

## TABLE DES MATIERES

<b>GLOSSAIRE</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>XI</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>1</b>

**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

<b>I. GENERALITES SUR LES HUILES ESSENTIELLES</b> .....	<b>5</b>
<b>I.1. Définitions</b> .....	<b>5</b>
<b>I.2. Fonctions biologiques des huiles essentielles</b> .....	<b>5</b>
<b>I.3. Rôles et localisation chez la plante</b> .....	<b>5</b>
<b>I.4. Constituants chimiques</b> .....	<b>6</b>
I.4.1. Les terpénoïdes .....	6
I.4.2. Les composés aromatiques. ....	6
I.4.3. Les composées d'origines diverses.....	7
<b>I.5. Toxicité des huiles essentielles</b> .....	<b>7</b>
<b>I.6. Utilisations des huiles essentielles</b> .....	<b>7</b>
I.6.1. En parfumerie .....	7
I.6.2. En cosmétologie.....	7
I.6.3. En industrie alimentaire .....	8
I.6.4. En thérapeutique .....	8
I.6.5. Autres usages .....	8
<b>I.7. Les différentes méthodes d'extraction des huiles essentielles</b> .....	<b>8</b>
I.7.1. Méthodes d'extraction classique.....	8
I.7.1.1. L'hydrodistillation.....	8
I.7.1.2. L'hydrodiffusion.....	9
I.7.1.3. L'enfleurage .....	9
I.7.1.4. L'expression .....	9
I.7.2. Les méthodes d'extraction modernes .....	9
I.7.2.1. L'extraction par fluide supercritique.....	9
I.7.2.2. La distillation assistée au four à micro-ondes .....	10
I.7.2.3. L'extraction par des solvants organiques volatils .....	10

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

<b>I. INTRODUCTION</b> .....	<b>13</b>
<b>II. MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>13</b>
<b>II.1. Matériels</b> .....	<b>13</b>
II.1.1. Le matériel végétal.....	13
II.1.1.1. Classification.....	13
II.1.1.2. Description botanique.....	14
II.1.1.3. Description du genre <i>Ocotea</i> .....	14
II.1.1.4. Description de l'espèce <i>Ocotea laevis</i> Kost.....	14
II.1.1.5. Distribution géographique.....	15
II.1.1.6. Date et lieu de récolte.....	15
II.1.1.7. Conservation du matériel végétal.....	16
II.1.2. Les produits chimiques.....	16
<b>II.2. Méthodes</b> .....	<b>16</b>
II.2.1. Méthode d'extraction : l'hydrodistillation.....	16
II.2.1.1. Principe.....	16
II.2.1.2. Mode opératoire.....	16
II.2.2. Calcul du rendement.....	17
II.2.3. Méthodes de caractérisation physique.....	17
II.2.3.1. Détermination de la densité relative.....	17
II.2.3.1.1. Définition.....	17
II.2.3.1.2. Mode opératoire.....	18
II.2.3.1.3. Calcul de la densité relative.....	18
II.2.3.2. Détermination de l'indice de réfraction.....	19
II.2.3.2.1. Définition.....	19
II.2.3.2.2. Mode opératoire.....	19
II.2.3.2.3. Calcul de l'indice de réfraction.....	19
II.2.3.3. Détermination du pouvoir rotatoire.....	20
II.2.3.3.1. Définition.....	20
II.2.3.3.2. Mode opératoire.....	20
II.2.3.3.3. Calcul du pouvoir rotatoire.....	20
II.2.4. Méthodes de caractérisation chimique.....	21
II.2.4.1. Détermination de l'indice d'acide (IA).....	21
II.2.4.1.1. Définition.....	21

II.2.4.1.2. Mode opératoire.....	21
II.2.4.1.3. Calcul de l'indice d'acide (IA).....	21
II.2.4.2. Détermination de l'indice d'ester.....	21
II.2.4.2.1. Définition.....	21
II.2.4.2.2. Mode opératoire.....	21
II.2.4.2.3. Calcul de l'indice d'ester (IE).....	22
II.2.4.3. Evaluation de la miscibilité à l'éthanol.....	22
II.2.4.3.1. Mode opératoire.....	23
II.2.4.4. Caractères organoleptiques.....	23
II.2.4.5. Criblage phytochimique de l'extrait des écorces d' <i>Ocotea laevis</i> Kost. 23	
II.2.4.5.1. Préparation des extraits à analyser.....	23
II.2.4.5.2. Détection des alcaloïdes (Tests de Mayer, Wagner, Dragendorff)24	
a) Test de Mayer.....	24
b) Test de Wagner.....	24
c) Test de Dragendorff.....	25
II.2.4.5.3. Détection des saponosides (Test de mousse).....	25
II.2.4.5.4. Détection des tanins et polyphénols (Test à la gélatine).....	25
a) Test à la gélatine.....	25
b) Test à la gélatine salée.....	25
c) Test au chlorure ferrique.....	25
II.2.4.5.5. Détection des flavonoïdes et leucoantocyanes (Test de WILLSTATTER).....	26
II.2.4.5.6. Détection des désoxyoses (Test de KELLER-KILIANI).....	26
II.2.4.5.7. Détection des stéroïdes et triterpènes.....	26
II.2.4.5.8. Détection des stérols insaturés (Test de SALKOWSKI).....	26
II.2.4.5.9. Détection des iridoïdes.....	25
II.2.4.6. Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	27
II.2.4.6.1. Principe.....	27
II.2.4.6.2. Mode opératoire.....	27
<b>III. RESULTATS.....</b>	<b>29</b>
<b>III.1. Cinétique d'extraction de l'huile essentielle.....</b>	<b>29</b>
<b>III.2. Rendement de l'huile essentielle.....</b>	<b>29</b>
<b>III.3. Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle.....</b>	<b>30</b>
III.3.1. Densité relative.....	30
III.3.2. Indice de réfraction.....	30
III.3.3. Pouvoir rotatoire.....	30

III.3.4. Indice d'acide .....	31
III.3.5. Indice d'ester .....	31
III.3.6. Miscibilité à l'éthanol .....	31
III.3.7. Caractéristiques organoleptiques .....	31
<b>III.4. Résultats du criblage phytochimique de la poudre des écorces d'<i>Ocotea laevis</i> Kost.....</b>	<b>31</b>
<b>III.5. Résultat de l'analyse chimique de l'huile essentielle par CPG/DIF .....</b>	<b>32</b>
<b>IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....</b>	<b>34</b>
<b>DEUXIEME PARTIE : ETUDE BIOLOGIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE</b>	
<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>38</b>
<b>II. MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>38</b>
<b>II.1. Matériels .....</b>	<b>38</b>
II.1.1. Matériels biologiques .....	38
II.1.1.1. Les souris (animaux à sang chaud) .....	38
II.1.1.2. Les larves de moustique (animaux à sang froid) .....	38
II.1.1.3. Les microorganismes .....	38
II.1.1.3.1. Les souches de bactéries .....	38
II.1.2. Matériels de laboratoire .....	38
II.1.2.1. Les milieux de culture microbienne utilisée .....	38
II.1.2.2. Les disques d'antibiogramme .....	39
II.1.2.3. La verrerie .....	39
<b>II.2. Méthodes.....</b>	<b>40</b>
II.2.1. Tests de toxicité aiguë .....	40
II.2.1.1. Principe.....	40
II.2.1.2. Mode opératoire .....	40
II.2.2. Test sur les larves de moustique .....	40
II.2.2.1. Principe.....	40
II.2.2.2. Mode opératoire .....	40
II.2.3. Tests d'activité antibactérienne .....	41
II.2.3.1. Stérilisation.....	41
II.2.3.2. Méthode des disques en milieu solide ou aromatoigramme .....	42
II.2.3.2.1. Principe .....	42
II.2.3.2.2. Mode opératoire.....	42
II.2.3.3. Evaluation de la concentration minimale inhibitrice en milieu solide ...	43

---

---

II.2.3.3.1. Principe .....	43
II.2.3.3.2. Mode opératoire.....	43
<b>III. RESULTATS .....</b>	<b>45</b>
<b>III.1. Toxicité aiguë sur souris .....</b>	<b>45</b>
<b>III.2. Effets sur les larves de moustique.....</b>	<b>45</b>
<b>III.3. Résultats des tests d'activité antibactérienne de l'huile essentielle .....</b>	<b>46</b>
III.3.1. Aromatogramme .....	46
III.3.2. CMI en milieu solide.....	46
<b>IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS .....</b>	<b>48</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>50</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ET WEBOGRAPHIQUES .....</b>	<b>52</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>ı</b>
<b>RESUME</b>	

---

---

## GLOSSAIRE

**Absolue** : concentré obtenu à partir d'une concrète ou d'un résinoïde.

**Anti-infectieux** : qui permet de lutter contre l'infection.

**Anti-inflammatoire** : qui combat l'inflammation.

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

**Antispasmodique** : qui peut combattre les spasmes musculaires.

**Antitussif** : qui calme la toux.

**Anxyolitique** : médicament destiné à traiter les symptômes psychologique ou somatique de l'anxiété

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

**Arbrisseau** : plante ligneuse à tiges ramifiées dès la base et en général de moins d'un mètre.

**Aromathérapie** : utilisation des huiles essentielles à des fins thérapeutiques.

**Aromatogramme** : technique d'exploration, de mesure de l'activité antibiotique, bactéricide et antiseptique des huiles essentielles.

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

**Biogénétique** : partie de la biologie qui a pour objet de rechercher et de reconstituer les conditions atmosphériques, physiques et chimiques qui ont permis l'apparition de la vie sur la terre.

**Carcinogénèse** : ensemble de phénomènes transformant une cellule normale en une cellule cancéreuse.

**Carminatif** : aliment qui favorise l'expulsion des gaz intestinaux, tout en réduisant leur production.

**Concrète** : produit solide ou semi-solide obtenu en distillant des matières parfumées végétales fraîches ou fanées (fleurs, feuilles,...), naturelles par des solvants volatils.

**Convulsion** : contraction involontaire et saccadée des muscles.

**Déprédateur** : animal qui commet des dégâts sur une plante ou des denrées, le plus souvent dans le but de se nourrir.

**Dermocausticité** : forte irritation, voire des brûlures de la peau.

**Diurétique** : substance qui augmente la production d'urine.

**Essence** : substance aromatique naturelle que la plante sécrète dans ses organes producteurs.

**Expectorant** : médicament ou herbe qui augmente l'expulsion du mucus de la trachée ou des bronches.

**Fluidifiant** : tout agent supposé être capable d'augmenter la fluidité d'un épanchement ou d'un produit de sécrétion pour en favoriser la résorption ou l'élimination.

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

**Mélanogenèse** : synthèse de la mélanine par les mélanocytes.

**Oblong** : plus long que large et à bords plus ou moins parallèles.

**Oléorésine** : produit visqueux insoluble dans l'eau.

**Organooleptique** : qui agit sur la perception sensorielle : goût, odeur, couleur, aspect, consistance.

**Pharmacopée** : recueil officiel, contenant une description des médicaments et notamment la formule et le mode de préparation.

**Phototoxicité** : photosensibilisation qui consiste en une réaction cutanée survenant lors de l'exposition à la lumière.

**Phytothérapie** : médecine fondée sur les extraits de plantes et les principes actifs naturels.

**Résinoïde** : extrait d'une matière végétale sèche obtenu par extraction à l'aide d'un solvant volatil et non aqueux.

**Sédatif** : substance qui a une action dépressive sur le système nerveux central et qui entraîne un apaisement, une relaxation, une réduction de l'anxiété, une somnolence, un ralentissement de la respiration et une diminution des réflexes.

**Tonifiant** : remède tonique, propre à redonner des forces physiques.

## LISTE DES ABREVIATIONS

**AFNOR** : Association Française de Normalisation

**ATTC** : American Type Culture Collection

**CFU** : Colonies Formant Unité

**CL<sub>50</sub>** : Concentration Létale 50%

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**CNRE** : Centre National de Recherche sur l'Environnement

**CPG** : Chromatographie en Phase Gazeuse

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

**d** : Densité relative à 20°C

**DL<sub>50</sub>** : Dose Létale à 50 %

**ED** : Eau Distillée

**HE** : Huile Essentielle

**IA** : Indice d'Acide

**IE** : Indice d'Ester

**IPM** : Institut Pasteur de Madagascar

**LABASM** : Laboratoire de Biochimie Appliquées aux Sciences Médicales

**min** : Minute

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**ppm** : Partie par million

**VMHD** : Vacuum Microwave Hydrodistillation

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : <i>Ocotea laevis</i> Kost .....	14
a) Pied .....	14
b) Rameau feuillu .....	14
<b>Figure 2</b> : Répartition géographique d' <i>Ocotea laevis</i> Kost.....	15
<b>Figure 3</b> : Appareil de type CLEVINGER (essencier pour huiles légères) .....	17
a) Photo.....	17
b) Schéma .....	17
<b>Figure 4</b> : Balance de mesure de la masse de l'HE .....	18
<b>Figure 5</b> : Réfractomètre KRÜSS OPTRONIC GERMANY .....	19
<b>Figure 6</b> : Polarimètre KRÜSS OPTRONIC GERMANY .....	20
<b>Figure 7</b> : Schéma du dispositif de la CPG .....	28
<b>Figure 8</b> : Teneur de l'huile essentielle des écorces d' <i>Ocotea Laevis</i> Kost .....	29
<b>Figure 9</b> : Aromatogramme de l'huile essentielle sur <i>Clostridium perfringens</i> .....	46

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Cinétique d'extraction de l'huile essentielle des écorces d' <i>Ocotea laevis</i> Kost..	29
<b>Tableau 2</b> : Rendement de l'huile essentielle des écorces d' <i>Ocotea laevis</i> Kost.....	29
<b>Tableau 3</b> : Densité relative de l'huile essentielle.....	30
<b>Tableau 4</b> : Indice de réfraction de l'huile essentielle.....	30
<b>Tableau 5</b> : Indice d'acide de l'huile essentielle .....	31
<b>Tableau 6</b> : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle des écorces d' <i>Ocotea laevis</i> Kost.....	31
<b>Tableau 7</b> : Résultat du criblage phytochimique de la poudre des écorces d' <i>Ocotea laevis</i> Kost. ....	32
<b>Tableau 8</b> : Constituants chimiques de l'huile essentielle .....	33
<b>Tableau 9</b> : Indices physiques et chimiques de l'huile essentielle des écorces d' <i>Ocotea laevis</i> Kost et de deux autres huiles essentielles.....	34
<b>Tableau 10</b> : Les souches de bactéries utilisées pour les tests d'activité antibactérienne et leurs caractéristiques.....	39
<b>Tableau 11</b> : Normes utilisées pour les tests de sensibilité des microorganismes .....	43
<b>Tableau 12</b> : Les concentrations correspondant aux dilutions effectuées .....	44
<b>Tableau 13</b> : Activité larvicide de l'huile essentielle .....	45
<b>Tableau 14</b> : Sensibilité des 7 souches testées à l'huile essentielle d' <i>Ocotea laevis</i> Kost .....	46
<b>Tableau 15</b> : Effets des différentes concentrations de l'huile essentielle sur <i>Clostridium perfringens</i> .....	47

An aerial photograph of a lush, green landscape. A river flows through the center, with a waterfall cascading into it. The surrounding terrain is covered in dense vegetation. The image is framed by a dark blue border with rounded corners.

# Introduction générale

## INTRODUCTION GENERALE

Depuis des millénaires, l'homme qui vit côte à côte avec les plantes est habitué à les consommer pour leurs propriétés nutritives et médicinales. Actuellement, les produits naturels d'origine végétale présentent un grand intérêt comme matière première destinée aux différents secteurs d'activité tels que : la cosmétique, la pharmacie, l'agroalimentaire, le phytosanitaire et l'industrie (SELLES, 2012).

Ainsi, le monde végétal est une source de nombreux produits utiles, dont en particulier les remèdes. « C'est aux plantes que la médecine dès son berceau a emprunté la plupart de ses remèdes » (PETITJEAN, 1996).

Selon l'estimation de l'OMS, environ 80% de la population mondiale ont essentiellement recours à la médecine traditionnelle pour satisfaire ses besoins en soins de santé primaire (WHO, 1986).

A présent, entre 20 000 et 25 000 plantes sont utilisées dans la pharmacopée humaine où 75% des médicaments ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins une molécule active d'origine végétale (ADOSSIDES, 2003).

Parmi les nombreuses plantes médicinales malgaches, citons :

- *Ravensara sp* (LAURACEES) utilisée comme antitussif (RAZAFINDRAMBAO *et al.*, 1971) ;
- *Cynosorchis sp* (ORCHIDACEES) utilisée contre les brûlures : application de la poudre, nature ou sous forme de pommade ;
- *Cassytha filiformis* L. (LAURACEES) : contre la blennorragie, pour conjurer les mauvais sorts ;
- *Mollugo nudicaulis* Lamarck & Poiret (MOLLUGINACEES) ou « aferontany » : la décoction ou l'infusion de la plante entière est utilisée dans le traitement de la blennorragie et de la coqueluche (antitussif) ; la plante exerce également une action apéritive et anabolisante (RAKOTO RATSIMAMANGA *et al.*, 1969).

Considéré par tous les scientifiques comme un sanctuaire de la nature, Madagascar dispose d'une flore endémique riche. Il a la particularité d'avoir une terre très fertile où tout pousse. L'île comporte 80% à 90% d'espèces endémiques parmi toutes les plantes répertoriées. Du fait de sa situation isolée en plein océan Indien, Madagascar a vu prospérer de nombreuses espèces de plantes et d'animaux. Le niveau d'endémisme est tel qu'on n'y trouve pas moins de douze familles entières de plantes uniquement présentes sur l'île. Cette biodiversité endémique est également due à une variété des climats : des régions les plus

arides aux régions saturées en humidité (<https://madagascar-tourisme.com/fr/vos-envies/faune-et-flore/plantes-endemiques>).

Selon l'Association de Normalisation Française (AFNOR, 1992), les huiles essentielles (HE) sont des produits volatils et odorants, de composition généralement assez complexe, contenus dans divers organes des plantes : fleurs, feuilles, tiges, bois, racines. Elles possèdent un pouvoir thérapeutique et diverses activités biologiques intéressantes telles que les propriétés antibactériennes, antifongiques, larvicides, insecticides, antioxydantes, anti-inflammatoires, antiseptiques, antivirales, antitoxiques, tonifiantes, stimulantes, calmantes, etc. (NICOLAS, 1991 ; MISHARA et DUBEY, 1994 ; NOUDOGBESSI *et al.*, 2008).

Voici quelques exemples de propriétés thérapeutiques connues des huiles essentielles :

- *Ravensara aromatica* (LAURACEES) utilisée pour ses propriétés anti-infectieuses;
- *Laurus nobilis* ou laurier noble (LAURACEES) utilisée comme tonifiant, anti-infectieux et anti-inflammatoire ;
- *Zingiber officinalis* ou gingembre (ZINGIBERACEES) utilisée comme stimulant digestif, carminatif et antalgique en application externe (ROULIER, 1990).

Les études effectuées sur les plantes aromatiques sont assez récentes pour le Laboratoire de Biochimie Appliquée au Sciences Médicales (LABASM, Faculté des Sciences à l'Université d'Antananarivo). De ce fait, le premier travail de caractérisation a eu lieu en 2007 avec une étude sur *Piper pyrifolium* (PIPERACEES), (RASOAMAHENINA, 2007). Par la suite, de nombreux travaux ont été effectués.

On peut citer ceux réalisés sur :

- *Ocotea laevis* Kost (LAURACEES), (RAZAFINDRAKOTO, 2010).
- *Ocotea zahamenensis* (LAURACEES), (MOHAMED, 2011) ;
- *Polyscias ornifolia* (ARALIACEES), (RATSIMANOHIRA, 2011) ;
- *Ocotea cymosa* (LAURACEES), (SEHENOASPIERA, 2011) ;
- *Ocotea auriculiformis* Kost (LAURACEES), (ANDRIANANTENAINA, 2012) ;
- *Senecio hirto-crassus* (ASTERACEES), (RAZAFIMAHARAVO, 2015) ;
- *Apodocephala pauciflora* (ASTERACEES), (MINIMINY, 2016) ;
- *Helichrysum ibityense* (ASTERACEES), (SADAM, 2017) ;

Pour notre part, le choix s'est fixé sur l'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost pour les raisons suivantes :

- l'endémicité de la plante ;

- les propriétés intéressantes de l'HE de ses feuilles (RAZAFINDRAKOTO, 2010) ;
- l'aromaticité de ses écorces.

Les objectifs spécifiques de notre travail peuvent être présentés comme suit :

- extraire l'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost ;
- déterminer ses propriétés physico-chimiques, ses caractères organoleptiques et sa composition chimique ;
- mettre en évidence l'activité antimicrobienne de l'HE ;
- entreprendre une étude de toxicité sur souris et les larves de moustique ;
- comparer les résultats à ceux obtenus sur l'HE de feuilles.

Le présent mémoire est donc subdivisé en deux grandes parties :

- l'extraction et l'étude physico-chimique de l'HE ;
- l'évaluation de la toxicité sur les animaux à sang chaud et à sang froid et les tests sur les microorganismes.

L'introduction générale suivie d'une synthèse bibliographique sur les HE précèdent ces deux parties et la conclusion ainsi que les perspectives seront présentées à la fin de ce document.



# Synthèse bibliographique

## I. GENERALITES SUR LES HUILES ESSENTIELLES

### **I.1. Définitions**

L'HE se définit comme un mélange de substances parfumées volatiles, sécrété par certains arbres et certaines plantes aromatiques ou plus précisément un extrait concentré et hydrophobe élaboré par des cellules spécialisées localisées dans différentes parties des plantes aromatiques (racines, écorces, feuilles, fruits, fleurs, tiges) (MALHEBIAU, 1994 ; PADRINI et LUCHERONI, 1997 ; RAKOTOMALALA, 2004).

Les plantes aromatiques sont les végétaux odorants contenant des composés volatils pouvant être extraits par divers procédés mécaniques ou chimiques, sous formes d'HE, de concrètes, d'absolues ou d'oléorésines. Il est clair que la nature chimique, la qualité et la quantité de ces produits sont différentes d'une plante à une autre et d'une région à une autre selon les conditions écologiques (RANDRIANJOHANY, 1996).

L'aromathérapie est l'usage des HE des plantes médicinales aromatiques dans un objectif thérapeutique (DURAFFOURD et LAPRAZ, 2002).

### **I.2. Fonctions biologiques des huiles essentielles**

Depuis des siècles, les HE étaient déjà employées pour guérir et prévenir des maladies. De nombreuses études ont montré que l'activité biologique d'une HE est en relation avec ses constituants chimiques ainsi que le groupe fonctionnel majoritaire (LAHLOU, 2004), la structure et les effets synergiques entre les composants (PIBIRI, 2006).

Les principales propriétés des HE connues sont nombreuses, à savoir :

- anti-infectieuses (antibactériennes, antifongiques, antiparasitaires, antiseptiques, insecticides et insectifuges) ;
- anti-inflammatoires ;
- régulatrices du système nerveux (antispasmodiques, calmantes, anxiolytiques, hypnotiques, analgésiques) ;
- dans la respiration (expectorantes et fluidifiantes), la cicatrisation et la circulation (FRANCHOMME *et al.*, 1990).

### **I.3. Rôles et localisation chez la plante**

Les HE permettent aux plantes de s'adapter à leur environnement et assurer leur protection contre les parasites et les déprédateurs (HOUEL, 2011 ; TALEB-TOUDERT, 2015).

Les HE sont produites dans le cytoplasme des cellules. Cependant, elles peuvent être stockées dans divers organes végétaux à savoir : les sommités fleuries (lavande, menthe, ...), dans les feuilles (citronnelle, eucalyptus,...), les rhizomes (gingembre, curcuma,...), dans les fleurs (rose, jasmin...), dans les racines (ail), les fruits (citron) ou les grains (muscade) (BOUTAYEB, 2013).

Parfois l'HE se trouve en liaison glycosidique à l'intérieur des tissus et ne se manifeste que lorsqu'on froisse, écrase, sèche ou distille la plante (SCHAUENBERG *et al.*, 2010).

#### **I.4. Constituants chimiques**

L'étude de la composition chimique des HE révèle qu'il s'agit de mélanges complexes et variables de constituants appartenant exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : les terpénoïdes et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (TEISSEIRE, 1991 ; BOUTAYEB, 2013).

La composition chimique des HE varie encore de façon appréciable avec le milieu et la période de la végétation. Elle peut aussi être modifiée au cours de l'extraction ou durant la conservation (BUSTA et FOEGEDING, 1980 ; JOU *et al.*, 1997).

Les HE peuvent contenir jusqu'à 300 composés différents (BASTIEN, 2008 ; PIOCHON, 2008). En dehors des terpènes, des hydrocarbures, des esters, des lactones, des aldéhydes, des alcools, des acides, des cétones, des phénols, des oxydes et autres peuvent y être trouvés (TEISSEIRE, 1991).

##### **I.4.1. Les terpénoïdes**

Le terme terpène rappelle la toute première extraction de ce type de composé dans l'essence de térébenthine. Dans le cas des HE, seuls les terpènes les plus volatils, c'est-à-dire, ceux dont la masse moléculaire n'est pas élevée sont observés. Ils répondent dans la plupart des cas à la formule générale  $(C_5H_8)_n$ . Suivant les valeurs de n, on distingue les hémiterpènes (n=1), les monoterpènes (n=2), les sesquiterpènes (n=3), les triterpènes (n=6), les tétraterpènes (n=8) et les polyterpènes.

##### **I.4.2. Les composés aromatiques**

Contrairement aux dérivés terpéniques, les composés aromatiques sont moins fréquents dans les HE. Très souvent, il s'agit de l'allyle- et du propénylphénol. Ces composés aromatiques constituent un ensemble important car ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles. Nous pouvons citer en exemple l'eugénol qui est responsable de l'odeur du clou de girofle (TEISSEIRE, 1991).

### **I.4.3. Les composés d'origines diverses**

Compte tenu de leur mode d'extraction, les HE peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraînés lors de l'hydrodistillation. Ces produits peuvent être azotés ou soufrés (TEISSEIRE, 1991).

### **I.5. Toxicité des huiles essentielles**

Une famille biochimique particulière, celle des cétones, est ici visée en particulier car elle présente une neurotoxicité et un risque abortif. La famille des phénols présente un double risque toxique, à savoir la causticité tournée vers la peau et les muqueuses (dermocausticité) et le foie (hépatotoxicité). La précaution à prendre avec les HE contenant des phénols est de ne pas les utiliser par voie cutanée, ni rectale. Seule la voie orale (en gélule ou oléo-capsules) sera possible.

Une autre toxicité concerne l'interférence de certaines molécules aromatiques avec les rayons ultra-violet, pouvant occasionner des risques de phototoxicité. Ce sont les extraits aromatiques contenant des furocoumarines et pyrocoumarines qui sont concernés. Leur application cutanée est contre-indiquée 8 heures avant une exposition aux ultra-violet. Des réactions érythémateuses susceptibles de favoriser la carcinogénèse et l'accélération de la mélanogénèse peuvent laisser des taches irréversibles. Leur utilisation par voie interne est aussi déconseillée (AUDE MAILLARD, 2015) web 1.

### **I.6. Utilisations des huiles essentielles**

Les HE sont considérées comme une matière première destinée à divers secteurs d'activités. Actuellement, parmi les 3 000 HE connues, 300 présentent une importance commerciale (BAKKALI *et al.*, 2008).

#### **I.6.1. En parfumerie**

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

#### **I.6.2. En cosmétologie**

Grâce à leurs propriétés antiseptique et antioxydante, les HE permettent de conserver les produits cosmétiques dans lesquels elles sont incorporées, tout en gardant une odeur agréable comme le cas du basilic et du romarin à propriétés tonifiantes ou du thym à propriété antipelluculaire.

### **I.6.3. En industrie alimentaire**

Les HE servent de condiments (gingembre, poivre). Elles sont aussi utilisées comme suppléments diététiques (MOHAMMEDI, 2006). Elles servent à rehausser le goût et empêcher le développement des contaminants alimentaires (DEMETZOS *et al.*, 1999 ; SCHERER et GODOY, 2009).

### **I.6.4. En thérapeutique**

Les HE possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne. Elles possèdent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques en tant qu'agents antimicrobiens. Le thymol est un antiseptique très irritant, astringent et caustique (EL KALAMOUNI, 2010). Les HE sont largement utilisées pour traiter certaines maladies internes cutanées comme la syphilis et des maladies externes cutanées comme la lèpre (infections d'origine bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux).

### **I.6.5. Autres usages**

En agriculture, les HE sont utilisées pour améliorer l'équilibre biologique des sols, d'où l'amélioration des rendements en même temps que celle de la santé de la plante et de la qualité de la production. Elles servent aussi à protéger les cultures en agissant comme insecticides ou activateurs de croissance. L'HE de *Psidia altissima* ou « dingadingana » est utilisée comme engrais biologique grâce à son apport en N-P-Ca-K (Azote-phosphore-Calcium-Potassium) (JOUHANNEAU, 1991).

## **I.7. Les différentes méthodes d'extraction des huiles essentielles**

Il existe diverses méthodes pour extraire les huiles essentielles (SMADJA, 2001).

### **I.7.1. Méthodes d'extraction classiques**

#### **I.7.1.1. L'hydrodistillation**

L'hydrodistillation est la méthode la plus ancienne connue puisque les Perses l'utilisaient dès 1000 ans avant Jésus-Christ. Néanmoins, en raison de sa relative facilité d'application, cette méthode est encore l'une des plus utilisées actuellement. Elle consiste à immerger le matériel végétal avec des pierres ponce dans de l'eau portée à ébullition. Les vapeurs hétérogènes (vapeurs d'eau et constituants volatils de l'HE) sont condensées dans un circuit de refroidissement et l'HE se sépare de l'eau par différence de densité. Cette eau,

appelée hydrolat, eau florale ou eau de cohobation est imprégnée de l'odeur de l'essence, ce qui signifie que certains composants sont hydrosolubles.

#### I.7.1.2. L'hydrodiffusion

Dans l'hydrodiffusion, la masse végétale est traversée par de la vapeur d'eau du haut vers le bas, à très faible pression. Cette méthode est basée sur l'action osmotique exercée par la vapeur d'eau, libérant l'HE sous forme de mélange hétérogène. Il s'agit d'entraîner les composés volatils avec la vapeur d'eau en utilisant la pesanteur, la gravité favorisant la diffusion de l'HE. Celle-ci est ensuite recueillie au bas de l'alambic. Il faut noter que le produit obtenu par hydrodistillation sera différent de celui obtenu par hydrodiffusion. En plus le rendement est plus élevé pour cette dernière que pour l'hydrodistillation.

#### I.7.1.3. L'enfleurage

Cette technique, comme son nom l'indique, s'applique aux fleurs. Elle permet d'éviter les changements dus à la chaleur et restitue l'odeur des fleurs au plus près. Elle repose sur la capacité qu'ont les corps gras d'absorber les essences et consiste à mettre les pétales en contact avec une huile purifiée qui s'imprègne de l'HE. Les pétales sont régulièrement changés jusqu'à saturation de l'huile. Une fois saturée, cette dernière peut être laissée telle quelle et donner une pommade parfumée ou être traitée avec de l'alcool pour ne laisser qu'un résidu très parfumé appelé « absolue ». Les huiles couramment utilisées sont l'huile d'olive et l'huile d'amande douce.

#### I.7.1.4. L'expression

Cette méthode s'applique uniquement aux épicarpes des fruits de la famille des Rutacées (citron, orange, bergamote, pamplemousse,...). Il s'agit d'exercer une action abrasive sur la surface du fruit, sous un courant d'eau. Les déchets solides sont éliminés et la phase liquide est soumise à une centrifugation qui sépare l'HE de la phase aqueuse (jus de fruit). Dans une variante de ce procédé, les poches sécrétrices sont rompues sous faible pression et l'HE est directement recueillie sans utiliser de l'eau.

### **I.7.2. Les méthodes d'extraction modernes**

#### I.7.2.1. L'extraction par fluide supercritique

Lorsque le CO<sub>2</sub> est soumis à la pression et à une certaine température (31°C), il se trouve dans un état intermédiaire entre l'état liquide et l'état gazeux, c'est l'état supercritique. Il acquiert ainsi les qualités d'un solvant c'est-à-dire l'inertie chimique, la sélectivité et la facilité d'élimination.

Le matériel végétal est traversé par un courant de CO<sub>2</sub> à l'état supercritique, sous pression. L'HE est entraînée par ce courant puis le mélange (CO<sub>2</sub> -HE) est recueilli dans un vase d'expansion où la pression est sensiblement réduite.

Dans ces conditions, le CO<sub>2</sub> s'évapore et il ne reste plus que l'HE. Cette technique est très intéressante du fait que le produit obtenu est très proche de l'essence contenue dans la plante et qu'il ne reste aucune trace résiduelle de solvant.

#### I.7.2.2. La distillation assistée au four à micro-ondes

Cette technique a été mise au point à la fin des années 80. La matière végétale est introduite dans le four et soumise aux micro-ondes. L'eau contenue dans les cellules végétales entre en ébullition et provoque la rupture des tissus, libérant ainsi les composés volatils. Le mélange de vapeur d'eau et d'HE est condensé puis laissé décanter. L'HE est ensuite récupérée.

Il existe deux versions de cette technique :

- la distillation sous micro-ondes à pression atmosphérique qui s'applique aux matériels végétaux à teneur en eau supérieure à 80 % ;
- la distillation sous micro-ondes à pression réduite (VMHD : Vacuum Microwave Hydrodistillation) qui peut s'appliquer aux produits secs ou humides.

#### I.7.2.1. L'extraction par des solvants organiques volatils

Il s'agit d'une extraction solide-liquide entre la matière végétale et le solvant. Elle met en œuvre des solvants comme l'hexane, l'éther de pétrole, le benzène ou le toluène. Cette technique permet de préserver les composés hydrolysables ou thermolabiles contenus dans certaines essences.

Elle se fait soit :

- par simple macération qui consiste en un contact entre le matériel végétal et le solvant ;
- par une extraction au Soxhlet au cours de laquelle il y a contact répété entre le matériel végétal et le solvant, ce dernier étant renouvelé à chaque fois.
- Les produits obtenus sont appelés :
  - « concrètes ou essences concrètes », concentrés aromatiques sous forme cireuse, obtenus à partir de matières végétales fraîches ou de fleurs fanées ;
  - « résinoïdes ou oléorésines » s'ils sont issus de matières végétales sèches.

### **I.8.Travaux anterieurs sur *Ocotea laevis* Kost**

Les propriétés physico-chimiques et biologiques de l'HE de feuilles *d'Ocotea laevis* Kost ont déjà été étudiées.

L'HE a été extraite par la méthode d'hydrodistillation et les rendements d'extraction étaient de 0,77 % et 0,64 % (2 récoltes).

Les caractéristiques physico-chimiques de l'HE ont été évaluées : la densité relative à 20°C était de  $0,9118 \pm 0,0005$  ; l'indice de réfraction de 1,4944 ; l'indice d'acide de 2,8055 ; l'indice d'ester de 12,622 et la miscibilité à l'éthanol de 4,82 : 1 (v/v).

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG) a révélé la présence d'au moins 60 composés dans l'échantillon.

Les tests de toxicité aiguë sur les souris ont montré que l'HE a provoqué des symptômes tels que l'hypoactivité, le traînement des pattes postérieures ainsi que des démangeaisons du museau. Cependant aucune souris n'était morte.

L'HE était toxique pour les larves du moustique *Culex quinquefasciatus*. La  $CL_{50}$  a été estimée à 38,68 ppm.

L'HE a manifesté une activité antibactérienne : 7 souches parmi les 10 testées étaient sensibles. La CMI contre *Vibrio harveyi* a été estimée à 0,57 mg/ml.

Enfin, pour les résultats des tests d'activité antioxydante au DPPH, l' $EC_{50}$  de l'HE était de 416,96 µg/ml contre 2,39 µg/ml pour l'acide ascorbique, un antioxydant de référence (RAZAFINDRAKOTO, 2010).



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

## **I. INTRODUCTION**

Des travaux ont déjà été effectués sur l'HE des feuilles d'*Ocotea laevis* Kost (voir Synthèse bibliographique).

Dans cette première partie de notre travail, l'étude des propriétés physico-chimiques de l'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost a été abordée. Elle comprend la détermination :

- des indices physiques : densité, indice de réfraction et pouvoir rotatoire ;
- des indices chimiques : indice d'acide, indice d'ester et miscibilité à l'éthanol ;
- des caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle ;
- des familles chimiques présentes dans la poudre et l'extrait des écorces ;
- de la composition chimique par la chromatographie en phase gazeuse (CPG-DIF).

## **II. MATERIELS ET METHODES**

### **II.1 MATERIELS**

#### **II.1.1. Le matériel végétal**

##### **II.1.1.1. Classification**

**(KOSTERMANS, 1950)**

La plante appartient au:

**Règne :** Végétal

**Sous-règne :** Métaphytes

**Embranchement :** Spermaphytes

**Sous-embranchement :** Angiospermes

**Classe :** Magnoliopsida

**Ordre :** Laurales

**Famille :** Lauracées

**Genre :** *Ocotea*

**Espèce :** *laevis*

**Auteur :** Kostermans (Kost)

**Nom vernaculaire :** Varongy fotsy

La plante, codée FRLOV002, a été identifiée à herbarium du Parc zoologique et botanique de Tsimbazaza par comparaison avec l'herbier de référence n° 717 établi par Lewis en Octobre 1993 et récolté à Toamasina (forêt littorale au sud du village d'Ambila-Lemaitso).

### II.1.1.2. Description botanique

La figure 1 montre des photos d'un pied et d'un rameau feuillu d'*Ocotea laevis* Kost



a) Pied



b) Rameau feuillu

**Figure 1 :** *Ocotea laevis* Kost

### II.1.1.3. Description du genre *Ocotea*

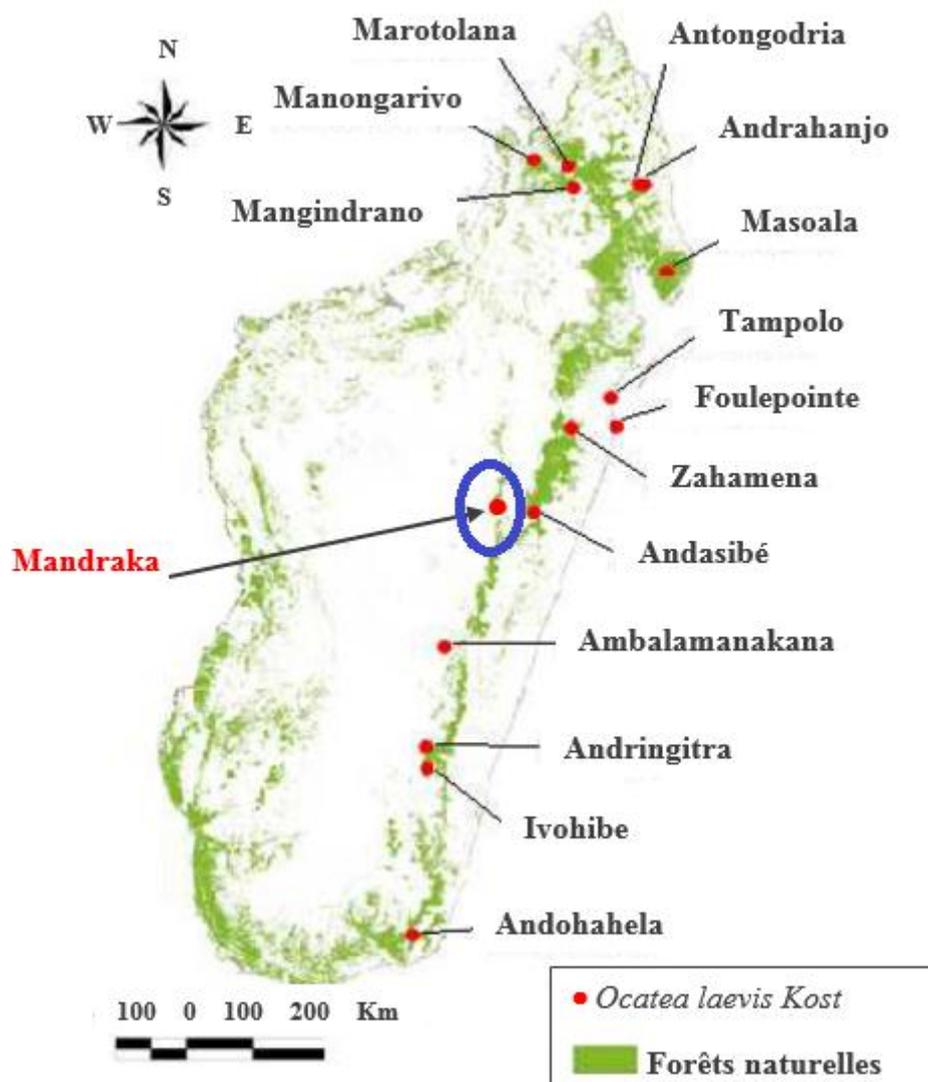
Les plantes du genre *Ocotea* sont des arbres ou des arbrisseaux à feuilles alternes ou opposées, glabres ou poilues. Les fleurs sont hermaphrodites (chez les espèces malgaches) ou dioïques, à réceptacle plus ou moins développé en tube. Elles sont groupées en panicule et rarement en grappe. Ces fleurs possèdent 9 étamines fertiles à anthères extrorses disposées en trois rangées et possédant quatre loges superposées par paire. L'ovaire est ovoïde ou ellipsoïdal, à style distinct. Le fruit est entouré à la base d'une cupule ordinairement hémisphérique (KOSTERMANS, 1950).

### II.1.1.4. Description de l'espèce *Ocotea laevis* Kost

*Ocotea laevis* Kost se présente comme un grand arbre (jusqu'à 25 m) à rameaux grisâtres. Les feuilles sont opposées ou alternes, raides-parcheminées ou coriaces, glabres, oblongues, lancéolées-elliptiques ou elliptiques, à base aiguë, à sommet acuminé ou parfois obtus. Les faces supérieures sont vertes et brillantes à nervure médiane, les faces inférieures sont plus claires à nervures médianes saillantes. Les panicules sont axillaires, parfois feuillées, multiflores et à ramifications peu nombreuses, espacées, grêles et courtes. Les fleurs sont garnies à l'extérieur de très petits poils (sous la loupe), à sépales assez étalés. Les 9 étamines sont très largement elliptiques-obtuses. L'ovaire est glabre, ellipsoïdal à petits stigmates discoïdes. Les baies sont ellipsoïdales, apiculées à cupules rouges, hémisphériques, presque lisses (KOSTERMANS, 1950).

### II.1.1.5. Distribution géographique

Cette plante est rencontrée dans les parties Nord et Est de Madagascar. La répartition géographique de la plante est présentée sur la figure 2.



Source : BD500FTM

**Figure 2** : Répartition géographique d'*Ocotea laevis* Kost

### II.1.1.6. Date et lieu de récolte

Une récolte a été effectuée au mois de Mars 2018 dans la forêt dense humide de Mandraka à 1 300 m d'altitude, à 70 km d'Antananarivo. Au cours de cette période, la plante était au stade végétatif.

### **II.1.1.7. Conservation du matériel végétal**

Les écorces ont été disposées à température ambiante dans un endroit sec, propre et aéré à l'abri de la lumière et de l'air en attendant l'extraction.

### **II.1.2. Les produits chimiques**

Les produits chimiques utilisés sont de marques LABOSI, MERCK ou RECTAPUR.

## **II.2. METHODES**

### **II.2.1. Méthode d'extraction : l'hydrodistillation**

#### **II.2.1.1. Principe**

Il s'agit d'une distillation simultanée de deux substances non miscibles (HE et eau) et l'appareil utilisé est de type Clevenger (figure 3, page 17). L'ébullition de ces deux substances se produit à une température inférieure au point d'ébullition de la substance la plus volatile, c'est-à-dire l'essence contenue dans la plante. Sous l'effet de la chaleur, les cellules de stockage libèrent les principes aromatiques qui sont entraînés par la vapeur d'eau. Cette vapeur hétérogène passe par un circuit réfrigérant. Une fois condensés, les deux liquides sont recueillis et forment deux phases.

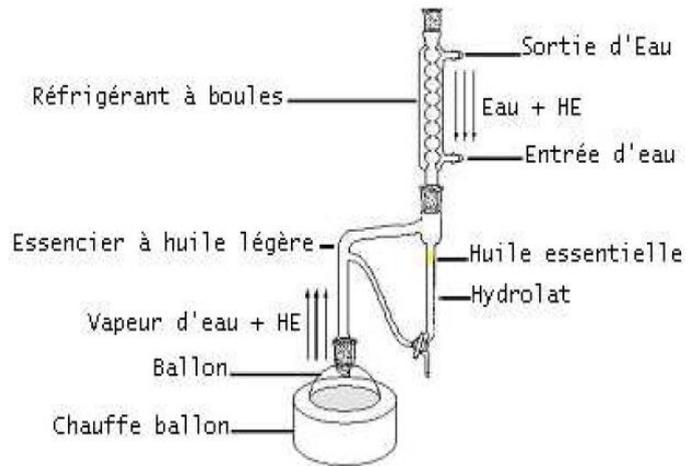
#### **II.2.1.2. Mode opératoire**

Les écorces d'*Ocotea laevis* Kost sont découpées en petits morceaux d'environ un centimètre. Elles sont ensuite pesées et introduites dans le ballon d'extraction où l'eau distillée est rajoutée de façon à les recouvrir. Des morceaux de pierre ponce sont ajoutés pour réguler l'ébullition et homogénéiser la température du mélange à l'intérieur du ballon.

L'huile extraite est déshydratée avec du sulfate de sodium et conservée dans un flacon teinté bien fermé à basse température (+4°C).



a) Photo



b) Schéma

**Figure 3 :** Appareil de type CLEVANGER (essencier pour huiles légères)

### **II.2.2. Calcul du rendement**

Le rendement (R) d'extraction exprimée en pourcentage est donné par la formule suivante :

$$R(\%) = \frac{\text{volume d'huile essentielle obtenu (ml)}}{\text{poids du matériel végétal (g)}} \times 100$$

### **II.2.3. Méthodes de caractérisation physique**

Les propriétés physico-chimiques sont déterminées par les méthodes décrites selon les normes AFNOR (1992).

#### **II.2.3.1. Détermination de la densité relative**

##### *II.2.3.1.1. Définition*

La densité relative est le rapport entre la masse d'HE et la masse d'eau distillée, de même volume et de même température (20°C). Elle est mesurée à l'aide d'un pycnomètre. La balance utilisée pour chaque mesure est présentée sur la figure 4 (page 18). Cette densité est déterminée selon les indications de la norme AFNOR, NF-T 75-111 (annexe 2).



**Figure 4 :** Balance de mesure de la masse de l'HE

#### *II.2.3.1.2. Mode opératoire*

Le pycnomètre de 5 ml vide est pesé sur une balance de précision munie de Silicagel et d'un thermomètre et la masse à vide est notée  $m_0$  à une température de 20°C. Ensuite, le pycnomètre est rempli d'eau distillée en ajustant au trait de jauge et est pesé ( $m_1$ ). Après que le pycnomètre est rincé et séché, il est rempli avec de l'HE. Trois pesées sont effectuées et la moyenne de ces valeurs est notée  $m_2$ .

#### *II.2.3.1.3. Calcul de la densité relative*

La densité relative à 20°C est donnée par la formule suivante :

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

avec :

$d_{20}^{20}$  : densité relative

$m_0$  : masse du pycnomètre vide (g)

$m_1$  : masse du pycnomètre rempli d'eau distillée jusqu'au trait de jauge (g)

$m_2$  : masse du pycnomètre rempli d'HE jusqu'au trait de jauge (g)

Si l'expérience est effectuée à la température  $t$ , un facteur de correction selon la norme AFNOR NF- T 75- 111, nous donne la valeur de la densité de l'échantillon à 20°C.

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

où  $t$  : température ambiante au moment de la manipulation

### II.2.3.2. Détermination de l'indice de réfraction

#### II.2.3.2.1. Définition

L'indice de réfraction est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'ondes déterminée passant de l'air à l'HE maintenue à une température constante. Il permet de vérifier la pureté d'un produit. Sa détermination est réalisée suivant les indications de la norme AFNOR NF-T 75-112 (annexe 3). Le réfractomètre utilisé est présenté sur la figure 5.



**Figure 5** : Réfractomètre KRÜSS OPTRONIC GERMANY

#### II.2.3.2.2. Mode opératoire

L'indice de réfraction à 20°C est mesuré à l'aide d'un réfractomètre à angle limite de réfraction. Avant de procéder à la mesure, l'appareil est d'abord étalonné avec de l'eau distillée. Pour cela, quelques gouttes d'eau distillée sont déposées sur le prisme puis laissées pendant quelques secondes, le temps que la température se stabilise avec celle de l'appareil et du laboratoire. Après l'étalonnage, le même procédé est répété cette fois sur l'échantillon. Trois mesures sont effectuées et la moyenne des valeurs obtenues constituera le résultat.

#### II.2.3.2.3. Calcul de l'indice de réfraction

Suivant la norme AFNOR NF T 75-112, la formule suivante permet de calculer l'indice de réfraction à 20°C :

$$\eta_D^{20} = \eta_D^t + 0,0004(t - 20)$$

Avec :

$\eta_D^{20}$  : Indice de réfraction à température 20°C

$\eta_D^t$  : Indice de réfraction à la température de l'expérience

$t$  : Température de l'expérience en °C

### II.2.3.3. Détermination du pouvoir rotatoire

#### II.2.3.3.1. Définition

Cette détermination consiste à mesurer la capacité de l'HE à dévier la lumière soit vers la droite (dextrogyre), soit vers la gauche (lévogyre). Sa détermination est réalisée suivant les indications de la norme AFNOR, NF-T 75-113 (annexe 4).

Le pouvoir rotatoire d'une HE est un angle donné par un polarimètre dans lequel tourne le plan d'une polarisation d'une radiation lumineuse à une longueur d'ondes correspondant aux raies de sodium. Ainsi, pour une hauteur de 100 mm de l'HE dans le tube polarimétrique, la mesure de l'angle est exprimée en milliradians ou en degrés. Son symbole est noté  $\alpha_D^t$ . Le polarimètre utilisée est présenté sur la figure 6.



**Figure 6** : Polarimètre KRÜSS OPTRONIC GERMANY

#### II.2.3.3.2. Mode opératoire

L'appareil est étalonné avec de l'eau distillée contenue dans le tube polarimétrique. Après nettoyage et séchage, le tube polarimétrique de 10 ml est rempli avec l'HE. Après 10 à 15 min, l'angle de rotation du plan de polarisation des raies D du sodium est lu lorsque la position d'équilibre entre les plages claires et sombres est obtenue.

#### II.2.3.3.3. Calcul du pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire est donné par la relation :

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

avec :

$\alpha_D^t$  : pouvoir rotatoire

A : valeur de l'angle de rotation (en degrés ou milliradians)

l: longueur du tube utilisé (mm)

## **II.2.4. Méthodes de caractérisation chimique**

### **II.2.4.1. Détermination de l'indice d'acide (IA)**

#### *II.2.4.1.1. Définition*

L'indice d'acide est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaires à la neutralisation des acides libres contenus dans 1 g d'HE. Cet indice est déterminé selon les indications de la norme AFNOR, NF-T 75-103 (annexe 5).

#### *II.2.4.1.2. Mode opératoire*

Deux grammes d'HE sont introduits dans un ballon ; 5 ml d'éthanol à 95% et 5 gouttes d'indicateur coloré (phénolphaléine) sont rajoutés. L'ensemble est ensuite titré avec la solution de KOH (0,1 N) jusqu'au virage de la coloration. Le volume de la solution de KOH versé est noté.

#### *II.2.4.1.3. Calcul de l'indice d'acide (IA)*

Suivant la norme AFNOR NF T- 75 – 103, il est déterminé à partir de cette formule :

$$IA = \frac{56,11 \times T}{m} \times V$$

avec:

IA : indice d'acide

V : volume de KOH utilisé (ml)

T : titre exact de la solution de KOH (N)

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

### **II.2.4.2. Détermination de l'indice d'ester**

#### *II.2.4.2.1. Définition*

L'indice d'ester est le nombre de milligrammes de KOH nécessaires à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1 g d'HE. Sa détermination est réalisée suivant les indications de la norme AFNOR, NF-T.75-104, données en annexe 6.

#### *II.2.4.2.2. Mode opératoire*

Une solution de KOH (0,5 N) à un volume de 25 ml et quelques fragments de pierre ponce sont ajoutés dans la solution finale précédente. L'ensemble est porté à ébullition par

chauffage à reflux pendant 60 min. Après refroidissement, 20 ml d'eau distillée et 5 gouttes de phénolphaléine à 2‰ sont rajoutés.

Les excès de KOH sont ensuite titrés avec de l'acide chlorhydrique (HCl) 0,5 N et le volume de ce dernier ayant induit un virage persistant de la coloration est noté.

Parallèlement à cette manipulation, un essai à blanc est effectué dans les mêmes conditions.

#### II.2.4.2.3. Calcul de l'indice d'ester (IE)

La formule suivante permet de calculer l'indice d'ester :

$$IE = \frac{28,05(V_0 - V_1)}{m}$$

Avec :

IE : indice d'ester

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

$V_1$  : Volume de HCl à 0,5 N utilisé pour la détermination (ml)

$m$  : Masse de la prise d'essai (g)

#### II.2.4.3. **Evaluation de la miscibilité à l'éthanol**

Selon les normes AFNOR, NF-T75-101, il existe plusieurs cas de miscibilité à l'éthanol :

##### 1<sup>er</sup> cas :

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

##### 2<sup>ème</sup> cas :

Une HE est dite miscible à V volumes d'éthanol de titre alcoométrique déterminé à 20°C, et se troublant par dilution à V' volumes, lorsque le mélange de 1 volume de l'HE considérée avec V volumes de cet éthanol est limpide, devient trouble après addition graduelle de (V'-V) volumes d'éthanol de même titre, et demeure trouble si l'on poursuit l'addition d'éthanol jusqu'à un total de 20 volumes.

### 3<sup>ème</sup> cas :

Une HE est dite miscible à V volumes d'éthanol de titre alcoométrique déterminé, à 20°C, avec un trouble entre V' et V'', lorsque le mélange de 1 volume d'HE considérée avec V volumes de cet éthanol est limpide, devient trouble après addition graduelle de (V'-V) volume d'éthanol de même titre, et redevient limpide après une nouvelle addition de (V''-V') volume d'éthanol de même titre.

#### II.2.4.3.1. Mode opératoire

Dans une éprouvette graduée, 1 ml d'HE est introduit à l'aide d'une pipette. Avec une burette graduée, de l'éthanol à 95% est versé par fractions de 0,5 ml sous agitation constante et énergique. Quand le mélange devient limpide, le volume d'éthanol versé est noté. Ensuite, l'addition doit être poursuivie jusqu'à un total de 20 volumes (20 ml) d'éthanol. Si un trouble apparaît avant que les 20 volumes soient ajoutés, il faut noter le volume ayant induit ce trouble.

#### **II.2.4.4. Caractères organoleptiques**

Les caractéristiques organoleptiques concernent l'aspect, la couleur et l'odeur d'une HE. Il s'agit d'utiliser les différents organes des sens, notamment les yeux pour déterminer macroscopiquement l'aspect et la couleur et le nez pour l'odeur (RANDRIANTSOA *et al.*, 2004).

#### **II.2.4.5. Criblage phytochimique de l'extrait des écorces d'*Ocotea laevis* Kost**

##### II.2.4.5.1. Préparation des extraits à analyser

Après avoir enlevé les lichens de leur surface, les écorces sont coupées en petits morceaux et broyées à l'aide d'un broyeur jusqu'à l'obtention de poudre. La poudre obtenue est utilisée pour préparer les quatre extraits suivants :

- Extrait aqueux :

Deux grammes de poudre végétale sont introduits dans un tube à essai auquel 10 ml d'eau distillée sont ajoutés. Le mélange est agité au vortex dans un tube bouché. Ensuite la suspension est portée à ébullition, laissée macérer pendant une nuit à + 4°C puis filtrée sur papier filtre pour avoir l'extrait aqueux.

- Extrait acide :

Deux grammes de poudre végétale sont mélangés à 10 ml d'acide chloridrique (HCl) 2 N dans un tube hermétique. Après agitation au vortex pendant 30 s, le mélange est laissé macérer pendant une nuit à +4°C suivie d'une filtration sur papier filtre qui conduit à l'extrait acide.

- Extrait hydroéthanolique :

Deux grammes de poudre végétale sont introduits dans un tube dans lequel 5 ml d'éthanol sont ajoutés. Le contenu est agité au vortex pendant 30 s, puis laissé macérer pendant une nuit à +4°C et le lendemain, le filtrat obtenu par filtration sur papier filtre constitue l'extrait hydroéthanolique.

- Extrait chloroformique :

Deux grammes de poudre végétale sont introduits dans un tube muni d'un bouchon dans lequel 5 ml de chloroforme ont été ajoutés. Le mélange est bouché puis agité au vortex, et enfin laissé macérer pendant une nuit à +4°C. Le lendemain, le filtrat obtenu constitue l'extrait chloroformique.

#### *II.2.4.5.2. Détection des alcaloïdes (Test de Mayer, Wagner et Dragendorff)*

La réaction de détection des alcaloïdes est basée sur l'aptitude qu'ont ces composés à se lier avec les métaux lourds. L'extrait acide est réparti dans 4 tubes, à raison de 1 ml par tube. Le premier sert de témoin et les trois autres sont utilisés respectivement pour les tests de Mayer, Wagner et Dragendorff.

- a) Test de Mayer

L'apparition d'une floculation après ajout de 5 gouttes de réactif de Mayer dans le tube 2 indique la présence d'alcaloïdes.

- b) Test de Wagner

Si l'addition de 5 gouttes de réactif de Wagner dans le tube 3 fait apparaître une floculation ou un précipité, des alcaloïdes sont présents dans l'extrait à tester.

## c) Test de Dragendorff

L'apparition d'un précipité ou d'une floculation dans le tube, après ajout de 5 gouttes de réactif de Dragendorff, montre la présence d'alcaloïdes dans l'extrait à analyser.

*II.2.4.5.3. Détection des saponosides (Test de mousse)*

Les saponosides ou saponines sont des glucosides naturels, dont la solution mousse abondamment lorsqu'on l'agite. L'extrait aqueux (1 ml) est agité énergiquement pendant 30 s. L'apparition d'une mousse de 3 cm de hauteur, persistant pendant 30 min, traduit la présence de saponines dans l'extrait.

*II.2.4.5.4. Détection des tanins et autres polyphénols (Test à la gélatine)*

Les tanins précipitent de leurs solutions aqueuses par la gélatine et réagissent également avec le chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ). L'extrait aqueux est réparti dans 4 tubes à essai à raison de 0,5 ml par tube. Le premier tube sert de témoin et les 3 autres sont utilisés pour détecter la présence de tanins et de composés phénoliques.

## a) Test à la gélatine

Cinq gouttes de gélatine aqueuse 1% sont versées dans le tube 2. L'apparition d'une floculation blanche indique la présence de tanins hydrosolubles de type catéchique.

## b) Test à la gélatine salée

L'opération se fait comme précédemment dans le tube 3 mais avec de la gélatine salée (gélatine 1% dans une solution aqueuse de NaCl 10%). L'apparition d'un précipité indique la présence de tanins condensés de type pyrogallique.

c) Test au chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ )

Cinq gouttes de  $\text{FeCl}_3$  10% en solution méthanolique sont ajoutées dans le tube 4 contenant 0,5 ml d'extrait aqueux. La formation d'un précipité de couleur vert-noir prouve la présence de tanins de type catéchol. Le changement de la coloration en bleuâtre caractérise la présence de tanins de type pyrogallique.

Remarque : Si le test à la gélatine salée est négatif, un résultat positif avec  $\text{FeCl}_3$  indique la présence de composés phénoliques différents des tanins.

#### II.2.4.5.5. Détection des flavonoïdes et leucoanthocyanes (Test de Willstätter)

Un millilitre d'extrait hydroéthanolique est introduit dans un tube à essai puis 1 ml de HCl 6 N est versé. Après agitation, 2 tournures de magnésium sont ajoutées. Le virage de la coloration en rouge après la dissolution totale des tournures de magnésium montre la présence de flavonoïdes.

Un millilitre d'extrait hydroéthanolique est introduit dans un autre tube à essai puis quelques gouttes d'HCl 2 N sont ajoutées. Le mélange est placé dans un bain-marie pendant 30 min. Le virage de la coloration en rouge indique la présence de leucoanthocyanes.

#### II.2.4.5.6. Détection des désoxyoses (Test de Keller-Kiliani)

Les désoxyoses sont des molécules issues de la famille des oses qui se distinguent par la perte d'un atome d'oxygène.

Dans un tube à essai contenant 0,5 ml d'extrait aqueux, 0,5 ml d'une solution d'acide acétique glacial puis 0,5 ml d'une solution de FeCl<sub>3</sub> 10% sont ajoutés. Le mélange est ensuite agité légèrement avant d'ajouter 1 ml d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 36 N le long de la paroi interne du tube. L'apparition d'un anneau pourpre à l'interface indique la présence de désoxyoses.

#### II.2.4.5.7. Détection des stéroïdes et triterpènes (Test de Libermann-Burchard)

Un volume de 0,5 ml d'extrait chloroformique est versé dans trois tubes à essai dont le premier sert de témoin. Cinq gouttes d'anhydride acétique sont additionnées à l'extrait chloroformique contenu dans un tube à essai, puis 2 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 36 N sont ajoutés. Après 1 h d'incubation, si la phase supérieure se colore en vert, des stéroïdes sont présents dans cet extrait, mais s'il apparaît un anneau pourpre entre les deux phases, cet extrait contient des triterpènes.

#### II.2.4.5.8. Détection des stérols insaturés (Test de Salkowski)

A 1 ml d'extrait chloroformique, 1 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 36 N est ajouté. Après 30 min, si la phase inférieure est colorée en rouge sang, l'extrait à analyser contient des stérols insaturés.

#### II.2.4.5.9. Détection des iridoïdes

Un millilitre d'extrait aqueux est introduit dans un tube à essai puis quelques gouttes d'HCl 12 N sont versées. Le tout est porté à ébullition dans un bain-marie bouillant pendant

30 min. L'apparition d'un précipité vert foncé ou bleu foncé indique la présence d'iridoïdes dans l'extrait.

#### **II.2.4.6. Chromatographie en phase gazeuse (CPG-DIF)**

La CPG-DIF ou Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme est une méthode d'analyse par séparation des composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans se décomposer (ARPINO *et al.*, 1995).

##### *II.2.4.6.1. Principe*

La séparation par CPG consiste à partager l'échantillon à analyser entre deux phases :

- l'une, un liquide stationnaire uniformément réparti sous forme d'une pellicule mince sur un solide inerte de grande surface spécifique ;
- l'autre, un gaz mobile ou gaz porteur (azote, hélium ou hydrogène) qui circule à travers l'ensemble stationnaire.

L'échantillon est introduit dans l'appareil, puis transformé à l'état gazeux dans la chambre d'injection. Il va être transporté à l'aide d'un gaz vecteur à travers une colonne constituée d'un tube étroit à l'intérieur duquel les différents composants vont migrer à des vitesses différentes vers le détecteur. Plus l'affinité du soluté pour la phase fixe est grande, plus la migration est lente et inversement. Les composés sortent de la colonne séparément et à des temps différents appelés temps de rétention.

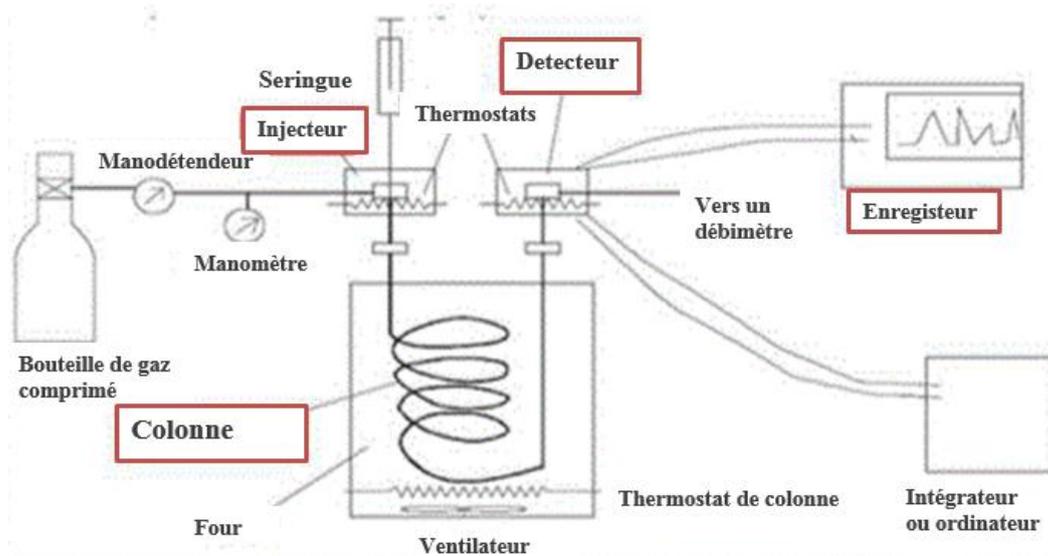
##### *II.2.4.6.2. Mode opératoire*

L'analyse de l'échantillon est réalisée à l'aide d'un chromatographe de marque SHIMADZU GC 14-A équipé d'une colonne capillaire OV1 (30 m x 0,32 mm x 0,25  $\mu$ m) et d'un détecteur à ionisation de flamme. La température de la colonne est programmée de 60°C à 230°C (paliers de 4,5 min à 3°C/min). La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur de 280°C. Le gaz vecteur utilisé est l'azote.

L'échantillon (25  $\mu$ l) est dilué dans 0,5 ml d'hexane. Un volume de 1  $\mu$ l de cette solution est injecté dans la colonne à l'aide d'une micro-seringue rincée avec de l'hexane. Les constituants sont identifiés par la méthode d'ajout de témoin purifié ou d'HE de composition connue.

##### Description du chromatographe

Le dispositif de la CPG est constitué de quatre parties essentielles : l'injecteur, le détecteur, la colonne et l'enregistreur (figure 7, page 28).



**Figure 7** : Schéma du dispositif de la CPG

### III. RESULTATS

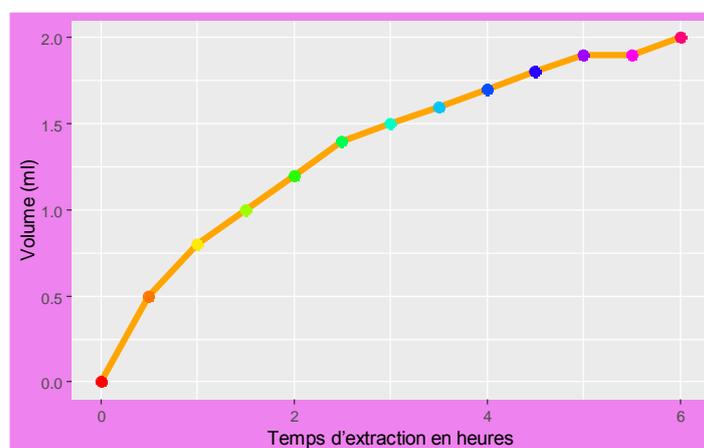
#### III.1. CINÉTIQUE D'EXTRACTION DE L'HUILE ESSENTIELLE

L'extraction dure 6 h, temps où le volume d'huile ne change plus. La cinétique d'extraction de l'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost est présentée dans le tableau 1 et la teneur obtenue est présentée sur la figure 8.

**Tableau 1** : Cinétique d'extraction de l'huile essentielle des écorces d'*Ocotea laevis* Kost

T (h)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6
V (ml)	0	0,5	0,8	1	1,2	1,4	1,5	1,6	1,7	1,8	1,9	1,9	2

T : temps d'extraction ; V : volume d'HE obtenue



**Figure 8** : Teneur de l'huile essentielle des écorces d'*Ocotea laevis* Kost

#### III.2. RENDEMENT EN HUILE ESSENTIELLE

Selon la formule donnée au §.II.2.2 (page 17), le rendement (R) de l'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost obtenue est présenté dans le tableau 2.

**Tableau 2** : Rendement de l'huile essentielle des écorces d'*Ocotea laevis* Kost

Temps d'extraction (h)	Poids (g)		Rendement (%)
	Ecorces	Huile essentielle obtenue	
6	100	1,9	<b>1,9</b>

D'après ces résultats, l'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost a été obtenue avec un rendement de 1,9%.

### III.3. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'HUILE ESSENTIELLE

#### III.3.1. Densité relative

La densité relative de l'HE d'*Ocotea laevis* Kost à 20°C, calculée par la méthode décrite au §.II.2.3.1 (page 17), est donnée dans le tableau 3.

**Tableau 3** : Densité relative de l'huile essentielle

	1 <sup>er</sup> essai	2 <sup>ème</sup> essai	3 <sup>ème</sup> essai
Masse ( $m_0$ ) à 26°C	10,0220	10,0220	10,0220
Masse ( $m_1$ ) à 26°C	12,0545	12,0545	12,0545
Masse ( $m_2$ ) à 26°C	11,9003	11,9007	11,9013
Densité à 26°C	0,9283	0,9285	0,9288
Densité ( $d_{20}^{20}$ )	<b>0,9285</b>		

La densité de l'HE obtenue est inférieure à celle de l'eau qui est égale à 0,9980. Il s'agit donc d'une huile légère car elle est moins dense que l'eau.

#### III.3.2. Indice de réfraction

L'indice de réfraction de l'échantillon, obtenu par la formule donnée au §. II.2.3.2 (page 19) est montré dans le tableau 4.

**Tableau 4** : Indice de réfraction de l'huile essentielle

	1 <sup>er</sup> essai	2 <sup>ème</sup> essai	3 <sup>ème</sup> essai	Moyenne
	$n_1$ à 12°C	$n_2$ à 12°C	$n_3$ à 12°C	$n_0^{20}$
Indice de réfraction	1,4956	1,4954	1,4958	1,4956

D'après le tableau ci-dessus, l'indice de réfraction de l'huile est de 1,4956. Il est supérieur à celui de l'eau distillée qui est de 1,3331.

#### III.3.3. Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire de l'HE est illisible car l'huile est très colorée.

### III.3.4. Indice d'acide

L'indice d'acide (IA) de l'HE est déterminé selon la méthode décrite au §. II.2.4.1 (page 21) et est présenté dans le tableau 5.

**Tableau 5** : Indice d'acide de l'huile essentielle

	1 <sup>er</sup> essai	2 <sup>ème</sup> essai
Masse de l'HE ( $\pm 0,0001$ g)	1,0000	1,0000
Volume de KOH 0,1 N ( $\pm 0,1$ ml)	0,4	0,2
Volume moyen (ml)	0,3	
Indice d'acide	<b>1,6833</b>	

### III.3.5. Indice d'ester

L'indice d'ester de l'HE extraite des écorces d'*Ocotea laevis* Kost, calculé en utilisant la formule décrite au §. II.2.4.2 (page 21) est de **32,2575**.

### III.3.6. Miscibilité à l'éthanol

L'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost est miscible à l'éthanol. Après addition progressive de 0,63 ml d'éthanol 95%, le mélange devient limpide et garde toujours sa limpidité même après addition de 20 ml d'éthanol.

### III.3.7. Caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques de l'HE obtenue sont présentées dans le tableau 6.

**Tableau 6** : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle des écorces d'*Ocotea laevis* Kost

Couleur	Aspect	Odeur	Goût
Verte	Limpide	Très piquante	Fade, peu piquant

## III.4. RESULTATS DU CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE DE LA POUDRE DES ECORCES D'*Ocotea laevis* Kost

D'après les résultats (tableau 7, page 32), la poudre des écorces d'*Ocotea laevis* Kost contient des alcaloïdes, des tanins et polyphénols, des désoxyoses, des anthraquinones, des flavonoïdes et des leucoanthocyanes.

**Tableau 7** : Résultats du criblage phytochimique de la poudre des écorces d'*Ocotea laevis* Kost

Nature de l'extrait	Famille chimique	Test	Résultats
Acide	Alcaloïdes	MAYER	+
		DRAGENDORF	+
		WAGNER	+
Aqueux	Iridoïdes	HCl	-
	Désoxyoses	KELLER-KILIANI	+
	Anthraquinones	BORNTRAGER	+
	Saponines	Test de mousse	-
	Tanins et polyphénols	FeCl <sub>3</sub>	+
		Gélatine 1%	+
		Gélatine salée	+
Hydroéthanolique	Flavonoïdes	WILLSTATTER	+
	Leucoanthocyanes	BATE-SMITH	+
Chloroformique	Stéroïdes et triterpènes	LIEBERMANN-BURCHARD	-
	Stérols insaturés	SALKOWSKI	-

+ : Positif ; - : Négatif

### III.5. CONSTITUANTS CHIMIQUES DE L'HUILE ESSENTIELLE PAR CPG/DIF

L'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost est composée de 28 molécules différentes, (soit 28 pics) dont les composés majoritaires sont :  $\alpha$ -pinène (4,13%), camphène (5,38%), limonène (6,79%), E-cinnamaldéhyde (6,18%), cyclosativène (6,05%),  $\beta$ -cadinène (7,82%),  $\alpha$ -muurolène (4,86%),  $\delta$ -cadinène (8,2%), oxyde de caryophyllène (4,38%). Le profil chromatographique est présenté en annexe 8. Les constituants chimiques de l'HE sont présentés dans le tableau 8 (page 33).

Tableau 8 : Constituants chimiques de l'huile essentielle

N° de pic	Temps de rétention	Constituants	Taux du composé dans l'échantillon (%)
<b>01</b>	<b>464</b>	<b><math>\alpha</math>-Pinène</b>	<b>4,13</b>
<b>02</b>	<b>490</b>	<b>Camphène</b>	<b>5,38</b>
03	523	Sabinène	0,1
04	533	$\beta$ -Pinène	2,25
05	548	Myrcène	0,87
06	581	$\alpha$ -Phéllandrène	1,1
07	614	$\alpha$ -Terpinène	2,74
<b>08</b>	<b>638</b>	<b>Limonène</b>	<b>6,79</b>
09	771	(E)- $\beta$ -Ocimène	0,09
10	931	Camphre	0,67
<b>11</b>	<b>1239</b>	<b>E-Cinnamaldéhyde</b>	<b>6,18</b>
12	1412	$\delta$ -Elémène	1,46
<b>13</b>	<b>1488</b>	<b>Cyclosativène</b>	<b>6,05</b>
14	1510	$\alpha$ -Copaène	2,29
15	1579	Méthyleugénol	1,38
16	1607	(E)- $\beta$ -Caryophyllène	2,11
17	1660	Aromadendrène	1,66
<b>18</b>	<b>1733</b>	<b><math>\beta</math>-Cadinène</b>	<b>7,82</b>
19	1751	$\gamma$ -Muuroène	1,95
20	1764	Germacrène-D	3,16
<b>21</b>	<b>1814</b>	<b><math>\alpha</math>-Muuroène</b>	<b>4,86</b>
22	1825	$\beta$ -Bisabolène	3,83
<b>23</b>	<b>1866</b>	<b><math>\delta</math>-cadinène</b>	<b>8,2</b>
24	1902	Elémol	1,45
25	1934	Elémicine	1,49
26	1946	E-Nérolidol	2,38
<b>27</b>	<b>2046</b>	<b>Oxyde de caryophyllène</b>	<b>4,38</b>
28	2100	$\gamma$ -Eudésmol	2,63

#### IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost a été extraite par la méthode d'hydrodistillation. Le rendement d'extraction est de 1,9%. Il est donc moyennement élevé. Des pertes ont probablement eu lieu pendant l'extraction. Ceci montre que l'HE obtenue contient des constituants très volatils. Pourtant, le rendement de l'HE extraite des écorces d'*Ocotea laevis* Kost est supérieur à celui des feuilles d'*Ocotea laevis* Kost (0,64% à 0,77 %) (RAZAFINDRAKOTO, 2010) et d'*Ocotea cymosa* (1,5%) (SEHENOASPIERA, 2011). Ce qui prouve que la teneur en HE peut varier d'une plante à l'autre et aussi suivant l'organe sécréteur.

Les résultats des analyses physique et chimique sont regroupés dans le tableau 9, comparés avec ceux de deux HE : feuilles d'*Ocotea laevis* Kost et d'*Ocotea auriculiformis* Kost.

**Tableau 9** : Indices physiques et chimiques de l'huile essentielle des écorces d'*Ocotea laevis* Kost et de deux autres huiles essentielles

Propriétés	Résultats obtenus		
	<i>Ocotea laevis</i> Kost (écorces)	<i>Ocotea auriculiformis</i> Kost (feuilles)	<i>Ocotea laevis</i> Kost (feuilles)
Densité relative	<b>0,9285</b>	0,96	0,9118
Indice de réfraction	<b>1,4956</b>	1,506	1,4944
Pouvoir rotatoire	<b>Illisible</b>	Illisible	Illisible
Indice d'acide	<b>1,6833</b>	1,399	2,8055
Indice d'ester	<b>32,2575</b>	30,813	12,622
Miscibilité à l'éthanol	<b>0,63/20 miscible</b>	non déterminé	4,82 :1

La densité à 20°C de l'HE extraite des écorces d'*Ocotea laevis* Kost est égale à 0,9285. Cette HE peut être considérée comme une huile légère car sa densité est inférieure à celle de l'eau (densité eau = 0,9982). Il en est de même de celle d'*Ocotea cymosa* (0,8618) et de l'HE des feuilles d'*Ocotea laevis* Kost (0,9118) car elles ont des densités inférieures à celle de l'eau. En outre, il existe des huiles lourdes qui ont une densité supérieure à l'eau comme celle de la cannelle (*Cinnamomum zeylanicum*, LAURACEES) et du girofle (*Eugenia caryophyllata*, MYRTACEES) dont les densités sont respectivement de 1,042 à 1,063 et

1,025 à 1,065 (MICHAT, 2006 ; RABEHAJA, 2007). D'après ce résultat, l'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost est donc légère, peu stable et facile à oxyder.

L'indice de réfraction de l'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost est de 1,4956. Il est supérieur à celui de l'HE des feuilles d'*Ocotea laevis* Kost qui est de 1,4944 (RAZAFINDRAKOTO, 2010) et est inférieur à celui de l'HE d'*Ocotea auriculiformis* Kost qui est de 1,506 (ANDRIANANTENAINA, 2012). Selon la littérature, l'indice de réfraction des HE est élevé, en général supérieur à celui de l'eau (1,3330) (GUENTER, 1975). L'IR est proportionnel à la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés (BOUKHATEM *et al.*, 2010). Il permet de vérifier la pureté de l'HE ou d'un produit, c'est-à-dire qu'un IR constant indique que le produit est pur (AFNOR). Donc, l'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost présente une bonne pureté.

L'indice d'acide est de 1,6833. Un indice d'acide inférieur à 2 indique que l'HE est bien conservée (BOUKHATEM *et al.*, 2010). Donc l'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost a été conservée dans les meilleures conditions.

L'indice d'acide de l'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost est plus élevé par rapport à celui de l'HE des feuilles d'*Ocotea auriculiformis* Kost qui est de 1,399 (ANDRIANANTENAINA, 2012) et moins élevé que celui de l'HE des feuilles d'*Ocotea laevis* Kost qui est de 2,8055 (RAFAFINDRAKOTO, 2010).

L'indice d'ester (IE) de l'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost est de 32,2575 contre 30,813 et 12,62 toujours pour les deux échantillons de comparaison. L'IE permet de déterminer la qualité d'une HE. Il est admis que plus l'IE est élevé plus l'HE est de bonne qualité (HILAN *et al.*, 2006). Donc, l'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost est de bonne qualité et contient plus d'acides libérés par hydrolyse que les deux autres HE.

L'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost est miscible à l'éthanol 95% avec des volumes d'éthanol et d'HE respectivement de 0,63 ml et 1 ml.

L'HE de ces écorces est de couleur verte, fade et limpide possédant une odeur piquante.

Le criblage phytochimique des écorces d'*Ocotea laevis* Kost a montré la présence d'alcaloïdes, de tanins et polyphénols, de désoxyoses, d'antraquinones, de flavonoïdes et de leucoanthocyanes. Cette diversité des composés pourrait contribuer à l'activité thérapeutique de la plante. En effet, pour :

- Les alcaloïdes : certains d'entre eux sont connus pour leurs propriétés antibactériennes (BRUNETON, 1993). Chez l'être humain, certains affectent le système nerveux en attaquant les transmetteurs chimiques et possèdent de nombreuses propriétés

biologiques à savoir analgésique (cocaïne), anti-malaria (quinine), stimulant du système nerveux central (caféine), (BADIAGA, 2011).

- Les flavonoïdes : possèdent diverses fonctions telles l'activité antiallergique, anti-inflammatoire et antibactérienne (BRUNETON, 1993).
- Les leucoanthocyanes, les tanins et les polyphénols, ont des effets bactéricides (BRUNETON, 1993).

L'analyse de l'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost par CPG/DIF a révélé 28 pics correspondant donc à 28 composés. Parmi ces 28 pics, 9 pics sont majoritaires qui sont :  $\alpha$ -pinène (4,13%), camphène (5,38%), limonène (6,79%), E-cinnamaldéhyde (6,18%), cyclosativene (6,05%),  $\beta$ -cadinène (7,82%),  $\alpha$ -muurolène (4,86%),  $\delta$ -cadinène (8,2%), oxyde de caryophyllène (4,38%).

D'après ces résultats, l'échantillon s'est montré très riche en monoterpènes et en sesquiterpènes, qui représentent les deux principaux groupes de terpènes. Ces composés pourraient conférer des activités biologiques intéressantes à l'HE.

**DEUXIEME PARTIE : ETUDE  
BIOLOGIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE**

## **I. INTRODUCTION**

Dans cette partie, les propriétés biologiques de l'HE extraite des écorces d'*Ocotea laevis* Kost ont été étudiées, à savoir :

- la toxicité aiguë sur les souris (animaux à sang chaud) ;
- l'activité sur les larves de moustique (animaux à sang froid) ;
- l'activité sur plusieurs souches de microorganismes.

## **II. MATERIELS ET METHODES**

### **II.1. MATERIELS**

#### **II.1.1. Matériels biologiques**

##### **II.1.1.1. Les souris (animaux à sang chaud)**

Les souris blanches (*Mus musculus*) de race OF1 utilisées ont été fournies par l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM). Elles ont un poids compris entre 18 g et 23 g.

##### **II.1.1.2. Les larves de moustique (animaux à sang froid)**

Les larves du moustique *Culex quinquefasciatus* au stade III de leur développement sont utilisées pour évaluer l'activité larvicide. Elles sont recueillies dans les rizières se trouvant aux environs de l'Université. Elles sont conservées au LABASM dans des bocaux contenant de l'eau où elles ont séjourné durant 72 h pour s'adapter au milieu avant le test.

##### **II.1.1.3. Les microorganismes**

###### **II.1.1.3.1. Les souches de bactéries**

Les bactéries utilisées au cours de nos manipulations proviennent du laboratoire de Microbiologie du LABASM. Elles sont présentées dans le tableau 10 (page 39).

#### **II.1.2. Matériels de laboratoire**

##### **II.1.2.1. Les milieux de culture microbienne utilisés**

Les milieux de culture utilisés pour l'étude de l'activité antimicrobienne sont :

- le milieu liquide MUELLER-HINTON (MH), un milieu non sélectif qui convient à la plupart des bactéries ;
- le milieu solide MUELLER-HINTON, un milieu non sélectif et riche en sodium ;
- la gélose ordinaire pour l'entretien des cultures.

La composition chimique de ces milieux de culture est donnée en annexe 9.

**Tableau 10** : Les souches de bactéries utilisées pour les tests d'activité antibactérienne et leurs caractéristiques

Nom de la souche	Référence	Gram	Caractères morphologiques et pouvoir pathogène
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 13124	+	Bacille anaérobie, longue survie dans le sol, infections digestives, septicémie sévère.
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	+	Coque, responsable d'infections localisées suppurées et plus rarement de septicémies.
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19114 TM	+	Bacille de petite taille, non sporulé, aéro-anaérobie, facultatif, ubiquitaire, pathogène pour l'homme.
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 1202	-	Bacille, responsable d'une shigellose, isolée dans les selles de malades.
<i>Salmonella enterica</i>	ATCC 13076	-	Bacille mobile, responsable d'intoxications alimentaires, de fièvres typhoïdes et de gastro-entérites, très résistant en milieu extérieur.
<i>Vibrio fischeri</i>	ATCC 49387	-	Bacille incurvé (vibron) fréquemment rencontré en milieu marin, responsable d'une maladie appelée vibriosis chez certains animaux marins (crevettes, poissons).
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	-	Bacille commensal du tube digestif, responsable d'infections urinaire et nosocomiale.

### II.1.2.2. Les disques d'antibiogramme

Des disques d'antibiogramme de 6 mm de diamètre ont été confectionnés à partir d'une feuille papier Whatman autoclavable.

### II.1.2.3. La verrerie

Elle comprend des boîtes de Petri de 90 mm de diamètre, des tubes vissés, des béciers, des pipettes et des bocaux hermétiques.

## II.2. METHODES

### II.2.1. Tests de toxicité aiguë

(FONTENELLE et *al.*, 2007).

#### II.2.1.1. Principe

Les réactions des souris suite à l'administration de l'HE sont observées pendant un temps déterminé (24 h).

#### II.2.1.2. Mode opératoire

La toxicité est évaluée par voie orale (gavage) à raison de 0,3 ml d'HE pour une souris de  $25 \pm 2$  g. Pour le test, 3 souris mâles sont utilisées.

### II.2.2. Test sur les larves de moustique

(OMS, 1970 ; ANSARI et *al.*, 2005 ; TIWARY et *al.*, 2007)

#### II.2.2.1. Principe

Les larves sont mises en contact avec l'extrait à tester afin d'apprécier leur susceptibilité. Si ce premier test se révèle positif, l'essai se poursuit par l'estimation de la concentration létale à 50% ( $CL_{50}$ ) qui est la concentration tuant 50% des larves après 24 h d'exposition.

#### II.2.2.2. Mode opératoire

- *Test préliminaire*

Les larves sont exposées à des fortes concentrations (100 et 200 ppm), afin d'observer leur sensibilité à l'HE. Trois lots de 25 larves au stade III sont placés dans des béciers de 500 ml. L'un des trois lots sert de témoin et les deux autres sont mis respectivement en présence des concentrations 100 et 200 ppm.

- *Réalisation du test proprement dit*

Six gobelets sont préparés avec différentes concentrations de l'HE. Dans chaque récipient, 25 larves sont introduites et un autre lot de 25 larves mis en présence d'éthanol absolu (1 ml) dilué dans 249 ml d'eau de source sert de témoin.

Après 24 h, les larves mortes ou moribondes sont comptées.

- Toute larve incapable de bouger quand on la touche avec une aiguille dans la région cervicale, est comptée comme morte ;

- Par contre, les larves incapables d'atteindre la surface ou de manifester la réaction de plongée caractéristique quand l'eau est agitée, est comptée comme moribonde.

L'expérience est réalisée trois fois.

- *Détermination de la concentration létale 50 % durant 24 h* (BOYD, 1966)

La CL<sub>50</sub> est déterminée graphiquement en utilisant la régression linéaire de la relation suivante :

$$\% \text{ mortalité} = f(\log C)$$

Où:

C : la concentration en mg/ml.

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

$$Y = A + BX$$

où :

Y : pourcentage de mortalité

A : une constante

B : coefficient de régression

X : logarithme décimal de la concentration de l'HE.

### **II.2.3. Tests d'activité antibactérienne**

#### **II.2.3.1. Stérilisation**

En bactériologie, la totalité du matériel utilisé doit être stérile. Les verreries sont stérilisées à l'étuve à 100°C pendant une heure. Les milieux de culture ainsi que les disques et les cônes pour micropipettes sont stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 21 min à 2 bars. La pince et l'anse d'ensemencement sont flambées avant et après chaque utilisation. L'HE à tester est stérilisé à l'aide d'un filtre Millipore (Sartorius, Minisart NML-stérile). Les manipulations se déroulent en milieu stérile, entre deux flammes de bec Bunsen et les mains du manipulateur sont nettoyées avec de l'alcool 95 % avant et après chaque test ainsi que la surface de travail. Il faut éviter de parler pendant les manipulations afin d'éviter toute contamination.

Après la lecture des résultats, tout le matériel souillé est décontaminé à l'autoclave pendant 40 min avant d'être lavé.

### II.2.3.2. Méthode des disques sur milieu solide ou aromatoگرامme

(BURT, 2004 ; ABDESSELAM, 2006 ; RAZAKARIVONY *et al.*, 2009).

Il s'agit d'une méthode ancienne mais toujours d'actualité. Elle permet l'estimation qualitative de l'effet de l'huile. L'aromatoگرامme est l'équivalent de l'antibiogramme mais l'extrait est remplacé par l'HE.

#### II.2.3.2.1. Principe

La méthode permet de mettre l'huile à étudier en contact avec les bactériesensemencées en nappe. L'huile diffuse dans le milieu d'une façon radiale, sa concentration diminuant à mesure qu'elle s'éloigne de sa source. Il se forme ainsi un gradient de concentration.

Dans le cas où la souche testée est sensible à l'HE, une zone circulaire d'inhibition de croissance appelée « halo d'inhibition » apparaît autour du disque. Le diamètre de ce halo traduit directement le degré de sensibilité de la souche : plus elle est sensible, plus le diamètre est grand.

#### II.2.3.2.2. Mode opératoire

- Repiquage des souches :

Les souches pures à étudier sont prélevées à l'aide d'une anse stérile à partir d'une culture sur gélose, puis repiquées sur un nouveau milieu gélosé coulé dans des boîtes de Petri, par la méthode des stries. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 24 h.

- Préparation de l'inoculum

Une colonie prélevée à partir des cultures rajeunies est mise en suspension dans de l'eau physiologique stérile à l'aide d'une anse stérile, puis le tout est homogénéisé par agitation. La densité optique (DO) de cette suspension est ajustée à 0,125 à 550 nm, ce qui correspond à  $10^6$  cellules formant unité ou CFU/ml.

- Ensemencement

La technique par inondation ou en nappe est appliquée pour l'ensemencement. La surface entière du milieu MH solide est inondée avec 5 ml de l'inoculum ci-dessus. La culture est incubée dans une étuve à 37°C pendant 15 min afin que les germes puissent adhérer sur le milieu. Puis, l'excès de liquide est aspiré à l'aide d'une pipette stérile et le milieu est séché pendant 15 min dans une étuve à 37°C.

- Dépôt des disques

A l'aide d'une pince, des disques imbibés de 10 µl d'HE à tester sont déposés sur la gélose MH ensemencé. Les boîtes de Petri sont ensuite fermées et laissées à la température ambiante pendant 30 min, puis mises à l'étuve à 25°C ou 37°C pendant 24 ou 72 h selon la souche.

Les résultats sont lus en mesurant les diamètres des halos. La moyenne des valeurs obtenues avec deux disques imprégnés par souche constitue le résultat final. Ce dernier est interprété selon les normes qui sont présentées dans le tableau 11.

**Tableau 11** : Normes utilisées pour les tests de sensibilité des microorganismes (PONCE *et al.*, 2003 ; MOREIRA *et al.*, 2005 ; BOUHARB *et al.*, 2014)

Diamètre du halo d'inhibition (X)	Sensibilité des souches	Résultats
$X < 8$ mm	Résistant	-
$9 \text{ mm} \leq X < 14$ mm	Sensible	+
$15 \text{ mm} \leq X \leq 19$ mm	Très sensible	++
$X > 20$ mm	Extrêmement sensible	+++

### II.2.3.3. Evaluation de la concentration minimale inhibitrice

#### II.2.3.3.1. Principe

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus petite concentration de produit actif pour laquelle aucune croissance microbienne n'est observée après 24 h d'incubation.

#### II.2.3.3.2. Mode opératoire

Cette détermination est faite sur le germe le plus sensible d'après la méthode des disques. Les étapes sont les mêmes que celles de l'aromatogramme mais différentes concentrations de l'échantillon sont testées sur les germes.

- Préparation des différentes concentrations

La solution de départ est obtenue en faisant une dilution de 1/100 (v/v) de l'HE dans du tween 80 à 0,1 %. A partir de cette solution-mère, une gamme de six concentrations (dilutions en cascades de 1/2 en 1/2) est préparée jusqu'à une dilution de 1/3200.

La concentration de l'HE pure a pu être calculée à partir de sa densité relative. En effet, la valeur de la densité absolue exprimée en g/ml est donnée par la formule suivante :

$$\text{Densité absolue} = d \times 0,99823$$

où :

d : densité relative de l'échantillon à 20°C

0,99823 : densité absolue de l'eau à 20°C (g/ml)

D'après cette formule, la densité absolue (donc la concentration) de l'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost est de 0,9268 g/ml soit 926,8 mg/ml. Le tableau 12 détaille les concentrations utilisées pour la détermination de la CMI.

**Tableau 12** : Les concentrations correspondant aux dilutions effectuées

Dilutions	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200
Concentrations (mg/ml)	9,27	4,63	2,32	1,16	0,58	0,29

### III. RESULTATS

#### III.1. Effets sur les souris

Tout de suite après l'administration de l'HE, une piloérection, une énophtalmie et une diminution de l'activité motrice ont été observées. Après 24 h, aucune mortalité n'a été observée. L'HE n'est pas donc létale à la dose utilisée et la  $DL_{50}$  n'a pas pu être déterminée.

#### III.2. Effets sur les larves de moustique

D'après le test préliminaire, toutes les larves sont mortes pour les 2 concentrations utilisées (200 ppm et 100 ppm). L'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost possède donc une activité larvicide.

L'HE a été diluée dans l'éthanol absolu pour obtenir une concentration de 50 mg/ml (solution-mère). Un volume de 1 ml de cette HE, dilué dans 249 ml d'eau de source naturelle permet d'obtenir la concentration de 200 ppm. A partir de cette solution-mère, une gamme de six concentrations a été préparée.

Six lots de 25 larves ont été exposés à ces six concentrations différentes de l'HE. Les résultats sont présentés dans le tableau 13.

**Tableau 13** : Activité larvicide de l'huile essentielle

Concentration de l'HE (ppm)	log C	Nombre de larves testées	Nombre de larves mortes	Taux de mortalité en (%)
0 (témoin)	0	25	0	0
12,5	1,09	25	0	0
25	1,39	25	5	20
50	1,69	25	16	64
66,6	1,82	25	18	72
83,2	1,92	25	22	88
100	2	25	25	100

Parmi les témoins, aucune larve n'a été tuée ; il n'a donc pas été utile d'utiliser la formule d'Abbott. D'après ces résultats l'HE a une activité toxique sur les larves de moustique. Un effet-dose a été observé.

L'équation de la droite de régression linéaire est  $Y = -129,12 + 112,58X$  avec un coefficient de corrélation  $r = 0,991$ . La valeur du  $\log CL_{50}$ , déterminée graphiquement est de 1,588 ce qui correspond à une  $CL_{50}$  de **38,8 ppm**.

### III.3. Activité antibactérienne de l'huile essentielle

#### III.3.1. Aromatogramme

L'activité de l'HE d'*Ocotea laevis* Kost a été évaluée sur 7 souches de bactéries dont 4 bactéries GRAM (-), 3 bactéries GRAM (+). La méthode décrite au § II.2.3.2. (page 40) a été utilisée et les résultats sont présentés dans le tableau 14. La figure 9 illustre l'activité antibactérienne de l'HE.

**Tableau 14 :** Sensibilité de 7 souches testées à l'huile essentielle des écorces d'*Ocotea laevis* Kost

Nom des souches	Diamètre du halo (mm)	Sensibilité de la souche
<i>Clostridium perfringens</i>	31	+++
<i>Vibrio fischeri</i>	16	++
<i>Enterobacter aerogenes</i>	15	++
<i>Salmonella enterica</i>	12	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	7,5	-
<i>Shigella flexneri</i>	6	-

+++ : Extrêmement sensible ; ++ : Très sensible ; + : Sensible ; - : Insensible



**Figure 9 :** Aromatogramme de l'HE sur *Clostridium perfringens*

#### III.3.2. CMI en milieu solide

D'après les résultats précédents, *Clostridium perfringens* est le germe le plus sensible à l'HE. La CMI a donc été déterminée sur ce germe. Les résultats sont donnés dans le tableau 15 (page 47).

**Tableau 15 :** Effets des différentes concentrations de l'HE sur *Clostridium perfringens*

N° disques	1	2	3	4	5	6
Concentration (mg/ml)	9,27	4,63	2,32	1,16	0,58	0,29
Observation	+	+	+	-	-	-

+ : présence de zone d'inhibition ; - : absence de zone d'inhibition

La CMI de l'huile essentielle sur *Clostridium perfringens* estimée en milieu solide par la méthode des disques, est donc de **1,16 mg/ml**.

#### **IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS**

Cette deuxième partie du travail a consisté à évaluer l'activité biologique de l'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost, à savoir la toxicité sur les souris et les larves, ainsi que l'activité antimicrobienne. D'après les résultats, l'HE extraite des écorces d'*Ocotea laevis* Kost possède des effets sur différents organismes.

Chez les souris, l'administration par voie orale de l'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost à différentes doses (100, 500 et 1000 mg/kg), provoque des symptômes d'intoxication caractérisés principalement par une piloérection, une énophtalmie et une diminution de l'activité motrice. Malgré ces troubles, aucune souris n'est morte après 24 h, bien que les doses administrées aient été assez élevées. La  $DL_{50}$  (24 h) qui est la dose causant la mort de 50% des souris en 24 h n'a donc pu être déterminée.

En outre, les tests de toxicité par voie orale nécessitent une quantité plus importante d'HE que ceux par les autres voies car les composés doivent transiter dans le tube digestif avant d'être absorbés pour parvenir aux organes ou tissus-cibles (RAKOTORANOROMALALA, 1989).

A titre comparatif, l'HE d'*Ocotea zahamenensis* à la dose 500 mg/kg a provoqué la mort des souris une heure après administration orale (RALIDERA, 2012).

L'échantillon s'est révélé toxique pour les larves de moustique *Culex quinquefasciatus*. En effet, l'huile essentielle provoque 100% de mortalité des larves de stade 3 à une concentration de 100 ppm. La  $CL_{50}$  (24 h) a été estimée à 38,8 ppm.

D'après ces résultats, nous pouvons dire que l'HE extraite des écorces d'*Ocotea laevis* Kost possède la même efficacité que celle de ses feuilles (RAZAFINDRAKOTO, 2010) qui provoque 100% de mortalité à la concentration 100 ppm sur les larves des moustique. La  $CL_{50}$  a été estimée à 38,68 ppm.

Parmi les sept souches microbiennes testées, *Clostridium perfringens* s'est révélé extrêmement sensible à l'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost avec un diamètre d'inhibition de 31 mm. *Vibrio fischeri* et *Enterobacter aerogenes* étaient très sensibles. *Salmonella enterica* et *Staphylococcus aureus* étaient sensibles. Par contre, *Listeria monocytogenes* et *Shigella flexneri* se sont avérés insensibles vis-à-vis de l'HE.

La CMI a été évaluée sur la souche de *Clostridium perfringens* qui était extrêmement sensible. Sa valeur a été estimée à 1,16 mg/ml. Elle est élevée par rapport à la CMI de l'HE extraite de feuilles d'*Ocotea levis* Kost (0,57 mg/ml) (RAZAFINDRAKOTO, 2010).

*Clostridium perfringens* est un bacille Gram positif. La bactérie est immobile, sporulée et anaérobie stricte. Elle produit des nécrotoxines, provoquant ainsi l'entérite nécrosante.

D'après ces résultats, nous pouvons dire que l'HE des écorces d'*Ocotea levis* Kost était moins efficace par rapport à celle des feuilles de cette même plante. En effet, le germe le plus sensible était *Vibrio harveyi* pour ce dernier organe et la CMI était très basse c'est-à-dire 0,57 mg/ml (RAZAFINDRAKOTO, 2010). Ceci pourrait être dû à une faible teneur en composés antibactériens dans les écorces, les 2 huiles ayant à peu près les mêmes compositions (voir Etude chimique). L'hypothèse d'une variation de teneur en fonction de la saison n'est pas à exclure.

En résumé, cette étude biologique a montré que l'HE extraite des écorces d'*Ocotea laevis* Kost possède une activité antibactérienne et larvicide. L'étude de toxicité a montré qu'à l'administration par voie orale, l'essence montre une faible toxicité aiguë chez les souris.

Il serait alors intéressant d'approfondir l'étude de cette essence à des fins thérapeutiques.



**CONCLUSION GENERALE ET  
PERSPECTIVES**

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

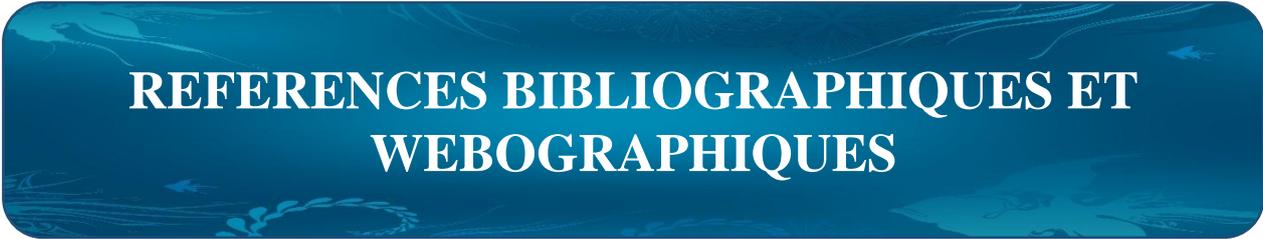
Les travaux réalisés dans le cadre de ce mémoire, nous ont permis de :

- extraire l'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost ;
- déterminer certaines de ses caractéristiques physico-chimiques et quelques-unes de ses caractères organoleptiques ;
- identifier les grandes familles présentes dans notre matériel d'étude ;
- identifier la composition chimique de l'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost par CPG/DIF ;
- obtenir des informations sur ses propriétés biologiques, telles que l'activité antibactérienne, l'activité larvicide, la faible toxicité sur souris ;
- améliorer les connaissances sur l'espèce *Ocotea laevis* Kost, une plante endémique de Madagascar.

Ce travail n'est que préliminaire dans l'étude de l'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost.

Dans l'avenir, nous envisageons d'adopter d'autres méthodes plus performantes, à savoir:

- d'autres procédés d'extraction afin d'améliorer le rendement ;
- la détermination des autres propriétés physico-chimiques de l'HE des écorces d'*Ocotea laevis* Kost comme l'indice de saponification ;
- une meilleure caractérisation des différents constituants en utilisant d'autres méthodes comme le couplage CPG-SM (CPG couplée à la spectrométrie de masse) ou CPG-IRTF (CPG / spectroscopie infrarouge à transformée de fourier) ;
- l'exploration d'autres propriétés biologiques de la plante comme les propriétés anti-inflammatoire, antivirale et autres.



**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ET  
WEBOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) ABDESSELAM Z. Les huiles essentielles, un pouvoir antimicrobien avéré. Nutra News, 2006 ; 6-16.
- 2) ADOSSIDES A. La filière Plantes Aromatiques & Médicinales, FAO Projets Assistance au Recensement Agricole, 2003 ; 70 p.
- 3) AFNOR, Recueil des normes françaises sur les huiles essentielles. Paris : Afnor, 1992.
- 4) ALBUQUERQUE M. R. J. R., COSTA S. M. O., BANDEIRA P. N., SANTIAGO G. M. P., ANDRADE-NETO M., SILVEIRA E. R., PESSOA O. D.L. Nematicidal and larvicidal activities of the essential oils from aerial parts of *Pectis oligocephala* and *Pectis apodocephala* Baker. An Acad. Bras. Cienc., 2007 ; 79(2) : 209-213.
- 5) ANDRIANANTENAINA R. Caractérisation physico-chimique et biologique d'huile essentielle et de la fraction hydrosoluble des feuilles d'*Ocotea auriculiformis* Kost. (Lauraceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2012 ; 84 p.
- 6) ANSARI M. A., MITTAL P. K., RAZDAN R. K., DHIMAN R. C., KUMAR A. Evaluation of pirimiphos-methyl (50% EC) against the immature of *Anopheles stephensi*, *An. culicifacies* (malaria vectors) and *Culex quinquefasciatus* (vector of bancroftianfilariasis). J. Vect. Borne. Dis., 2004 ; 41 : 10-16.
- 7) ARPINO P., PREVOT A., TRANCHANT J., VERGNOL A., WITIER P. Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Paris : Masson, 1995 ; 700 p.
- 8) BADIAGA M. Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali. [Thèse de Doctorat] université de Bamako, 2011 ; 10 p.
- 9) BAKKALI F., AVERBECK D., IDAOMAR M. Biological effects oils. A review Science Direct. Food and Chemical Toxicology, 2008 ; 46 : 446-475.
- 10) BASTIEN F. Effet larvicide des huiles essentielles sur *Stomoxys calcitrans* à la Réunion [Thèse de Doctorat]. Toulouse : Université Paul Sabatier, 2008 ; 25-26.
- 11) BOUHARB H., BADAoui K.E., ZIAR T., ALRI E.J., CHAKIR S., ALAOUI T. Sélection de quelques plantes médicinales du Zerhoun pour l'activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Applied Biosciences, 2014 ; 78 : 6685 - 6693.
- 12) BOUKHATEM M. N., HAMAIIDI M. S., SAIDI F., HAKIM Y. Extraction, composition et propriété physico-chimique de l'huile essentielle du *Géranium rosa* (*Pelargonium graveolens* L) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). Revue « Nature et Technologie », 2010 ; 3 : 37-45.
- 13) BOUTAYEB A. Etude bibliographique sur les huiles essentielles et végétales. [Mémoire de licence]. Université Ibn Tofail-licence, 2013 : chapI.
- 14) BOYD W.C. Fundamentals of Immunology. 4ème éd. New York: Wiley and Sons Editors., 1966 ; 503 p.
- 15) BRUNETON J. Pharmacognosie, Phytochimie. Plantes médicinales. 2ème Ed. Technique & Documentation. Paris : Lavoisier, 1993 ; 915 p.

- 16) BUSTA F. F. et FOEGEDING P. M. Chemical food preservatives In S.block. "Disinfection, sterilization and preservation", Lea and febiger Eds, Philadelphia.USA., 1980 ; 656-694.
- 17) CARSON C. F., HAMMER K. A, RILEY T. V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. Clin. Microbiol. Rev., 2006 ; 19(1) : 50-62.
- 18) CAVALLI J.F. "Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 des huiles essentielles de Madagascar". [Thèse de Doctorat en Chimie Organique et analytique]. Université de Corse Pascal Paoli : Faculté des sciences et techniques, 2002 ; 275 p.
- 19) DEBRAY.M., H. JACQUEMIN & R. RAZAFINDRAMBAO. Contribution à l'inventaire des plantes médicinales de Madagascar. Paris : ORSTOM, 1971 ; 150 p.
- 20) DEMETZOS C., STAHL B., ANASTASSAKI T., GAZOULI M., TZOUVELEKIS L.S., RALLIS M. Chemical analysis and antimicrobial activity of the resin Ladano, of its essential oil and of the isolated compound. Planta Med., 1999 ; 65 (1) : 76-78.
- 21) DURAFFOURD C., LAPARZ J. C. Traité de phytothérapie clinique. Ed. Paris : Maloine, 2002.
- 22) EL KALAMOUNI C. Caractérisation chimique et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées [Thèse de Doctorat] Toulouse, INPT, 2010.
- 23) FONTENELLE R. O. S., MORAIS S. M., BRITO E. H. S., KERNTOPF M. R., BRILHANTE R. S. N., CORDEIRO R. A., TOME A. R., QUEIROZ M. G. R., NASCIMENTO N. R. F., SIDRIM J. C., ROCHA M. F. G. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. J. Antimicrob. Chemother, 2007 ; 59 : 934-940.
- 24) FRANCHOMME P., PENOEL D. L'aromathérapie exactement, encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Limoges : Jollois, 1990.
- 25) GUENTER E. The essential oils vol. II, III, IV, V, VI, D. New York USA: Van Nostrand ed., 1975 ; 175 p.
- 26) HILAN C., SFEIR R., JAWISH D., AITOUR S. Huiles essentielles de certaines plantes médicinales de la famille des Lamiaceae. Lebanaise. Science. Journal., 2006 ; 7 (2) : 13-22.
- 27) HOUEL E. Etude des substances bioactives issues de la flore amazonienne. Analyse de préparation phytothérapiques à base de *Quassia amara* (Simaroubaceae) et *Psidium acutangulum* (Myrtaceae) utilisée en Guyane Française pour une indication antipaludique. Identification et analyse métabolique d'huiles essentielles à activité antifongique. [Thèse de doctorat : Chimie des substances]. Université des Antilles et de la Guyane, 2011 ; 220 p.
- 28) JOUHANNEAU D. G. La médecine des plantes aromatiques : Phyto-aromathérapie et huiles essentielles de l'Océan Indien. Ed. Diffusion Océan Indien, 1991 ; 154 p.
- 29) JOU N. T., YOSHIMORI R B., MASONG R. J. S., LIEBLING M. R. Single-tube. Nested, reverse transcriptase PCR for detection of viable *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol., 1997 ; 35 : 1161-1165.

- 30) KOSTERMANS A. J. G. H. Flore de Madagascar et des Comores : 81ème famille.
- 31) LAHLOU M. Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils, *Phytotherapy Research*, 2004 ; 435-448.
- 32) LOIZZO M. R., MENICHINI F., TUNDIS R., BONESI M., CONFORTI F., NADJAFI F., STATTI G. A., FREGA N.G., MENICHINI F. *In vitro* biological activity of *Salvia leriifolia* benth essential oil relevant to the treatment of Alzheimer's disease. *J. Oleo. Sci.*, 2009 ; 58 (8) : 443-446.
- 33) MALHEBIAU P. Caractérolgie des essences de plantes et la température des humains *Biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs*. 2ème éd. Lausanne : Jakin, 1994 ; 635 p.
- 34) MINIMINY O. Caractérisation physico-chimique et biologique de l'huile essentielle extraite des feuilles d'*Apodocephala pauciflora*, une Asteraceae endémique de Madagascar. [Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master II en Sciences de la vie : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2016; 90 p.
- 35) MISHARA A. K., DUBEY N. K. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994; 60 (4): 1101-1105.
- 36) MOHAMED S. B. Caractérisation physico-chimique et biologique de l'huile essentielle extraite d'écorce d'*Ocotea zahamenensis* (LAURACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2011 ; 72 p.
- 37) MOHAMMEDI Z. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. [Mémoire magister]. Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen, 2006 ; 155 p.
- 38) MOREIRA M. R., PONCE A. G., DEL VALLE C. E., ROURA S. I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a food borne pathogen. *L. W. T.*, 2005 ; 38 : 565-570.
- 39) NAOMY R. B. Caractérisation physico-chimique et biologique de l'huile essentielle extraite des feuilles d'*Ocotea zahamenensis* (LAURACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2012 ; 63 p.
- 40) NICOLAS V. Huiles essentielles : Production mondiale, échanges internationaux et évaluation des prix 10ème journée internationale des huiles essentielles. Actes, *Ravista italiana Eppos.*, 1991 ; numéro spécial 02/1992 : 534-539.
- 41) NOUDOGBESSI J. P., KOSSOU D., SOUHOUNHLOUE D. C. K. Effet insecticide, ovicide et larvicide des huiles essentielles de *Pimenta racemosa* (Miller) et de *Chromolaena odorata* (L. Robinson) sur le grand capucin [*Prostephanus truncatus* (Horn) ] du maïs. *J Soc Ouest-Afr Chim*, 2008 ; 26 : 41-51.
- 42) OMS. Résistance aux insecticides et lutte anti vectorielle (série des rapports techniques n°443, 17ème rapport du comité d'experts des insecticides). Genève : OMS, 1970 ; 306 p.
- 43) PADRINI F., LUCHERONI M. T. Les huiles essentielles : pour retrouver la vitalité, le bien-être, la beauté. Vecchi éd., 1997 ; 8 p.

- 44) PERRIER DE LABATHIE H., 1931. Les plantes introduites à Madagascar. XI : R.B.A., 1931 ; 719-729.
- 45) PETITJEAN A., RANDRIANJOHANY E. Plantes médicinales et aromatiques communes aux îles de l'océan indien, Plantes Aromatiques et Médicinales, à Madagascar. Faculté des Sciences, Université de la Réunion en association avec l'IMRA, 1996 ; 180 p.
- 46) PIOCHON M. Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurienne : composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse., 2008 ; 200 p.
- 47) PONCE A.G., FRITZ R., DEL VALLE C., ROURA S. I. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensm. Wiss.u. Technol.*, 2003, 36 : 679-684.
- 48) RABEHAJA R. D. J. Contribution à la valorisation de *Cymbopogon giganteus* (Chiov) madagascariensis (A. Camus), [Mémoire de DEA de Génie Chimique] Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2007 ; 79 p.
- 49) RAKOTOMALALA H. Etude des huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei*. Caractérisation-Identification des constituants-Activités biologiques. [Thèse de Doctorat : Sciences]. La Réunion : Université de la Réunion, 2004 ; 15-16.
- 50) RAKOTO-RANOROMALALA D. Purification et étude des propriétés physico-chimiques et biologiques des principes toxiques de *Tachadenus longiflorus* (GENTIANACEAE). [Thèse de Doctorat de 3ème cycle : Biochimie] Antananarivo: Université d'Antananarivo, 1989 ; 68 p.
- 51) RAKOTO-RATSIMAMANGA A., BOITEAU P., MOUTON M. Eléments de pharmacopée malagasy, Tome I. Antananarivo : Imprimerie nationale, 1969.
- 52) RANDRIANTSOA D.R. Etude comparative de deux huiles essentielles antibactériennes extraites des plantes *Cinnamosma fragrans* et *Citrus simensis* dans l'élevage de la crevette : *Panaeus monodon*. [Mémoire de DEA: Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2004 ; 78 p.
- 53) RASOAMAHENINA-ANDRIANAIVORAVELONA. A. M. Etude chimique et toxicologique des fruits de *Piper pyrifolium* (PIPERACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie] Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2007 ; 74 p.
- 54) RATSIMANOHATRA H. C. Caractérisation physico- chimique et biologique de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Polyscias ornifolia* (ARALIACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2011 ; 74 p.
- 55) RAZAFIMAHARAVO H. Caractérisation physico-chimique et biologique de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Senecio hirto-crassus* (Asteraceae). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo: Université d'Antananarivo, 2015; 80 p.
- 56) RAZAFINDRAKOTO A.R. Caractérisation physico-chimique et biologique de l'huile essentielle des feuilles d'*Ocotea laevis* Kost (LAURACEAE). [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2010 ; 60 p.

- 57) RAZAFINDRAMBAO R. Contribution à l'inventaire des plantes médicinales de Madagascar. Paris : ORSTOM, 1971 ; 151p.
- 58) RAZAKARIVONY A. A., ANDRIAMIHAJA B., RAZANAMAHEFA B. Etude chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Callistemon rigidium*. Actes du symposium biomad. Université d'Antananarivo, 2009 ; 28 p.
- 59) ROULIER G. Les huiles essentielles pour votre santé. Paris : Dangles, 1990 : 336 p.
- 60) SADAM S. M. Caractérisation physico-chimique et biologique de l'huile essentielle extraite des feuilles d'*Helichrysum ibityense* (Asteraceae). [Mémoire de Master II : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2017 ; 90 p.
- 61) SALEHI P., SONBOLI A., EFTEKHAR F., NEJAD-EBRAHIMI S., YOUSEFZADI M. Essential oil composition, antibacterial and antioxydant activity of the oil and various extracts of *Ziziphora clinopodioides subsprigida* (Boiss.) RECH. F. from Iran. Biol. Pharm. Bull., 2005 ; 28 (10) : 1892-1896.
- 62) SCHERER R. et GODOY H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2diphenyl-1-picrylhydrazyl method. Food Chemistry, 2009.
- 63) SEHENOASPIERA M.N. Caractérisation physico-chimique et biologique de l'huile essentielle extraite des feuilles d'*Ocotea cymosa* (LAURACEAE) [Mémoire de DEA : Biochimie]. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 2011 ; 40 p.
- 64) SELLES C. Valorisation d'une plante médicinale à activité antidiabétique de la région de Tlemcen: *Anacyclus pyrethrum* L, Application de l'extrait aqueux à l'inhibition de corrosion d'un acier doux dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M. Thèse de pharmacie, 2012 ; 214 p.
- 65) TALEB-T K. Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de kabylie (Nord algérien). Evaluation de leurs effets sur le bruche du niébé *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae) [Thèse de doctorat : Sciences]. Algérie : Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 2015 ; 206 p.
- 66) TEISSEIRE P.J. Chimie des substances odorantes. Paris : Lavoisier, Technique et Documentation, 1991; 480 p.
- 67) TIWARY H., NAIK S. N, TEWARY D. K., MITTAL P. K., YADAV S. Chemical composition and larvicidal activities of the essential oil *Zantoxylum armatum* DC (Rutaceae) against three mosquito vectors. J. V. Borne. Dis., 2007 ; 198-204.
- 68) WHO. Bulletin de l'organisation mondiale de la santé, 1986 ; 64 (2) : 159-175.

### REFERENCES WEBOGRAPHIQUES

1. [WWW.aude-maillard.fr/](http://WWW.aude-maillard.fr/)(toxicité sur les huiles essentielles)
2. <https://madagascar-tourisme.com/fr/vos-envies/faune-et-flore/plantes-endemiques>
3. <http://www.asterale.com/> (les huiles essentielles de Madagascar)
4. [https://www.plantes-botanique.org/genre\\_ocotea](https://www.plantes-botanique.org/genre_ocotea) [La filière “Plantes Aromatiques & Médicinales”].



## *Annexe 1*

### *Préparation des échantillons d'huile essentielle*

Norme ISO 356 : 1977

*Réactifs :*

Sulfate de magnésium ou sulfate de sodium, récemment séché et neutre.

Pour sécher le sulfate de magnésium ou le sulfate de sodium, chauffer jusqu'à une masse constante entre 180°C et 200°C (température prise de la masse constamment remuée). Pulvériser finement et conserver dans un flacon sec et hermétiquement bouché.

*Matériels :*

- Etuve
- Fioles
- Papier filtre
- Entonnoir

## *Annexe 2*

Détermination de la densité relative (AFNOR NF T 75)

*Réactifs :*

- Ethanol pour le nettoyage
- Eau distillée

*Appareillage*

- Pycnomètre

## *Annexe 3*

Détermination de l'indice de réfraction (AFNOR NF T 75 – 112)

*Réactifs :*

- Acétone
- Eau distillée

*Appareillage*

Réfractomètre muni d'un thermomètre (KRUSS OPTONIC)

## *Annexe 4*

Pouvoir rotatoire (AFNOR, NF-T 75-113)

*Réactifs :*

- L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau de pureté au moins équivalente.

- Ethanol

*Appareillage :*

- Polarimètre, d'une précision au moins égale à  $\pm 0,5$  mrad ( $\pm 0,03^\circ$ ), et réglé de façon à donner  $0^\circ$  à  $100^\circ$  avec l'eau.
- Tubes d'observation, en général de  $100 \text{ mm} \pm 0,5 \text{ mm}$  de longueur.

## ***Annexe 5***

### Indice d'acide (AFNOR, NF-T 75-103)

*Réactifs :*

- Ethanol à 95%, récemment neutralisé par la solution d'hydroxyde de potassium, en présence de phénolphtaléine à 1%.
- Hydroxyde de potassium à 0,1 N

*Appareillage :*

- Fiole conique de 250 ml ou ballon à large col de 100 ml de capacité
- Burette
- Pipette
- Balance analytique précise à 0,001 g près
- Eprouvette de 5 ml de capacité

## ***Annexe 6***

### Indice d'ester (AFNOR, NF-T75-104)

*Réactifs :*

- Hydroxyde de potassium éthanolique à 0,5 N Acide chlorhydrique à 0,5 N
- Phénolphtaléine à 2%.

*Appareillage :*

- Ballon (250 ml)
- Eprouvette
- Burette de 25 ml
- Balance analytique
- Réfrigérant à reflux

## Annexe 7

### Détermination de la miscibilité à l'éthanol (NF T 75 -101)

#### Réactifs :

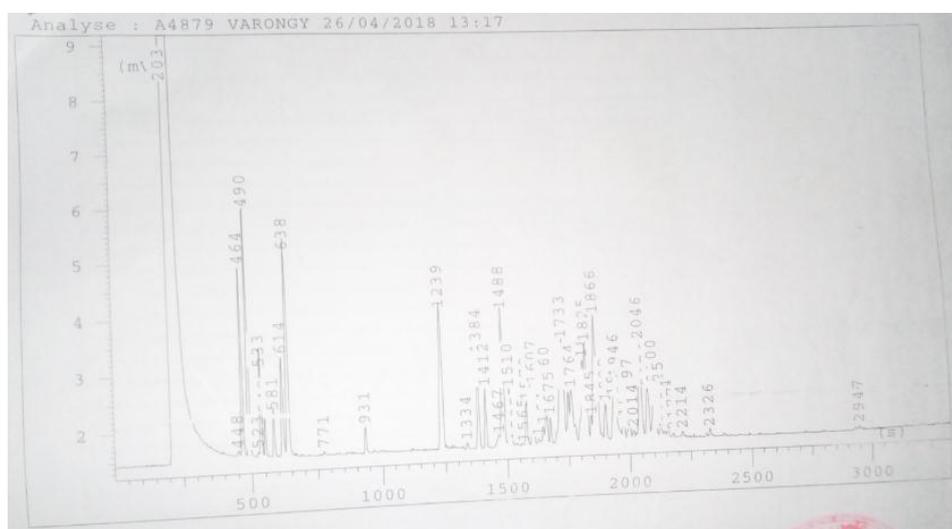
- Ethanol 95°

#### Matériels :

- Tube à essai
- Pipette pasteur

## Annexe 8

### Profil chromatographique de l'huile essentielle d'*Ocotea laevis* Kost



## Annexe 9

### Composition des différents milieux de culture

#### MUELLER-HINTON

Peptone.....	17,5g
Amidon .....	1,5g
Extrait de viande.....	2,0g
pH=7,3 +/- 0,2	

#### MUELLER-HINTON AGAR

Peptone.....	17,5g
Amidon.....	1,5g
Extrait de viande.....	2,0g
Agar.....	15g
pH=7,3 +/- 0,1 à 25°C.	