

Etude phytochimique des espèces *Plectranthus neochilus* et *Plectranthus amboinicus* de l'île de La Réunion

1) Généralités

La Phytochimie, ou chimie des substances naturelles, consiste en l'étude du métabolisme, de la structure et du rôle des substances produites par les végétaux. Cette science est étroitement mêlée à la Pharmacognosie, axe diagonal de la pharmacie qui traite tous les aspects allant de la plante au médicament. Elle permet la connaissance des matières premières végétales possédant des propriétés médicamenteuses.

Cette chimie entremêle plusieurs méthodes :

- Méthodes extractives : techniques d'extraction « classique » (solide-liquide ; liquide-liquide) et les nouveaux procédés d'extraction (micro-ondes par exemple)
- Méthodes séparatives (purification, isolement) : chromatographie, cristallisation
- Méthodes analytiques : techniques chromatographiques (sur couche mince, liquide haute performance, en phase gazeuse) et techniques structurales (spectrométrie par résonance magnétique ou spectrométrie de masse)

Les plantes sont de véritables « usine chimique ». Elles sont capables de synthétiser une grande variété de métabolites (produits intermédiaires du métabolisme) qui ont diverses fonctions : énergétique, structural, signalisation, stimulation ou inhibition d'enzymes...

On les classe en deux catégories :

- Les métabolites primaires : retrouvés dans toutes les cellules de l'organisme végétal pour assurer sa survie, répartis en quatre grandes catégories (glucides, lipides, acides aminés et acides nucléiques)
- Les métabolites secondaires : de structures chimiques souvent complexes, très dispersés et très variables selon les espèces, jouant un rôle dans la survie et la propagation de l'espèce. Ils sont également répartis en quatre catégories : les composés phénoliques, les saponines, les alcaloïdes (et dérivés azotés) et les composés terpéniques. (Tous possédant des sous catégories)

Les métabolites secondaires peuvent être des substances hétérosidiques ou non hétérosidiques, c'est-à-dire lié à un ou plusieurs sucres (oses) par liaison osidiques à la partie non sucrée (aglycone ou génine).

Parmi les métabolites secondaires, on retrouve les terpènes. Ce sont des composés issus de la condensation d'unités de base à 5 carbones appelé isoprène. On parle également de terpénoïdes ou d'isoprénoïdes. Ils regroupent à la fois des composés de faibles poids moléculaires, volatiles et composants principaux d'huiles essentielles, et des molécules hautement polymérisées comme le caoutchouc. Cette voie de biosynthèse donne naissance à de très nombreux métabolites secondaires. On les classe selon le nombre d'unités terpéniques. L'unité monoterpène correspond à une molécule à 10 carbones formée à partir de deux unités isoprènes.

La phytochimie du genre *Plectranthus* est encore mal connue. Abdel-Mogib et al ont présenté en 2000 une revue regroupant les constituants phytochimiques du genre *Plectranthus* rapportés jusqu'en 1999 [24]. Les principaux sont les diterpénoïdes, les huiles essentielles et les composés phénoliques.

Environ 140 diterpènes ont été identifiés dans les feuilles du genre. En majorité on retrouve des abiétanes pouvant être hautement modifiés. Des labdanes et des kauranes sont également présents.

Les abiétanes [25] :

Parmi les diterpènes d'origine naturelle, les abiétanes sont isolés à partir d'une grande variété de plantes terrestres. Ces composés possèdent un large éventail d'activités biologiques : antimicrobiennes, antiulcéreuses, anti-oxydantes, anti-inflammatoires, cardiovasculaires et cytotoxiques. Ces propriétés ont suscité un intérêt considérable de la part des milieux pharmaceutique et médical. En effet avec l'émergence de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques présents sur le marché, la nécessité de trouver de nouvelles molécules devient une priorité en santé publique. Les recherches se tournent vers les molécules issues du vivant car elles présentent des diversités structurales très intéressantes et le fait que certaines plantes soient utilisées depuis des dizaines d'années (voir plus) dans les médecines traditionnelles, poussent les scientifiques à extraire, isoler et analyser ces métabolites issus du métabolisme végétal.

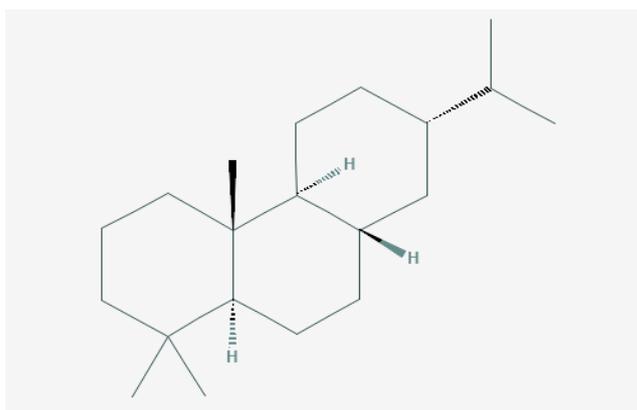


Figure 2 : Abietane, structure en 2D
(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/abietane#section=Top>)

Ces molécules possèdent un squelette carboné caractéristique à 20 atomes de carbones. Certains dérivés possèdent un cycle aromatique, d'autres vont avoir des fonctions hydroxyliques ou carboxyliques. Chez les *Plectranthus*, ce sont majoritairement les abiétanes aromatiques qui sont retrouvés. Ils sont caractérisés par un cycle aromatique C avec un degré d'oxygénation pouvant varier de positions.

Deux voies de biosynthèses sont possibles. La première étant la voie de l'acide mévalonique connue aussi sous le nom de voie de l'HMG-Co A reductase menant à la synthèse notamment du cholestérol. La seconde est celle de la voie du méthylérythritol phosphate, appelée aussi « voie non mévalonique ». Les deux impliquant des réactions de cyclisation et/ou d'arrangement du diphosphate de géranylgeranyle. [26]

Parmi toutes les espèces du genre *Plectranthus*, certaines ont fait l'objet d'extraction et d'isolation d'abiétanes. Quelques-uns de ces composés ont été testés pour leur activité antimicrobienne ce qui pourrait expliquer leurs utilisations traditionnelles en particulier pour le traitement des infections, de la fièvre et d'état inflammatoire.

Travaux antérieurs sur la composition phytochimique des espèces *Plectranthus neochilus* et *Plectranthus amboinicus*

A) *Plectranthus neochilus*

La phytochimie de cette espèce a été peu étudiée. De par son appartenance au genre *Plectranthus*, les diterpénoides sont largement présents. On trouve également des composés phénoliques, notamment des flavonoïdes. Ceux-ci ont été retrouvés dans les extraits aqueux lors d'une étude qui visait à tester la capacité de phyto-remédiation de la plante [27].

En tant que genre de la sous-famille des Nepetoideae, le *Plectranthus* est riche en huile essentielle, c'est-à-dire plus de 0.5% d'huile volatile en poids sec.

L'huile essentielle de *Plectranthus neochilus* a fait l'objet de diverses études dans différents lieux géographiques. Les constituants principaux retrouvés dans ces huiles sont les monoterpènes (C10) et les sesquiterpènes (C20). Les fractions majoritaires varient d'une espèce à l'autre mais aussi au sein d'une même espèce selon le lieu de récolte du spécimen. On retrouve en annexe 3 page 79 un tableau comparant la composition des huiles essentielles de spécimens d'Afrique du Sud [28] du Brésil [29] et du Portugal [30]. D'autres classes sont aussi présentes dont des alcools, des aldéhydes non aromatiques, des hydrocarbures et des acides gras. [30]

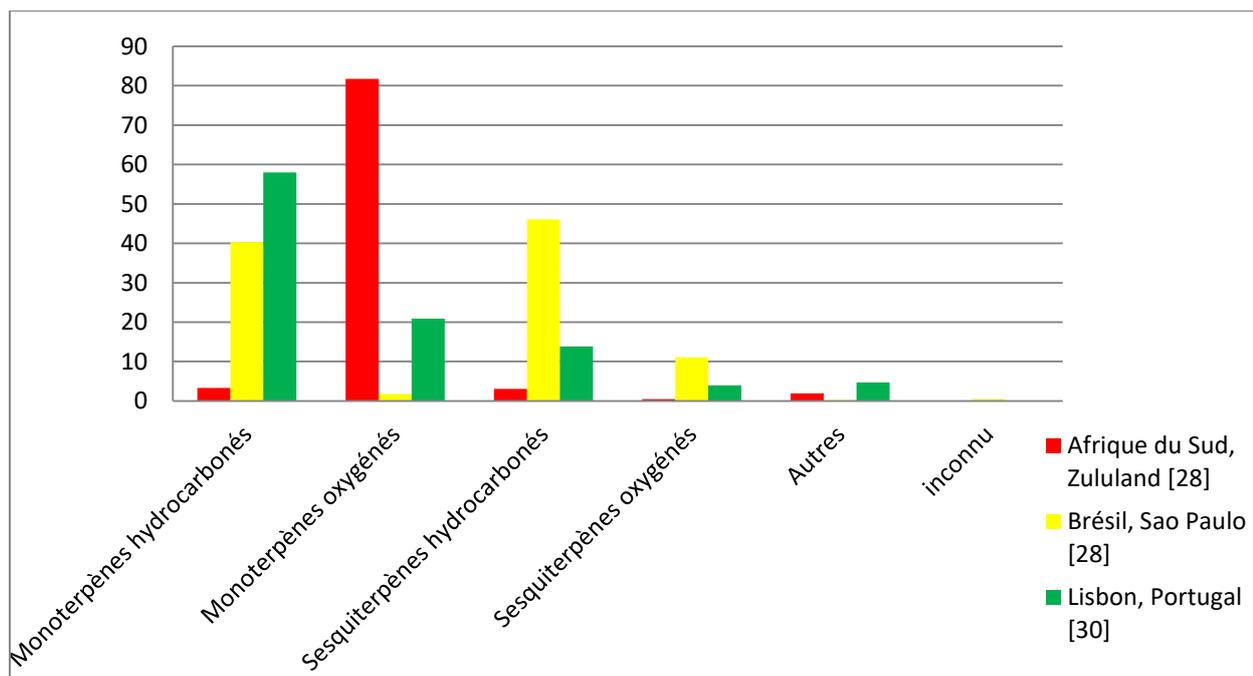


Figure 3 : Histogramme de la composition (en%) des huiles essentielles retrouvée dans la littérature

Pour le spécimen d’Afrique du Sud et du Portugal, ce sont les monoterpènes qui prédominent alors que pour celui du Brésil, ce sont les sesquiterpènes. Ces différences peuvent être attribuées à des facteurs géographiques et climatiques. Certains éléments sont bien connus pour faire varier les profils chimiques : le stade de développement de la plante, l’organe étudié, les conditions géographiques, climatiques, agronomiques, le moment de la récolte et les méthodes d’extraction. Ces dernières sont similaires, mais il y a un manque de données sur les quantités de matières utilisées. Au Portugal, les feuilles et souches étudiées sont à tous stades végétaux et floraux alors que dans les autres études le stade de développement n’est pas précisé.

On peut voir des différences assez importantes au sein de la composition de l’huile essentielle qui traduisent le fait que la plante adapte son métabolisme en fonction du biotope et des pathogènes qu’elle va rencontrer. Ces différences peuvent expliquer les différences d’utilisations au sein des médecines traditionnelles.

En Afrique du Sud [28] on retrouve majoritaire du citronellol (29%), du formiate de citronellyle (11%), du linalol (9,8%) de l’isométhone (9,2%) et du propionate de citronellyle (3,4%).

Au Brésil [29] les composés majoritaires de l'huile essentielle sont dans l'ordre des structures chimiques suivantes : β -caryophyllène (1; 28,2%), α -thujène (2; 12,2%), α -pinène (3 ; 2,6%), β -pinène (5 ; 6,2%), germacrène D (5 ; 5,3%) et l'oxyde de caryophyllène (6 ; 5,3%)

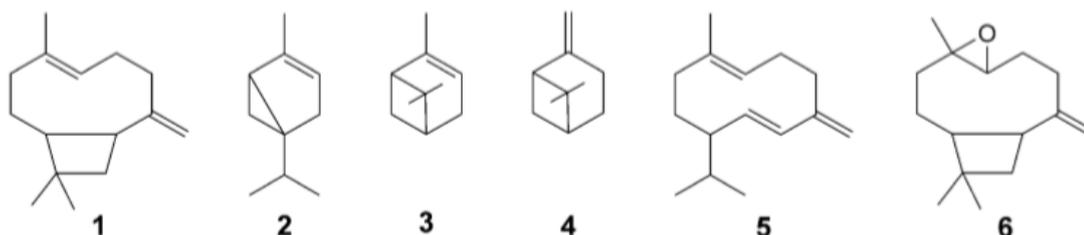


Figure 4 : Structures chimiques des constituants majoritaires identifiés dans l'huile essentielle des feuilles de *P. neochilus*

Au Portugal [23], 67 composés ont été identifiés au sein d'un mélange complexe d'une huile jaune pâle dont les chercheurs ont qualifié l'odeur comme désagréable. Majoritairement sont présents : acétate d' α -terpényle (traces -> 48%), α -thujène (2 -> 28%), β -caryophyllène (2->28%), β -pinène (1->25%), α -pinène (1->19%).

B) *Plectranthus amboinicus*

Une analyse des composés de son huile essentielle a été réalisée en 1992 à l'Université de La Réunion par le professeur Vera et son équipe [31] dans le but d'identifier les composés terpéniques contribuant aux effets pharmacologiques de la plante.

Après une hydrodistillation type Clevenger pendant 3 heures des tiges et des feuilles, on obtient une huile essentielle de couleur jaune avec un rendement de 0.07%. L'analyse a été réalisée par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. 95% des composés ont été identifiés avec pour fraction majoritaire les monoterpènes hydrocarbonés (45%), viennent ensuite les mono et sesquiterpènes oxygénés.

Les composés majoritaires ont également été identifiés :

- 16,3% : Δ -3-carène
- 12,3% : camphre
- 13,4% : carvacrol
- 11,9% : γ -terpinène

Cette étude visait également à identifier certains composés volatils contribuant à l'odeur très caractéristique de la plante. Elle peut être assimilée à celle du thym (dû au carvacrol) et au camphre.

Cette plante a fait l'objet de plusieurs screening dans le but de trouver de nouveaux candidats médicaments. Des terpènes isolés de ce *Plectranthus* ont présenté une activité antimicrobienne : on peut citer le limonène, le linalol le myrcène et le thymol [12].

Utilisée comme anti-inflammatoire dans certaines régions du monde, des chercheurs de Taïwan [32] ont tenté d'identifier les principes actifs de la plante justifiant cette allégation. Des extraits aqueux ont été préparés puis fractionnés en fonction de leur activité inhibitrice envers une cytokine, TNF- α . Quatre composés ont retenu leur attention : le premier, cependant incertain, est un lignane, l'acide 2- (3,4-dihydroxybenzylidényl) -3- (3,4-dihydroxyphényl) -4-hydroxypentanedioïque (1). Les composés 2 à 4 sont respectivement l'acide shimobashirique C, l'acide salvianolique L et l'acide rosmarinique.

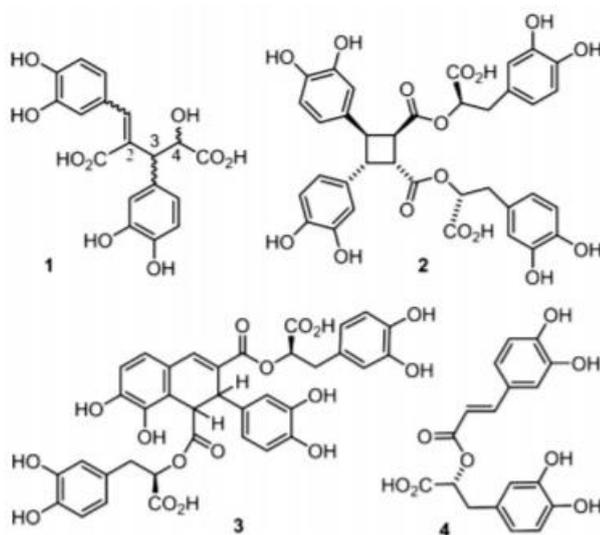


Figure 5 : Composés 1 à 4 retrouvés dans *Plectranthus amboinicus* étudié à Taïwan

L'acide rosmarinique de formule $C_{18}H_{16}O_8$ est un acide phénolique bien connu, notamment pour ses propriétés puissantes en tant qu'antioxydant, retrouvé dans de nombreuses Lamiacées comme le romarin, *Rosmarinus officinalis*, d'où il tient son nom. L'acide C shimobashirique ($C_{36}H_{32}O_{16}$), isolé de *Collinsonia japonica*, plante japonaise, est un dimère de l'acide rosmarinique probablement formé par cyclo-addition. L'acide salvianolique L ($C_{36}H_{30}O_{16}$) qui tient son nom de *Salvia officinalis*, dérive également de l'acide rosmarinique et présente un squelette de dihydro-naphtalène.

De façon plus générale, des composés de nature phénolique ainsi que des alcools sont également retrouvés dans le PA.

3) Etude phytochimique des espèces *Plectranthus neochilus* et *Plectranthus amboinicus* de La Réunion

Cette étude a été réalisée durant mon stage de Master 2 Valorisations Chimique et Biotechnologique de la Biodiversité, au sein du Laboratoire de Chimie de Substances Naturelles et de Sciences des Aliments, sous la direction du Professeur Anne Bialecki. Nous avons réalisé un profilage chimique sur trois lots de *Plectranthus neochilus* et un lot de *Plectranthus amboinicus*. L'objectif étant d'une part, d'étudier l'influence du lieu de récolte sur la composition chimique de *P. neochilus*, et d'autre part de comparer les compositions chimiques des deux espèces *P. neochilus* et *P. amboinicus*.

Les manipulations ont été réalisées au sein du LCSNSA. Pour les extraits la notation est la suivante : 001 réfère au lot du secteur Nord, 002 pour le secteur Sud, 003 pour le secteur Est ; PN pour *Plectranthus neochilus*, PA pour *P. amboinicus*.

Deux grands types d'extractions ont été réalisés pour obtenir d'un côté les composés volatils et de l'autre les composés non volatils des différents lots.

A) Matériels et Méthodes

i) Matériel végétal

Les plantes ont été collectées dans trois lieux différents de l'île avec l'aide de deux collecteurs différents. Elles ont été déposées à l'herbier de la faculté de Saint-Denis de la Réunion.

Le premier lot de *Plectranthus neochilus* a été collecté et identifié le 11/03/2019 par le Dr Claude Marodon à Montgaillard (latitude $-20,908840^\circ$; longitude $55,4666287^\circ$) pour le secteur Nord de l'île. Nommé PN1.

Le deuxième lot provient de Manapany-les-Bas (latitude $-21,3697222$; longitude $55,57694^\circ$), collecté et identifié le 15/03/2019 par Mr Hermann Thomas. Nommé PN2, pour le secteur Sud.

Le troisième lot pour le secteur Est a été collecté et identifié par Dr Claude Marodon le 21/03/2019 à Saint-André (latitude $-20,971210^\circ$; longitude $55,665971^\circ$), nommé PN3.

Le lot de *Plectranthus amboinicus* provient de Vincenzo (latitude -21,3697222° ; longitude 55,69444°), collecté et identifié le 15/03/2019 par Mr Hermann Thomas, nommé PA2.

Tableau IV : Masse en gramme des matières végétales

| | <i>P. neochilus</i> | | | <i>P. amboinicus</i> |
|--|---------------------|-------------|-------------|----------------------|
| | PN-HE-001 | PN-HE-002 | PN-HE-003 | PA-HE-002 |
| Masse végétale totale | 1530 | 1018 | 1300 | 1058 |
| Masse pour l'étude des composés volatils | 862 | 478 | 958 | 688 |
| Masse pour l'étude des composés non volatils (fraîche) | 668 | 540 | 250 | 370 |
| Masse pour l'étude des composés non volatils (sèche) | 40 | 46 | 56 | 28 |
| Pourcentage d'humidité | 94 | 91,5 | 77,6 | 92,4 |

ii) Les solvants

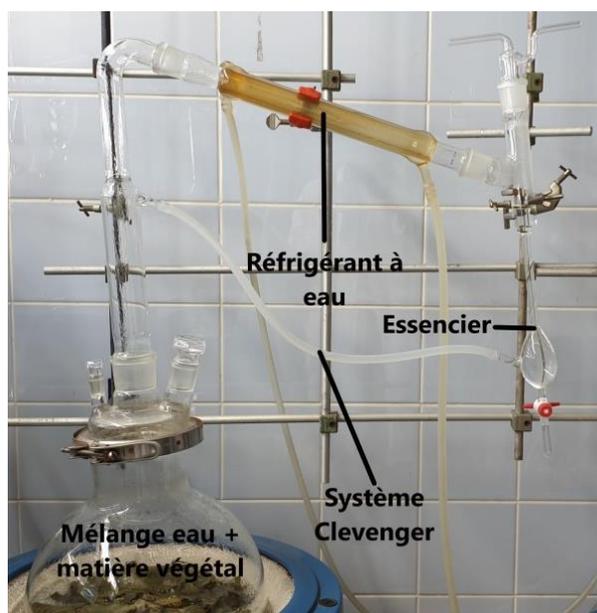
Pour l'extraction des composés volatils et l'extrait type tisane l'eau du robinet a été employée. Pour les composés non volatils, les solvants utilisés (Fisher Scientific et Acros solvants) sont l'acétate d'éthyle et l'éthanol. Pour les chromatographies sur couche mince, acétate d'éthyle, méthanol, cyclohexane et dichlorométhane ont été employés. Tous les solvants utilisés sont de grade analytique.

iii) Hydrodistillation type Clevenger

Pour l'étude des composés volatils nous avons réalisé une extraction des huiles essentielles par hydrodistillation type Clevenger. Cette technique consiste à mettre la matière végétale directement en contact avec de l'eau dans un ballon rodé. Le mélange est ensuite porté à ébullition. La chaleur va entraîner l'éclatement et la libération des composés odorants. Les molécules volatiles sont ainsi entraînées par les vapeurs d'eau qui contiennent l'huile. Au contact des parois froides du réfrigérant celles-ci se condensent. On récupère ainsi de l'eau et de l'huile essentielle dans un essencier de type Clevenger. Ce système permet de travailler en circuit fermé pour limiter les pertes et assurer un recyclage de l'eau.

Quatre hydrodistillations ont été réalisées dans les mêmes conditions pour les 4 lots. Le jour de la réception des lots, un tri a été réalisé pour n'avoir que les feuilles et les pétioles pour l'hydrodistillation programmée le lendemain.

En fonction des quantités de matière, les lots en provenance de Montgaillard (PN-1) et de Saint-André (PN-3) ont subi deux hydrodistillations simultanées dans deux ballons différents, obtenant ainsi deux extraits.



Photographie 5 : Montage d'hydrodistillation (Jessica Nakab)

iv) Extraction aqueuse mimant l'usage traditionnel

Le premier extrait pour l'étude des composés non volatils est un extrait aqueux mimant l'usage traditionnel à savoir l'infusion, ou tisane, nommé T. 10 grammes de matière végétale séchée et broyée ont été mis en contact avec 100mL d'eau portée à ébullition. Le tout est laissé à infuser pendant 30 minutes puis filtré sous vide à l'aide d'un Büchner. Les extraits aqueux ont été placés au réfrigérateur puis au congélateur à -80°C avant d'être placés au lyophilisateur pendant 48H.

v) Lyophilisation

Les extraits types tisanes ont été lyophilisés à l'aide du lyophilisateur Cosmos -80°C CRYOTEC.

vi) Extraction Accélérée par Solvant ASE

Deux extraits plus apolaires ont été réalisés pour l'étude des composés non volatils. Le premier réalisé à l'acétate d'éthyle (AE) et le second éthanolique (OH). Les deux ont été réalisés à l'aide de l'ASE 300 (Accelerated Solvent Extractor Dionex). Les cellules ASE sont remplies avec la matière sèche broyée. Les solvants utilisés sont l'AE préalablement filtré ainsi que l'éthanol.

Cette méthode d'extraction permet une économie de temps et de solvants tout en améliorant les rendements d'extractions.

La programmation a été la même pour les deux types d'extraits, le seul paramètre variable étant le solvant. Les extractions ont été réalisées pour épuiser la matière végétale. Les cellules ont été mises en contact cinq fois pendant cinq minutes avec le solvant. A la fin de l'extraction, le solvant a été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif.

Les paramètres de l'ASE sont les suivants :

- Solvants : AcOEt ou EtOH
- Température : 40°C
- Pression : 100 bar
- Nombre de cycles : 5
- Temps de pause : 5min/cycles
- Temps de purge : 120s

vi) Outils analytiques

- **Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG-SM)**

L'association d'une méthode séparative, la chromatographie gazeuse, à une méthode d'identification, la spectrométrie de masse, permet l'étude de mélange complexes et l'identification de composés à l'état de trace. Cette technique a permis l'analyse des huiles essentielles.

Le chromatographe est un Hewlett Packard HP 6890 series GC method équipée d'une colonne capillaire SPB-5 de longueur 60m, diamètre 0,32mm et une épaisseur de phase de 0,25 µm. Le gaz vecteur employé est de l'Hélium avec un débit de 0,7ml/min. Le four est programmé pour aller de 60°C jusqu'à 250°C à raison de 4° par minute.

Le spectromètre de masse, Hewlett Packard 6890 à impact électronique, a permis une détection de masse allant de 20 à 400 UMA avec un courant d'ionisation de 70eV et une température de la source de 200°C.

- **Chromatographie sur Couche Mince CCM**

Utilisation de plaque de silice en phase normale (SI60-F254, Merck), pour les révélations une lampe UV émettant à deux longueurs d'ondes différents : 254 et 365nm, ainsi que de la vanilline sulfurique préparés de la façon suivante : 1g de vanilline (Fluka) dissoute dans 100ml d'éthanol absolu (Merck) supplémenté de 2mL d'acide sulfurique concentré (Fisher Scientific). Après pulvérisation les plaques sont chauffées quelques minutes à 105°C.

- **Chromatographie Liquide à Haute Performance CLHP**

La chromatographie en phase liquide à haute performance, abrégée sous le nom anglais HPLC pour High Performance Liquid Chromatography, est une technique analytique permettant la séparation de molécules présentes dans un mélange.

Les analyses ont été réalisées sur une chaîne analytique Dionex Ultimate 3000 (Thermo scientific), pilotée par le logiciel Chroméléon couplée en série à 2 détecteurs :

- Un détecteur d'aérosols chargés CAD (de l'anglais Charged Aerosol Detector) équipé d'un générateur de diazote de type Alliance (Thermo scientific). Son fonctionnement est basé sur le principe de nébulisation d'un solvant et des analytes pour ensuite les charger

de façon positive grâce au gaz et de les analyser à l'aide d'un électromètre. C'est un détecteur universel permettant la détection d'analytes non volatils à semi volatils, idéal pour les molécules dépourvues de chromophore ou faiblement ionisables.

- Et d'un détecteur UV à barrette de diodes DAD (Thermo scientific). Ce détecteur spectroscopique UV-visible permet de mesurer de manière simultanée l'absorbance des composés sur l'ensemble du spectre UV-visible soit de 200 à 800 nm. Il permet la détection d'une large gamme de chromophores.

Les échantillons ont été préparés à une concentration de 10mg/ml dissous dans leur solvant d'extraction c'est à dire de l'eau pour les extraits aqueux type tisanes (T), dans l'acétate d'éthyle pour les extraits organiques (AE), et dans l'éthanol pour les extraits alcooliques (OH), préalablement filtrés avant d'être introduits dans les vials CLHP.

Les solvants pour l'analyse :

- A : eau milli Q (ultra pure) + 0,1% d'acide formique (AF)
- B : Acétonitrile HPLC + 0,1 % d'acide formique

Conditions d'analyse : (pour l'extrait à l'AE, OH et T) :

Colonne : Gemini C18 (3 µm), 150*4,6 mm

Eluant : ACN+0,1% AF/H₂O+0,1%AF

Gradient : 10%B : 90%A à 90%B : 10%A (30 min) ; 90%B : 10%A à 100%B : 0%A (20 min) ; 100%B : 0%A (20 min)

Débit : 0,7 ml/min

Détection : DAD/CAD

NB : - Bien conditionner la colonne avant chaque analyse

- Après chaque utilisation, nettoyer la colonne à 100 % d'ACN (environ 30mn) puis conditionner pour le stockage (à 65 % ACN).

B) Etude des composés volatils

i) Principe de l'étude

Pour étudier les composés volatils de ces plantes nous avons réalisé une extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation type Clevenger.

L'analyse de la composition des huiles essentielles obtenues a été réalisée par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM). Cette technique associe une méthode séparative, la chromatographie gazeuse, à une méthode d'identification la spectrométrie de masse, et permet l'étude de mélange complexes et l'identification de composés à l'état de trace.

ii) Résultats

Le tableau V ci-dessous présente la couleur, le rendement et la masse obtenue des extractions réalisées. On note une différence de rendement entre les différents extraits pour un même lot, notamment dans le premier où une fuite d'hydrolat a entraîné une perte de matière due à un mauvais retour d'eau dans le Clevenger. Un manque de répétabilité dû aux extractions peut expliquer ces différences (en plus des pertes de matières).

Tableau V: Caractéristiques principales des huiles essentielles obtenues

| | <i>P. neochilus</i> | | | | <i>P. amboinicus</i> | |
|--------------------------------------|---------------------|---------|--------------|-------------------------|-----------------------------------|---|
| | PN-HE-001 | | PN-HE-002 | PN-HE-003 | | PA-HE-002 |
| Extraits | 1 | 2 | | 1 | 2 | |
| Couleur de l'huile essentielle | Jaune foncé | | Jaune orangé | Jaune foncé voir orange | | Jaune clair (aspect plus liquide que les autres) |
| Rendement (en %) | 0,04 | 0,1 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,24 |
| Masse de l'huile essentielle obtenue | 171,6mg | 411,8mg | 25,2mg | 25,7mg | 128,1mg (possible reste d'eau) | 1,6297g |

On note que le *Plectranthus amboinicus* est plus riche en huile essentielle que le *Plectranthus neochilus*. On associera cet écart à la variabilité d'espèce. Des différences sont observées au sein des trois lots de PN, ce qui nous indique déjà un premier effet de localisation sur le profil chimique de la plante.

Les extraits ont ensuite été analysés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) selon la même méthode pour tous les extraits. Le tableau disponible en annexe 4 page 81 regroupe les résultats.

- **PN-HE-001 (*Plectranthus neochilus* – huile essentielle – 1er lot) :**

Pour le premier extrait, 106 composés ont été détectés, 59 ont été identifiés. Dans le second, 69 composés ont été détectés, 45 identifiés. Pour les deux extraits, le composé majoritaire est le carvacrol, un monoterpène avec une fonction phénol connue pour ses propriétés carminatives et antiseptiques [21], à raison de 24,5% pour le premier extrait, et 21,8% pour le second. Ensuite, on retrouve le camphre, un monoterpène oxygéné, dont la teneur varie entre 11,2% et 12,7% pour les extraits 1 et 2 respectivement. Par la suite des différences se font entre les deux extraits. Pour le premier, on retrouve en troisième composé majoritaire le caryophyllène à 5,7% (4,3% pour le second) puis l' α -bergamotène à 5,1% (3,8% dans le second extrait). Pour le second extrait nous avons le γ -terpinène à 6,8% puis le 3-carène à 4,3%

Deux composés non identifiés sont à noter : le premier retrouvé dans les 2 extraits avec des indices de rétention relatif (IRR) respectifs de 1797 et 1795 à 2,7% et 1,3% avec des spectres de masses similaires. Le deuxième non identifié retrouvé uniquement dans le premier extrait avec un IRR de 1505 à 5,3%.

- **PN-HE-002 (*Plectranthus neochilus* – huile essentielle – 2^{ème} lot) :**

88 composés ont été détectés en CG-SM, dont 48 identifiés. On retrouve majoritairement du caryophyllène à 14,1%, le zonarène à 7,8% (non détecté dans le premier lot), l'oxyde de caryophyllène à 7,7% et le terpinén-4-ol à 3,1%. Contrairement au premier lot on ne retrouve ni le carvacrol ni l' α -bergamotène.

Un composé majeur, 12%, n'a pas été identifié, pour un IRR de 2566 et une masse molaire de 316 uma (spectre de masse disponible en annexe 5 p. 84).

- **PN-HE-003 (*Plectranthus neochilus* – huile essentielle – 3^{ème} lot) :**

Pour le premier extrait, 88 composés ont été détectés dont 51 identifiés, 78 détectés dont 38 identifiés pour le deuxième. Le composé majoritaire est ici aussi le caryophyllène avec respectivement 9,0% et 8,8%. Vient ensuite l'oxyde de caryophyllène à hauteur de 7,0% et 8,0%. L'épi- α -cubénol est retrouvé uniquement dans le premier extrait à 5,6%. Le δ -cadinène est présent à 4,1% pour le premier et 4,7% dans le second. Le carvacrol quant à lui est retrouvé à un très faible pourcentage (0,4 et 0,5) et le camphre absent.

Dans les deux extraits, un composé majeur n'a pas été identifié, pour des IRR respectifs de 2570 et 2566 à 19,1% et 16,6%. Leurs spectres sont similaires entre eux mais également avec celui non identifié de PN-HE-002, la masse moléculaire est la même soit de 316 UMA (spectres de masse disponibles en annexe 6 et 7 page 84 respectivement pour les extraits 1 et 2)

- **PA-HE-002 (*Plectranthus amboinicus* – huile essentielle – lot du Sud) :**

64 composés ont été détectés dont 44 identifiés. Le composé majoritaire est le carvacrol à 16,3% puis le camphre à 9,2%, comme dans PN-HE-001. Vient ensuite le γ -terpinène à 6,5% (retrouvé dans les autres huiles mais à des pourcentages plus faibles), le 3-carène à 7,1% et l'*ortho*-cymène à 4,9%.

Tableau VI : Différentes classes chimiques retrouvées dans les huiles essentielles (en %)

| | <i>P. neochilus</i> | | | | | <i>P. amboinicus</i> |
|------------------------------|---------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------------|
| | PN-HE-001 | | PN-HE-002 | PN-HE-003 | | PA-HE-002 |
| | 1 | 2 | | 1 | 2 | |
| Monoterpènes | 44,1 | 69,0 | 7,5 | 1,9 | 1,3 | 56,0 |
| Monoterpènes hydrocarbonés | 5,4 | 32,7 | 1,2 | 0,1 | 0 | 28,8 |
| Monoterpènes oxygénés | 38,7 | 36,3 | 6,3 | 1,8 | 1,3 | 27,2 |
| Sesquiterpènes | 31,1 | 21,1 | 50,2 | 40,3 | 43,0 | 19,8 |
| Sesquiterpènes hydrocarbonés | 23,6 | 18,3 | 33,8 | 21,4 | 20,7 | 16,9 |
| Sesquiterpènes oxygénés | 7,4 | 2,8 | 16,4 | 18,9 | 22,3 | 2,9 |
| Diterpènes | 0,1 | 0 | 0 | 0,2 | 0 | 0 |
| Acides gras | tr | 0 | 0 | 0,5 | 0 | 0 |
| Autres | 1,8 | 1,6 | 0,9 | 1,3 | 0,1 | 1 |

Tableau VII : Composés majoritaires retrouvés dans les huiles essentielles

| <i>P. neochilus</i> | | | | | <i>P. amboinicus</i> |
|------------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| PN-HE-001 | | PN-HE-002 | PN-HE-003 | | PA-HE-002 |
| 1 | 2 | | 1 | 2 | |
| Carvacrol (24,5%) | Carvacrol (21,8%) | Caryophyllène (14,1%) | Composé non identifié (19,1%) | Composé non identifié (16,6%) | Carvacrol (16,3%) |
| Camphre (11,2%) | Camphre (12,7%) | Composé non identifié (12%) | Caryophyllène (9%) | Caryophyllène (8,8%) | Camphre (9,2%) |
| Caryophyllène (5,7%) | γ -terpinène (6,8%) | Zonarène (7,8%) | Oxyde de caryophyllène (7%) | Oxyde de caryophyllène (8%) | 3-carène (7,1%) |
| α -bergamotène (5,1%) | 3-carène (4,3%) | Oxyde de caryophyllène (7,7%) | Δ -cadiène (4,1%) | Δ -cadiène (4,7%) | γ -terpinène (6,5%) |

iii) Discussions

En accord avec les résultats retrouvés dans la littérature, on retrouve majoritairement des mono et des sesquiterpènes.

Pour PN-HE-001, ce sont les monoterpènes, de 44,1 à 69,0%, majoritairement les oxygénés (38,7 et 36,3%) qui sont dominants. Viennent ensuite les sesquiterpènes hydrocarbonés, à 23,6 et 28,3%, puis les monoterpènes hydrocarbonés, de 5,4 à 32,7%.

La tendance est différente pour PN-HE-002 : la famille dominante est celle des sesquiterpènes (50,2%), majoritairement les hydrocarbonés (33,8%), puis les oxygénés (16,4%), devant les monoterpènes oxygénés (6,3%).

Cette tendance est retrouvée pour PN-HE-003 avec comme famille dominante les sesquiterpènes, de 40,3 à 43,0%, les hydrocarbonés similaires aux oxygénés. Les monoterpènes sont quant à eux très peu présents, de 1,3 à 1,9%.

Pour PA-HE-002, ce sont les monoterpènes (comme PN-HE-001) qui dominent à 56,0%, avec une similitude entre les oxygénés et les hydrocarbonés. Les sesquiterpènes oxygénés sont très peu représentés au profit des hydrocarbonés. Ces résultats sont accord avec ceux de la littérature.

Au sein d'une même espèce les pourcentages diffèrent : pour le premier lot les monoterpènes dominant comme pour le *Plectranthus amboinicus*, tandis que pour les lots du Sud et de l'Est de PN ce sont les sesquiterpènes qui dominant. De plus, lorsque l'on regarde la composition des huiles, on remarque une similitude entre PN-HE-001 et PA-HE-002 plus qu'entre les lots de PN.

Des différences sont observées au sein de la même espèce. La localisation a un impact sur le profil chimique des composés volatils sécrétés par la plante. En effet les conditions environnementales sont variables d'un côté à l'autre de l'île.

L'analogie entre PN-HE-001 et PA-HE-002 permet d'émettre l'hypothèse d'une éventuelle confusion d'espèce lors de la collecte du premier lot.

Concernant le composé majeur non identifié dans les lots deux et trois, nous supposons qu'il s'agit d'un diterpène éventuellement oxygéné. Un isolement suivi d'une analyse par Résonance Magnétique Nucléaire est à envisager pour identifier sa structure.

C) Etude des composés non volatils

i) Principe de l'étude

Le principe de cette étude consiste en un premier temps à la réalisation de trois extraits différents pour chaque lot afin de réaliser une extraction la plus exhaustive possible.

Un extrait aqueux a été réalisé en mimant l'usage traditionnel de la plante, à savoir la tisane (nommée T), les deux autres plus « classiques » à l'aide d'acétate d'éthyle (AE) et d'éthanol (OH), obtenus par ASE. Les trois extraits ont été réalisés avec de la matière végétale préalablement séchée et broyée.

Dans un second temps, un criblage chimique a été réalisé sur les extraits bruts en utilisant différentes techniques chromatographiques : la Chromatographie sur Couche Mince (CCM) et la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP).

Tableau VIII : Rendements (en %) des extractions

| | P. neochilus | | | P. amboinicus |
|------------------------------|--------------|------|------|---------------|
| | PN-1 | PN-2 | PN-3 | PA-2 |
| Tisane (T) | 23,0 | 22,5 | 20,3 | 33,1 |
| Acétate d'éthyle (AE) | 6,7 | 6,1 | 5,4 | 2,2 |
| Ethanol (OH) | 6,2 | 5,0 | 7,7 | 5,5 |

L'écart du rendement des extraits acétate d'éthyle et éthanolique pour le PA est dû à une fuite de solvant pendant l'extraction alcoolique survenue à mi extraction, celle-ci a été reprise depuis le début.

ii) Criblage chimique par CCM

La réalisation de CCM permet de nous donner une idée sur le profil chimique des extraits. Les extraits ont été testés avec différents éluants afin d'optimiser la séparation. Les CCM qui sont présentées sont celles dont les résultats étaient les plus satisfaisants.

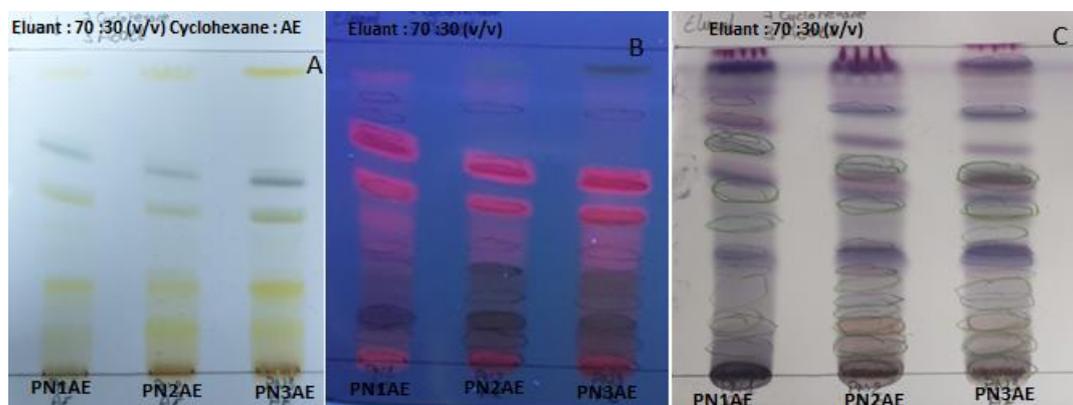
- **PN-T :**

L'éluant donnant une séparation satisfaisante est un mélange de cyclohexane et d'AcOEt 40:60 (v/v), cependant pour ces extraits les images des plaques ne permettent pas une visualisation correcte.

Cet éluant est de nature plutôt apolaire, lors des essais précédents avec des plus polaires aucune séparation n'était visible. Quelques points communs apparaissent entre les trois lots de PN. Des composés très polaires restent « accrochés » en bas de la plaque mais les lots 2 et 3 présentent des composés plus apolaires qui migrent avec le solvant. Ces composés absorbent dans l'UV à 254nm.

L'utilisation de la vanilline sulfurique a permis la révélation de composés de saveur amers ainsi que des terpènes par une coloration allant du rouge au bleu. L'apparition de taches violacées sur les trois lots nous laisse supposer une dominance de composés terpéniques mais également de substances amères. Celles-ci peuvent expliquer le goût souvent caractérisé comme fort ou amer, qui poussent les consommateurs à ajouter du miel dans l'infusion pour l'adoucir.

- **PN-AcOEt :**

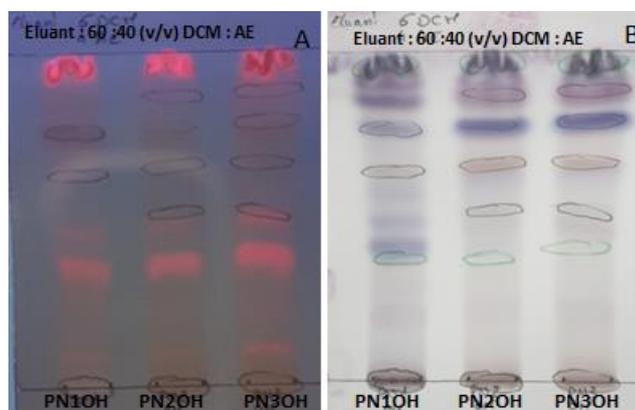


Photographie 6 : Plaques CCM pour les extraits AcOEt de PN ; en A en visible; en B sous UV 365nm; en C après révélation à la vanilline sulfurique (Jessica Nakab)

L'éluant est une nouvelle fois un mélange de cyclohexane et d'AcOEt 70:30 (v/v), plutôt apolaire. La migration est satisfaisante et nous montre des composés avec des polarités diverses : de nature polaire restant accroché en bas de plaque, à apolaire proche de la ligne de front de solvant. Les trois lots ont des composés communs colorés, qui absorbent tantôt dans l'UV 245nm, tantôt dans l'UV 365nm et certains dans les deux longueurs d'ondes. La révélation à la vanilline sulfurique nous montre une nouvelle fois la présence de nombreux composés terpéniques et amers à travers les colorations violettes.

Les profils chimiques sont assez proches entre les trois lots mais certaines différences sont observées laissant suggérer un effet de localisation.

- **PN-OH :**



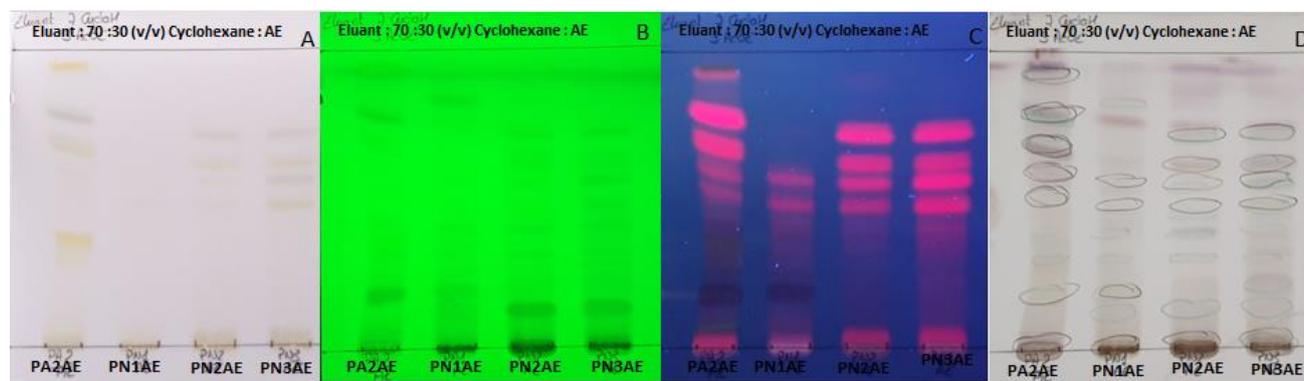
Photographie 7 : Plaques CCM pour les extraits OH de PN ; en A sous UV 365nm; en B après révélation à la vanilline sulfurique (Jessica Nakab)

L'éluant choisi est un mélange de dichlorométhane (DCM) et d'AcOEt à 60 :40 (v/v), de polarité moyenne. La migration est satisfaisante et nous montre une large gamme de polarité dans les trois lots. Comme aperçu pour l'extrait AcOEt, des composés colorés apparaissent, certains absorbent à 254nm, certains à 365nm et d'autres dans les deux longueurs d'onde.

Les profils entre les trois lots sont assez ressemblants, mais des différences apparaissent : des composés se détachent dans le premier lot mis en évidence à l'aide de la vanilline sulfurique.

Ces CCM réalisées sur les trois extraits nous permettent de voir une similitude des profils chimiques mais avec quelques nuances. Le premier lot se détache des deux autres qui sont plus proches. On note également des variations d'intensité entre les spots qui peuvent être associés à des concentrations variables d'un lot à l'autre pouvant une fois de plus nous montrer un effet de localisation sur le métabolisme de la plante.

- **PA versus PN :**



Photographie 8 : Plaques CCM pour les extraits AcOEt de PN ; en A en visible; en B sous UV 254nm ; en C sous UV 365nm; en D après révélation à la vanilline sulfurique (Jessica Nakab)

L'espèce *Plectranthus amboinicus* présente elle aussi un profil chimique couvrant une large gamme de polarités. Tout comme le PN, elle présente des bandes qui absorbent tantôt dans l'UV 254nm, tantôt 365nm et parfois dans les deux. Après révélation à la vanilline sulfurique, on distingue également des taches violacées correspondant à des composés terpéniques ou des substances amères.

On note cependant la présence de composés plus polaires non retrouvés dans PN.

On voit également des similitudes entre PA et PN-1 mais aussi avec PN-2 et PN-3.

La localisation entre PA et PN-2 étant proche, cela peut laisser penser que l'environnement influe sur le métabolisme de la même façon malgré qu'elles soient d'espèces différentes

iii) Criblage chimique par CLHP

Les extraits bruts ont ensuite été analysés par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) couplée à deux détecteurs (CAD et DAD).

Les chromatographies ont été réalisées en phase inverse, c'est-à-dire avec une phase stationnaire apolaire et hydrophobe, les composés les plus polaires sortent au début. Le gradient utilisé est un gradient d'acétonitrile (solvant B) à 10% au début d'analyse, qui monte à 90% à 30minutes, à 100% à la 50^{ème} minute, pour rester à 100% jusqu'à la fin soit 65minutes. L'autre

solvant est de l'eau ultra pure. Les deux solvants ont été mélangés à 0,1% d'acide formique. Le code couleur est le même pour les trois extraits de PN : noir pour PN1, bleu pour PN2 et rose pour PN3.

- **Extraits T :**

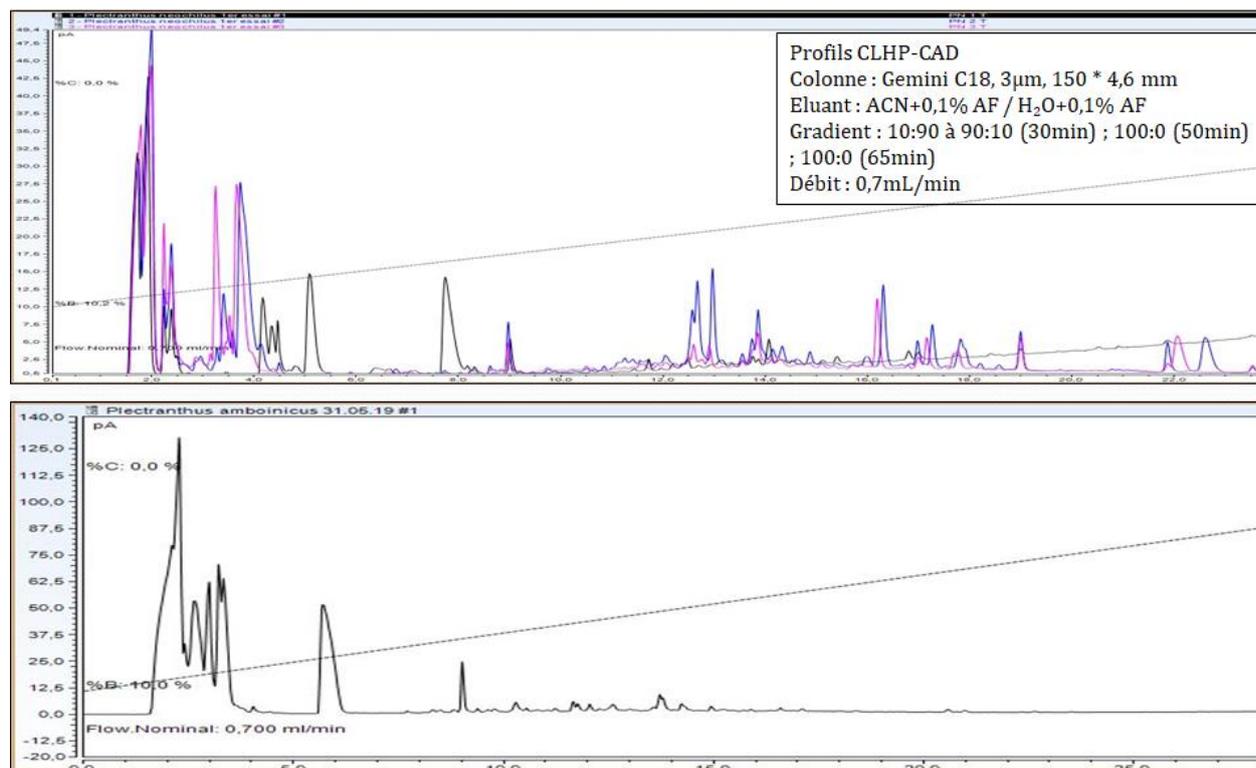


Figure 6: Chromatogramme des trois lots de PN (en haut) et PA (en bas), extraits aqueux

A première vue, la séparation des composés est convenable pour un premier essai, on arrive à distinguer des pics correspondant à des composés, ce que l'on avait du mal à apercevoir en CCM.

Pour le premier lot, les composés sont majoritairement polaires : ils sortent en début d'analyse majoritairement sous les 50% d'acétonitrile (atteint au bout de 18min).

Pour le deuxième lot, on voit également la majorité des composés sortant sous les 50% d'acétonitrile, soit des composés plutôt polaires. A la différence du premier lot, des composés à polarité moyenne sont détectés jusqu'à environ 70% d'acétonitrile. Une première différence entre ces deux lots apparaît.

La majorité des composés sont polaires pour le troisième lot. On voit cependant quelques composés de polarités moyennes.

En se fondant sur le fait que l'aire des pics chromatographiques est proportionnelle à la concentration ou la quantité de produit analysé en détection CAD, on peut dire que l'effet de localisation influence non seulement les types de composés présents mais également leurs concentrations. En effet, certains composés moyennement polaires sont plus importants dans les lots 2 et 3 par rapport au premier.

Ces résultats sont en accord avec les observations faites en CCM, à savoir la présence de composés de nature très polaire pour les trois lots, et aussi la présence de composés plus apolaires dans les lots 2 et 3. Le premier lot présente un profil plus polaire.

Pour le PA, la majorité des composés sont polaires, tous sortent bien en dessous des 50% d'acétonitrile. Peu de composés sont détectés au-delà.

En comparant les quatre profils on peut s'apercevoir que les PA-2-T et PN-1-T sont plus ressemblants, il en va de même pour PN-2-T et PN-3-T. Pour c'est deux derniers, nous pouvons attribuer les différences d'aires sous les pics à l'effet de localisation.

- **Extraits AcOEt :**

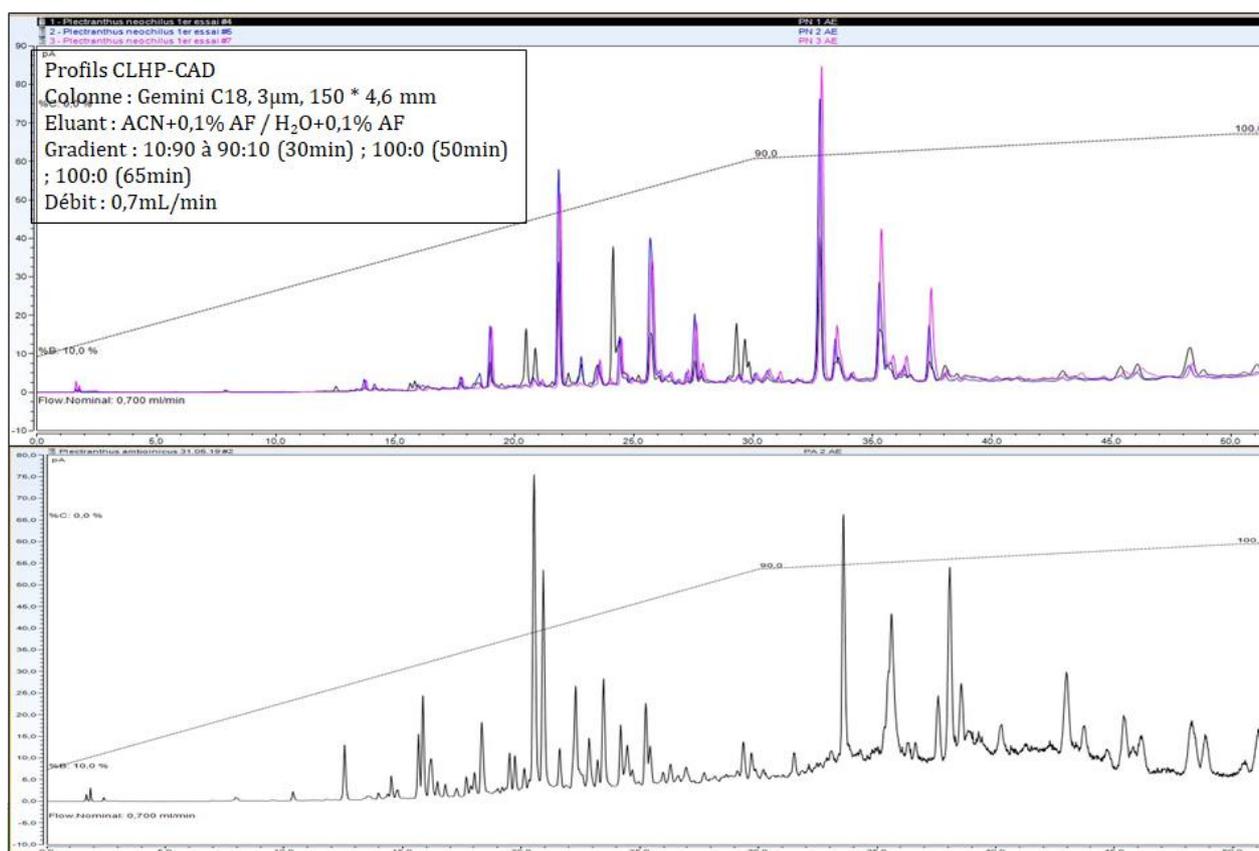


Figure 7 : Chromatogramme des trois lots de PN (en haut) et PA (en bas), extraits AcOEt

Pour les trois lots de PN, les composés polaires sont moins présents par rapport aux extraits aqueux, différence due à l'emploi de deux solvants de différentes polarités pour les extractions. La majorité des composés sont de polarité moyenne. Lorsque l'on compare les trois lots entre eux on peut voir que les profils sont relativement proches mais le premier lot se différencie une nouvelle fois des deux autres par l'apparition de pics en fin d'analyses de nature plutôt apolaire plus intensément que dans les deux autres lots. Ces derniers sont assez similaires, on note une nouvelle fois une différence au niveau de l'aire des pics entre les lots 2 et 3, nuance que l'on peut expliquer par la différence de localisation.

Le PA présente un panel de polarité un peu plus varié que le PN. Des composés plus polaires mais aussi apolaires sont présents dans celui-ci. Si on superpose les profils des quatre extraits entre eux, on s'aperçoit une fois de plus que le PN-1-AE est plus proche du PA-2-AE que les deux autres.

Ces observations rejoignent celles faites en CCM, on retrouve une large gamme de polarité avec la présence de composés un peu plus polaires chez PA non retrouvés chez PN.

- **Extraits EtOH :**

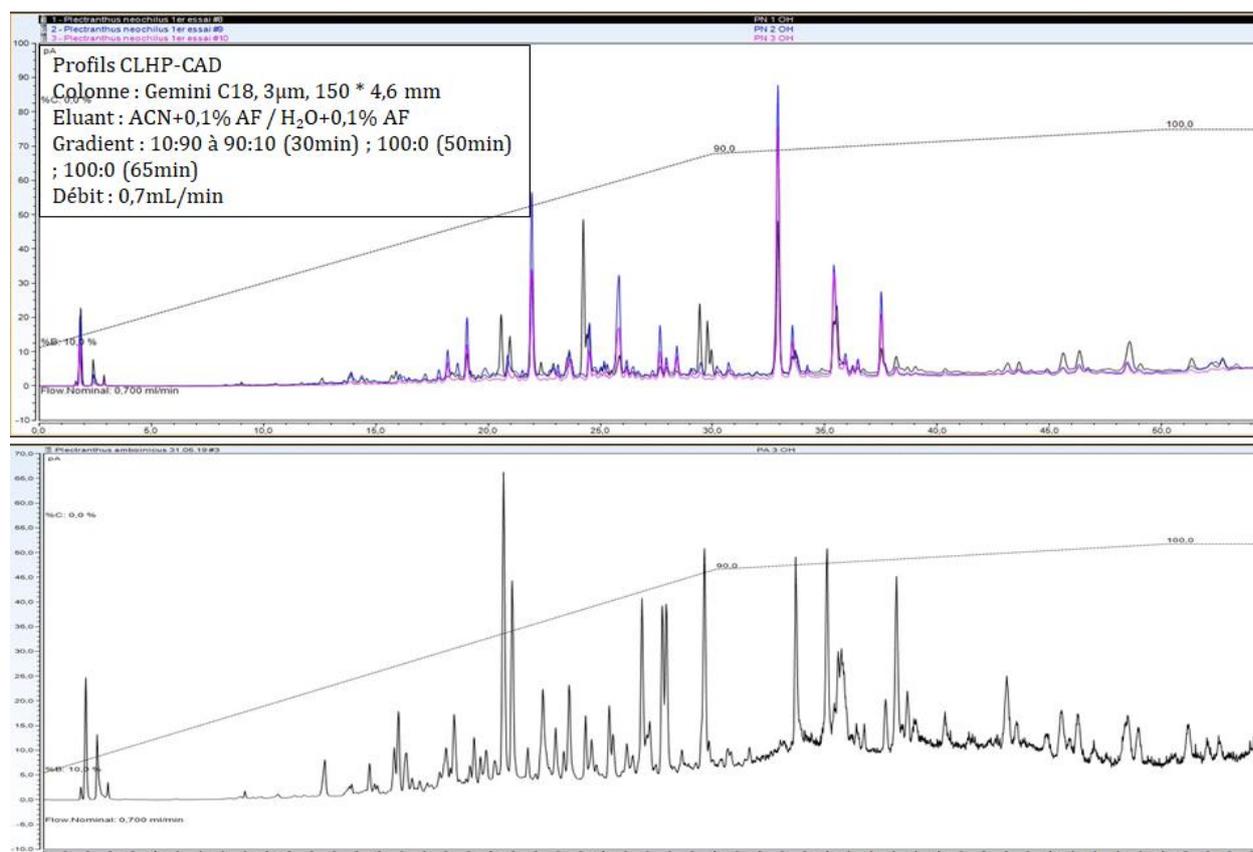


Figure 8 : Chromatogramme des trois lots de PN (en haut) et PA (en bas), extraits OH

A première vue, les extraits alcooliques sont très proches de ceux à l'acétate d'éthyle. On retrouve un panel de polarité assez large avec une dominance de composés de polarité moyenne. Cependant des composés polaires sont plus présents dans l'extrait alcoolique pour les trois lots, d'intensité variable selon le lot. Des points communs se retrouvent dans les trois lots avec une nuance d'aire de pic qui peut être associé à un effet géographique.

La large gamme de polarités apparait de manière plus évidente sur cet extrait éthanolique : des composés très polaires sortant en début d'analyse comme des très apolaires sortant à la fin. Les composés les plus importants sont, comme pour les trois lots de PN, de polarité moyenne. Ces analyses sont en accord avec les résultats des CCM.

Une fois de plus on note la ressemblance entre les lots PN-1 et PA-2 vis-à-vis des lots 2 et 3 de PN.

Ces premiers profils nous ont permis de voir que le PN et le PA offraient des composés couvrant une large gamme de polarités. Au vu des résultats, un fractionnement et des isolements sont envisageables pour identifier les composés présents dans ces extraits afin de discerner les différences et les points communs. Celles-ci peuvent être attribuées à la variabilité d'espèce mais aussi à la variation de localisation.

Comme pour les huiles essentielles, l'analogie entre PN-1 et PA-2 nous laisse penser à une éventuelle confusion d'espèce.

Concernant la nature des composés présents, au vu des profils de polarités, nous pouvons émettre l'hypothèse à des composés plutôt hétérocycliques, des alcaloïdes ou des polyphénols type flavonoïdes. Une analyse par CLHP couplé à la spectrophotométrie de masse nous permettrait de confirmer ou non ces hypothèses.

Conclusion

Cette étude a contribué aux connaissances ethnobotaniques et phytochimiques de deux espèces de *Plectranthus*, le *P. neochilus* et le *P. amboinicus*, présentes à l'île de La Réunion.

Concernant le premier aspect, les deux plantes sont utilisées aux mêmes fins médicinales. Toutes les deux sont recommandées contre les douleurs et pour le traitement de l'état grippal, par l'administration d'infusion réalisée à base des feuilles.

L'enquête ethnobotanique a permis de voir l'utilisation qui est faite du *P. neochilus*, notamment auprès de la population. Elle est employée en grande majorité pour le soulagement des maux de têtes, ce qui peut expliquer son nom vernaculaire à savoir la Plante Efferalgan® ou Doliprane®. Elle est généralement utilisée à l'état frais, à raison de trois feuilles en infusion. Une certaine méfiance ressort de la part des consommateurs mais également auprès des professionnels en « zerbaz » ce qui laisse penser à une éventuelle toxicité de la plante.

En ce qui concerne la phytochimie, les profils chimiques des deux espèces sont assez similaires. Toutes les deux contiennent des métabolites de polarité très différente. Les composés terpéniques prédominent dans les huiles essentielles. Cependant, on note une différence entre les deux espèces au niveau de la classe terpénique dominante ainsi qu'au niveau des composés majoritaires.

A propos des huiles essentielles, on note que le PA possède un rendement plus élevé que le PN. Nous pouvons associer cet écart par la variabilité d'espèce. Les différences de rendements entre les lots de PN peuvent être expliquées par l'effet du lieu de récolte.

De plus, nous suspectons une confusion des deux espèces lors de la récolte du premier lot : que ce soit pour le profil chimique des composés non volatils ou bien pour les huiles essentielles, ce lot a plus de points communs avec le PA qu'avec les deux autres lots du même genre

En effet les composés majoritaires retrouvés dans les huiles essentielles sont similaires entre le PN-1 et le PA-2. Les différences entre les lots 2 et 3 peuvent être expliquées par l'effet de localisation.

Des tests d'activités et de toxicités sur les extraits bruts sont en cours de réalisation à la Faculté de Pharmacie d'Aix-Marseille. En fonction des résultats, un fractionnement suivi d'une analyse par des méthodes spectroscopiques pourraient permettre une identification des principes

actifs présents dans les différents extraits. Des premiers résultats toxicologiques nous ont été adressés, le test des micronoyaux a été réalisé et dans les conditions expérimentales les extraits aqueux de PN n'ont montré aucune activité clastogène ou aneugène. On peut dire que le *Plectranthus neochilus* est sans effet génotoxique, et d'autres recherches de toxicités (aigue et chronique) restent à entreprendre pour rassurer les consommateurs de la Plante Doliprane, ce qui encourage la poursuite des essais.

Bibliographie

- [1] : Bureau L. La phytothérapie pertinente. ALTAL Éditions; 112 p.
- [2] : Morant O. Epidémie de Chikungunya à la Réunion 2005-2007 Place des plantes médicinales dans la maladie. 2007.
- [3] : Paracétamol : l'ANSM lance une consultation publique pour sensibiliser les patients et les professionnels de santé au risque de toxicité pour le foie en cas de mésusage - Point d'Information - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 31 janv 2019]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Paracetamol-l-ANSM-lance-une-consultation-publique-pour-sensibiliser-les-patients-et-les-professionnels-de-sante-au-risque-de-toxicite-pour-le-foie-en-cas-de-mesusage-Point-d-Information>
- [4] : Description botanique des Lamiaceae | BOTANIQUE.ORG [Internet]. [cité 5 févr 2019]. Disponible sur: <https://www.botanique.org/description-botanique-lamiaceae-article24366/>
- [5] : [BIOECO] - Famille des Lamiacées. [Internet]. [cité 5 févr 2019]. Disponible sur: <http://bioeco.free.fr/photos/familles/lamiac.htm>
- [6] : Rijo P, Batista M, Matos M, Rocha H, Jesus S, Simões MF. Screening of antioxidant and antimicrobial activities on *Plectranthus* spp. extracts: Pesquisa das atividades antioxidante e antimicrobiana em extractos de plantas do género *Plectranthus*. Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research. déc 2018;9(2):225-35.
- [7] : Rice LJ, Brits GJ, Potgieter CJ, Van Staden J. *Plectranthus*: A plant for the future? South African Journal of Botany. oct 2011;77(4):947-59
- [8] : Index de la flore [Internet]. [cité 7 févr 2019]. Disponible sur: https://mascarine.cbnm.org/index.php/flore/index-de-la-flore/nom?code_taxref=445720
- [9] : Lavergne R, Véra R. Étude ethnobotanique des plantes utilisées dans la pharmacopée traditionnelle à La Réunion. : 225
- [10] : *Plectranthus amboinicus* | TRAMIL [Internet]. [cité 7 mai 2019]. Disponible sur: <http://www.tramil.net/fr/plant/plectranthus-amboinicus>
- [11] : *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. [Internet]. [cité 7 mai 2019]. Disponible sur: http://www.mi-aime-a-ou.com/plectranthus_amboinicus.php
- [12] : Lukhoba CW, Simmonds MSJ, Paton AJ. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. Journal of Ethnopharmacology. janv 2006;103(1):1-24.
- [13] : Sodré GA, Ferah PC, Lima HRR, Campos LV, Delou CMC, Wille Lima NR. Phenotypic Plasticity of Boldo Mirim (*Plectranthus neochilus* Schlechter) within Rach of Children from Second Degree of Elementary School. Creative Education. 2018; 09(09):1359-76.

- [14] : Lima NRW, Sodré GA, Lima HRR, de Sá Mancebo SS, Campos LV, Gibson A, et al. The Efficacy of a Practical Activity in the Construction of Knowledge of the Concepts of Species and Phenotypic Plasticity Using the Boldo Mirim (*Plectranthus neochilus*; Schltr.). Creative Education. 2017; 08(13):2036-48.
- [15] : Bandeira JM, Bianchi VJ, Rubin S, Peters JA, Braga EJB. Genetic similarities among four species of the *Plectranthus* (L'Hér.) genus. Acta Scientiarum Biological Sciences [Internet]. 1 janv 2010 [cité 11 juin 2019];32(1). Disponible sur: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/880>
- [16]: Définitions : ethnobotanique - Dictionnaire de français Larousse [Internet]. [Cité 27 mai 2019]. Disponible sur: <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/ethnobotanique/31403>
- [17] : plantes médicinales de La Réunion [Internet]. [Cité 19 févr. 2019]. Disponible sur: http://lansiv-kreol.net/environ_plantesmed.htm
- [18] : Duarte M do R, Lopes JF. Stem and leaf anatomy of *Plectranthus neochilus* Schltr., *Lamiaceae*. Revista Brasileira de Farmacognosia. Déc. 2007;17(4):549-56.
- [19]: Tareau MA, Palisse M, Odonne G. As vivid as a weed... Medicinal and cosmetic plant uses amongst the urban youth in French Guiana. Journal of Ethnopharmacology. Mai 2017; 203:200-13.
- [20]: De Albuquerque U.P. The Use of Medicinal Plants by the Cultural Descendants of African People in Brazil. : 6.
- [21] Longuefosse J-L. Le guide de phytothérapie créole : Bien se soigner par les plantes créoles. Orphie. Broché; 2006.
- [22] York T, de Wet H, van Vuuren SF. Plants used for treating respiratory infections in rural Maputaland, KwaZulu-Natal, South Africa. Journal of Ethnopharmacology. juin 2011;135(3):696-710.
- [23] : Smadja J, Marodon C. Le grand livre des plantes médicinales de l'île de La Réunion t.1 ; inscrites à la Pharmacopée Française. Orphie; 2016. 232 p.
- [24] : Abdel-Mogib M, Albar H, Batterjee S. Chemistry of the Genus *Plectranthus*. Molecules. 28 févr 2002;7(2):271-301
- [25] : Neto Í, Faustino C, Rijo P. Antimicrobial abietane diterpenoids against resistant bacteria and biofilms. 2015;13
- [26] : González MA. Aromatic abietane diterpenoids: their biological activity and synthesis. Natural Product Reports. 2015;32(5):684-704.

- [27] : Ramborger BP, Ortis Gularte CA, Rodrigues DT, Gayer MC, Sigal Carriço MR, Bianchini MC, et al. The phytoremediation potential of *Plectranthus neochilus* on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and the role of antioxidant capacity in herbicide tolerance. *Chemosphere*. déc. 2017;188:231-40.
- [28] : Lawal OA, Hutchings AH. Chemical Composition of the Leaf Oil of *Plectranthus neochilus* Schltr. :3.
- [29] : Caixeta SC, Magalhães LG, de Melo NI, Wakabayashi KAL, de P. Aguiar G, de P. Aguiar D, et al. Chemical Composition and in vitro Schistosomicidal Activity of the Essential Oil of *Plectranthus neochilus* Grown in Southeast Brazil. *Chemistry & Biodiversity*. nov. 2011;8(11):2149-57
- [30] : Mota L, Figueiredo AC, Pedro LG, Barroso JG, Miguel MG, Faleiro ML, et al. Volatile-Oils Composition, and Bioactivity of the Essential Oils of *Plectranthus barbatus*, *P. neochilus* and *P. ornatus* Grown in Portugal. *Chemistry & Biodiversity*. mai 2014;11(5):719-32.
- [31]: Vera R, Mondon J.M. Extract of *Plectranthus amboinicus*. : 2
- [32] : Chen Y-S, Yu H-M, Shie J-J, Cheng T-JR, Wu C-Y, Fang J-M, et al. Chemical constituents of *Plectranthus amboinicus* and the synthetic analogs possessing anti-inflammatory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. mars 2014;22(5):1766-72

Liste des photographies

Photographie 1 page 20 : *Plectranthus amboinicus* (Jessica Nakab)

Photographie 2 page 21 : *Plectranthus neochilus* (Jessica Nakab)

Photographie 3 page 23 : Différences morphologiques chez *P. neochilus* (Jessica Nakab)

Photographie 4 page 33 : Etalage de Franswa Tibere, tisanneur, marché nocturne de Saint-Denis (Jessica Nakab)

Photographie 5 page 48 : Montage d'hydrodistillation (Jessica Nakab)

Photographie 6 page 59 : Plaques CCM pour les extraits AcOEt de PN ; en A en visible; en B sous UV 365nm; en C après révélation à la vanilline sulfurique (Jessica Nakab)

Photographie 7 page 60 : Plaques CCM pour les extraits OH de PN ; en A sous UV 365nm; en B après révélation à la vanilline sulfurique (Jessica Nakab)

Photographie 8 page 61 : Plaques CCM pour les extraits AcOEt de PN ; en A en visible; en B sous UV 254nm ; en C sous UV 365nm; en D après révélation à la vanilline sulfurique (Jessica Nakab)

Liste des figures

Figure 1 page 34 : Répartition en catégorie d'âge des personnes interrogées

Figure 29 page 40 : Abietane, structure en 2D
(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/abietane#section=Top>)

Figure 310 page 42: Histogramme de la composition (en%) des huiles essentielles retrouvée dans la littérature

Figure 4 page 43: Structures chimiques des constituants majoritaires identifiés dans l'huile essentielle des feuilles de *P. neochilus*

Figure 5 page 4411 : Composés 1 à 4 retrouvés dans *Plectranthus amboinicus* étudié à Taïwann

Figure 6 page 6212: Chromatogramme des trois lots de PN (en haut) et PA (en bas), extraits aqueux

Figure 713 page 64: Chromatogramme des trois lots de PN (en haut) et PA (en bas), extraits AcOEt

Figure 814 page 65: Chromatogramme des trois lots de PN (en haut) et PA (en bas), extraits OH

Liste des tableaux

Tableau I page 35 : Appellations vernaculaires du *Plectranthus neochilus*

Tableau II page 35: Allégations retrouvées pour le *Plectranthus neochilus*

Tableau III page 36 : Parties et quantités utilisées pour la préparation de PN

Tableau IV page 47 : Masse en gramme des matières végétales

Tableau V page 52: Caractéristiques principales des huiles essentielles obtenues

Tableau VI page 55: Différentes classes chimiques retrouvées dans les huiles essentielles (en %)

Tableau VII page 55: Composés majoritaires retrouvés dans les huiles essentielles

Tableau VIII page 57: Rendements (en %) des extractions

Annexes

Annexe 1 : Fiche enquête ethnobotanique

Annexe 2 : Résultats de l'enquête ethnobotanique

Annexe 3 : Comparatif des huiles essentielles retrouvées dans la littérature

Annexe 4 : Comparatif des huiles essentielles étudiées

Annexe 5 : Spectre de masse du composé non identifié de PN-HE-002

Annexe 6 : Spectre de masse du composé non identifié de PN-HE-003 du premier ballon

Annexe 7 : Spectre de masse du composé non identifié de PN-HE-003 du deuxième ballon

FICHE ENQUETE ETHNOBOTANIQUE

A PROPOS DE VOUS

- 1) Vous êtes : un homme une femme
- 2) Quel âge avez-vous ? <20 ans 20-29ans 30-39ans 40-49ans
 50-59ans 60-69ans >70ans

3) Profession ?

.....

A PROPOS DE LA PLANTE

1) Sous quel nom connaissez-vous cette plante ? (nom latin en plus si connu)

.....

2) Pour quelles maladies ou troubles de la santé l'utilisez-vous ?

.....

3) Comment l'utilisez-vous ?

- Plante fraîche Plante séchée

Quelle partie de la plante ?

.....
.....

En quelle quantité ?

.....
.....

Comment la préparez-vous ?

.....
.....
.....

Associez-vous d'autres plantes à la préparation ?

.....
.....
.....

4) A quel posologie utilisez-vous cette plante ? (combien par jours, durée traitement)

.....
.....
.....
.....

5) Connaissez-vous d'éventuelles toxicités, ou contre-indication, ou précautions à prendre avec cette plante ?

.....
.....
.....
.....

6) Commentaires libres

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

En vous remerciant pour avoir pris le temps de répondre à cette enquête

Jessica NAKAB

Annexe 2 : Résultats de l'enquête ethnobotanique

| Sexe | Age | Secteur | Profession | Nom plante | latin | Indications | Fraiche/sèche | Partie | Quantité | Préparation | Autres plantes | Posologie | Toxicités | Commentaires |
|------|-----------|---------|----------------------------|---------------------------------|-------|---|---------------|-----------------------|------------------------------------|---|--|---|---|---|
| H | 30-39ans | S | Professeur | Plante Doliprane | | mal de tête, curatif ou préventif (apero) | fraiche | feuilles | 1 ou 2 | mange direct | | le soir après l'apero, une fois de temps à autre | | A testé auprès d'amies migraineuses, une a maché la feuille, en 15min symptômes disparues |
| H | >70ans | | Retraité | Plante Doliprane | | meme que le doliprane | fraiche | branche avec feuilles | une branche 10-15cm /casserole | infusion | verveine citronnelle | 3 à 4 tasses / jour selon symptômes | | Préfère le ti baume (P.amboinicus) par rapport au gout |
| F | >70ans | | Retraité | Plante Doliprane | | meme que le doliprane | fraiche | branche avec feuilles | une branche 10-15cm /casserole | infusion | verveine citronnelle | 3 à 4 tasses / jour selon symptômes | | Préfère le ti baume (P.amboinicus) par rapport au gout |
| H | 20-29ans | S | Employé Jardin St Philippe | Plante Dafalgan | | Mal de tête | fraiche | feuilles (cœur) | un cœur | infusion, décoction ou cataplasme | | pas souvent | | "Même m'en a fait quand j'étais petit" (possible confusion avec l'amboinicus...) |
| H | 20-29 ans | S | Employé Jardin St Philippe | Plante Dafalgan | | Mal de tête | fraiche | feuilles (cœur) | un cœur ou 3 feuilles | infusion | | | | |
| H | 60-69ans | S | Employé Jardin St Philippe | Efferalgan | | meme que l'efferalgan | fraiche | feuilles | 3 feuilles | infusion ou décoction (plus de molécules) | | | | mauvais herbe, grasse, pousse partout |
| F | 30-39ans | S | Gynécologue | Efferalgan ou Gros Thym | | Digestion | fraiche | feuilles | 4 feuilles | infusion | fleurs de thym ou ayapana | de temps en temps le soir | | Voisine de 80ans qui lui a donné, on lui a parlé d'une utilisation culinaire |
| H | 60-69ans | O | Tisaneur | Efferalgan | | Migraine/sommeil | fraiche | feuilles | quelques feuilles | infusion | | 2/3 fois | | Usage personnel, appréhension intuitive qu'elle a un revere, il ne faut pas en abuser |
| F | 50-59ans | O | Jardin | Menthe Efferalgan Doliprane pei | | meme que le doliprane (douleurs musculaires, digestion) | fraiche | feuilles | 3 ou 5 | infusion ou cataplasme de feuilles écrasées | | 1 ou 2/jour | | Usage personnel, jamais en plante sèche car elle a trop d'eau |
| H | 20-29 ans | N | Post Doctorant de chimie | Efferalgan ou ti baume | | Maux de tête et digestion | fraiche | feuilles | quelques feuilles | tisane, quelques feuilles pour 1L d'eau | Basilic sacré et verveine citronnelle | une fois par jour le soir, pas plus de 2 ou 3 jours de suite | Non | |
| H | 30-39 ans | O | Chomage | Efferalgan ou ti baume | | Mal de tête | fraiche | feuilles | "au pif" | infusion | | | | "Paraît que ça marche même pour les règles douloureuses" |
| F | 50-59 ans | O | Chomage | Plante Efferalgan | | Fièvre, maux de tête, grippe | fraiche | feuilles | 4 petites pour une casserole d'eau | infusion | Peut être mélangée avec le cœur de cerises | N'importe quel moment, dit que les gramounes disent qu'il faut prendre ça 2 fois/jour sur une semaine | Il ne faut pas abuser de la quantité de feuilles, pas mettre plus de doses requises parce que toutes les plantes à haute dose deviennent toxiques | On peut le boire jusqu'à 3 fois par jour |

| Sexe | Age | Secteur | Profession | Nom plante | latin | Indications | Fraiche/sèche | Partie | Quantité | Préparation | Autres plantes | Posologie | Toxicités | Commentaires |
|------|-----------|---------|--------------------------------------|-------------------------|-------|--|---------------|-------------------|---|---|---|---|--|--|
| F | 20-29 ans | O | Etudiante | Plante Doliprane | | Fièvre, maux de tête, grippe | fraiche | feuilles et tige | 2 tiges pour 1L | tisane | Aucune | 1 verre matin et soir, pas de nombre spécifique tant que la douleur est présente je prend | Ne pas la mélanger avec d'autres plantes, e pas boire plus de 2 verres/jour | |
| F | 20-29 ans | E | Ingenieure en Energies renouvelables | Efferalgan pei | | Douleur, fièvre, fatigue | fraiche | feuilles et tiges | quelques feuilles | infusion | citronnelle, thym, gingembre, citron et miel | une tasse le soir | | |
| F | 50-59 ans | E | Assistante sociale | Efferalgan pei ou baume | | douleur, état grippal | fraiche | feuilles | quelques feuilles | infusion | non | une tasse le soir | | |
| F | 20-29 ans | O | Etudiante | Doliprane | | état grippal, grosse fièvre | fraiche | feuilles | 3-4 feuilles (variable selon intensité de la maladie) | infusion | citron et cœur de cerise | une tasse le soir | non | "Je ne sais pas si elle est utilisée pour d'autres troubles mais pour la fièvre très efficace. J'ai transpirée toute la nuit sûrement la tisane faisait effet, le lendemain j'étais en pleine forme ! Tres efficace" |
| H | 30-39 ans | N | Technicien de labo | Efferalgan/D afgang | | Maux de tête et digestion | fraiche | cœur | variable selon humeur | infusion ou décoction | basilic pour la digestion, HE de tea tree pour les maux de tête | une tasse le soir avant ou après repas | | Jamais une plante seule, toujours mélanger. Et ne pas la confondre avec la plante Doliprane ! |
| F | 20-29 ans | S | Masseuse | Baume Efferalgan | | maux de tête | fraiche | feuilles | plusieurs | "couronne sur la tête" | | rarement | | |
| | | | | | | tendinites | fraiche | feuilles | 3 | cataplasme | | | | très rarement en infusion |
| F | 30-39 ans | S | Masseuse | Baume Efferalgan | | maux de tête | fraiche | feuilles | plusieurs | "couronne sur la tête" | | rarement | | "L'odeur enivre et soulage le mal de tête" |
| H | 30-39 ans | E | Agriculteur | Efferalgan | | pas pour des problèmes en particulier, plus par plaisir, rarement grippe, douleurs, fièvre | fraiche | feuilles | quelques feuilles | infusion | verveine citronnelle, menthe, thym, etc... | rare, 3 ou 4 x par an | non | jamais seul toujours en association |
| H | <20 ans | S | Etudiant | Efferalgan | | Mal de tête, digestion, douleur | fraiche | feuilles | 5 feuilles | infusion | ayapana, citronnelle, +/- romarin pour la digestion | une bonne tasse le soir | Si les feuilles sont abîmées, trouées... mauvaise odeur donc à ne pas utiliser | Seul pour les maux de tête ou les douleurs. Plante a multiplication anarchique, résistante et robuste. |
| F | 60-69 ans | N | Retraîtée | Efferalgan | | Etat grippal, rhume, maux de tête | fraiche | feuilles | 1 ou 2 | infusion | thym citronné ou verveine citronnelle ou géraniem | rarement, le soir | | ne l'utilise pas a tord et à travers |
| F | 50-59 ans | O | Institutrice | Efferalgan | | Mal de tête, digestion, douleurs | fraiche | feuilles | 3 feuilles | infusion | ayapana si pour la digestion | une bonne tasse le soir | | gout amer, ajoute du miel pour adoucir |
| H | 20-29 ans | E | ouvrier | Menthe Doliprane | | Douleurs, fièvre, maux de dents | fraiche | feuilles | petite poignée | infusion | | 2-3 jours uniquement | pas de toxicité connue tant que la prise n'est pas importante | |
| | | | | | | | | feuilles | 1 | directement macher pour les maux de dents | | | | |
| F | 50-59 ans | N | agent d'entretien | Doliprane | | diététique, ça aide les fonctions rénales. Bon aussi pour les migraines fièvre, grippe... | fraiche | feuilles | 30g | infusion | | | | |
| | | | | | | | seche | feuilles | 15g | infusion | | | | |
| F | 30-39 ans | N | chargé de mission | Doliprane | | migraine, maux de tête ou soulager les courbatures | fraiche | feuilles | 3 bourgons (1=5feuilles) | infusion | citronnelle | une bonne tasse le soir | "on m'a dit de faire attention aux doses" | certaine méfiance car forte en gout "tu sens qu'il ne faut pas en abuser" |

Annexe 3 : Comparatif des huiles essentielles retrouvées dans la littérature

| | Composition (%) | | |
|--|----------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | Afrique du Sud, Zululand [21] | Brésil, Sao Paulo [22] | Lisbon, Portugal [23] |
| Monoterpènes | | | |
| Monoterpènes hydrocarbonés | 3,3 | 40,36 | 43 - 73,05 |
| camphène | | 0,13 | |
| δ-3-carène | | | 0,2 - 1,7 |
| <i>p</i> -cymène | | | 0,65 - 1,5 |
| <i>o</i> -cymène | | 0,33 | |
| 2,5-dimethylstyrène | | | 0,05 - 0,15 |
| limonène | 1,9 | 0,33 | 0,5 - 2,8 |
| β-myrcène | | 0,28 | 0,125 - 0,65 |
| (<i>E</i>)-β-ocimène | 0,4 | 2,66 | 1,6 - 4,55 |
| (<i>Z</i>)-β-ocimène | 0,3 | 0,41 | 0,175 - 1,8 |
| α-phellandrène | | | 0,15 - 0,45 |
| β-phellandrène | | | 0,3 - 2,8 |
| α-pinène | | 12,63 | 9,9 - 18,1 |
| β-pinène | | 6,19 | 4,7 - 19,05 |
| sabinène | | 2,7 | 2,3 - 5,85 |
| α-terpinène | | 0,69 | 0,3 - 0,95 |
| γ-terpinène | | 1,32 | 0,525 - 1,8 |
| α-terpinolène | 0,7 | 0,28 | |
| thuja-2,4(10)-diène | | 0,19 | |
| α-thuyène | | 12,22 | 10,55 - 26,3 |
| Monoterpènes oxygénés | 81,7 | 1,78 | 6,45 - 35,35 |
| acétate de bornyle | | | 0,05 - 0,8 |
| acétate de citronellyle | 0,7 | | |
| acétate d'α-terpinyle | | | 1,6 - 27,6 |
| butyrate de citronellyle | 1,3 | | |
| butyrate de géranyle | 0,8 | | |
| carvacrol | | | 0,05 - 0,1 |
| citronello | 29 | | |
| formate de citronellyle | 11 | | |
| formate de géranyle | 0,7 | | |
| géraniol | 3,1 | | |
| isobutyrate de géranyle | 0,3 | | |
| isomenthone | 9,2 | | |
| linalol | 9,8 | | |
| oxyde de <i>cis</i> -linalol (furanoïde) | 0,9 | | |
| menthone | 1,2 | | |
| <i>p</i> -menth-1,5-diène-8-ol | | | 0,05 - 1,1 |
| oxyde de <i>cis</i> - rose | 0,8 | | |
| oxyde de <i>trans</i> - rose | 3,3 | | |
| propionate de citronellyle | 3,4 | | |
| terpinén-4-ol | | | 1,85 - 3,85 |

| | | | |
|--------------------------------------|------------|--------------|--------------------|
| α -terpinéol | 4,5 | 1,78 | 0,375 - 2,45 |
| <i>trans</i> - thujone | | | 0,075 - 0,8 |
| tiglate de géranyle | 1,5 | | |
| valérate de citronellyle | 0,2 | | |
| Sesquiterpenes | | | |
| Sesquiterpenes hydrocarbonés | 3,1 | 46,12 | 8,05 - 19,7 |
| allo-aromadendrène | 0,1 | | |
| α -amorphène | | 0,37 | |
| aromadendrène | 0,2 | | |
| <i>trans</i> - α -bergamotène | | | 0,075 - 0,4 |
| β -bourbonène | 0,6 | 1,32 | 0,25 - 1 |
| δ -cadinène | 0,4 | 2,5 | 0,05 - 0,45 |
| γ -cadinène | | | 0,125 - 0,8 |
| β -caryophyllène | 0,4 | 28,23 | 3,4 - 8,9 |
| α -copaène | 0,1 | 1,2 | 0,75 - 1,75 |
| β -copaène | | | 0,125 - 0,5 |
| α -cubébène | | 0,65 | 0,45 - 1,4 |
| β -cubénène | | 0,5 | 0,45 - 1,2 |
| β -élemène | 0,1 | | 0,075 - 0,25 |
| eremophilène | | 4,5 | |
| germacrène D | 0,5 | 5,36 | 1,75 - 4 |
| α -guaiène | 0,1 | | |
| α -humulène | 0,1 | 1,49 | 0,075 - 0,5 |
| iso- α -cedrène | 0,1 | | |
| lédène | 0,4 | | |
| α -muurolène | | | 0,125 - 0,75 |
| γ -muurolène | | | 0,075 - 0,45 |
| β -sélinène | | | 0,05 - 0,3 |
| sesquisabinène | | | 0,05 - 0,1 |
| Sesquiterpenes oxygénés | 0,5 | 11,08 | 2,3 - 5,6 |
| α -cadinol | | 2,42 | 0,3 - 1,55 |
| δ -cadinol | | 0,68 | |
| T-cadinol | | | 0,25 - 1,1 |
| cédrol | | | 0,05 - 1 |
| épi- α -cadinol | | 2,02 | |
| kessane | | | 0,05 - 0,5 |
| T-muurolol | 0,5 | | |
| (<i>E</i>)-nérolidol | | 0,59 | |
| oxyde de caryophyllène | | 5,37 | 0,65 - 3,35 |
| Autres | 1,9 | 0,2 | 3,55 - 5,75 |
| octan-3-ol | | 0,2 | 2,5 - 4,8 |
| 2-pentylfurane | | | 0,05 - 0,6 |
| tiglate 2-phenyléthyle | 1,9 | | |
| Inconnu | | 0,47 | |

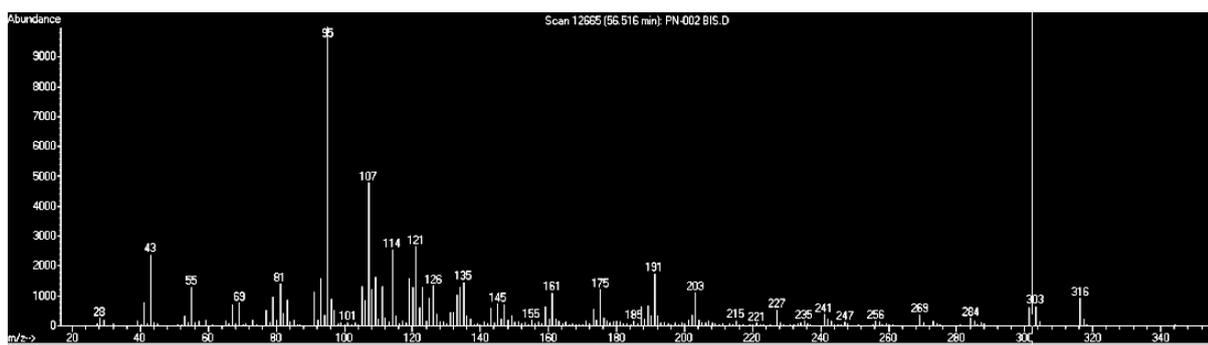
Annexe 4 : Comparatif des huiles essentielles étudiées

| | | PLECTRANTHUS NEOCHILUS | | | | | P.AMBOI NICUS |
|-----------------------------------|--------------------|------------------------|-------------|-----------------------|-----------------------|------------|------------------|
| | | LOT 1 (PN- HE-001) | | LOT 2 (PN- HE-002) | LOT 3 (PN- HE-003) | | PA-HE- 002 |
| Nom | IRR | 1 | 2 | | 1 | 2 | |
| Monoterpènes | | 44,1 | 69 | 7,5 | 1,9 | 1,3 | 56 |
| Monoterpènes hydrocarbonés | | 5,4 | 32,7 | 1,2 | 0,1 | 0 | 28,8 |
| camphène | 955 | | 0,6 | | | | 0,7 |
| 3-carène | 1017 | | 9,7 | | | | 7,1 |
| δ-3-carène | 1010 | | | | tr | | |
| (+)-4-carène | 1022 | 0,5 | 4,1 | | | | 4 |
| p-cymène | 1094 | | | | tr | | |
| limonène | 1034 | 0,3 | 1,6 | | | | 1,6 |
| myrcène | 992 | tr | 0,9 | | | | |
| α-ocimène | 1049/1048 | tr | 0,2 | | | | |
| E-β-ocimène | 1049 | | | 0,3 | tr | | 0,1 |
| (Z)-β-Ocimène | 1037 | tr | 0,2 | 0,1 | | | |
| ortho-cymène | 1029 | 1,5 | 5,3 | 0,4 | 0,1 | | 4,9 |
| para-cymène | 1026 | | | | | | 0,4 |
| α-phellandrène | 1010 | 0,1 | 1 | | | | 0,9 |
| α-pinène | 939 | | 0,6 | tr | tr | | 0,6 |
| β-pinène | 984 | | 0,1 | 0,1 | tr | | 0,9 |
| sabinène hydrate | 1074 | tr | | | | | |
| α-terpinène | 1017/1021 | 1,1 | | tr | | | |
| β-terpinène | 1060 | tr | 0,4 | | | | |
| γ-terpinène | 1063 | 1,7 | 6,8 | 0,2 | | | 6,5 |
| terpinolène | 1094 | 0,2 | 0,6 | | | | 0,5 |
| thuja-2,4(10)-diène | 949 | | | | tr | | |
| α-thujène | 930 | | 0,6 | 0,1 | tr | | 0,6 |
| Monoterpènes oxygénés | | 38,7 | 36,3 | 6,3 | 1,8 | 1,3 | 27,2 |
| camphre | 1160/1156 /1154 | 11,2 | 12,7 | 0,2 | | | 9,2 |
| carvacrol | 1310 | 24,5 | 21,8 | | 0,4 | 0,5 | 16,3 |
| cymen-8-ol | 1191 | | | 0,4 | 0,3 | | |
| para-cymen-8-ol | 1192 | 0,2 | | | | 0,2 | |
| fenchone | 1096 | 0,4 | 0,4 | | | | 0,4 |
| linalool | 1101 | | | | 0,1 | tr | 0,4 |
| linalyl (oxyde de) | 1174 | 0,1 | | | | | |
| menth-2-en-1-ol | 1130 | 0,1 | | | tr | | |
| cis-menth-2-en-1-ol | 1128 | | | 0,1 | | | |
| trans-menth-2-en-1-ol | 1146 | | | 0,1 | tr | | |
| α-phellandrène-8-ol | 1168/1167 | 0,1 | tr | | | | |
| roséfuran (epoxyde de) | 1177 | tr | | | | | |
| terpinèn-4-ol | 1186/1185 | 1,3 | 1 | 3,1 | 0,8 | 0,5 | 0,9 |
| α-terpinéol | 1198 | 0,3 | 0,2 | | 0,2 | 0,1 | |

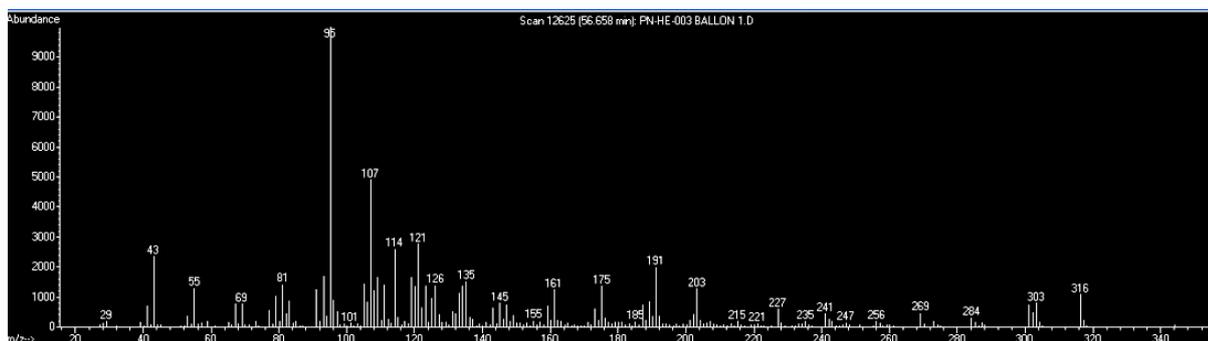
| | | | | | | | |
|-------------------------------------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| γ-terpinéol | 1206/1198 | 0,2 | | 0,9 | | | |
| thymol | 1296/1306 | 0,3 | 0,2 | 1,5 | | | tr |
| thymoquinone | 1254 | | | | tr | | |
| Sesquiterpènes | | 31 | 21,1 | 50,2 | 40,3 | 43 | 19,8 |
| Sesquiterpènes hydrocarbonés | | 23,6 | 18,3 | 33,8 | 21,4 | 20,7 | 16,9 |
| aromadendrène | 1457 | | | 0,2 | | | |
| α-bergamotène | 1447 | 5,1 | 3,8 | | | | 3,3 |
| bisabolène | 1515 | 0,6 | 0,3 | | | | 0,3 |
| bourbonène | 1396 | | | 2,6 | | | |
| β-bourbonène | 1398 | 0,1 | | | 0,7 | 0,8 | |
| α-bulnesène | 1512 | 1,9 | 1 | | | | |
| <i>trans</i> -cadinène-ether | 1558 | 0,2 | tr | | | | 0,1 |
| cadina-1(2),4-diène | 1544 | | | | | | 0,2 |
| cadina-1(6),4-diène | 1475 | | | 0,2 | 0,2 | 0,2 | |
| <i>trans</i> -cadina-1,4-diène | 1544 | | | 0,2 | 0,1 | 0,1 | |
| <i>trans</i> -cadina-1(6),4-diène | 1477 | tr | | | | | |
| α-cadinène | 1550 | 0,1 | | 0,1 | 0,1 | 0,1 | |
| δ-cadinène | 1535 | 3 | 1,4 | | 4,1 | 4,7 | 1,6 |
| α-calacorène | 1556 | tr | | 0,2 | 0,2 | 0,2 | |
| β-calacorène | 1576 | tr | | 0,1 | 0,2 | 0,1 | |
| α-caryophyllène (=humulène) | 1471 | 2,5 | 1,6 | 1,5 | 1 | 0,8 | 1,6 |
| caryophyllène | 1438 | 5,7 | 4,3 | 14,1 | 9 | 8,8 | 3,8 |
| <i>cis</i> -caryophyllène | 1419 | | | 0,3 | 0,1 | 0,1 | |
| α-copaène | 1388 | 1,8 | 1,2 | 1,2 | 0,9 | 0,7 | |
| β-copaène | 1442 | | | 0,6 | 0,2 | | |
| α-cubebène | 1359 | 0,2 | 0,1 | 0,7 | 0,5 | 0,4 | 0,1 |
| β-cubebène | 1399 | | 0,3 | 0,7 | 0,4 | 0,6 | 1 |
| β-elemène | 1400 | | | | | | 0,3 |
| epizonarène | 1539 | 0,2 | | | | | |
| farnesène | 1457 | 0,3 | 0,1 | | | | 0,1 |
| germacrène D | 1485 | 0,4 | tr | | | 0,1 | |
| α-gurjunène | 1423 | | | | | | 0,1 |
| β-gurjunène | 1441 | | | | | 0,2 | |
| β-longipinène | 1401 | 0,6 | | | | | |
| muurola-4(14),5-diène | 1494 | | | | 1,1 | | |
| <i>cis</i> -muurola-4(15),5-diène | 1465 | tr | | | | | |
| <i>trans</i> -muurola-4(14),5-diène | 1496 | 0,9 | 0,5 | 2,8 | | 0,9 | |
| α-muuroloène | 1510 | | | 0,3 | 0,3 | 0,3 | |
| γ-muuroloène | 1484 | | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,2 |
| α-selinène | 1500 | | | | 0,1 | | 1 |
| β-selinène | 1501 | | 3,5 | | | | 3,1 |
| zonarène | 1527 | | | 7,8 | 1,9 | 1,3 | 0,1 |
| Sesquiterpènes oxygénés | | 7,4 | 2,8 | 16,4 | 18,9 | 22,3 | 2,9 |
| α-acoréol | 1643 | | | 1 | | | |
| α-bisabolol | 1692 | 0,3 | | | | | |
| bisaboladien-4-ol | 1615 | | | | | 0,2 | |
| α-cadinol | 1671 | 1,3 | 0,6 | 2,4 | 4,1 | 3,6 | 0,7 |
| calamenen-10-ol | 1682 | | | | | 0,1 | |

| | | | | | | | |
|--|------|------------|------------|------------|------------|------------|----------|
| caryophyllène (oxyde de) | 1602 | 1,9 | 0,9 | 7,7 | 7 | 8 | 0,6 |
| caryophylla-4(14) ,8(15)-dièn-5- α -ol | 1651 | | | | 0,4 | | |
| caryophylla-4(12) ,8(13)-dièn-5 β -ol | 1650 | | | | | 0,6 | |
| <i>cis</i> -cadin-4-en-7-ol | 1643 | 0,7 | 0,3 | | | | |
| cubébol | 1528 | | 0,2 | 0,5 | | | 0,1 |
| cubénol | 1656 | | | | | | 0,9 |
| driménone | 1812 | | | | 0,2 | | |
| 1- <i>epi</i> -cubénol | 1643 | | | | 0,3 | 1,2 | 0,3 |
| <i>épi</i> - α -cadinol | 1656 | | | | 5,6 | | |
| 1,10-di- <i>épi</i> -cubénol | 1630 | | | 0,3 | 0,4 | | |
| 10,10-Diméthyl-2,6-diméthylènebicyclo [7.2.0] undecan-5 β -ol | 1651 | | | 0,7 | | | |
| eudesma-4(15) ,7-dièn-1- β -ol (impure) | 1699 | 0,1 | | 1,4 | | 0,3 | |
| germacrène D-4-ol | 1591 | 0,1 | tr | | | | |
| germacra-4(15), 5,10(14)-trien-1- α -ol | 1692 | | | | 0,3 | 1,4 | |
| 14-hydroxy-9- <i>épi</i> -caryophyllène | 1679 | | | 0,1 | | | 0,3 |
| E-14-hydroxy-9- <i>épi</i> -caryophyllène | 1687 | 0,9 | | | | | |
| α -muurolol | 1654 | | | | | 5,3 | |
| nérolidol | 1566 | | | 1,8 | | 1 | tr |
| β -nérolidol | 1566 | 0,2 | | | | | |
| β -oplopénone | 1624 | | | 0,4 | 0,4 | 0,4 | |
| valérianol | 1658 | 1,9 | 0,8 | | | | |
| salvia-4(14)-en-1-one | 1610 | | | 0,1 | 0,2 | 0,2 | |
| Diterpènes | | 0,1 | 0 | 0 | 0,2 | 0 | 0 |
| cembrène A | 1983 | tr | | | 0,2 | | |
| phytol | 2113 | 0,1 | | | | | |
| Alcool | | 0,2 | 0,6 | 0,4 | tr | 0 | 0 |
| octen-3-ol | 979 | 0,2 | 0,6 | 0,4 | tr | | |
| Acides gras | | tr | 0 | 0 | 0,5 | 0 | 0 |
| Hexanoate d'éthyle | 997 | tr | | | | | |
| Acide palmitique | 1960 | | | | 0,5 | | |
| Autres | | 1,8 | 1,6 | 0,9 | 1,3 | 0,1 | 1 |
| acétate de carvacrol | 1375 | | | | | | tr |
| asarone | 1709 | | | 0,7 | | | |
| damascenone | 1391 | | | 0,2 | 0,1 | tr | |
| méthyl éther carvacrol | 1248 | 1,8 | 1,6 | | | 1 | 1 |
| phytol-acétate | 2218 | | | | 1,2 | | |
| α -térpinyl acétate | 1353 | | | tr | tr | 0,1 | |

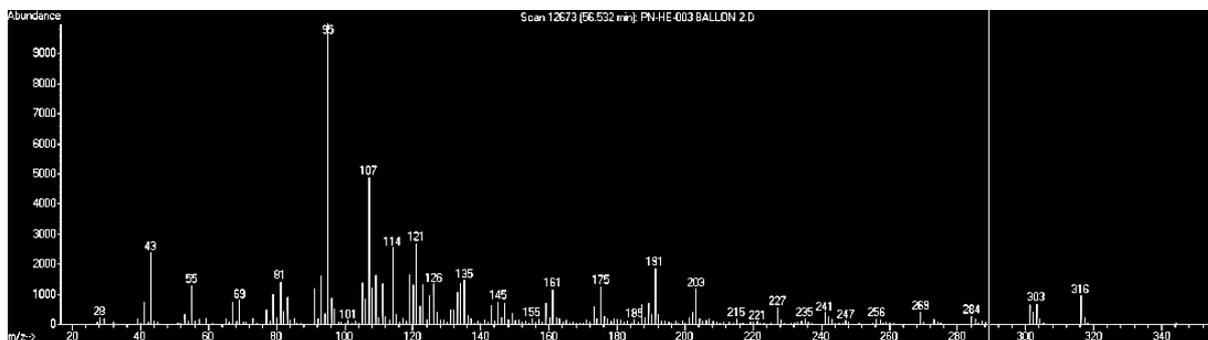
Annexe 5 : Spectre de masse du composé non identifié de PN-HE-002



Annexe 6 : Spectre de masse du composé non identifié de PN-HE-003 du premier ballon



Annexe 7 : Spectre de masse du composé non identifié de PN-HE-003 du deuxième ballon



SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.