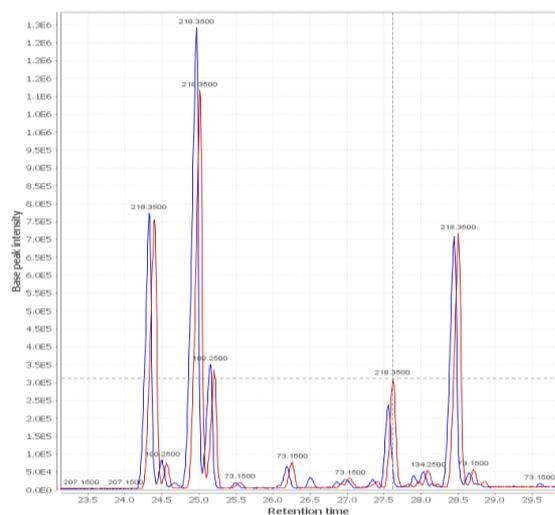


Figure 6. 21. Graphe covariante/corrélation (X, t)

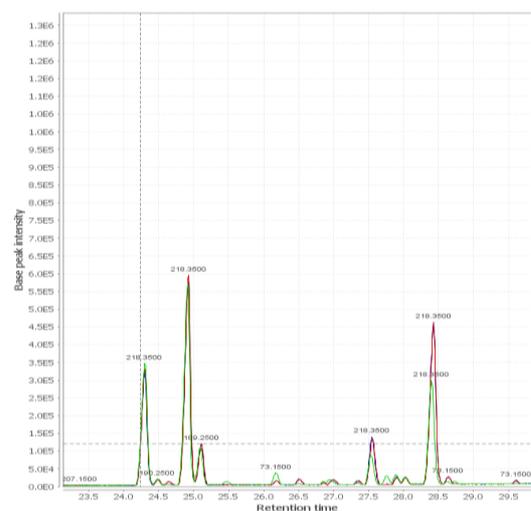
La liste des variables d'origine X pour une corrélation (X, t) supérieure à 0,90 est donnée en annexe 2. Elles sont classées selon le temps de rétention et le rapport m/z. Les variables extraites de la figure 6.21 montrent que les différences se concentrent sur les pics à 24,32 min (composé **1**), à 24,95 min (composé **4**) et à 28,45 min (composé **16**). Ces valeurs de temps de rétention sont moyennées et, comme souvent avec l'ACP, il semble que l'axe 1 soit ce que l'on nomme un axe de « poids » ; c'est-à-dire que la composante 1 résume une tendance quantitative dans les données. Comme présenté sur la figure 6.22, les pics des échantillons situés à l'extrémité positive de l'axe 1 sont plus intenses que ceux des échantillons situés à l'opposé. Cependant, les intensités relatives des pics sont conservées.

Pour la seconde composante (l'axe R2X[2]), les échantillons DE de Boko village 1 prim (D₁₂) et DE Okouma 14 (D₁₁) sont opposés. Le graphe covariante/corrélation (X, t) pour la composante 2 (non représenté) montre des corrélations moins importantes (0,7 au maximum).

Cependant, il existe une opposition entre les variables issues du pic à 24,3 min (composé **1**) et celles issues de celui à 26,2 min (composé **19**).



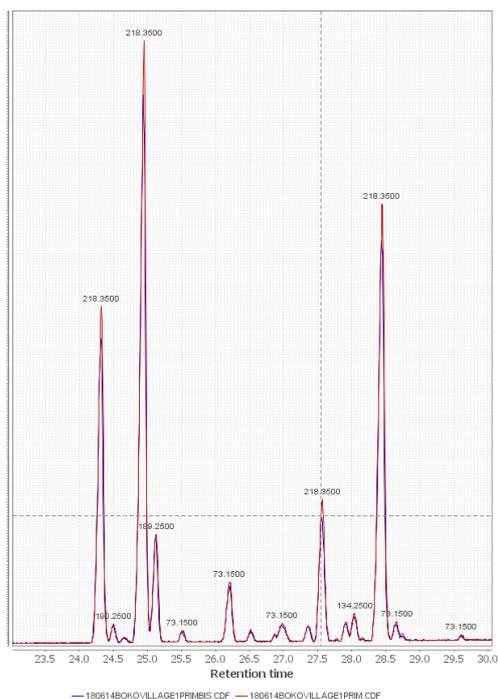
a) extrémité positive



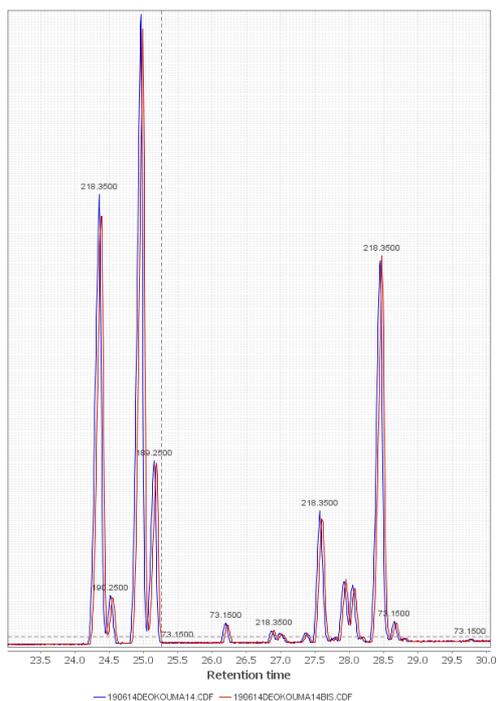
b) extrémité négative

Figure 6. 22. Profil chromatographique des exsudats de *D. edulis* (G. Don) Lam des deux extrémités de l'axe R2X[1]

La figure 6.23 montre l'allure des chromatogrammes des deux échantillons opposés sur l'axe R2X[2], nous ne remarquons pas de différences très significatives.



a) extrémité positive



b) extrémité positive

Figure 6. 23. Profil chromatographique des exsudats de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam des deux extrémités de l'axe R2X[2]

De façon à matérialiser les distances entre les profils CPG-SM des différents échantillons, une classification hiérarchique ascendante a été calculée sur la base du tracé des scores présenté en figure 6.20.

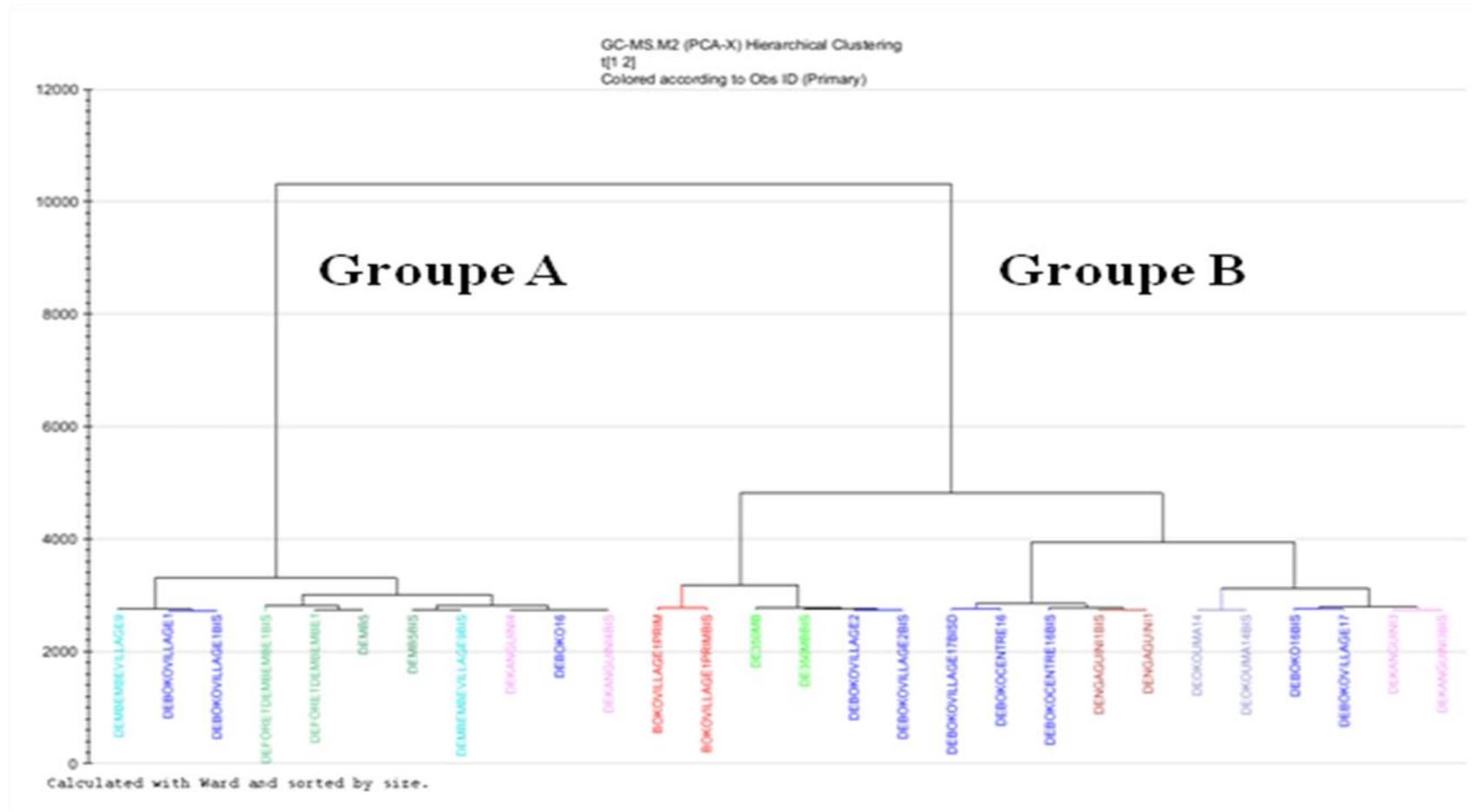


Figure 6. 24. Classification hiérarchique ascendante des exsudats de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam

Cette classification hiérarchique ascendante ne permet pas de mieux discriminer les exsudats de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam selon leur origine géographique.

En effet, en ignorant les répliquas et le troisième niveau de subdivision qui montrent une grande variabilité, on distingue deux grands groupes (A et B) qui se subdivisent en deux sous groupes (I et II). Le groupe A-I comprend, alors, les exsudats DE Kanguini 4 et DE Boko village 16 alors que le groupe A-II comprend DE Mbémbé village 9, DE Boko village 1 et DE MB5. Le groupe B-I comprend DE Boko village 1prim, DE forêt de Mbémbé 1, DE 350 MB et DE Boko village 17 alors que le groupe B-II comprend : DE Kanguini 3, DE Okouma 14, DE Boko village 2, et DE Boko centre 16.

II.1.2. Composition chimique de l'exsudat de *G. demeusei* (Harms) J. Léonard

Le chromatogramme de l'extrait à l'éther de pétrole de poudre de copal Mbaka, provenant de *G. demeusei* (Harms) J. Léonard obtenu après méthylation au TMS diazométhane, avec la méthode « hautes températures », est présenté dans la figure 6.25. Contrairement à ceux suggérés par des études précédentes sur des exsudats de type copal, il apparaît qu'aucun composé n'est élué au-delà de 7 min (dans la gamme des hautes températures du four chromatographique). Les composés correspondants aux pics numérotés sur la figure 6.25 sont indiqués dans le tableau VI.5.

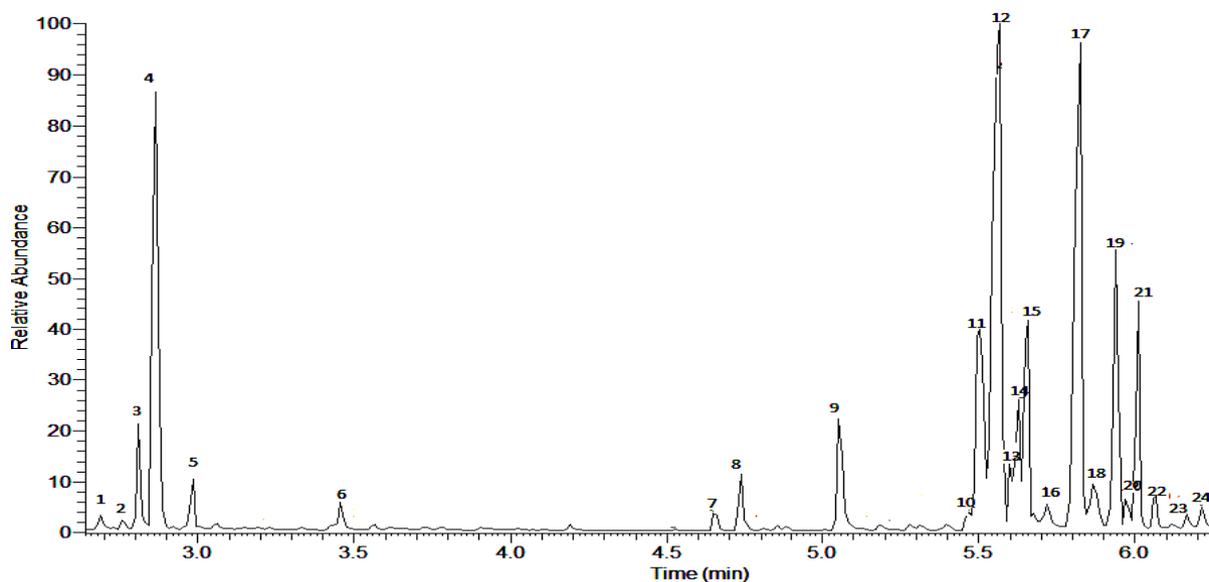


Figure 6. 25. Chromatogramme de l'extrait à l'éther de pétrole du copal Mbaka après dérivation au TMS-diazométhane.

Cette analyse a révélé la présence de vingt-quatre composés répartis en trois groupes : les sesquiterpènes (élués entre 2 et 3 min), les diterpènes (élués entre 4,6 et 5,1 min) et les acides diterpéniques (élués entre 5,5 et 6,5 min). Ce type d'exsudat présente un profil spécifique

dominé par la présence d'acides diterpéniques de types labdanes, obtenus sous forme d'esters méthyliques. Les composés majeurs sont les esters méthyliques des acides éperuique, copalique, cativique, ozique, et kolavénique (tableau VI.5).

La composition chimique de ce copal se rapproche de celle d'autres copals appartenant à la famille de Fabaceae-Caesalpinioideae, décrits dans la littérature [Steigenberger, 2013; Doménech-Carbo et al., 2009]. Les acides diterpéniques (éperuique, copalique, cativique, ozique, et kolavénique) présents, semblent être des marqueurs de ces copals. Ils ont été retrouvés dans presque tous les copals produits en Afrique tropicale (provenant de : *Copaifera*, *Daniellia*, *Gossweilerodendron*, *Guibourtia*, *Oxystigma* et *Tessmannia*), et en Amérique du sud (provenant du genre *Copaifera* et *Hymenaea*) [Langenheim, 2003]. Plusieurs acides labdaniques libres tels que les acides éperuique, labda-8-en-15-oïque, cativique, copalique et kovalénique ont été identifiés dans le copal Congo provenant du genre *Daniellia* [van den Berg et al., 1999; 2002]. Une autre étude rapporte la présence de l'épimanol, l'acide iso-ozique, cativique, copalique et diméthyl-ent-pinifolique comme constituants mineurs [Steigenberger, 2013].

Les différences principales observées dans le copal Mbaka par rapport aux copals dit Congo sont la grande part d'acides copalique et cativique et l'absence de l'acide diméthyl-ent-pinifolique. La composition chimique de copal Mbaka est également très différente de celle des copals Sierra Leone provenant de *Guibourtia copalifera* Benn ou *Daniellia thurifera* Benn, déclarés par Steigenberger (2013). Cette différence est due à la prévalence d'acides ent-labdane-hydroxylés et méthoxylés et à la faible quantité d'acide éperuique copalique dans ces copals. Par ailleurs, l'identification de l'acide ozique dans le copal Mbaka suggère un rapprochement avec le copal Zanzibar, provenant de *Hymenaea verrucosa* (Gaertn.) Oliv (syn. *Trachylobium verrucosum* Hayne), trouvé à Madagascar et plus généralement sur la côte-est de l'Afrique [Langenheim, 2003].

Tableau VI. 5. Composés identifiés dans la fraction peu volatile de copal Mbaka et leurs ions caractéristiques en impact électronique

N°	tr(min)	Composés identifiés	m/z
1	2,69	α -copaène	55, 69, 81, 91, 105, 119, 133, 147, 161 , 189, 204
2	2,76	α -cedrène	55,69,77,93,105, 119 ,136,147,161,175,189, 204
3	2,81	α -bergamotène	79, 91, 93, 107, 119 , 120, 133,147, 161, 189, 204
4	2,87	β -caryophyllène	79,91 93, 105, 119, 133 , 147, 161, 175, 189, 204
5	2,99	α -humulène	79, 80, 91, 93 , 107, 121, 147, 148, 189, 204
6	3,46	oxyde de caryophyllène	79 , 91, 93, 109, 121, 123, 135, 149, 161, 177, 187, 205, (220)
7	4,65	labda-8(20), 12,14-triène (énantio-biformène)	81, 90, 109, 123,137, 149, 161, 175, 187, 203, 216, 229, 243, 257 , 272
8	4,74	non identifié	79,81,91,93,95,107,123, 137 ,147,159,173,177,189,1 91,204, 229, 244, 272, (290)
9	5,05	manool	81, 95, 123, 137 , 257, 272, (290)
10	5,47	labd-8-èn-15-oate (iso-éperuate) de méthyle	93, 95, 109,121, 136, 191 , 238, 277, 305, 320
11	5,50	ozate de méthyle	79, 93, 107, 121 , 163,187, 241, 257, 269, 301, 316
12	5,57	labd-8(20)-èn-15-oate (epéruate) de méthyle	55, 69, 81, 95, 123, 137 , 177, 191, 223, 277, 289, 305, 320
13	5,60	Ozol	81, 93, 107, 121, 147, 161, 191, 257 , 273 (288)
14	5,63	isomère du composé 10	95, 109, 121, 136, 163, 191 , 223, 238, 251, 277, 305, 320
15	5,66	labd-7-èn-15-oate (cative) de méthyle	95, 107, 109, 122, 191 , 196, 277, 289, 305, 320
16	5,72	non identifié	73, 137, 156, 187,229, 244, 257 , 272, 277,347
17	5,82	labd-8(20),13-dièn-15-oate (copalate) de méthyle	55, 79, 81, 95, 114 , 123, 137, 205, 244, 271, 287, 303, 318
18	5,87	labd-7,13-dièn-15-oate de méthyle	95,107,121,135, 189 ,191,286,303, 318
19	5,94	isomère du composé 21	81, 109, 135, 161, 175, 189, 204 , 243, 253, 271, 287, 318
20	5,97	labdanolate de méthyle	71, 101, 125, 144 , 177, 185, 235,267, 291,305, 320, 338
21	6,01	cléroda-3,13-dièn-15-oate (kolavénate) de méthyle	93, 95, 107, 109, 121, 123, 149, 175, 189 ,190, 191, 243, 271, 303, 318
22	6,07	non identifié	82, 137, 156, 172, 197, 229, 244 , 258, 286, 361, 376
23	6,21	non identifié	71, 95, 109, 121, 135, 149, 163, 191 , 204, 220, 257, 272, 361
24	6,29	non identifié	82, 95, 109, 114, 123, 138, 163, 177, 191, 205, 243, 266 , 276, 289, 304, 377, 393

en gras : pic de base ; en gras et souligné : pic moléculaire ; en gras, souligné et entre parenthèse : pic moléculaire absent du spectre de masse

D'après plusieurs travaux, les copals Congo polymérisent [Mills & White, 1994 ; Bevan et al., 1968]. Cette polymérisation est souvent attribuée à la présence d'acide ozique (énantiomère de l'acide communiqué). Par conséquent, sa présence dans l'échantillon de copal Mbaka et son aspect physique nous ont mené à nous pencher sur ce sujet. Dans le but de caractériser ce solide, l'utilisation de la pyrolyse, qui est une méthode fréquemment employée dans l'étude des polymères synthétiques et utilisée avec succès dans l'étude des laques asiatiques au sein de notre laboratoire [Vo Duy, 2007] semblait être une stratégie adaptée.

Nous avons donc analysé l'échantillon de copal Mbaka par pyrolyse en présence de TMAH. Le chromatogramme obtenu est présenté sur la figure 6.26.

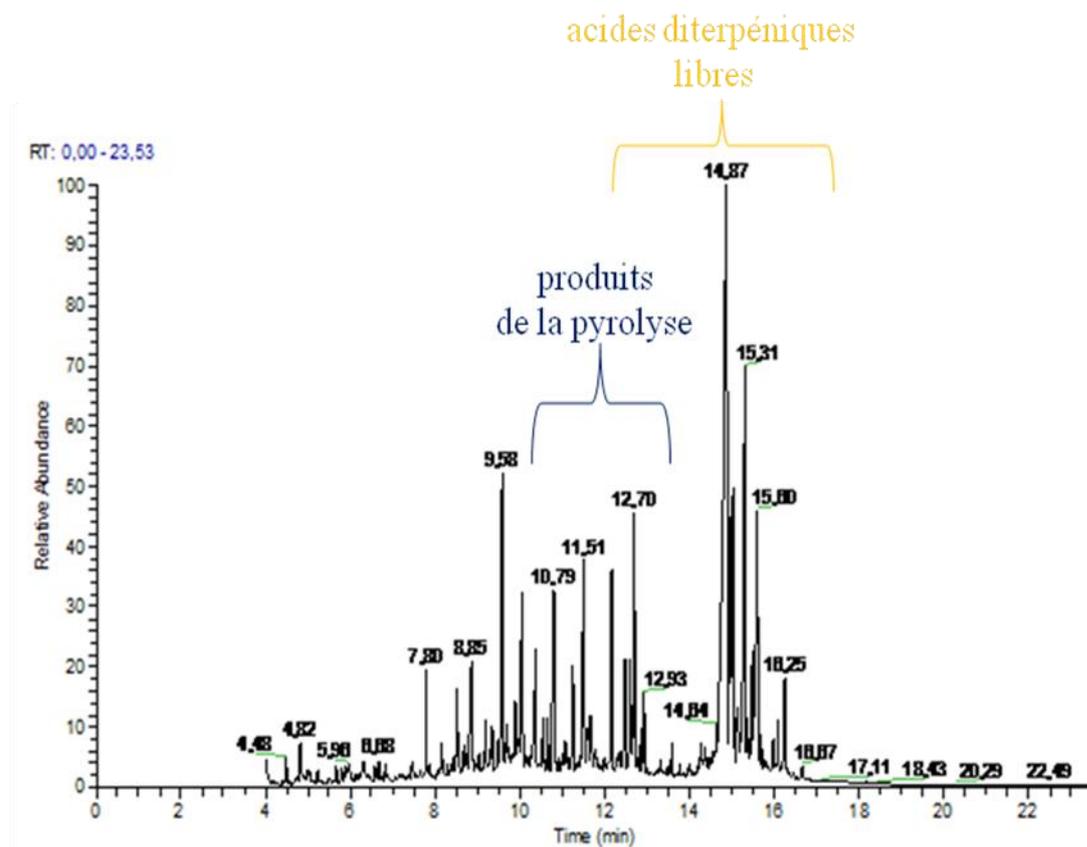


Figure 6. 26. Chromatogramme obtenu après pyrolyse de l'échantillon de copal Mbaka

L'analyse par Py-CPG-SM de l'échantillon de copal Mbaka a montré que ce dernier n'est pas polymérisé. Les produits de la pyrolyse obtenus entre 10 et 13 min sont issus de la dégradation des sesquiterpènes et de quelques acides diterpéniques libres. Les acides diterpéniques élués entre 14 et 18 min sont les mêmes que ceux identifiés dans le tableau VI.5. Ces résultats s'expliquent par le fait que les échantillons ont été directement collectés sur l'arbre après une brève exposition au soleil et à l'air. La polymérisation ne dépend pas seulement de la nature de l'échantillon mais aussi de la durée de conservation ou d'exposition éventuelle au soleil et/ou à l'air, il est alors possible que la réaction de polymérisation n'ait pas eu le temps de se produire.

Il s'agit donc d'un copal frais dont le profil chromatographique ne correspond pas tout à fait à ceux des copals étudiés dans le cadre des objets du patrimoine historique.

VI.2.2. Composition chimique de la fraction volatile des exsudats étudiés

VI.2.2.1. Exsudats de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam

La fraction volatile des exsudats de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam a été extraite soit par microextraction sur phase solide en espace de tête (Hs-SPME), soit par hydrodistillation.

Les rendements d'extraction en huiles essentielles de chaque exsudat (m/m) ainsi que les caractéristiques physiques de ces huiles (aspect, couleur, odeur et indice de réfraction Ind R) figurent dans le tableau VI.6.

Tableau VI. 6. Rendements et caractéristiques physiques des huiles essentielles extraites des exsudats de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam

Code	provenance d'exsudat	Rdt (%)	Aspect	Couleur	Odeur	Ind R/ 20°C
B ₃ [*]	Kintélé	4,66	claire limpide	incolore	forte, agréable (térébenthine)	1,473
B ₂ [*]	Owando (Mbémbé)	5,88	claire limpide			1,472
B ₁ [*]	Owando (Yengo)	6,28	claire limpide			1,468
D ₄	Boko (Boko village 17)	1,74	claire limpide			1,483
D ₆	Owando (Kanguini 4)	7,84	claire limpide			1,486
D ₇	(Okouma 14)	6,50	claire limpide			1,489

*B₁ ; B₂ ; B₃ : échantillons analysés en 2010 [Elouma, 2010]

Les faibles valeurs d'indices de réfraction des huiles essentielles (1,468 à 1,489) indiquent leur faible réfraction de la lumière. Les rendements d'extraction des échantillons d'huiles essentielles de *D. edulis* (G. Don) K. J. Lam varient de 4,66 % à 7,84 %. Ces taux varient en fonction de la zone de récolte. Un rendement du même ordre (6,68 %) a été obtenu à partir des échantillons de Gabon [Obame et al., 2007]. Cependant, le faible rendement d'extraction de l'échantillon de Boko village 17 (1,74 %) s'explique par le vieillissement de l'exsudat, suite à son exposition à l'air et au soleil. Bien que cela soit vrai, la fraction la plus importante dans ces exsudats est donc la fraction résineuse.

Le tableau VI.7 décrit les composants identifiés et leurs pourcentages d'aire relatifs dans les huiles essentielles des exsudats de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam. L'analyse des huiles essentielles a permis d'identifier 27 constituants représentant plus de 99% du total des composés. Ces huiles contiennent essentiellement des monoterpènes hydrocarbonés (69,9-99,2%) et des monoterpènes oxygénés (0,5-29,7%). Cette richesse en monoterpènes des huiles essentielles des exsudats de Burseraceae a été rapportée par plusieurs auteurs [Freiman et al., 2000 ; Obame et al., 2008 ; Koudou et al., 2009]. Dans l'huile essentielle extraite des

exsudats résineux de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam collectés à Boko (D₄), nous avons pu identifier 15 composés dont les majeurs sont : α -phéllandrène (27,4%), limonène (24,4%), p-cymène (12,0%), γ -terpinène (11,4%), α -terpinène (8,4%) et terpinèn-4-ol (6,1%). Dans l'huile essentielle extraite des exsudats résineux de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam collectés à Owando (Kanguini 4) (D₆), 21 composés ont été identifiés dont les majoritaires sont : terpinèn-4-ol (19,9%), α -phéllandrène (15,6%), limonène (13,2%), p-cymène (8,4%), α -terpinéol (8,3%) et le α -pinène (7,4%). Dans celle extraite des exsudats de *D. edulis* (G. Don) K. J. Lam collectés à Okouma (D₇) 17 composés ont été identifiés, les constituants majeurs sont : sabinène (32,4%), α -phéllandrène (26,3%), α -pinène (12,2 %), limonène (10,7%), et le p-cymène (8,1%). Par ailleurs, on note une variation importante des pourcentages de certains composés par rapport aux huiles essentielles des exsudats analysés en 2010 (B₁, B₂, B₃) et provenant d'autres sites [Elouma, 2010].

Tableau VI. 7. Composition chimique des huiles essentielles extraites des exsudats de *D. edulis* (G. Don) K. J. Lam..

N°	IK	Composés identifiés	B1	B2	B3	D ₄	D ₆	D ₇
1	930	α -thujène	0,1	0,4	t	0,5	3,9	1,1
2	931	α -pinène	53,5	5,3	22,3	3,0	7,4	12,2
3	947	camphène	0,6	0,2	t	-	0,4	0,1
4	976	sabinène	9,9	1,5	5,3	t	6,7	32,4
5	979	β -pinène	11,4	0,6	12,1	0,5	2,1	2,5
6	996	3-p-menthène	-	6,1	-	0,1	0,1	t
7	991	myrcène	-	-	-	-	0,3	-
8	1004	p-mentha-1(7), 8-diène	-	-	0,4	-	-	-
9	1005	α -phéllandrène	4,9	8,8	2,0	27,4	15,6	26,3
10	1018	α -terpinène	0,3	2,8	t	8,4	2,7	0,9
11	1023	1-p-menthène	-	T	2,3	-	-	t
12	1026	p-cymène	1,8	42,6	41,6	12,9	8,4	8,1
13	1029	limonène	7,8	8,5	10,1	24,4	13,2	10,7
14	1031	β -phéllandrène	1,1	2,2	2,5	-	T	-
15	1030	1,8-cinéol	0,8	-	-	2,4	0,9	1,5
16	1057	γ -terpinène	0,7	7,7	0,4	11,4	6,7	1,4
17	1070	cis-hydrate de sabinène	-	-	-	-	0,1	0,3
18	1088	terpinolène	0,3	1,6	0,2	2,1	2,4	0,3
19	1090	p-cymenène	0,5	0,2	-	t	-	-
20	1125	cis-p-menth-2-èn-1-ol	-	-	-	-	0,2	-
21	1142	trans-p-menth-2-èn-1-ol	-	-	-	-	0,1	-
22	1144	camphor	0,6	T	-	-	-	-
23	1147	trans-hydro- α -terpinéol	-	1,3	-	-	0,2	-
24	1162	pinocarvone	0,5	-	-	-	-	-
25	1187	terpinèn-4 ol	4,5	5,4	0,1	6,1	19,9	1,7
26	1196	α -terpinéol	0,3	4,4	0,4	0,2	8,3	0,1
27	1252	pipéritone	-	0,1	-	-	-	-
Total des composés identifiés			99,6	99,7	99,8	99,4	99,6	99,9
Monoterpènes hydrocarbonés			92,9	88,5	99,2	90,7	69,9	96,2
Monoterpènes oxygénés			6,7	11,2	0,5	8,7	29,7	3,7

Le tableau VI.8 présente les principaux constituants des huiles essentielles des différentes parties de *D. edulis* (G. Don) K. J. Lam et d'exsudat de *D. buettneri* H.J. Lam selon leurs origines. Il apparaît que, les échantillons analysés et ceux rapportés dans la littérature [Onocha et al., 1999 ; Obame et al., 2007 ; 2008 ; Elouma, 2010] contiennent presque les mêmes composés. On constate que le taux de limonène est élevé dans nos échantillons (D₄, D₆ et D₇) par rapport à ceux des huiles essentielles des exsudats résineux du Gabon collectés sur *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam et sur *D. buettneri* H.J. Lam. De plus, on remarque que le taux de l' α -phéllandène est également élevé nos échantillons (D₄, D₆, D₇). Par contre, on constate que le taux de p-cymène est plus élevé dans les échantillons (B₂, B₃ et G) par rapport à nos échantillons. Par ailleurs, le β -caryophyllène et le myrcène ne sont presque pas présents dans les exsudats résineux de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam, mais existent en grande quantité respectivement dans l'huile essentielle des feuilles et des fruits [Onocha et al., 1999].

Cette variabilité de la composition chimique de ces exsudats peut s'expliquer par leurs origines géographiques différentes mais aussi par la fraîcheur de l'exsudat. Un exsudat fraîchement recueilli n'aura pas la même composition en composé volatil qu'un exsudat recueilli après exposition au soleil, c'est-à-dire, après une exsudation non provoquée par l'homme.

Tableau VI. 8. Comparaison des principaux constituants de l'huile essentielle des exsudats résineux et de différentes parties de *Dacryodes* selon leurs origines.

Espèces	<i>D. edulis</i> (G. Don) K. J. Lam											<i>D. buettneri</i> H.J. Lam
	B ₁	B ₂	B ₃	D ₄	D ₆	D ₇	E	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	G
α -thujène α -pinène	53,6	5,7	22,3	3,5	11,3	13,3	19,1	8,8	0,1	25,2	7,3	13,8
sabinène	9,9	1,5	5,3	t	6,7	32,4	21,7	-	-	4,5	4,2	4,4
myrcène	-	-	-	-	0,3	-	-	45,3	-	0,3	-	-
β -pinène	11,4	0,6	12,1	0,5	2,1	2,5	4,3	1,2	-	2,2	4,2	42,0
α -phéllandène	4,9	8,8	2,0	27,4	15,6	26,3	0,2	-	-	4,2	2,1	1,6
p-cymène	1,8	42,6	41,6	12,9	8,4	8,1	11,3	0,2	0,1	2,4	2,6	19,0
limonène	7,8	8,5	10,1	24,4	13,2	10,7	5,7	0,5	-	12,5	10,2	1,8
β -phéllandène	1,1	2,2	2,5	-	t	-	0,9	0,4	-	1,3	6,6	3,0
γ -terpinène	0,7	7,7	0,4	11,4	6,7	1,4	5,8	0,2	-	8,6	4,3	1,15
α -terpinéol	0,3	4,4	0,4	0,2	8,3	0,1	3,0	-	-	-	-	2,1
terpinèn-4 ol	4,5	5,4	0,1	6,1	19,9	1,7	19,8	-	-	-	-	27,3
β -caryophyllène	-	-	-	-	-	-	-	2,2	26,4	0,5	-	-

B₁ ; B₂ ; B₃ : exsudat résineux, Congo travaux de DEA [Elouma, 2010] ; D₄ ; D₆ ; D₇ : exsudat résineux, Congo ; travaux actuels ; E : exsudat résineux, Gabon [Obame et al., 2008] ; F₁ (fruits) ; F₂ (feuilles) ; F₃ (écorce de tronc) ; F₄ (écorce de racine), Nigéria [Onocha et al., 1999] ; G : exsudat résineux, Gabon [Obame et al., 2007]

L'utilisation d'exsudat résineux de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam sur les plaies, sous forme de pommade (en mélange avec de l'huile de palme), par certains tradipraticiens de la ville

Owando, pourrait se justifier par l'activité antimicrobienne des molécules présentes dans sa fraction volatile. En effet, certains constituants majeurs dans les huiles essentielles de ces exsudats ont des propriétés antimicrobiennes bien connues. Par exemple, le terpinèn-4-ol et le γ -terpinène présentent une activité antifongique et antibactérienne contre Gram-(+) [Kunicka-Styczniska & kalemdz, 2009]. De plus, l' α -pinène et le limonène ont aussi montré une activité antimicrobienne [Romeo et al., 2008]. Les travaux rapportés par Obame et al. (2008) ont montré que l'huile essentielle issue de l'échantillon de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam du Gabon a une meilleure activité contre les espèces bactériennes que contre les levures.

Etude statistique des échantillons d'exsudats de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam

Analyse en Hs-SPME

Une fois que la composition chimique de la fraction volatile des exsudats de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam a été connue, nous avons utilisé la Hs-SPME pour comparer les profils chromatographiques de 15 exsudats de différentes zones. Le tracé des scores (figure 6.27) donne, la projection des 48 individus sur le premier plan factoriel formé par les deux premiers axes R2X[1] et R2X[2], qui représentent respectivement 65,3 et 13,6 % de la variance totale.

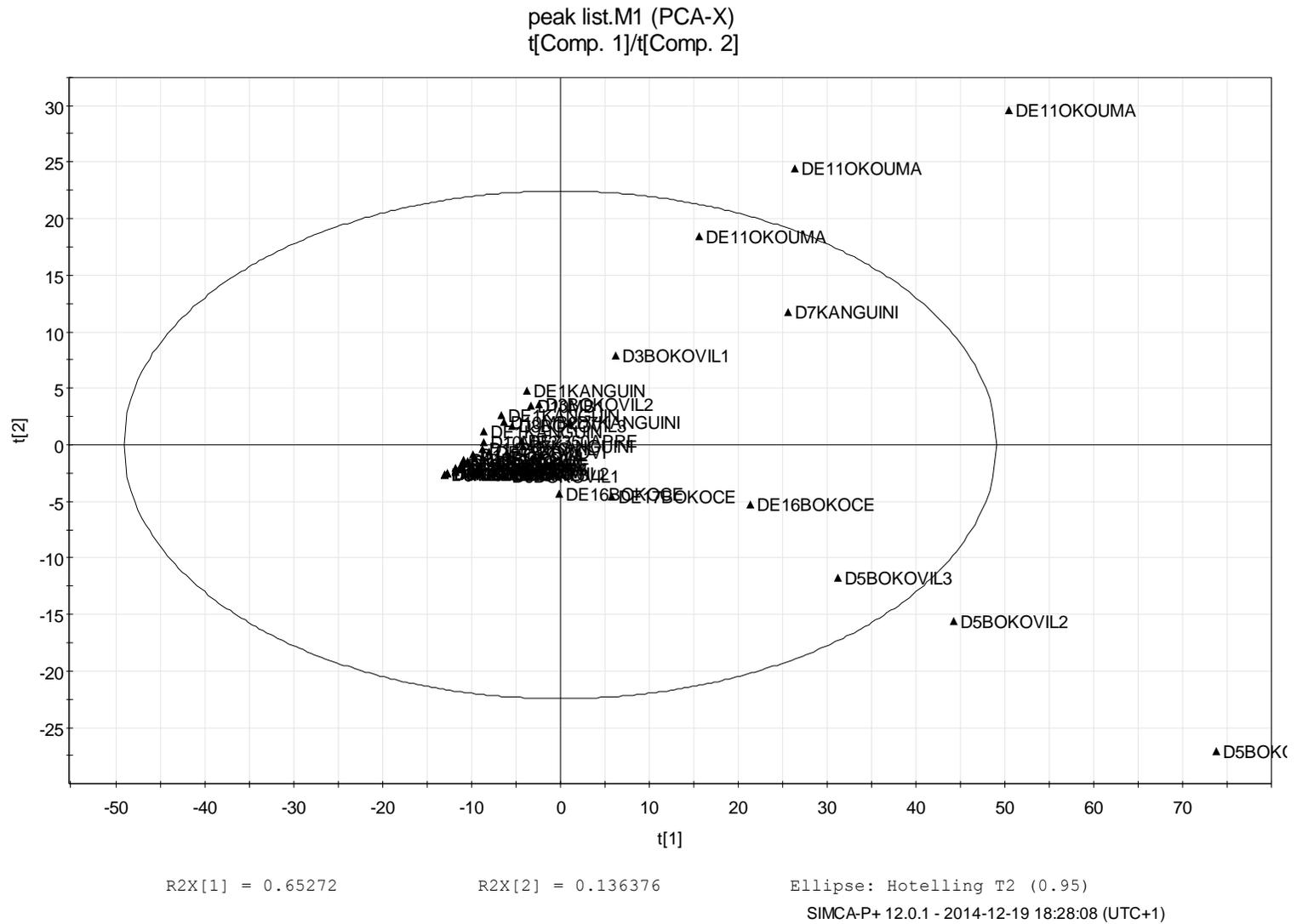
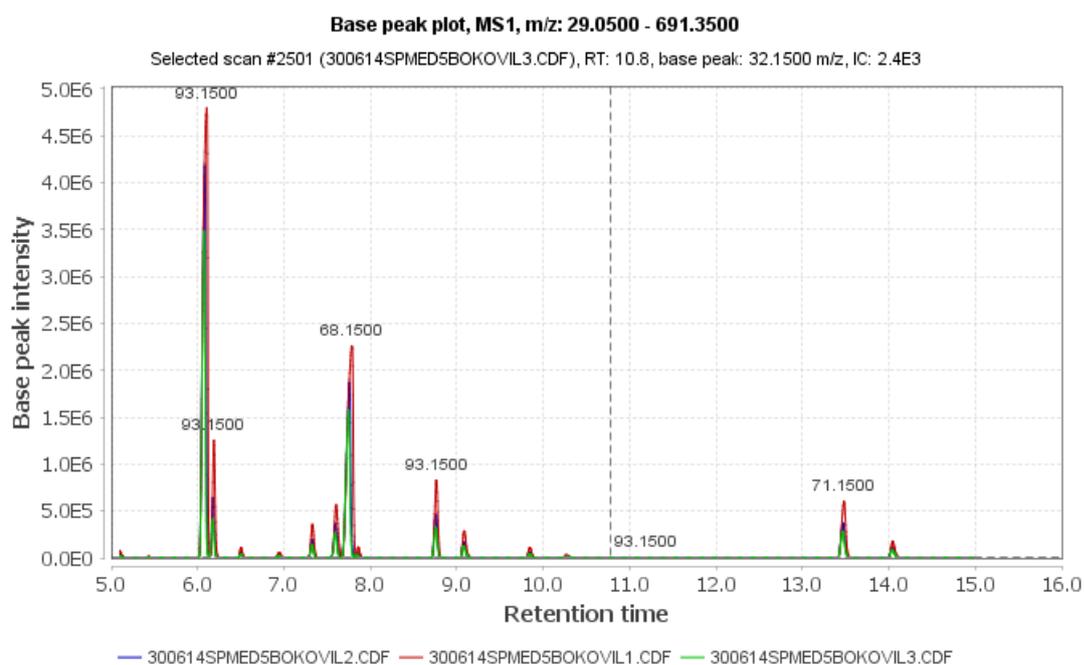
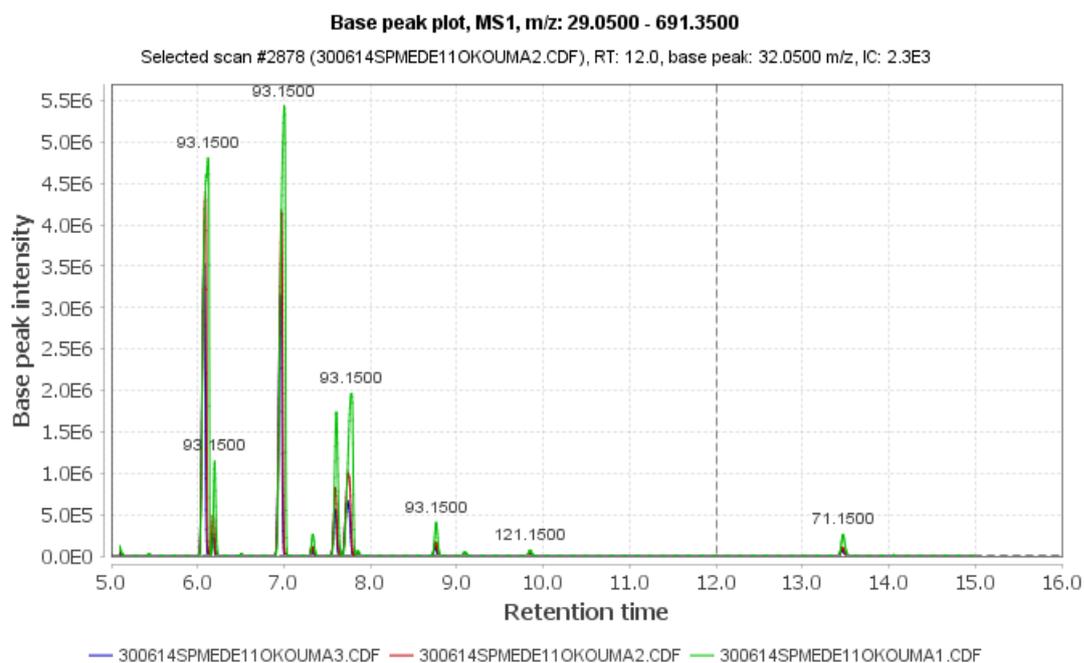


Figure 6. 27. Projection des 48 individus sur le premier plan factoriel (ACP) avec une limite de confiance de 78,9 %.

Comme nous pouvons le voir sur cette figure 6.27, les échantillons d'exsudats de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam D₅ (Boko village) et D₁₁ (Okouma) sont significativement différents des autres (car en dehors de l'intervalle T²). Toutefois, on remarque aussi une différence significative entre ces deux échantillons (situés de part et d'autre de l'axe R2X[1]). Cette différence est illustrée dans la figure 6.28.



a) Chromatogrammes de de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam D₅ (DE Boko village)



b) Chromatogrammes de de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam D₁₁ (DE Okouma 14)

Figure 6. 28. Chromatogrammes des échantillons D₅ et D₁₁ de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam

Par contre, les autres échantillons d'exsudat de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam D₂ (Boko centre) ; D₃, D₆, D₁₂, D₁₃, D₁₄ (Boko village) ; D₇, D₉, D₁₆ (Kanguini) ; D₁₅ (forêt de Mbémbé) ; D₈ (Mbémbé village) D₄, D₁₀ (Mombo beach) ; D₀, D₆, D₁₃, D₁₄ (Boko village) sont très proches comme le montre la figure. 6.29.

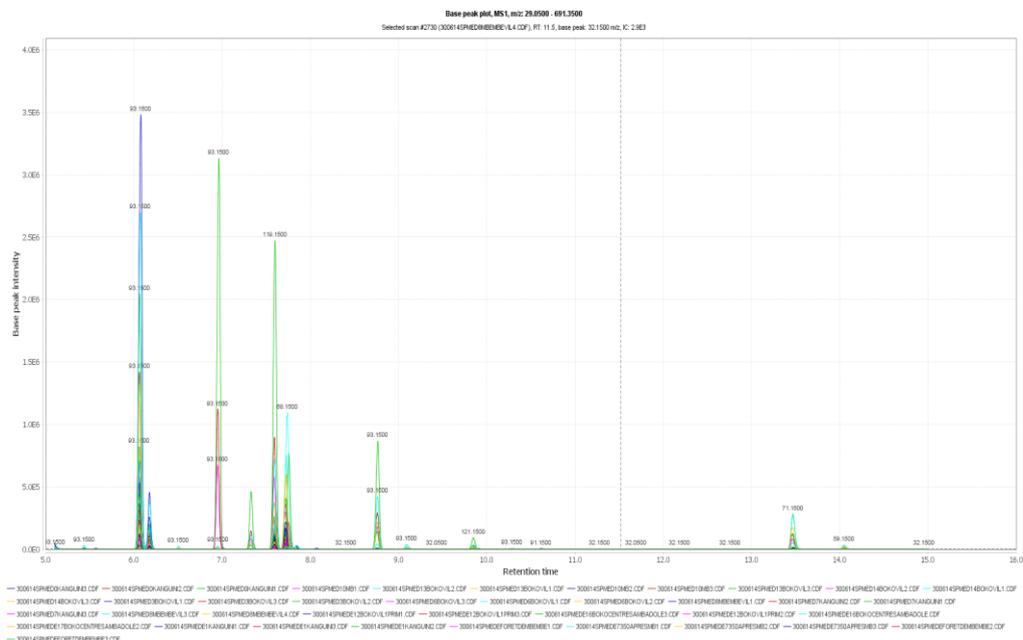


Figure 6. 29. Chromatogrammes des autres échantillons d'exsudats de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam

La figure 6.30 montre que les variables discriminantes selon l'axe R2X[1] correspondent aux pics à 6,07 min, 7,7 min, 9,85 min et 13,45 min. Ces pics correspondent respectivement aux composés suivants : sabinène, limonène, terpinolène et terpinèn-4-ol. Ces variables expliquent les différences de coordonnées des D₅ et D₁₁ le long de cet axe. Par contre, l'axe R2X[2] montre des variables en lien avec le pic à 9,10 min et 14,0 min (α -terpinéol) pour D₅ alors que, pour le D₁₁ c'est le pic à 6,95 min.

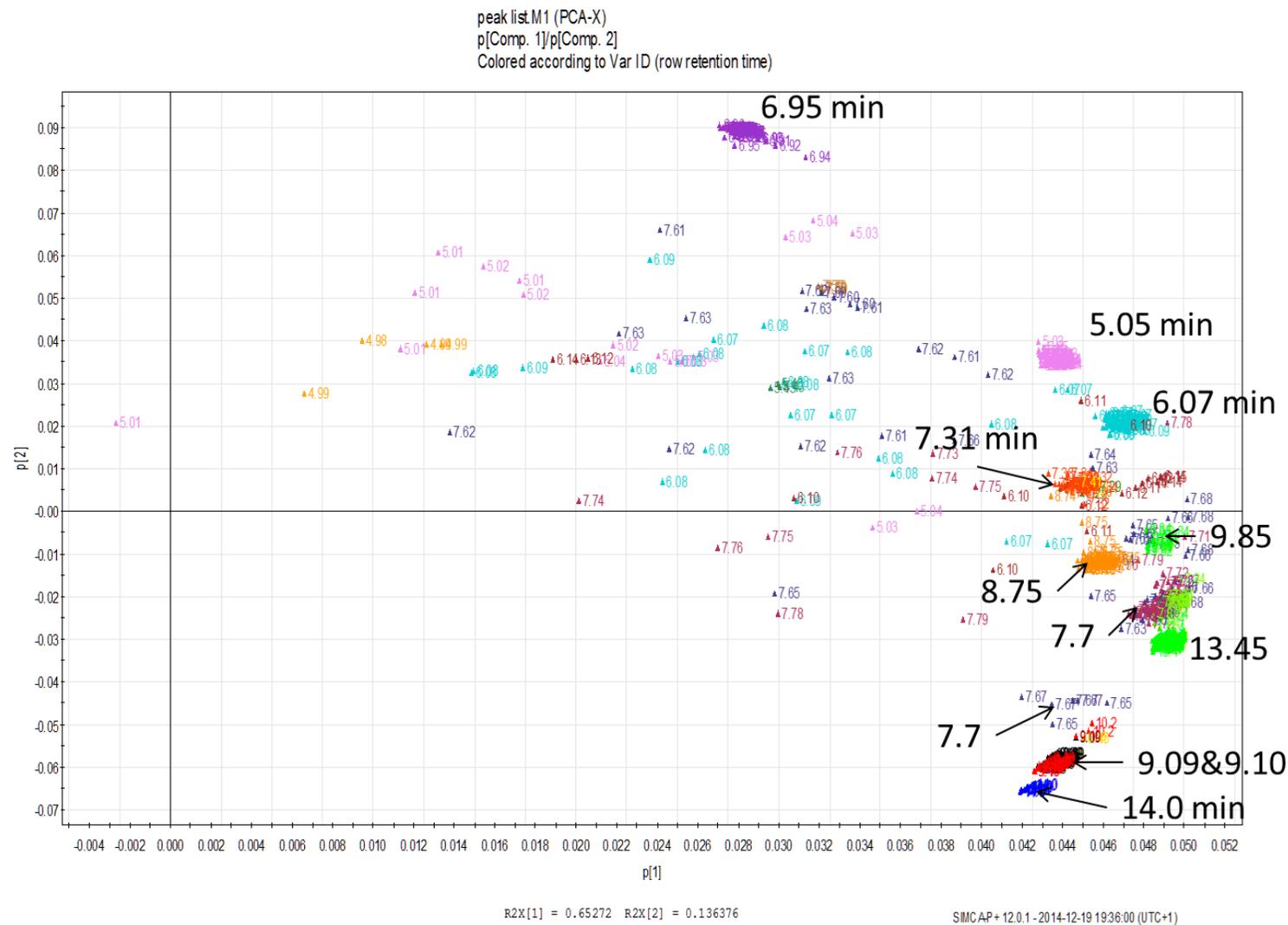


Figure 6. 30. Contribution des variables des échantillons d'exsudats de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam aux deux premières composantes

Pour montrer la similitude entre les extraits volatils des différents exsudats de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam, nous avons soumis l'ensemble des résultats à un traitement statistique des données par la méthode de la classification hiérarchique ascendante. Le dendrogramme de la figure 6.31 fait apparaître deux principaux groupes d'extraits volatils de ces exsudats. Le premier groupe est constitué d'extrait volatil d'exsudat de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam D₅ (Boko village) et D₁₁ (Okouma). Ces extraits volatils sont significativement différents des autres. De plus, ils sont également différents entre eux et donc appartiennent à deux sous-groupes différents (I-a et I-b). Cependant, nous ne tenons pas compte des répliquas des exsudats de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam D₂ (Boko centre) et D₇ (Kanguini), car cette variabilité n'a pas une origine géographique mais plutôt due à la technique d'extraction utilisée (Hs-SPME). Le second groupe (II) qui se subdivise en deux grands sous-groupes (II-a et II-b) montre une grande variabilité. Cette variabilité est probablement due à la technique d'extraction utilisée.

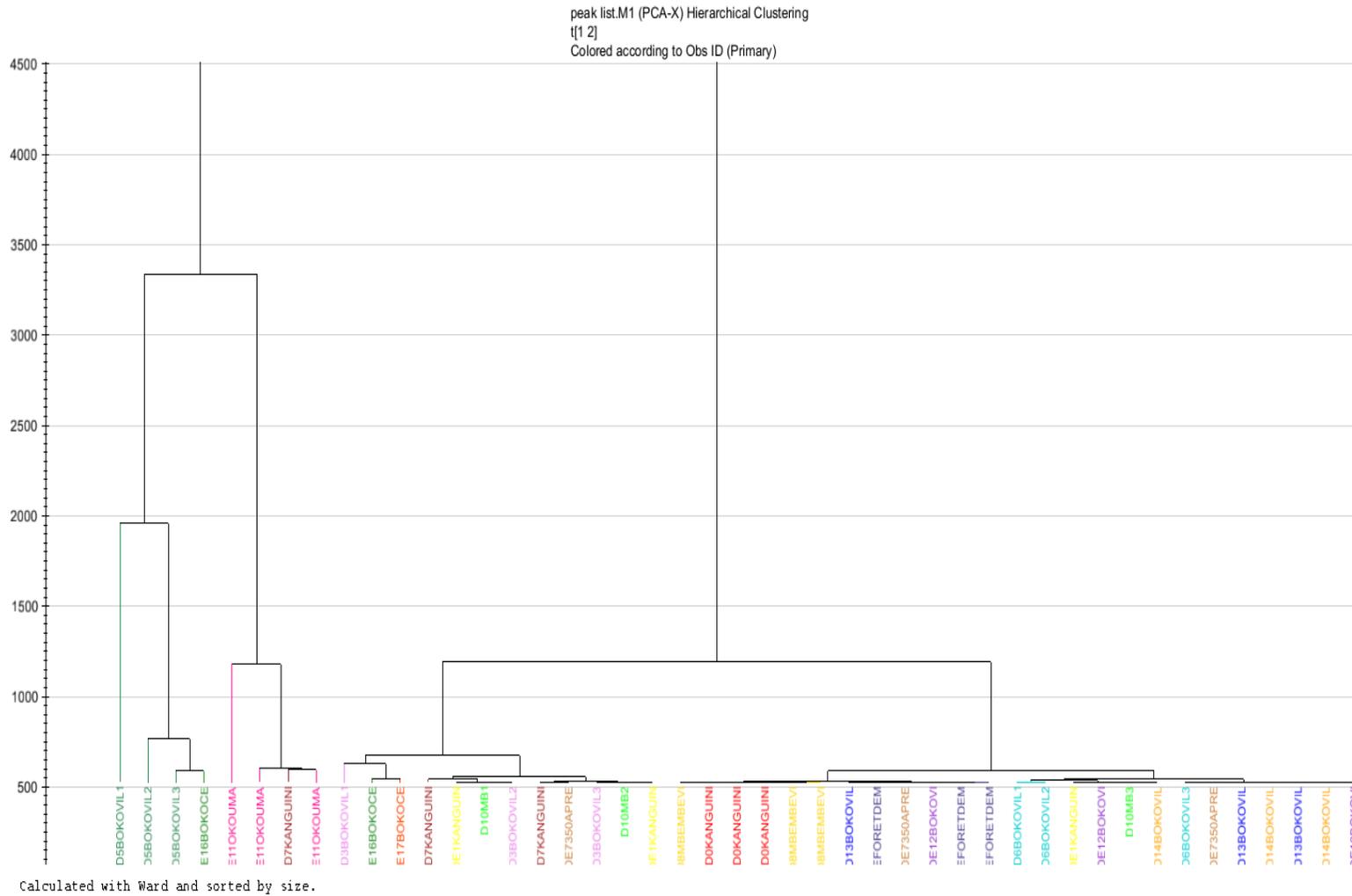


Figure 6. 31. Hiérarchisation des extraits volatils d'exsudat de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam de différentes zones

VI.2.2.2. Composition chimique de l'exsudat de *G. demeusei* (Harms) J. Léonard

La fraction volatile du copal Mbaka a été extraite par microextraction sur phase solide en espace de tête (Hs-SPME) et par hydrodistillation (HD). L'huile essentielle a été obtenue avec un rendement 0,02 % (m/m). Les deux extraits ont été analysés par la suite en GC-MS. Le chromatogramme de la fraction volatile extraite par Hs-SPME et l'huile essentielle de copal Mbaka sont qualitativement identiques. Cependant, il y a des différences quantitatives pour certains pics (figure 6.32). Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que l'hydrodistillation est une technique d'épuisement des composés volatiles de la plante alors que la Hs-SPME est une technique basée sur le partage des composés d'intérêts entre les deux phases (la matrice de l'échantillon et une phase polymérique spécifique supportée par une fibre de silice fondue). Ces différences ont été également rapportées par [Benyelles et al. \(2011\)](#) sur d'autres échantillons (extrait des racines de *Rhaponticum acaule* L.).

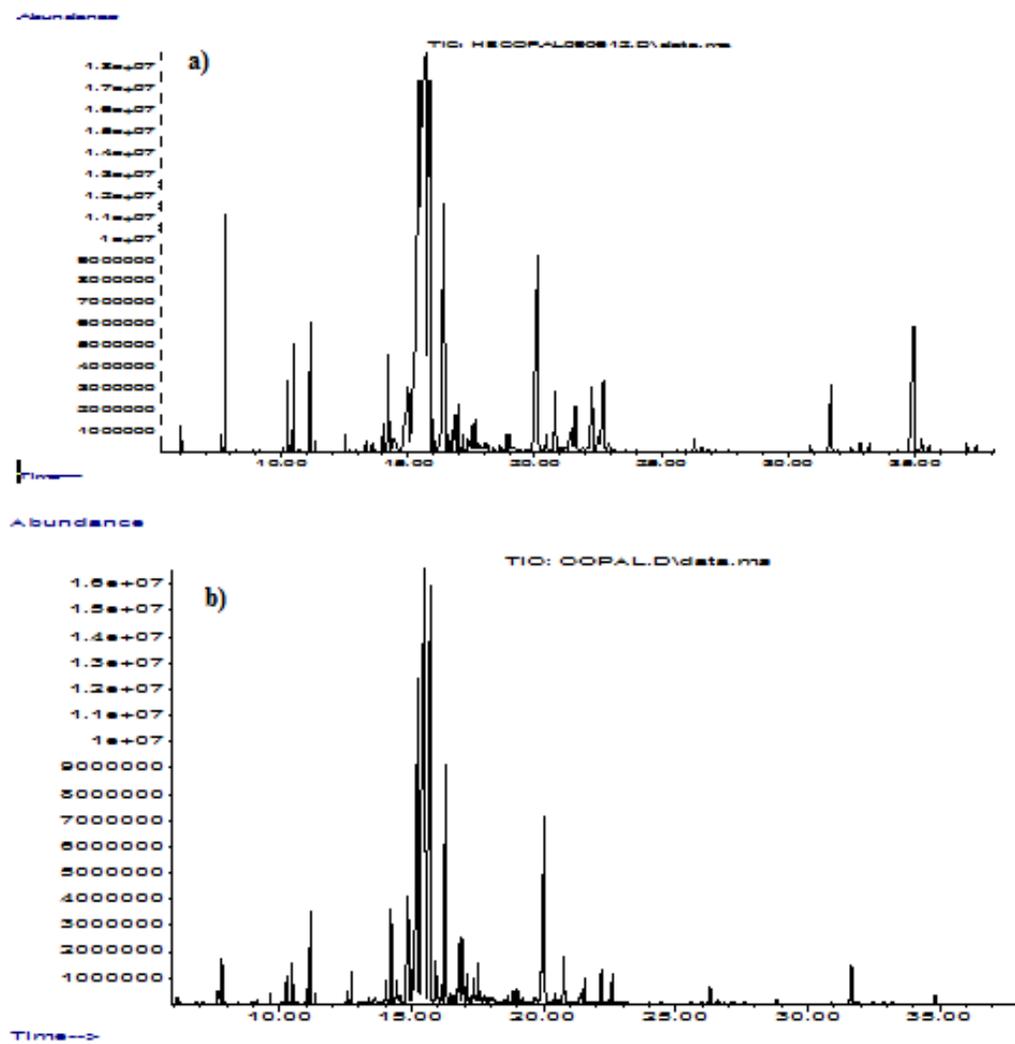


Figure 6. 32. Profils chromatographiques de la fraction volatile de copal Mbaka ; a) sous forme d'huile essentielle ; b) en extrait par Hs-SMPE

Tableau VI. 9. Composés identifiés dans la fraction volatile du copal Mbaka obtenue par hydrodistillation et par Hs-SPME

N°	Composés identifiés	ions caractéristiques du spectre de masse en (EI)	IK ^{Calc}	% aires HD	%airesSPME
1	α -thujène	41 ; 53 ; 65 ; 77 ; 93 ; 105 ; 136	927	0,02	0,10
2	α -pinène	53; 67; 77; 91; 93 ; 105; 121; 136	934	0,16	0,30
3	Sabinène	41; 53; 65; 69; 77; 79; 93 ; 121; 136	975	0,01	0,03
4	β -pinène	41; 53; 69; 79; 93 ; 107; 121; 136	980	0,03	0,10
5	α -méthylstyrène	51 ; 78 ; 91 ; 103 ; 115 ; 117 ; 118	985	0,02	0,03
6	Myrcène	41 ;53;55; 67; 69;93; 136	991	0,03	0,10
7	α -phéllandrène	39;65;77; 93 ;119; 136	1007	0,08	0,39
8	p-cymène	39 ; 51 ; 65 ; 77 ; 91 ; 103 ; 119 ; 134	1024	1,17	1,26
9	D-limonène	53; 68 ;79; 96; 107; 121; 136	1030	0,30	0,28
10	1,8-cinéol	43 ; 55 ; 71 ; 81 ; 93 ; 108 ; 125 ; 139 ; 154	1034	2,03	1,27
11	γ -terpinène	51 ; 65; 77 ; 93 ; 105 ; 121; 136	1061	0,03	0,04
12	terpinèn-4-ol	43 ; 55; 67; 71 ; 77; 86 ; 93; 111; 136; 154	1180	0,40	0,42
13	Naphtalène	51 ; 63 ; 74 ; 77 ; 102; 128	1187	0,02	0,03
14	p-cymèn-8-ol	43 ; 51 ; 65 ; 77 ; 91 ; 135 ; 150	1190	0,02	0,06
15	α -terpinéol	43; 55; 59 ; 77; 81; 93; 121 ; 136 ; (154)	1195	0,77	0,59
16	thymol, méthyl éther	65 ; 77 ; 91 ; 105 ; 119 ; 134 ; 149 ; 164	1230	0,78	0,50
17	carvacrol, méthyl éther	65 ; 77 ; 91 ; 105 ; 119 ; 134 ; 149 ; 164	1268	1,16	0,70
18	2-isopropyl-1-méthoxy-4-méthylbenzene	65 ; 77 ; 91 ; 105 ; 119 ; 134 ; 149 ; 164	1273	0,07	0,10
19	Isopropylbenzoate	43 ; 51 ; 59 ; 77 ; 105 ; 123; 149; 164	1309	0,11	0,13
20	sesquiterpène (a) non identifié	67 ;77 ;91 ;105 ; 119 ;131 ;145 ;159 ;174 ;187 ; 204	1345	0,02	0,06
21	Cyclosativène	41 ; 55 ; 79 ; 94 ; 105 ; 120 ; 133 ; 161 ; 189 ; 204	1365	0,29	0,32
22	α -copaène	41 ; 55 ; 69 ; 81 ; 93 ; 105 ; 119 ; 161 ; 189 ; 204	1376	1,10	1,00
23	β -elemène	41; 53 ; 67 ; 81 ; 93 ; 107; 121; 133; 147; 161; 189; 204	1396	0,26	0,31
24	Cyperène	91 ; 105 ; 119 ; 133 ; 147 ; 161 ; 175 ; 189 ; 204	1402	0,11	0,18
25	Italicène	41 ;55 ;69 ;79 ;93 ;105 ; 119 ;134 ;148 ;161 ; 189 ; 204	1409	1,99	1,49
26	α -cedrène	55 ; 69 ; 77 ; 93 ; 105 ; 119 ; 147 ; 161 ; 189 ; 204	1416	0,80	0,93
27	cis- α -bergamotène	69 ; 79 ; 93 ; 107 ; 119 ; 133 ; 147 ; 161 ; 189 ; 204	1419	10,39	11,11
28	β -caryophyllène	69 ; 79 ; 93 ; 105 ; 120 ; 133 ; 147 ; 161 ; 189 ; 204	1423	40,00	40,91
29	β -ylangène	55 ; 67 ; 79 ; 91 ; 105 ; 119 ; 147 ; 161 ; 189 ; 204	1433	0,18	0,10

Tableau VI.9. Composés identifiés dans la fraction volatile du copal Mbaka obtenue par hydrodistillation et par Hs-SPME (suite)
IK calc: indice de Kovats calculé pour une colonne non polaire (RTX-5 MS)

N°	Composés identifiés	ions caractéristiques du spectre de masse en (EI)	IK ^{Calc}	% aires HD	%aires SPME
30	α - trans-bergamotène	69 ; 79 ; 93 ; 107 ; 119 ; 133 ; 147 ; 161 ; 189 ; 204	1439	15,41	14,43
31	cis- β -farnesène	41 ; 55 ; 69 ; 79 ; 93 ; 105 ; 120 ; 133 ; 147 ; 161 ; 204	1449	0,33	1,15
32	épi- β -santalène	41;69;79 ;109;121 ;135 ;149 ;161 ;177 ;187 ;205	1453	0,12	0,41
33	α -humulène	41; 55 ; 67 ; 79 ; 93 ; 107 ; 122 ; 161 ; 204	1457	6,91	7,08
34	Sesquisabinène	41;55; 69 ;77;93;105;120;133;161;175;189; 204	1463	0,91	0,76
35	sesquiterpène (b) non identifié	41;57;79; 91 ;107;119;133;148;161;189; 204	1469	0,18	0,14
36	ar-curcumène	41 ; 55 ; 83 ; 91 ; 105 ; 119 ; 132 ; 145 ; 187 ; 202	1484	0,16	0,26
37	γ -curcumène	41;55;69;77;93;105; 119 ;134; 147 ; 161; 189; 204	1487	1,34	0,83
38	sesquiterpène (c) non identifié	41 ; 53 ; 65 ; 79 ; 91 ; 107 ; 122 ; 147 ; 162 ; 204	1498	0,40	0,34
39	β -bisabolène (d) non identifié	41 ; 53 ; 69 ; 79 ; 93 ; 107 ; 119 ; 134 ; 161 ; 189 ; 204	1509	0,18	0,25
40	β -curcumène	41 ; 55 ; 69 ; 77 ; 93 ; 105 ; 119 ; 134 ; 161 ; 204	1516	0,34	0,30
41	Sesquicinéole	43;55 ; 69 ;81 ; 95;109 ;119 ; 139 ;161 ; 204 ; (222)	1518	0,20	0,27
42	δ -cadinène	41 ; 55 ; 69 ; 81 ; 91 ;105 ;119 ;134 ;145 ; 161 ; 189; 204	1528	0,09	0,06
43	sesquiterpène (e) non identifié	79 ;93 ;107 ; 119 ;138 ;149 ;161 ; 177 ; 189 ; 204 ; (220)	1557	0,28	0,25
44	oxyde de caryophyllène	43;69 ;79 ;93 ;109 ; 121 ;135 ;149 ;161 ; 177 ; (220)	1584	5,56	5,49
45	époxyde de humulène II	43 ;55 ;67 ;79 ;96 ;109 ; 123 ;138 ;177 ;189 ; 205 ; 220	1614	0,84	0,79
46	α -acoronol	59 ; 67 ; 79 ;93 ;105 ; 119 ;134 ;147 ;161;189 ;204;(220)	1636	0,18	0,09
47	caryophylla-4(14), 8(15)-dièn-5-ol	55 ; 69 ; 79 ; 91 ;105 ;117 ;123 ; 136 ;149 ;159 ; (220)	1643	0,50	0,36
48	14-hydroxy-9-épi-cis-caryophyllène	41 ; 55 ; 69 ; 79 ; 91 ;105 ;121 ; 131 ; 187;205 ; (220)	1676	1,27	0,88
49	diterpène (a) non identifié	109 ; 123 ; 136 ; 151 ; 166 ; 177 ; 190 ; 229 ; 247 ; 262	1791	0,13	0,03
50	diterpène (b) non identifié	107 ;123 ;137 ;147 ;159 ;177 ;189 ;204 ;229 ;244 ; 262	1957	0,60	0,49
51	Manool	81 ; 95 ; 107 ; 123 ; 137 ; 177 ; 204 ; 244 ; 257 ; 272 ; 290	2060	1,26	0,20
	Total			99,28	98,41

Cependant, par rapport à l'hydrodistillation, la procédure de Hs-SPME est simple et rapide à mettre en œuvre [Demirci, 2005 ; Belliardo 2006]. De plus, elle nécessite une moins grande quantité d'échantillon. Le tableau VI.9 résume la composition chimique de l'espace de tête et de l'huile essentielle de copal Mbaka. Comme l'indique ce tableau, la fraction volatile est composée principalement de sesquiterpènes. Les principaux sesquiterpènes identifiés sont: le β -caryophyllène, le trans- α -bergamotène, le cis- α -bergamotène, l' α -humulène et l'oxyde de caryophyllène. La composition chimique de la fraction volatile du copal Mbaka est proche de celle des huiles de copaiba exsudées du tronc des arbres du genre *Copaifera*. Ainsi, des études ont montré que les huiles de copaiba obtenues à partir de *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera cearensis* espèces Huber ex Ducke et *Copaifera reticulata* Ducke sont principalement composées de β -caryophyllène (57,5%, 19,7% et 40,9%, respectivement), suivi de l' α -humulène, l' α -copaène, l' α -bergamotène et le δ -cadinène [Veiga Junior et al., 2007].

L'activité répulsive attribuée au copal Mbaka par la population de la Likouala, lorsqu'il est brûlé, peut être justifiée par sa composition en certains terpénoïdes. En effet, plusieurs activités biologiques sont attribuées au β -caryophyllène : insecticide [Omolo et al., 2004 ; Rodilla et al., 2008 ; Chaubey, 2012], antimicrobienne [Goren et al., 2011] et anti-inflammatoire [Chavan et al., 2010]. Par ailleurs, l'effet répulsif de l'oxyde de caryophyllène a été démontré sur *Anopheles gambiae* par Omolo et al. (2004). D'autres monoterpènes mineurs (α -pinène, α -terpinéol, limonène, 1,8-cinéole et terpinèn-4-ol) présents dans la fraction volatile de ce copal ont montré également des effets répulsifs ou des activités insecticides [Obeng-Ofori et al., 1997 ; Prates et al., 1998 ; Ojmelukwe & Alder, 1999 ; García et al., 2005 ; Stamapoulos et al., 2007].

VI.3. Apport de la GCxGC-MS dans la caractérisation des exsudats

Les exsudats des plantes sont des mélanges complexes, et il est souvent difficile de séparer tous les composants de l'échantillon par des techniques classiques (CPG-FID ou CPG-SM). De plus, les constituants mineurs qui peuvent avoir des propriétés pharmacologiques intéressantes, peuvent co-éluer ou être masqués par des analytes plus abondants. Afin de pallier ce problème, l'utilisation d'une technique réputée sensible et résolutive comme la GCxGC-MS est envisagée. Elle est appliquée, ici, à l'étude de la fraction volatile d'exsudat de *G. demeusei* (Harms) J. Léonard.

VI.3.1. Analyse de la fraction volatile d'exsudat de *G. demeusei* (Harms) J. Léonard par GCxGC-MS

Le profil chromatographique de l'huile essentielle d'exsudat de *G. demeusei* (Harms) J. Léonard (copal Mbaka) est représenté en 2D par la figure 6.33. Sur cette figure, les composés présents dans cet exsudat sont regroupés par familles (monoterpènes, sesquiterpènes et diterpènes). Comme vu en CPG-SM, les composés majeurs dans l'extrait volatil du copal Mbaka sont les sesquiterpènes.

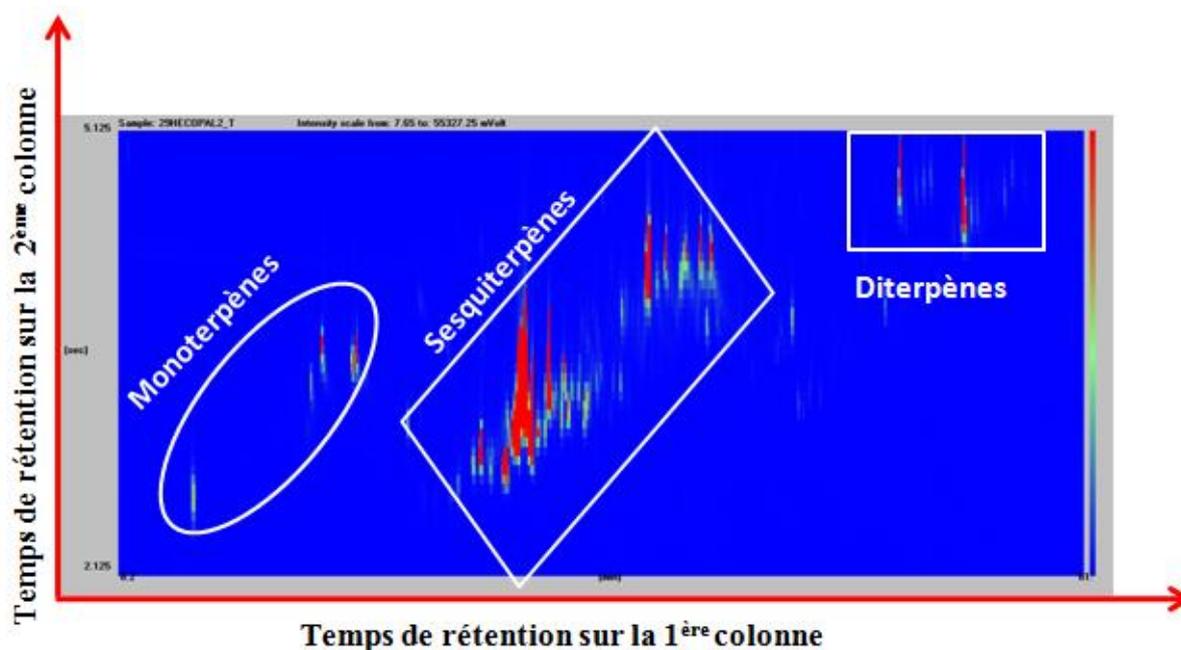


Figure 6. 33. Profil chromatographique de l'huile essentielle de copal Mbaka en GCxGC-MS

Par rapport au résultat de la CPG-SM, nous avons identifié 14 composés supplémentaires à l'état de trace. Quelques-uns des composés identifiés grâce à la GCxGC-MS sont dans les zones entourées en rouge sur le chromatogramme en trois dimensions de la figure 6.34. Ces composés sont : le camphène, la pinocamphone, l' α -terpinène, le 2,3-déhydro-1,8-cinéole, l'allo-ocimène, le 3-isothujanol, le linalol, le p-menth-1-èn-8-ol, l'acétate d'isobornyle, l'hydrate de trans-sesquisabinène, l'époxyde de cis-farnésène, l'alcool de caryophyllène, l' α -cubébène, et l'épi- β -bisabolol. Certains de ces composés ont montré plusieurs activités biologiques, notamment antimicrobienne. Parmi ceux rapportés comme ayant une activité insecticide, il y a le linalol [Ojmelukwe et Alder, 1999 ; Stamapoulos et al., 2007]. Ce composé, quoique mineur, peut contribuer à l'activité insecticide attribuée à ce copal par les populations d'Owando mais aussi de la Likouala.

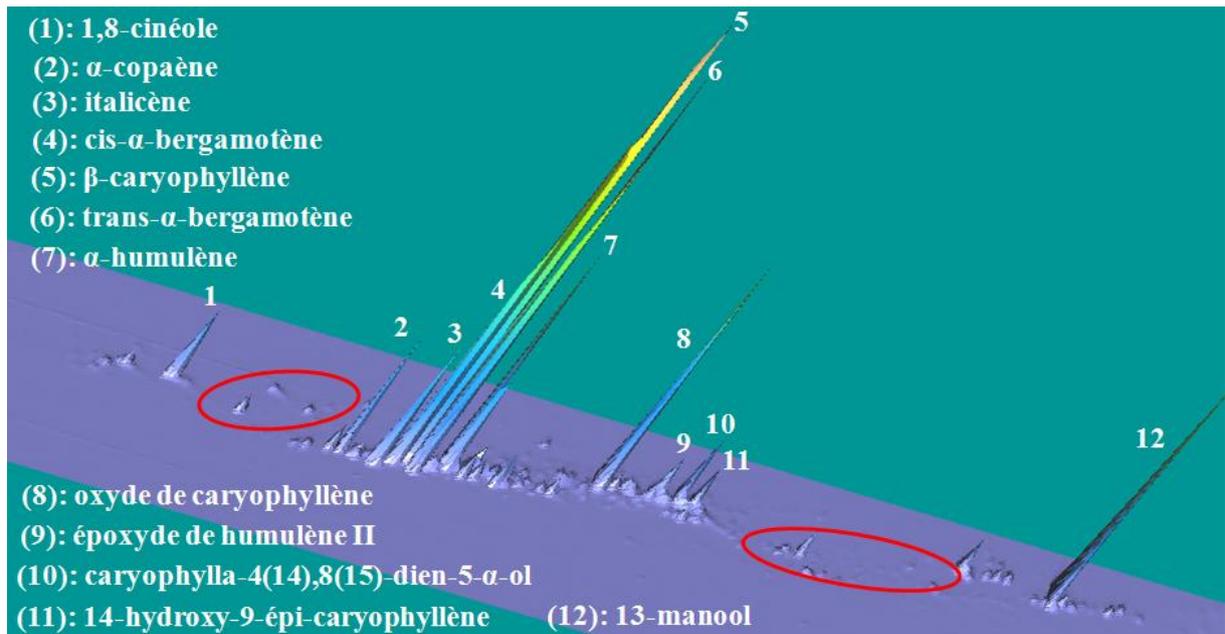


Figure 6. 34. Profil chromatographique de l'huile essentielle de copal Mbaka en GCxGC-MS

VI.3.2. Caractérisation des colonnes capillaires courtes et applications en GCxGC-MS

En GCxGC-MS, la mise en place de séparations consécutives sur deux colonnes de natures différentes est une alternative innovante pour la séparation des constituants des mélanges complexes.

Un des problèmes souvent rencontrés en GCxGC est le manque de répétabilité des chromatogrammes, ce qui rend difficile la comparaison des cartes chromatographiques en 2D. En particulier, une question se pose : la non-répétabilité entre deux cartes est-elle due aux réglages de l'appareillage (paramètres de modulation et de transfert)? Ou proviennent-ils d'un changement des performances de la colonne de deuxième dimension? Dans ce deuxième cas, le problème peut-être dû au fait que les colonnes utilisées en deuxième dimension n'ont pas toutes la même épaisseur de film. Pour éliminer l'hypothèse de fluctuation des coordonnées des tâches de rétention en GCxGC, il convient de s'assurer de la valeur et de la constance de l'épaisseur de film des secondes colonnes de GCxGC lorsqu'on compare deux cartes obtenues avec deux colonnes de deuxième dimension dont les caractéristiques ($L \times d \times e_f$ et nature de la phase stationnaire) sont identiques.

Pour ce faire, comme développé dans la partie « Matériel et méthodes » (§ III.3.5.), il convient d'appliquer le test de Grob (1978) via la mesure de la température de rétention (T_R) du E12 en mode programmation de température. Puis de déterminer l'efficacité de revêtement (« Coating Efficiency, CE% ») en éluant le E12 en mode isotherme [Ettre, 1998]. Ces

résultats permettront de comparer les colonnes entre elles, et de choisir des colonnes équivalentes (colonnes courtes avec la même épaisseur de film) de telle sorte que les grandeurs de rétention en CPG rapide et la position des tâches en GCxGC soient reproductibles quand on remplace une colonne par une autre.

Dans l'étude préliminaire à ce travail, l'épaisseur de film de colonnes courtes de phase stationnaire apolaire (100% polydiméthyl siloxane et 95%-5% poly méthyl-phényl siloxane) avait été évaluée. L'objectif de ce travail a été de poursuivre la caractérisation des colonnes capillaires en testant celles de phase stationnaire polaire et de géométries diverses, pour une utilisation en CPG rapide et GCxGC.

Pour chaque colonne, les analyses ont été répétées 6 fois, pour se faire une idée de la répétabilité des mesures et calculer un coefficient de variation. Le test de Dixon a été utilisé pour éliminer les valeurs aberrantes au seuil de risque 95 % [Cetama, 1986].

Le premier lot caractérisé a été celui des colonnes de 0,25 mm de diamètre interne. Ces colonnes ont été utilisées pour établir une nouvelle série de référence des températures de rétention du dodécanoate de méthyle (E12), car la manière de préparer les colonnes capillaires a beaucoup évolué depuis les années 70-80.

Le tableau VI.10 présente les résultats partiels obtenus. De manière générale :

- Pour chacune des colonnes testées issues d'une même filiation, les températures de rétention ont été obtenues avec des coefficients de variation extrêmement faibles. Ils varient entre 0,01% minimum et 0,17% au maximum. Une telle répétabilité conduit à ce que la comparaison des variances et des valeurs moyennes pour chaque T_R conduise à un diagnostic à 95% de probabilité de non équivalence de ces valeurs.
- Une précision au 1/100 de degré semble tout à fait illusoire. Il ne nous semble pas certain qu'elle ait une signification au 1/10 de degré mais dans la mesure où les écart-types des données s'arrondissent au 1/10, nous les avons prises en considération comme telles. Par rapport aux données de Grob (1978) la variation de T_R d'une colonne longue à une colonne courte a été de 3°C au maximum.
- Nous avons comparé la température de rétention du E12 obtenue sur différentes colonnes dans les deux séries de mesures (à pression puis à vitesse constante). Les moyennes de températures obtenues sont significativement différentes au seuil de risque 95%, lorsque la différence de température est d'une unité. Les valeurs de T_R à pression constante sont toujours supérieures à celles obtenues à vitesse constante, ce

qui semble normal compte tenu de l'augmentation de viscosité des gaz avec la température.

- Les valeurs de e_f calculées y sont données au 1/1000 de μm simplement pour permettre leur comparaison. En effet, arrondies au 1/100, elles pourraient apparaître comme différentes car dans ce cas elles seraient arrondies au centième inférieur ou au centième supérieur selon leur valeur par rapport à la valeur décimale intermédiaire se terminant par un 5. Par exemple, 0,234 μm serait arrondi à 0,23 μm et 0,236 μm à 0,24 μm faisant apparaître une différence de 0,01 μm qui n'est pas le reflet de la réalité des deux valeurs initiales à comparer ! Elles ont été calculées en prenant, comme valeur juste et donc comme référence, l'épaisseur de film des colonnes de 30 m (tableau VI.10) et celle des colonnes de diamètre 0,1 mm reportées sur la première ligne de chacune des trois phases stationnaires testées. Si on compare les valeurs de e_f trouvées, pour la même colonne, à pression et à vitesse constantes, elles sont tout à fait comparables et même égales, au seuil de 95% de probabilité. Dans la mesure où ces mesures concernent la même colonne, ce résultat est attendu si la méthode d'évaluation n'amène pas de biais. Il valide donc la méthode d'évaluation de ce paramètre pour les colonnes courtes. Pour les colonnes de 0,1 mm de diamètre, l'écart n'est que de 0,001 μm ! Par contre pour les colonnes de 0,25 mm de diamètre, l'écart maximum est de 0,005 mm à deux exceptions près (M5M15 pour BPX70 et UBWAX).
- Il semble que l'épaisseur de film des colonnes de 30 m soit toujours plus grande que celle des colonnes de longueur inférieure sur des morceaux de colonne venant de la première moitié de la colonne de départ. Dans le seul cas où la colonne de 15 m testée provenait de la partie terminale de la colonne de départ (Colonne UB17302525), les épaisseurs de la colonne de 30 m et de 15 m sont identiques. Dans la mesure où nous n'avons fait les mesures que sur 3 colonnes que nous n'avons pas testées les portions de colonnes $M_{15}M_{30}$ pour BPX70 et UBWAX, ni M_0M_{15} pour la colonne UB1730, nous ne pouvons que supposer que l'épaisseur est plus faible en tête de colonne qu'en queue de colonne.
- A cet égard, nous observons des incohérences : à pression constante avec la BPX70, la T_R sur M_5M_{15} est supérieure (99,1°C) à celle de M_0M_{15} qui, elle, est très voisine de celle de M_0M_5 (98,45°C en moyenne) alors qu'elle devrait être inférieure ! Cela est probablement dû à un réglage défectueux du t_0 dans le cas de la colonne de 10 m, ce

que nous n'avons pas eu le temps de vérifier. Par contre à vitesse constante, les résultats sont cohérents. Il en est de même pour la colonne UB1730, la T_R pour la portion de colonne $M_{20}M_{30}$ devrait être voisine de celles observées pour M_0M_{30} et $M_{15}M_{30}$.

- Les résultats obtenus montrent que l'épaisseur de film calculée varie très peu, bien que les températures moyennes soient significativement différentes au seuil de risque de 95%.

Tableau VI. 10. Valeurs de températures de rétention, d'épaisseurs de film et du « coating efficiency » obtenues pour des portions de colonnes de diamètre interne 0,25 mm

Colonne BPX70 (0,25 mm)						
		Pression = constante		Vitesse =constante		
	Longueur (m)	T_R (°C)	e_f (µm)	T_R (°C)	e_f (µm)	Coating Efficiency (%)
M_0M_{30}	30	99,49 ± 0,06	0,250	98,38 ± 0,05	0,250	38,35
M_0M_{15}	15	98,28 ± 0,17	0,235	97,45 ± 0,01	0,239	28,58
M_5M_{15}	10	99,11 ± 0,09	0,245	97,35 ± 0,08	0,238	26,35
M_0M_5	5	98,57 ± 0,13	0,239	97,60 ± 0,26	0,240	24,35
Colonne UBWAX (0,25 mm)						
		Pression = constante		Vitesse =constante		
	Longueur (m)	T_R (°C)	e_f (µm)	T_R (°C)	e_f (µm)	Coating Efficiency (%)
M_0M_{15}	15	116,14 ± 0,19	0,250	114,80 ± 0,55	0,250	42,89
M_5M_{15}	10	114,58 ± 0,12	0,232	112,79 ± 0,11	0,226	37,07
M_0M_5	5	114,88 ± 0,08	0,236	113,26 ± 0,09	0,231	30,53
Colonne UB17302525 (0,25 mm)						
		Pression = constante		Vitesse =constante		
	Longueur (m)	T_R (°C)	e_f (µm)	T_R (°C)	e_f (µm)	Coating Efficiency (%)
M_0M_{30}	30	126,97 ± 0,09	0,250	124,76 ± 0,02	0,250	49,90
$M_{15}M_{30}$	15	126,54 ± 0,07	0,245	124,45 ± 0,09	0,246	48,69
$M_{20}M_{30}$	10	124,58 ± 0,04	0,221	122,62 ± 0,04	0,225	46,22
M_0M_5	5	124,05 ± 0,05	0,214	122,18 ± 0,22	0,219	82,95

Pour ces colonnes, nous n'avons pas pu descendre en dessous de 5 m à cause de la limitation technologique imposée par l'appareil utilisé. En effet le contrôle de la vitesse de gaz vecteur en fonction de la programmation de température est peu fiable et donc l'appareil se met en mode erreur.

Nous constatons que l'efficacité d'imprégnation (coating efficiency) de ces colonnes change d'une portion de colonne à l'autre; cela traduit donc l'irrégularité du dépôt de phase stationnaire le long de la colonne. Pour les colonnes BPX70 et UBWAX, on note une diminution de la coating efficiency avec la longueur de la colonne, alors que pour la colonne UB17302525 cela n'est pas vrai. Cette valeur est nettement élevée pour la portion M_0M_5

(82,95 %). Il semble que, dans ce cas, la colonne M₀M₅ soit plus homogène que les colonnes longues. L'ordre de grandeur de la coating efficiency est proche de la valeur couramment décrite pour les colonnes capillaires polaires (40 %).

Les conclusions tirées pour les colonnes de 0,25 mm de diamètre interne sont aussi valides pour le lot de colonnes de 0,1 mm de diamètre interne (tableau VI.11). Nous avons remarqué, d'une façon générale, une diminution de température moyenne de rétention du E12 avec la longueur de la colonne. De plus, nous constatons que la coating efficiency varie aussi de manière identique. Les deux colonnes M₀M₁ et M₁M₂ de BP20 ayant la même épaisseur de film de phase stationnaire et la même longueur, elles sont équivalentes et ont les mêmes propriétés chromatographiques. Elles ont donc été sélectionnées pour la deuxième dimension en GCxGC-MS. Cette sélection devrait permettre l'obtention de chromatogrammes reproductibles en utilisant l'une ou l'autre de ces deux colonnes, dans la mesure où les paramètres de modulation lors du transfert n'amènent pas de perte de répétabilité.

Tableau VI. 11. Valeurs de températures de rétention, d'épaisseurs de film et de coating efficiency de portions de colonnes de diamètre interne 0,10 mm

Colonne TR-5MS (2,0m x 0,1 mm x 0,1µm)						
		Pression = constante		Vitesse = constante		
	Longueur (m)	T_R (°C)	e_f (µm)	T_R (°C)	e_f (µm)	Coating Efficiency (%)
M ₀ M ₂	2	126,15 ± 0,11	0,100	124,00 ± 0,14	0,100	30,25
M ₀ M ₁	1	124,75 ± 0,29	0,093	122,92 ± 0,12	0,095	29,24
M ₁ M ₂	1	124,25 ± 0,14	0,091	122,75 ± 0,14	0,094	27,19
Colonne PCB (9,5m x 0,1 mm x 0,1µm)						
M ₀ M _{9,5}	9,5	130,89 ± 0,19	0,100	128,08 ± 0,08	0,100	-
M _{8,5} M _{9,5}	1	131,58 ± 0,27	0,104	129,13 ± 0,28	0,105	-
Colonne BP20 (9,0 m x 0,1 mm x 0,1µm)						
M ₀ M ₉	9	115,58 ± 0,04	0,100	113,84 ± 0,03	0,100	41,50
M ₀ M ₂	2	113,66 ± 0,13	0,091	112,02 ± 0,12	0,091	38,90
M ₀ M ₁	1	113,00 ± 0,16	0,088	111,37 ± 0,38	0,089	30,34
M ₁ M ₂	1	112,75 ± 0,32	0,087	111,17 ± 0,13	0,088	33,51

La figure 6.35 montre les cartes chromatographiques de l'extrait volatil de copal Mbaka sur les deux colonnes BP20 (M₀M₁ et M₁M₂). Les deux cartes sont comparables, les temps de rétention sur la première colonne sont pratiquement constants. Entre les deux configurations de GCxGC, on constate une variation de temps de rétention sur la deuxième colonne. La différence de temps de rétention dans la deuxième colonne (excepté pour le soluté p) est inférieure ou égale à 0,22 min (13 s). Elle est inférieure au temps de modulation et peut donc

provenir d'un décalage de temps d'injection lors du transfert dans la deuxième dimension dû à un transfert décalé dans la deuxième configuration d'expérience (colonne M_1M_2 en deuxième dimension) par rapport à la première configuration (colonne M_0M_1 en deuxième dimension). Une différence de position de la tête de la colonne courte dans le modulateur entre les deux configurations peut en être la cause. Les temps de rétention des composés sont reportés dans le tableau VI.12. Une étude comparative avec une colonne de diamètre 0,1 mm et d'épaisseur de film de 0,12 μm aurait permis de montrer le décalage dû à e_f dans la deuxième dimension mais n'étant pas commercialisée, elle nécessiterait une confection sur mesure, ce qui ne nous a pas été possible d'obtenir durant nos expérimentations.

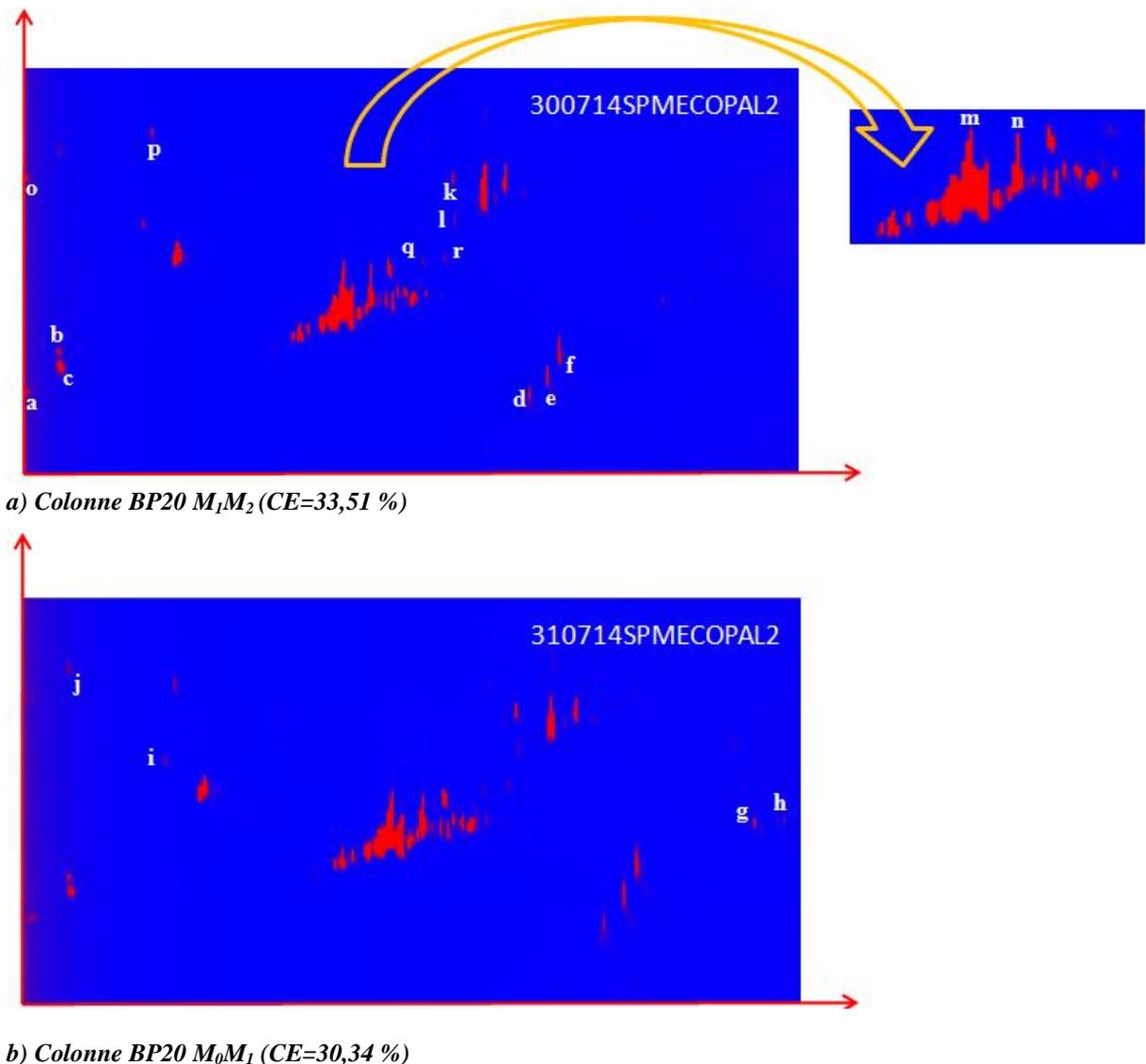
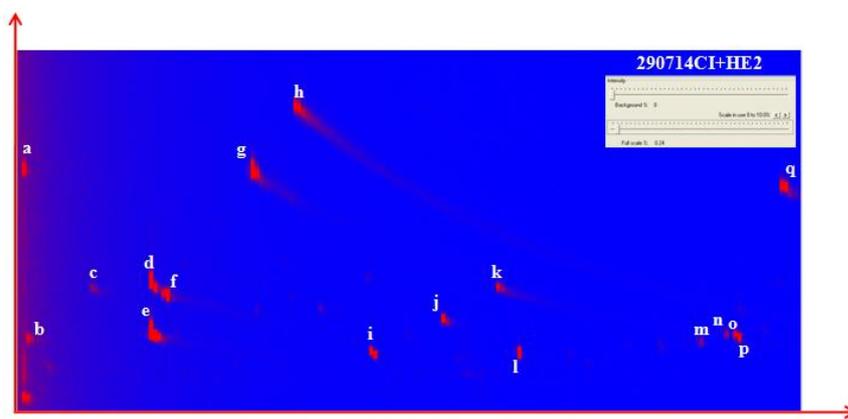


Figure 6. 35. Cartes chromatographiques de l'extrait par Hs-SPME d'exsudat de *G. demeusei* (Harms) J. Léonard en GCxGC-MS obtenues en utilisant 2 colonnes équivalentes.

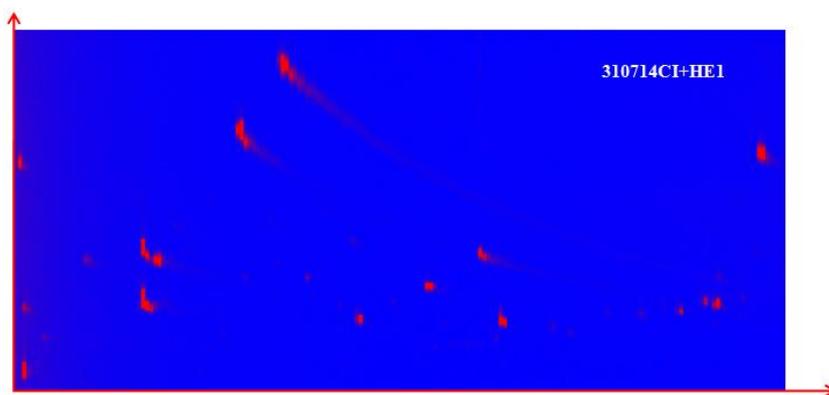
Tableau VI. 12. Temps de rétention sur la deuxième colonne des composés annotés sur les cartes chromatographiques de la fraction volatile du copal Mbaka

Composé	tr ² M ₀ M ₁	tr ² M ₁ M ₂	Composé	tr ² M ₀ M ₁	tr ² M ₁ M ₂
a	1,23	1,23	J	4,85	4,87
c	1,58	1,62	K	4,51	4,33
b	1,84	1,81	L	3,89	3,70
d	1,29	1,30	M	3,19	3,07
e	1,59	1,75	N	3,11	3,00
f	2,04	2,21	O	4,44	4,40
g	2,63	2,65	P	5,11	4,69
h	2,65	2,69	Q	3,23	3,10
i	3,77	3,55	R	3,24	3,19

Par ailleurs, nous avons analysé un échantillon d'huile essentielle de citronnelle dont nous disposons au laboratoire, car leurs terpènes présentent une bonne distribution sur la carte 2D. Les 2 cartes chromatographiques sont rapportées sur la figure 6.36 ci-dessous et les temps de rétention de ces composés dans le tableau VI.13.



a) Colonne BP20 M₁M₂ (CE=33,51 %)



b) Colonne BP20 M₀M₁ (CE=30,34 %)

Figure 6. 36. Cartes chromatographiques d'un échantillon d'huile essentielle de citronnelle

Tableau VI. 13. Temps de rétention sur la deuxième colonne des composés annotés sur les cartes chromatographiques de l'huile essentielle de citronnelle

Composé	tr ² M ₁ M ₂	tr ² M ₀ M ₁	Composé	tr ² M ₁ M ₂	tr ² M ₀ M ₁
A	3,81	3,87	J	1,59	1,93
C	2,03	2,31	K	2,03	2,47
B	1,30	1,56	L	1,12	1,40
D	2,21	2,63	M	1,22	1,50
E	1,51	1,85	N	1,31	1,69
F	1,97	2,35	O	1,31	1,62
g	3,84	4,47	P	1,31	1,69
h	4,69	5,50	Q	3,50	4,06
i	1,13	1,44			

Les mêmes conclusions que pour l'étude précédente peuvent en être tirées. Excepté pour les solutés g, h et q, la différence de temps dans la deuxième dimension entre les deux configurations peut être attribuée à une différence dans les temps de transfert due à la modulation. La précision de mesure du pointé du centre de la tâche dans la deuxième dimension est aussi un paramètre à considérer dans la suite du développement de la présente étude.

Enfin notre étude a permis de déterminer les nouvelles températures de rétention de référence du E12 sur des colonnes d'épaisseur de film de 0,15µm à utiliser pour caractériser les colonnes de géométrie variable. Elles sont reportées dans le tableau VI.14 suivant.

Tableau VI. 14. Valeurs de températures de rétention de référence pour des colonnes de 0.15µm d'épaisseur de film

Phase stationnaire	T _{R E12} (°C) Pression = constante	T _{R E12} (°C) Vitesse = constante
BPX70	109,5	108,4
UBWAX	126,1	124,8
UB1730	137,0	135,0
TR5MS	134,0	131,9
PCB	138,8	136,7
BP20	123,5	121,7

Nous avons mis au point une méthode permettant de comparer les épaisseurs de film des colonnes courtes à utiliser en deuxième dimension d'un appareillage de GCxGC et de celles de chromatographie gazeuse ultra rapide. Elle permet de les choisir lors du remplacement de l'une par l'autre et donc de s'affranchir de ce paramètre pour rendre compte des fluctuations

observables entre deux chromatogrammes et donc de rechercher une cause instrumentale à ces fluctuations.

A cette occasion, nous avons aussi déterminé les températures de rétention de référence des colonnes d'épaisseur de film de 0,15 μm à utiliser pour caractériser n'importe quelle épaisseur de film de colonnes enduites avec une des six phases stationnaires récentes étudiées.

Références Bibliographiques (partie III)

Articles et revues scientifiques

Anthony C.B. (1995). Natural Preservatives from *Landolphia owariensis*. *Afr. Dev. J.* 2: 21-22.

Assimopoulou A.N. and Papageorgiou V.P. (2004). GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. Chia. *Biomedical Chromatography* 19: 285-311.

Belliardo F., Bicchi C., Cordero C., Liberto E., Rubiolo P., Sgorbini B. (2006). Headspace-solid-phase microextraction in the analysis of the volatile fraction of aromatic and medicinal plants. *J. Chromatogr. Sci.* 44: 416-429.

Benyelles B., Allali H., El Amine Dib M., Djabou N., Tabti B., Costa J. (2011). Essential oil from *Rhaponticum acaule* L. roots: Comparative study using HS-SPME/GC/GC-MS and hydrodistillation techniques. *Journal of Saudi Chemical Society*. Doi:10.1016/j.jscs.2011.12.001.

Bevan C., Ekong D., and Okogun J. (1968): "West African Timbers. Part XXI. Extractives from *Daniellia* Species. The Structure of a New Diterpene, Ozic Acid." *J. Chem. Soc. C*: 1063-1066.

Brody R.H., Edwards H.G.M., Pollard A.M. (2001). A study of amber and copal samples using FT-Raman spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 57(6): 1325-1338.

Budzikiewicz H., Wilson J.M. and Djerassi C. (1963). Mass spectrometry in structural and stereochemical problems—XXXII. Pentacyclic Triterpenes. *Journal of the American Chemical Society* 85: 3688-3699.

Chavan M.J., Wakte P.S., Shinde D.B. (2010). Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine* 17:149-151.

Chaubey MK. (2012). Acute, lethal and synergistic effects of some terpenes against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *Ecologia Balkanica* 4: 53-62.

Cruz-Canizares J., Domenech-Carbo M.T., Gimeno-Adelantado J.V., Mateo-Castro R. and Bosch-Reig F. (2005). Study of Burseraceae resins used in binding media and varnishes from artworks by gas chromatography-mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1093: 177-194.

Demirci B., Demirci F., Baser K.H.C. (2005). Headspace-SPME and hydrodistillation of two fragrant *Artemisia* sp. *Flavour Fragrance J.* 20:395-398.

- Doménech-Carbó M.T.**, de la Cruz-Canizares J., Osete-Cortina L., Doménech-Carbó A., Davida H. (2009). Ageing behaviour and analytical characterization of the Jatobá resin collected from *Hymenaea stigonocarpa* Mart. *International Journal of Mass Spectrometry* 284: 81-92.
- Ettre L.S.**, (1998) The correct meaning of « Coating Efficiency » vs the « utilization of theoretical Efficiency » *Journal of High Resol Chromatogr* 21: 121-123.
- Freiman M.**, Ramos S., Siani A.C., Tappin M.R., Guimaraes A.C. and Ribeiro J.E., (2000). Essential oils from oleoresins of *Protium* spp. of the amazon regions. *Flavour frag. J.* 150: 383-388.
- García M.**, Donadel O.J., Ardanaz C.E., Tonn C.E., and Sosa M.E. (2005). Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium castaneum*. *Pest Manage. Sci.* 61: 612–618.
- Geetha T.** & Varalakshmi P. (2001). Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. *J Ethnopharmacol.* 76(1):77-80.
- Goren A.C.**, Piozzi F., Akcicek E., Kilic T., Carikci S., Mozioglu E., Setzer W.N. (2011). Essential oil composition of twenty-two *Stachys* species (mountain tea) and their biological activities. *Phytochemistry Letters* 4: 448-453.
- Grob K.Jr.**, Grob G. and Grob K.J. (1978). Comprehensive, standardized quality test for glass capillary columns. *Journal of Chromatography A* 156: 1-20.
- Guiliano M.**, Mille G., Onoratini G., Simon P. (2006). Présence d'ambre dans le Crétacé supérieur Santonien de La Mède à Martigues (S-E de la France) Caractérisation IRTF. *C.R. Palevol* 5: 851-858.
- Guiliano M.**, Asia L., Onoratini G., Mille G. (2007). Applications of diamond crystal ATR FTIR spectroscopy to the characterization of ambers. *Spectrochimica Acta Part A* 67: 1407-1411.
- Koudou J.**, Obame L.C., Kumulungui B.S., Edou P., Figueredo G., Chalchat J.C., and Traore A.S. (2009). Volatile constituents and antioxidant activity of *Aucoumea klaineana* Pierre essential oil. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 3(6): 323-326.
- Kunicka-Stycznaska S.** & kalemdz D. (2009). Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems. *Journal of Applied Microbiology* 107: 1903-1911.
- Lucero-Gómez P.**, Mathe C., Vieillescazes C., Bucio L., Belio I., Vega R. (2013). Analysis of Mexican reference standards for *Bursera* spp. Resins by Gas Chromatography-Mass

Spectrometry and application to archaeological objects. *Journal of Archaeological Science* doi:10.1016/j.jas.2013.07.021.

Mathe C., Culioli G., Archier P. and Vieillescazes C. (2004). Characterization of archaeological frankincense by gaschromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr A* 1023: 277-285.

Obame L.C., Edou P., Bassolé I.H.N., Koudou J. et coll. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oil of *Dacryodes edulis* (G. Don) H.J. Lam from Gabon. *Afr. J. Microbiol Res.* 2: 148-152.

Obame L.C., Koudou J., Chalchat J.C., Bassolé I., Edou P., Ouattara A.S. and Traore A.S. (2007). Volatile components, antioxidant and antibacterial activities of *Dacryodes buettneri* H. J. Lam. essential oil from Gabon. *Sci. Res. Essays* 2 (11): 491-495.

Obeng-Ofori D., Reichmuth C.H., Bekele J., & Hassanali A. (1997). Biological activity of 1,8-cineole, a major component of essential oil of *Ocimum kenyense* (Ayobangira) against stored product beetles. *Journal of Applied Entomology* 121: 237-243.

Ojimelukwe P.C., & Alder C. (1999). Potential of Zimtaldehyde, 4-allylanisol, linalool, terpinol and others phytochemicals for the control of the confused flour beetle (*Tribolium confusum* J.D.C.) (G.L. Tenebrionidea). *Journal of Pest Science* 72: 81-86.

Omolo M.O., Okinyo D., Ndiege I.O., Lwande W.L., Hassanali A. (2004). Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. *Phytochemistry* 65: 2797-2802.

Onocha P.A., Ekundayo O., Oyelola O., Laakso I., (1999). Essential oils of *Dacryodes edulis* (G. Don) H.J. Lam (African pear). *Flavour fragr. J.* 14: 135-139.

Prates H.T., Santos J.P., Waquil J.M., Fabris J.D., Oliveira A.B., and Foster JE. (1998). Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). *J. stored Prod. Res.* 34: 243-249.

Prati S., Sciutto G., Mazzeo R., Torri C., Fabbri D. (2011). Application of ATR-far-infrared spectroscopy to the analysis of natural resins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399: 3081-3091.

Regert M., Devière T. and Le Hô A-S. (2008). Reconstructing ancient Yemeni commercial routes during the middle ages using structural characterization of terpenoid resins. *Archaeometry* 50: 668-695.

Rodilla J.M., Tinoco M.T., Morais J.C., Gimenez C., Cabrera R., Martín-Benito D., Castillo L., Gonzalez-Coloma A. (2008). *Laurus novocanariensis* essential oil: seasonal variation and valorization. *Biochem Syst. Ecol.* 36: 167-176.

Rüdiger A.L. and Veiga-Junior V.F. (2013). Chemodiversity of ursane-and oleanane-type triterpenes in Amazonian Burseraceae oleoresins. *Chemistry and Biodiversity*10(6) :1142-1153.

Romeo F.V., Deluca A., Piscopo A., Poina M. (2008). Antimicrobial effect of some Essential Oils. *Journal of Essential Oil Research* 20 : 373-379.

Scalarone D., Lazzari M., Chiantore O. (2003). Ageing behaviour and analytical pyrolysis characterisation of diterpenic resins used as art materials: Manila copal and sandarac. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 68–69: 115-136.

Siani A.C., Nakamura M.J., Tappin M.R.R., Monteiro S.S., Guimarães A.C. and Ramos M.F.S. (2012). Chemical Composition of South American Burseraceae Non-volatile Oleoresins and Preliminary Solubility Assessment of their Commercial Blend. *Phytochem. Anal.* 23: 529-539.

Stamapoulos D.C., Damos P., and Karagianidou G. (2007). Bioactivity of five monoterpenoid vapours to *Tribolium confusum* (du Val) (*Coleoptera: Tenebrionidae*). *J. stored Prod. Res* 43: 571-577.

Susunaga G.S., Siani A.C., Pizzolatti M.G., Yunes R.A., Delle Monache F. (2001). Triterpenes from the resin of *Protium heptaphyllum*. *Fitoterapia* 72: 709-711.

Veiga Junior V.F., Rosas E.C., Carvalho M.V., Henriques M., Pinto A.C. (2007). Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga hayne-* a comparative study. *J. Ethnopharmacol.* 112: 248-254.

Wiklund S., Johansson E., Sjöström L., Mellerowicz E.J., Edlund U., Shockcor J.P., Gottfries J., Moritz T., Trygg J. (2008). Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Anal Chem.*80(1): 115-22.

Congrès ou colloques

Van den Berg K.J., Ossebar J., Van Keulen H., Van Grieken R., Anssens P. Van't Dack K. & Meersman L. (2002, June) Analysis of copal resins in 19th century oil paints and resin/oil var-nishes. In Art 2002. Proceedings of the 7th International Conference on non-destructive

Test-ing and Microanalysis for the Diagnostics and Conservation of Cultural and Environmental Heritage, 2–6 June 2002 Vol. 1 (Eds. R. van Grieken, K. Janssens, L. Van't dack, & G. Meers-man), University of Antwerp, Department of Chemistry, Antwerp-Wilrijk, p. 1–10.

Van den Berg K.J., Van der Horst J., Boon J.J. (1999, Auguste): *Recognition of copals in aged resin/oil paints and varnishes*. Paper presented at the ICOM-CC 12th Triennial Meeting, Lyon, France.

Livres ou manuels

Arbonnier M. (2009). *Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest*. Versailles : 3^{ème} Editions Quae, CIRAD, MNHN.

Bertrand D. & Dufour E. (2006). *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques* Technique & Documentation. (2nd Edition).660p.

Botineau M. (2010). *Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs*. Paris: Ed. Tec & Doc.

Boullard B. (2001). *Plantes médicinales du monde. Réalités et croyances*. Dictionnaire. Estem éd., 636 p.

Bouquet A. (1969). *Féticheurs et médecine traditionnelle du Congo Brazzaville*. Paris, France : Travaux et documents de l'ORSTOM n° 13.

Burkill H.M. (1994). *The Useful Plants of West Tropical Africa*. United Kingdom : 2nd Edition, Volume 2, Families E-I Royal Botanic Gardens, Kew.

CETAMA (1986). *Statistique appliqué à l'exploitation des mesures*. 2nd Edition, Paris: Masson. 125p.

Eyog Matig O., Ndoye O., Kengue J. et Awono A. (2006). *Les Fruitières Forestiers Comestibles du Cameroun*. Editeurs, 2006. 204p. ISBN-13: 978-92-9043-707-9

Harley G.W. (1980). *Native African Medicine*. London : UK, Frank Cass.

Harris D.J., Moutsamboté J.-M., Kami E., Florence J., Bridgewater S. & Wortley A.H. (2011). *Une Introduction aux Arbres du Nord de la République du Congo*. Ecosse : Royal Botanic Garden Edinburgh.

Irvine F.R. (1961). *The Woody Plants of Ghana*. London 2nd Ed.: Oxford University Press.

Koni Muluwa J. & Bostoen K. (2008). *Noms et usages des plantes utiles chez les Nsong (RD Congo, Bandundu, bantu B85F)*. Gothembourg : University of Gothembourg, Department of Oriental and African Languages, Göteborg Africana Informal Series, n°6.

Laird S.A., Betafor M., Enanga M., Fominyam C., and Itoe M. (1997). *Medicinal Plants of the Limbe Botanic Garden*. Cameroon : Garden. Limbe Botanic Garden.

Lemmens R.H.M.J., Louppe D. & Oteng-Amoako A.A. (2012). *Ressources végétales de l'Afrique tropicale 7(2). Bois d'œuvre 2. [Traduction de : Plant Resources of Tropical Africa 7(2). Timbers 2. 2012]*. Wageningen, Pays-Bas : Fondation PROTA, Wageningen.

Louppe D., Oteng-Amoako A.A. & Brink M. (2008). *Ressources végétales de l'Afrique tropicale 7(1). Bois d'œuvre 1. [Traduction de : Plant Resources of Tropical Africa 7(1). Timbers 1. 2008]*. Wageningen, Pays-Bas : Fondation PROTA.

Raponda-Walker A., Sillans R. (195). *Plantes utiles du Gabon*. Gabon, Libreville : SEPIA.

Vivien J. & Faure J.J. (2011). *Arbres des forêts denses d'Afrique centrale*. France: Edition Nguila-Kerou-Clohars Carnoet.

Derrick M.R., Stulik D., Landry J.M. (1999). *Infrared Spectroscopy in Conservation Science*. Los Angeles: The Getty Conservation institute.

Langenheim J.H. (2003). *Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology, and Ethnobotany*. Timber Press, Portland.

Larkin P.J. (2011). *IR and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation*. Elsevier, Waltham, MA: USA.

Mills J.S. & White. (1994). *The Organic Chemistry of Museum Objects*. Oxford: Butterworth-Heinemann Ltd.

Thèses, mémoires ou rapports de fin d'études

Elouma Ndinga A. M. (2010). *Inventaire et analyse chimique des exsudats de quelques plantes du Congo*. Mémoire de DEA, Université Marien Ngouabi, Brazzaville (Congo).

Vo Duy S. (2007). *Mise au point de méthodes analytiques pour la caractérisation de la matière organique constituante d'objets du patrimoine culturel*. ThD Chim. analytique, Université Paris-sud XI.

Steigenberger G. (2013). *The Vigani Cabinet-Analysis of historical resinous materials by gas chromatography-mass spectrometry and infrared spectroscopy*. Department of Mathematics and Natural Sciences at the Technical, University Dresden, Dresden.

Sites internet

Gérard J. & Louppe D. (2011). *Azelia bipindensis Harms. [Internet] Fiche de PROTA4U (Plant Resources of Tropical Africa/Ressources végétales de l'Afrique tropicale)*. Consulté le

12 juillet 2014. www.prota4u.org/search.asp

Lemmens R.H.M.J. (2007). *Omphalocarpum elatum* Miers. [Internet] Record from PROTA4U. Louppe D., Oteng-Amoako A.A. & Brink, M. (Editors). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Netherlands. Accessed 21 July 2014. www.prota4u.org/search.asp.

Mollet N.P. (2007). *Rauvolfia caffra* Sond. [Internet] Fiche de PROTA4U (Plant Resources of Tropical Africa/Ressources végétales de l'Afrique tropicale). Consulté le 21 juillet 2014. www.prota4u.org/search.asp

Schmelzer G.H. (2007). *Rauvolfia vomitoria* Afzel. [Internet] Record from PROTA4U (Plant Resources of Tropical Africa/Ressources végétales de l'Afrique tropicale). Accessed 21 July 2014. www.prota4u.org/search.asp

Schmelzer G.H. (2012). *Daniellia ogea* (Harms) Rolfe ex Holland. [Internet] Record from PROTA4U (Plant Resources of Tropical Africa/Ressources végétales de l'Afrique tropicale). Accessed 12 July 2014. www.prota4u.org/search.asp

Todou G. & Doumenge C. (2008). *Dacryodes buettneri* (Engl.) H.J.Lam. [Internet] Fiche de PROTA4U (Plant Resources of Tropical Africa/Ressources végétales de l'Afrique tropicale). Consulté le 11 juillet 2014. www.prota4u.org/search.asp

CD-ROM

Boone M.J. (2006). *Hunteria umbellata* (K. Schum.) Hallier f. In: Schmelzer G.H., Gurib-Fakim A. editors. Prota11: Medicinal plants/Plantes médicinales (CD-ROM) Wageningen, Netherlands: PROTA.

Mairura F.S. & Schmelzer G.H. (2006). *Tabernaemontana crassa* Benth. In: Schmelzer G.H. & Gurib-Fakim A. (Editeurs). Prota 11(1): Medicinal plants/Plantes médicinales 1 (CD-ROM) Wageningen, Pays Bas. PROTA

Schmelzer G.H. (2006). *Baijsea axillaris* (Benth.)Hua. In: Schmelzer G.H. & Gurib-Fakim A. (Editeurs). Prota 11(1): Medicinal plants/Plantes médicinales 1. (CD-ROM) Wageningen, Pays Bas: PROTA.

Tchinda A.T. & Tané P. (2008). *Amphimas pterocarpoides* Harms. In: Louppe D., Oteng Amoako A.A. & Brink M. (Editeurs). Prota 7(1): Timbers/Bois d'œuvre 1. (CD-ROM) Wageningen, Pays Bas. PROTA.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale

Les exsudats, substances naturelles complexes produits par les plantes qui diffèrent de la sève, ont été classés dans le présent travail en quatre types :

- les latex ;
- les exsudats gommeux ;
- les exsudats résineux (terpéniques et phénoliques) ;
- les exsudats résineux obtenus sous forme de mélange (essentiellement des gommés-résines).

La caractérisation de ces substances est un grand défi pour l'analyse du fait que leur composition chimique dépend de leur origine botanique, géographique et évolue souvent avec le temps.

Au regard des études réalisées par d'autres auteurs, nous avons opté pour une stratégie multi-analytique, jugée plus efficace, pour la caractérisation des exsudats des plantes sélectionnées dans le cadre de ce travail.

Les résultats obtenus sont de trois ordres :

- résultats relatifs à l'inventaire des plantes à exsudats du Congo ;
- résultats sur le choix et la mise en place de la méthodologie de caractérisation des exsudats ;
- résultats sur la caractérisation des exsudats des plantes sélectionnés pour étude.

Du point de vue de l'inventaire des plantes à exsudats du Congo, sur la base des recherches bibliographiques et des enquêtes ethnobotaniques disponibles ou réalisées dans le présent travail auprès de 30 tradipraticiens de la ville d'Owando, il ressort que 135 plantes à exsudats appartenant à 87 genres ont été répertoriées. Ce résultat nous donne très rapidement un aperçu des plantes à exsudats et des types d'exsudats rencontrés au Congo, le latex étant de loin l'exsudat le plus fréquent, notamment dans la famille des Apocynaceae, des Euphorbiaceae, des Moraceae et des Sapotaceae. Les exsudats résineux, de type oléorésine, copal et gommés-résines, sont retrouvés dans la famille des Anacardiaceae, des Burseraceae et des Fabaceae sous famille des Caesalpinoideae.

Il est important de signaler que les enquêtes ethnobotaniques menées à Owando ont présenté trois intérêts majeurs :

- premièrement, elles ont conduit à la récolte des échantillons d'exsudats les plus cités et d'origine botanique bien certifiée, que nous avons soumis aux investigations chimiques ;
- deuxièmement, elles ont permis d'identifier les exsudats utilisés par les Kôyo, population majoritaire dans la zone d'étude ;
- troisièmement, elles ont confirmé quelques usages des exsudats rapportés dans la littérature et énumérés par les populations d'Owando, ainsi que les multiples propriétés attribuées à plusieurs exsudats par des populations d'autres pays ou zones d'Afrique (glu, insectifuge, allume-feu, antidouleurs, anti-inflammatoires et antimicrobiens).

Malheureusement le manque de coopération de quelques détenteurs de savoir et de savoir-faire, et l'inexistence d'équivalent du mot « exsudat » en langue Kôyô, bien que contournée par une formulation multiple de la question liée à la connaissance des exsudats, ont constitué les principales limites de la méthodologie adoptée.

Du point de vue du choix et de la mise en place de la méthodologie de caractérisation des exsudats, nous nous sommes orientés, comme précédemment annoncé, vers une stratégie multi-analytique :

- utilisation des techniques d'analyses spectroscopiques ;
- utilisation des techniques chromatographiques ;
- utilisation des techniques de traitement d'échantillons ;

Les techniques spectroscopiques fournissent, - premièrement, une empreinte caractéristique des échantillons à analyser qui est très utile pour une comparaison avec d'autres échantillons d'exsudats, notamment ceux décrits dans la littérature ; - deuxièmement, elles sont peu onéreuses et faciles à mettre en œuvre. Les techniques spectroscopiques sont financièrement accessibles pour beaucoup de laboratoires, notamment pour le laboratoire du Sud, tel que l'Unité de Chimie du Végétal et de la Vie. La caractérisation par infrarouge seule n'a pas été suffisante, mais ses résultats nous ont permis de nous orienter dans le choix de la technique séparative, plus informative à utiliser par la suite.

Les techniques chromatographiques, quant à elles, sont les plus utilisées pour l'analyse de ce type de substances. C'est le cas de la CPG-SM. Néanmoins, la CPG-SM nécessite le plus souvent un traitement d'échantillons au préalable.

Parmi les techniques de traitement d'échantillons utilisées dans le cadre de ce travail, nous pouvons citer : la Hs-SPME et l'hydrodistillation qui ont été mises en œuvre particulièrement pour l'extraction de la fraction volatile des exsudats des plantes. Cependant, lorsque les quantités d'exsudats étaient faibles, seule la Hs-SPME a été utilisée. C'est une technique intéressante car elle est très spécifique et sensible, qui permet de concentrer les composés volatils, mais elle reste une technique de profilage et complémentaire à l'hydrodistillation.

Pour avoir les informations quant à la composition de la fraction peu volatile, nous avons eu deux démarches possibles : - premièrement, faire une extraction au Soxhlet avec un solvant apolaire (l'éther de pétrole) suivie d'une méthylation et/ou d'une silylation ; - deuxièmement, faire une silylation et/ou une méthylation directe sur un prélèvement brut d'exsudat. Nous avons constaté que les résultats obtenus dans les deux cas n'étaient pas significativement différents. C'est pour cette raison que beaucoup d'analyses sur les exsudats résineux ont été faites selon le deuxième procédé.

Par ailleurs, face à la complexité d'un échantillon tel que l'huile essentielle de l'exsudat de *G. demeusei* (Harms) J. Léonard, de type copal, nous avons exploité le pouvoir séparatif plus puissant de la technique de couplage GCxGC-MS.

Au cours de la conduite des analyses GCxGC-MS, il s'est posé le problème de la non-répétabilité des chromatogrammes en 2D. Pour résoudre ce problème supposé provenir des colonnes courtes utilisées en 2^{ème} dimension, nous avons mis en place une méthodologie permettant leur caractérisation. Pour cela, nous avons utilisé :

- le test de Grob en se basant sur la température de sortie du E12 pour contrôler l'épaisseur de film des phases stationnaires ;
- l'efficacité d'imprégnation (Coating Efficiency : CE) pour vérifier la régularité du dépôt des dites-phases le long des colonnes.

Lors de l'utilisation du test de Grob, la précision de la mesure de la température de rétention du E12 affecte donc la valeur de l'épaisseur de film des phases stationnaires évaluées et dépend des paramètres de programmation de température. Une des difficultés rencontrées est le réglage de la vitesse linéaire de gaz vecteur de telle sorte à obtenir le t_0 du méthane comme indiqué par Grob. En effet, une variation du t_0 de plus de 10 % entraîne des résultats erronés concernant l'épaisseur de film de phase stationnaire. Une autre difficulté rencontrée est liée à

l'appareillage qui ne permet pas de caractériser l'épaisseur de film des colonnes de longueurs inférieures à 5 m avec des diamètres et épaisseurs de film de 0,25 mm par manque de stabilité de la perte de charge.

L'évaluation de la régularité du dépôt de film de phase stationnaire le long de la colonne a été faite en déterminant la CE. Les valeurs de la CE obtenues ont ainsi permis la comparaison des colonnes de même diamètre. Dans ce cas, l'influence d'une erreur sur le t_0 n'influence pratiquement pas le facteur de rétention ou de capacité (k).

En vue de caractériser les exsudats des plantes sélectionnées, les techniques spectroscopiques et chromatographiques ont été utilisées :

- Spectroscopies du proche infrarouge (SPIR) et du moyen infrarouge (SMIR) ;
- Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG-SM) ;
- Chromatographie en Phase Gazeuse bidimensionnelle couplée à la Spectrométrie de Masse (GCxCG-MS).

Apports des techniques spectroscopiques :

Les 15 échantillons d'exsudats de différents types analysés en SPIR, n'ont pas pu être discriminés, après traitement des résultats expérimentaux en Analyse en Composante Principale (ACP), notamment pour plusieurs raisons :

- en proche infrarouge,
 - l'état physique de l'exsudat influence de manière significative l'information spectrale ;
 - la discrimination de l'échantillon se fait en fonction de la masse d'échantillon au fond du tube ;
 - les quantités d'exsudats disponibles pour l'analyse en réflectance diffuse n'étaient pas suffisantes pour effectuer une mesure fiable ;
 - l'analyse de l'exsudat résineux liquide et collant est délicate car il est souvent difficile de déposer de grandes quantités d'échantillons au fond du tube.

- en moyen infrarouge :

L'analyse des exsudats par cette technique a montré qu'il était possible de discriminer les exsudats résineux diterpéniques (*G. demeusei* (Harms) J. Léonard) des exsudats résineux triterpéniques (*D. edulis* (G. Don) K.J. Lam).

Cette technique a également montré que pour un même exsudat, tel que celui de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam, on pouvait avoir des différences spectrales significatives

dans la région des empreintes digitales. Ce qui nous a permis de distinguer plusieurs groupes pour cet échantillon. Il apparaît aussi qu'avec cette technique, on arrive à distinguer clairement une gomme-résine d'une résine. Enfin, cette technique nous a également orientés vers la technique de traitement d'échantillon la plus adaptée (la silylation) pour une analyse en GPG-SM.

Apports des techniques chromatographiques :

Nous avons soumis aux analyses chromatographiques les fractions peu volatiles et les fractions volatiles des exsudats de *D. edulis* et de *G. demeusei*.

A propos des fractions peu volatiles

Cas de *D. edulis* : la fraction résineuse de l'exsudat silylé de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam, analysé en GPG-SM, est constituée que de composés triterpéniques, comme rapporté dans la littérature pour les autres espèces de cette famille (Burseraceae). Les chromatogrammes de ces exsudats ont révélé la présence d'environ 24 triterpènes, avec comme constituants majeurs les épimères de l' α et la β -amyrine. L' α et la β -amyrine, ainsi que le lupéol ont des activités anti-inflammatoire et analgésique reconnues ; ceci pourrait donc justifier l'utilisation d'exsudats résineux de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam par les populations locales, en application sur les points douloureux (entorse, pied enflés).

La classification hiérarchique ascendante n'a pas permis de mieux discriminer les exsudats de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam selon leur origine géographique.

Cas de *G. demeusei* : l'extrait à l'éther de pétrole méthylié du copal a révélé, après analyse en GPG-SM, la présence de 24 constituants. Le profil chromatographique de ce copal est dominé par la présence d'acides diterpéniques de types labdanes, dont les majeurs sont les acides épéruïque, copalique, cativique, ozique, et kolavénique. Ces acides semblent être des marqueurs de ces copals exsudés par les espèces de la famille des Fabaceae, sous-famille des Caesalpinioideae. L'analyse en Py-CPG-SM n'a pas révélé la présence d'une fraction polymérique ; ceci malgré la présence de l'acide ozique (énantiomère de l'acide communique) qui polymérise, selon plusieurs auteurs. Il semblerait que le copal analysé dans le cadre de ce travail soit un copal frais dont le profil chromatographique ne correspond pas tout à fait à ceux des copals étudiés dans le cadre des objets du patrimoine historique que nous avons en référence ou qui ont été décrits.

A propos des fractions volatiles

Cas de *D. edulis* : les indices de réfraction des huiles essentielles des exsudats de *D. edulis* sont faibles (1,468 à 1,489). Le rendement d'extraction de ces huiles dépend de la fraîcheur de l'exsudat et varie entre 4,66% et 7,84%. Le rendement le plus faible a été obtenu à partir de l'échantillon 17 de Boko-Village (1,74%).

Cette fraction volatile est riche en monoterpènes hydrocarbonés. C'est une particularité des exsudats des espèces de la famille de Burseraceae. Les composés majeurs sont : l' α -pinène, l' α -phellandrène, le limonène, le p-cymène, le γ -terpinène, l' α -terpinène et le terpinèn-4-ol. Si les échantillons contiennent presque les mêmes composés majeurs, on note néanmoins des variations significatives d'un exsudat à un autre. Cela est fonction de la fraîcheur de l'exsudat mais aussi de sa zone géographique. Les propriétés antimicrobiennes bien connues de certains terpènes, par exemple, le terpinèn-4-ol, le γ -terpinène, l' α -pinène et le limonène pourraient justifier son utilisation sous forme de pommade sur les plaies par certains tradipraticiens de la ville d'Owando.

Les analyses en ACP des fractions volatiles des échantillons de *D. edulis* extraits en Hs-SPME, ont montré que les échantillons D₅ (Boko-Village) et D₁₁ (Okouma) sont significativement différents des autres. Le traitement statistique de ces données par la méthode de la classification hiérarchique ascendante nous a permis de classer ses fractions en deux grands groupes. Par ailleurs, la grande variabilité observée n'est pas due à une origine géographique mais plutôt due à la technique d'extraction utilisée (Hs-SPME).

Cas de *G. demeusei* (Harms) J. Léonard : le rendement d'extraction des huiles essentielles du copal Mbaka est très faible (0,02 %). Cette fraction volatile est essentiellement constituée de sesquiterpènes. Les principaux sont : le β -caryophyllène, le trans- α -bergamotène, le cis- α -bergamotène, l' α -humulène et l'oxyde de caryophyllène. La composition chimique de la fraction volatile du copal Mbaka est proche de celle des huiles de copaiba exsudées du tronc des arbres du genre *Copaifera*. L'activité répulsive attribuée au copal Mbaka par la population de la Likouala, lorsqu'il est brûlé, peut être justifiée par sa composition en certains terpénoïdes, comme le β -caryophyllène, l'oxyde de caryophyllène, l' α -pinène, l' α -terpinéol, le limonène, le 1,8-cinéole et terpinèn-4-ol.

L'analyse de cette huile essentielle en GCxGC-MS nous a permis d'identifier 14 composés supplémentaires à l'état de trace : le camphène, la pinocamphone, l' α -terpinène, le 2,3-déhydro-1,8-cinéole, l'allo-ocimène, le 3-isothujanol, le linalol, le p-menth-1-èn-8-ol, l'acétate d'isobornyle, l'hydrate de trans-sesquisabinène, l'époxyde de cis-farnesène, l'alcool

de β -caryophyllène, l' α -cubébène, et l'épi- β -bisabolol. Cela illustre bien l'intérêt de cette technique chromatographique pour caractériser spécifiquement les substances naturelles.

Du point de vue caractérisation des colonnes courtes et application en GCxGC-MS, les résultats préliminaires obtenus ont montré que :

- la variation de T_R d'une colonne longue à une colonne courte a été de 3°C au maximum ; cela signifie que l'épaisseur moyenne de film de phases stationnaires n'est pas la même pour les colonnes de grande longueur par rapport aux colonnes courtes que l'on obtient en les coupant ;
- bien que les valeurs de T_R obtenue à pression constante soient toujours supérieures à celles obtenues à vitesses constantes, les valeurs de l'épaisseur de film d'une même colonne courte ont été trouvées identiques dans les deux modes.

La méthodologie mise en place a permis de comparer les épaisseurs de film des colonnes courtes à utiliser en deuxième dimension d'un appareillage de GCxGC et en chromatographie gazeuse ultra rapide. Ces résultats nous ont permis de sélectionner deux colonnes équivalentes pour des essais en GCxGC.

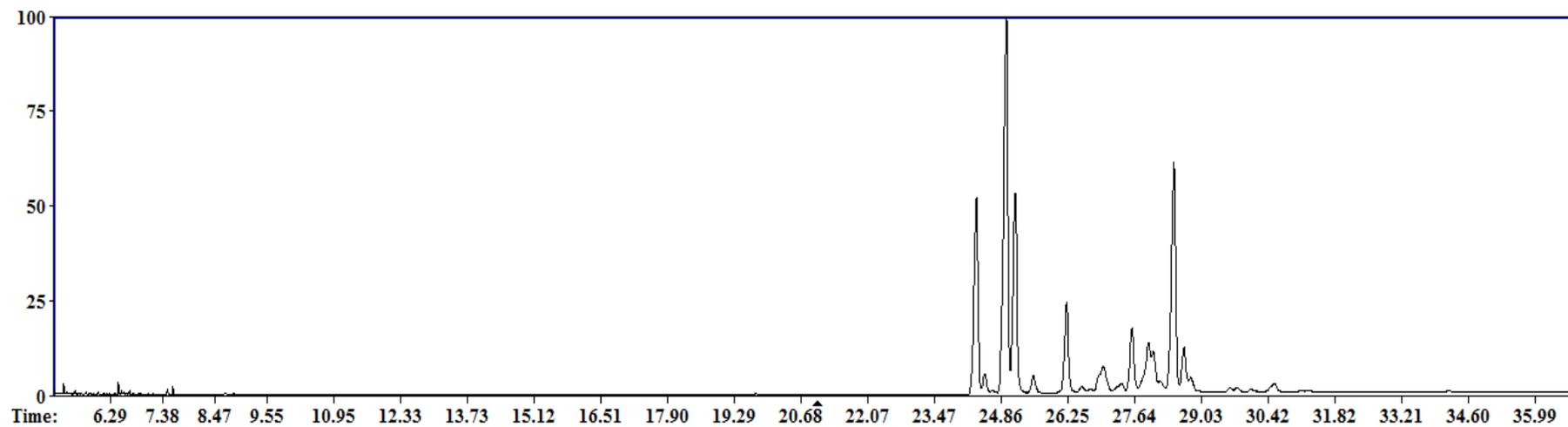
Les cartes chromatographiques de l'extrait volatil de copal Mbaka sur les deux colonnes montrent des légères différences qui, en conséquence de cette étude, peuvent être attribuées à un décalage de temps d'injection lors du transfert dans la deuxième dimension et non pas à la nature des deux colonnes.

Perspectives

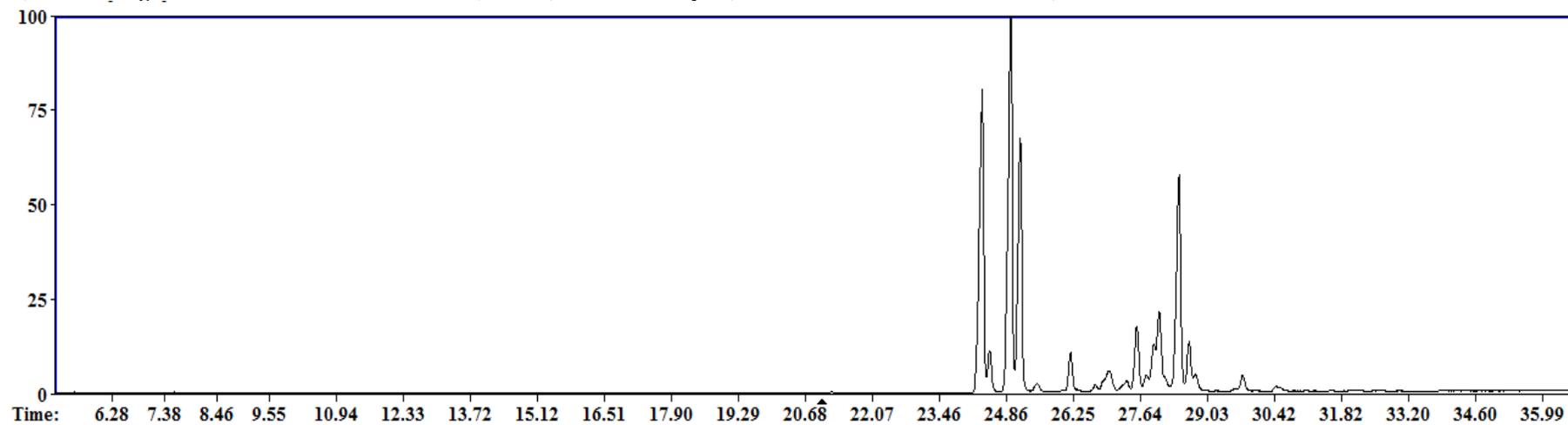
Nous envisageons :

- de poursuivre les études de caractérisation des colonnes courtes utilisées en GCxGC-MS, afin de déterminer les causes de la non-répétabilité des cartes 2D ;
- de confronter les résultats des épaisseurs de film déterminés par le test de Grob avec ceux mesurés à partir de la microscopie électronique à balayage ;
- de poursuivre les enquêtes ethnobotaniques afin de couvrir tout le territoire national ; de faire des tests pour confirmer l'activité insecticide de l'exsudat de type copal de *G. demeusei* (Harms) J. Léonard ;
- d'évaluer l'activité antimicrobienne et antibactérienne des exsudats de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam.

ANNEXES



a) Chromatogramme de l'exsudat de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam silylé (échantillon de forêt de Mbémbe)



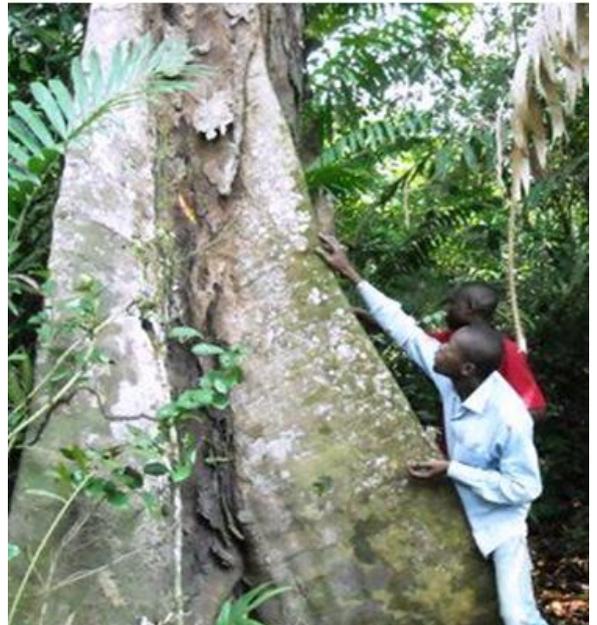
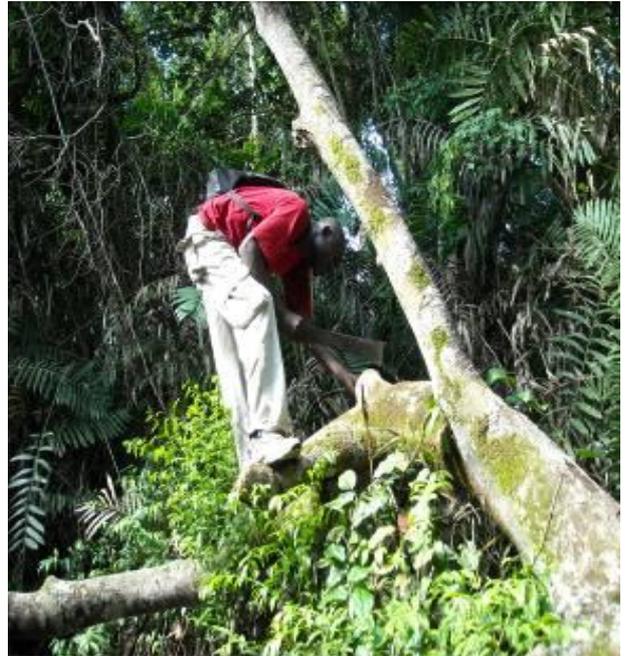
b) Chromatogramme de l'exsudat de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam silylé (échantillon d'Okouma)

La liste des variables d'origine X pour une corrélation (X, t) supérieure à 0,90

Var ID (Primary)	Var ID (row m/z)	Var ID (row retention time)	M2.p[1]	M2.p{corr}[1]	Var ID (Primary)	Var ID (row m/z)	Var ID (row retention time)	M2.p[1]	M2.p{corr}[1]	
	452	219.342	24.3279	0.0409666		274	136.244	24.948	0.0400003	0.90978
	114	94.15	24.3289	0.040905		473	272.348	24.948	0.0405273	0.921766
	448	218.342	24.3289	0.0413333		216	122.242	24.9483	0.0405701	0.92274
	456	220.333	24.329	0.0402563		316	149.24	24.9483	0.0405345	0.921931
	273	136.245	24.3299	0.0399967		360	169.217	24.9484	0.0397801	0.904771
	422	203.25	24.3301	0.0405167		231	125.245	24.9485	0.040994	0.93238
	180	111.242	24.3309	0.0402419		301	146.232	24.9485	0.0406395	0.924318
	471	271.347	24.3312	0.0415856		544	183.243	24.9486	0.0408933	0.93009
	285	138.242	24.8798	0.0403907		668	65.1452	24.9488	0.0406031	0.923491
	381	177.237	24.94	0.0408112		279	137.244	24.9488	0.0405326	0.921888
	27	61.1452	24.9424	0.0408073		662	407.45	24.9489	0.040042	0.910728
	292	144.156	24.9439	0.0404817		372	175.25	24.949	0.0403797	0.91841
	138	103.147	24.9441	0.0405989		378	176.25	24.949	0.0401247	0.912609
	93	83.15	24.9449	0.0401155		449	218.34	24.949	0.0405207	0.921616
	135	101.147	24.9449	0.040301		423	203.25	24.9493	0.0406709	0.925032
	60	75.15	24.9456	0.0405082		288	143.15	24.95	0.0403708	0.918207
	232	128.15	24.9456	0.0401861		352	162.245	24.95	0.0402773	0.916082
	2	41.15	24.9458	0.040138		57	74.15	24.9502	0.0404706	0.920476
	48	73.15	24.9458	0.0405363		185	115.147	24.9505	0.0402351	0.915122
	79	80.15	24.9461	0.0400655		194	118.168	24.9507	0.0404824	0.920746
	746	85.1532	24.9461	0.0403809		565	499.49	24.9509	0.0405903	0.923201
	115	94.15	24.9461	0.0406325		670	71.15	24.9514	0.0405394	0.922043
	355	163.237	24.9461	0.0404911		492	408.45	24.9514	0.0400212	0.910254
	149	106.15	24.9466	0.0405913		439	211.25	24.9519	0.0399726	0.90915
	189	117.15	24.9466	0.0399221		340	159.244	24.9527	0.0403357	0.917409
	196	119.15	24.9466	0.0405125		103	92.15	24.9536	0.040502	0.921191
	222	123.244	24.9466	0.040471		181	111.245	24.9539	0.0410385	0.933393
	472	271.347	24.9466	0.0403541		286	142.155	24.9539	0.0399778	0.909268
	26	59.1452	24.9468	0.0403056		343	160.245	24.9539	0.0398783	0.907005
	252	132.168	24.9468	0.0406995		747	187.248	24.9539	0.0399324	0.908236
	312	148.242	24.9468	0.0405844		11	45.1427	24.9541	0.0402621	0.915734
	331	155.15	24.9468	0.0400445		23	57.15	24.9541	0.0402368	0.915159
	120	95.15	24.9471	0.0408202		366	173.25	24.9541	0.0400639	0.911227
	161	108.153	24.9471	0.0406037		8	43.15	24.9546	0.0400314	0.910489
	228	124.247	24.9471	0.0403475		296	145.15	24.9561	0.0407479	0.926783
	346	161.241	24.9471	0.040723		246	131.15	24.9568	0.04042	0.919326
	453	219.342	24.9471	0.0405865		89	82.15	24.9607	0.0410176	0.932918
	498	29.1532	24.9473	0.0404148		132	97.1677	24.9643	0.0411458	0.935833
	69	77.1468	24.9473	0.0408794		721	138.25	24.9733	0.0410345	0.933302
	83	81.15	24.9473	0.0410055		469	257.345	24.9748	0.0399933	0.909621
	204	120.153	24.9473	0.0406317		428	204.25	24.9772	0.0405332	0.9219
	235	129.15	24.9473	0.040882		73	79.15	24.9789	0.0411798	0.936607
	260	134.24	24.9473	0.0401616		129	96.15	24.9821	0.041109	0.934997
	324	150.25	24.9473	0.0409141		328	151.25	24.986	0.0411807	0.936628
	385	185.247	24.9473	0.0401638		950	79.15	24.9916	0.0410599	0.933881
	556	258.345	24.9474	0.04023		208	121.179	24.9916	0.0409911	0.932316
	255	133.15	24.9475	0.0406576		337	158.234	24.9967	0.0404535	0.920088
	141	105.15	24.9476	0.0404896		395	189.25	25.0052	0.0410993	0.934777
	304	147.237	24.9476	0.040732		973	393.45	25.013	0.0398911	0.907296
	334	157.15	24.9476	0.0401541		168	109.234	25.0234	0.0400678	0.911316
	15	55.15	24.9478	0.0407081		107	93.15	25.0237	0.0410052	0.932635
	40	69.15	24.9478	0.0407991		975	151.245	25.0545	0.0407346	0.92648
	152	107.15	24.9478	0.0408221		635	185.244	28.4415	0.0400103	0.910009
	266	135.24	24.9478	0.0407697		187	115.15	28.4578	0.0398675	0.906761
	402	190.25	24.9478	0.040625						
	476	279.339	24.9478	0.0398298						
	443	215.25	24.9479	0.0406434						
	457	220.343	24.9479	0.0405098						
	97	91.15	24.948	0.0406282						

ANNEXE 3

Collecte des exsudats d'arbres d'origine botanique certifiée lors de nos enquêtes ethnobotaniques



INVENTAIRE ET ANALYSE CHIMIQUE DES EXUDATS DES PLANTES D'UTILISATION COURANTE AU CONGO-BRAZZAVILLE

Résumé



Les exsudats des plantes sont des substances naturelles complexes. Ils sont utilisés par plusieurs populations d'Afrique et trouvent de nombreuses applications : en thérapeutique, en pharmacie galénique, en parfumerie, etc. Au Congo, une grande majorité de ces substances est encore mal connue. Ce travail de thèse a consisté à inventorier les plantes à exsudats du Congo et à mettre au point une méthodologie d'analyse physico-chimique permettant la caractérisation des exsudats d'arbres d'origine botanique certifiée.

La méthodologie d'inventaire adoptée nous a permis de recenser 135 plantes à exsudats appartenant à 87 genres. Il en ressort de cette étude que les exsudats des plantes inventoriées ont plusieurs usages (glu, insectifuge, allume-feu, antidouleur, etc.).

La stratégie mise en place pour leur caractérisation fait appel à plusieurs techniques analytiques (SPIR, SMIR, CPG-SM, GCxGC-MS) et de traitements d'échantillon (Hs-SPME, hydrodistillation, extraction au Soxhlet, silylation, méthylation, pyrolyse).

Dans le cadre de ce travail deux exsudats ont été caractérisés. Il en ressort que l'exsudat de *D. edulis* (G. Don) K.J. Lam est constitué de monoterpènes hydrocarbonés et de triterpènes, dont les majeurs sont : 3-épi- α et - β -amyrine alors que celui de *G. demeusei* (Harms) J. Léonard est constitué essentiellement de sesquiterpènes et d'acides diterpéniques de type labdane (acide éperuique, cativique, copalique, ozique, etc.).

Par ailleurs, face à la complexité des exsudats nous avons cherché à exploiter le pouvoir séparatif plus puissant de la GCxGC-MS. Au cours de ces analyses, il s'est posé le problème de la non-répétabilité des chromatogrammes en 2D. Pour résoudre ce problème supposé provenir des colonnes courtes utilisées en 2^{ème} dimension, nous avons mis en place une méthodologie permettant de vérifier l'épaisseur de film et l'homogénéité des dépôts de phases stationnaires afin de sélectionner des colonnes courtes identiques pour la GCxGC. Cependant, les résultats préliminaires ont montré que même avec des colonnes de deuxième dimension identiques, on pouvait avoir des cartes chromatographiques différentes en 2D.

Mots clés : exsudat, triterpènes, acides diterpéniques, hydrodistillation, Hs-SPME, SPIR, SMIR, CPG-SM, GCxGC-MS

INVENTORY AND CHEMICAL ANALYSIS OF EXUDATES FROM PLANTS COMMONLY USED IN THE REPUBLIC OF CONGO-BRAZZAVILLE

Summary

Plant exudates are natural complex substances. They are used by several populations in Africa and have many applications: in therapeutics, in galenic pharmacy, in perfumery, etc. In Congo, a great majority of these substances are not yet well known. This thesis work aimed to make an inventory of plant exudates from Congo and to develop a methodology for performing physico-chemical analysis which may enable characterization of exudates from botanical certified trees.

Through the methodology that we developed, 135 plant exudates belonging to 87 genera were registered. It was observed in this study that these exudates are used for many purposes (glue, insect repellent, making fire, anti-pain, etc).

The strategy implemented for characterizing the exudates included several analytical (SPIR, SMIR, GC-MS, GCxGC-MS) and sample processing (Hs-SPME, hydrodistillation, extraction using the Soxhlet, silylation, methylation pyrolyse) techniques.

With regard to this work, two exudates were characterized. It was found that the exudate from *D. edulis* (G. Don) K.J. contains monoterpene hydrocarbons and triterpenes, with the major constituents being: 3-epi- α and - β -amyrine, while the exudate from *G. demeusei* (Harms) J. Léonard mainly contains sesquiterpenes and the labdane-type diterpenic acids (eperuique acid, cativique acid, copalique acid, ozique acid, etc).

Besides that, faced with the complexity of the exudates, we tried to explore the elevated resolving power of the GCxGC-MS. But, during the analyses, we faced some problems related to the non-repeatability of chromatogramme in 2D. In order to resolve these problems which were probably due to the use of different two-dimensional short columns, we put in place a methodology which makes it possible to verify the film thickness and homogeneity of layers of stationary phases so as to select identical short columns for GCxGC. However, the preliminary results have shown that even when using identical short columns, we still observed differences in 2D chromatographic cards.

Keywords: exudate, triterpens, diterpenic acids, hydrodistillation, Hs-SPME, SNIR, SMIR, GC-MS, GCxGC-MS

Laboratoire d'Etude des Techniques et Instruments d'Analyse Moléculaire (LETIAM), IUT Orsay
Bâtiment 602 - Rue Noetzlin 91405 Orsay .
Unité de Chimie du Végétal et de la Vie, Faculté des Sciences et Techniques – Université Marien
NGOUAB. BP. 69, Brazzaville – Congo.