



UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA



Faculté des Sciences et Sciences de l'ingénieur

Département de Génie des procédés

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme

MAGISTER

Spécialité : Synthèse Organique et Phytochimie

par

HELLALI Naima

THEME:

Evaluation de quelques modes d'extraction en fonction de la composition chimique dans la plante Cymbopogon schoenanthus (L.) de la région de ILLIZI

Soutenu publiquement le 24 novembre 2007 Devant le jury composé de :

Mr S. DOUNIT, Maître de Conférences, Univ. Ouargla

Mr M. HADJ-MAHAMMED, Professeur, Univ. Ouargla

Mr L. SAKHRI, Profes. 1r, Univ. Ouargla

Mr H. DENDOUGUI, Maître de Conférences, Univ. Ouargla

Mr N. GHERRAF, Maître de Conférences, Univ. Ouargla

Président Rapporteur

Examinateurs

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biogéochimie des milieux désertiques de l'Université de Ouargla, sous la direction de Monsieur HADJ-Med Mahfoud, Professeur au département des sciences physiques de la faculté des sciences et sciences de l'ingénieur.

Qu'il me soit permis de le remercier très sincèrement et de lui exprimer ma profonde gratitude pour l'aide précieuse, les conseils et les encouragements qu'il m'a sans cesse

prodiqué afin de mener à terme ce travail.

Je remercie respectueusement Monsieur Salah DOUNIT, Maître de Conférences à l'université Kasdi Merbah Ouargla, qui me fait un grand honneur en acceptant de présider le jury de ce mémoire.

J'exprime mes profonds remerciements à Messieurs Lakhdar SAKHRI, Professeur, Hocine DENDOUGUI, Maître de Conférences et Noureddine GHERRAF, Docteur, à l'université Kasdi Merbah Ouargla, pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de participer au jury de ce mémoire.

Notre matériel végétal provient de la wilaya d'Illizi et nous a été gracieusement fourni par Hellali Abderrahmane nous lui exprimons notre reconnaissance et nos profonds remerciements.

Je remercie vivement Monsieur Le Professeur B.Y. MEKLATI, Directeur du CRAPC à l'USTHB, pour nous avoir permis de réaliser quelques spectres d'échantillons en couplage GC-MS.

Les extractions par micro ondes ont été effectuées au Laboratoire d'analyse organique fonctionnelle systématique de la Faculté de chimie de l'USTHB grâce à la collaboration de Mme N. TIGRINE, Maître de Conférence. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier également tous mes collègues du Laboratoire auxquels j'associe tous ceux qui m'ont soutenu de prés ou de loin par leurs encouragements et leur collaboration.

Je dédie enfin ce travail à ma famille pour la patience, le soutien moral et les encouragements qu'elle n'a cessé de me prodiguer tout au long de ma formation.

Dans ce travail nous présentons une contribution à l'évaluation de quelques modes d'extraction en fonction de la composition chimique d'une plante de la famille des poacées : Cymbopogon schoenanthus L issue de la région de ILLIZI. Cette plante est connue pour ses propriétés insecticides vis-à-vis de Callosobruchus maculatuset, leur utilisation dans des produits cosmétiques pour la protection de la peau. Elle est connue sous le nom de lemmad et paille de la Mecque et est fréquemment utilisée dans la pharmacopée traditionnelle.

Les tests chimiques préliminaires effectués sur la plante nous ont orienté sur l'extraction de ses huiles essentielles. Quatre méthodes d'extraction différentes l'entraînement à la vapeur d'eau (EV), l'hydrodistillation (HD), l'hydrodistillation assisté par le micro onde (HDAMC), l'extraction par des solvants volatiles au soxhlet ont été utilisé pour l'obtention les extrait d'huile essentielle qui sont analysé chromatographie en phase gazeuse seule puis couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) a permis de mettre en évidence plus de 20 composés monoterpéniques et sesquiterpéniques. La pipéritone est le composé majoritaire dans tous les extraits, et le plus important taux dans la composition chimique de l'huile essentielle est attribué aux monoterpènes oxygénés.

L'évaluation des modes d'extraction utilisés selon les rendements en huiles essentielles et leurs compositions a été entamée et a montré que globalement les classes chimiques essentielles des composés identifiés sont les monoterpènes carbonés pour l'EV, les monoterpènes oxygénés pour l'HDAMC, les sesquiterpènes carbonés pour l'extrait à l'éthanol et les sesquiterpènes oxygénés pour l'HD, avec un meilleur rendement pour l'extrait à l'éthanol.

ملخص:

يعتبر هذا العمل كبداية لتقيم بعض علاقة طرق الاستخلاص بالتركيبة الكيميائية لنبات الـ Cymbopogon ، التي تنتمي إلى العائلة النجيلية (Poacées) المتواجدة في منطقة إيليزي و تعرف هذه النبئة بخصائصها كمضاد للحشرات ضد Callosobruchus maculatusel و هي كثيرة الاستعمال في الطب الشعبي التحاليل الكيميائية الأولية لهذه النبئة وجهت عملنا إلى استخلاص الزيوت الاساسية منها، باستعمال اربعة طرق استخلاص و هي : الجر ببخار الماء ، التقطير بالماء، التقطير بالماء باستعمال فرن صغير الترددات و اخبرا الاستخلاص باستعمال و هي : الجر ببخار الماء ، التقطير بالماء، التقطير بالماء باستعمال فرن صغير الترددات و اخبرا الاستخلاص باستعمال و هي : المور ببخار الماء ، التقطير بالماء التعليل الكروماتوغرافي في الطور الغازي من جهة و التحليل الكروماتوغرافي في الطور الغازي المقترن مطياف الكتلة، أن المركب الاعظمي هو البيبريطون " piperitone و وتع

بمقارنة الطرق المستخدمة للاستخلاص، لاحظنا تواجد ملحوظ للتربينات الكربونية الأحادية في مستخلص الجر بالبخار و لتربينات الاكسيجينية الاحادية في مستخلص القطير بالماء باستعمال فون صغير الترددات أما بالنسبة للسكوتربينات الكربونية فقد كشفنا على أكبر نسبة منها في مستخلص الايثانول وفي الاخبر فإن وفرة السسكوتربينات الاكسوجينية كانت اكثر تواجدا في مستخلص التقطير بالماء, قد يسجلنا أيضا الحصول على أحسل مردود في الاستخلاص بطريقة Soxhlet مقارنة بالطرق الاخرى المستعملة

Abréviations

CPG: Chromatographie en phase gazeuse

GC-MS: Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

EE: L'extrait à l'éthanol

EH: L'extrait à l'hexane

EV: L'extrait par entraînement à la vapeur

H.E: L'huile essentielle

HD: Hydrodistillation

HDMO: Hydrodistillation assistée par micro ondes.

H60: L'huile extraite à 60 °C

1170 : L'huile extraite à 70 °C

H80 : L'huile extraite à 80 °C

H90 : L'huile extraite à 90 °C

MC: Mélanges des 5 extraits par micro ondes

MC1 : L'huile extraite par HDMO durant la première période

MC2: L'huile extraite par HDMO durant la deuxième période

MC3: L'huile extraite par HDMO durant la troisième période

MC4: L'huile extraite par HDMO durant la quatrième période

MC5: L'huile extraite par HDMO durant la cinquieme période

Liste des figures

N° de la figure	Titre	Page		
1	le montage de l'entraînement à la vapeur d'eau	6		
2	le montage de l'hydrodistillation			
3	Appareil de Soxhlet	9		
4	le montage de l'extraction par micro ondes	10		
5	Cymbopogon schoenanthus (L.) Spreng	14		
6	Les fleure de Cymbopogon schoenantus	15		
7	Chromatogramme de l'analyse par GC de l'huile «EV» de Cymbopogon schoenanthus sur colonne capillaire SE 30.	23		
8	Chromatogramme de l'analyse par GC de l'huile H60 de Cymbopogon schoenanthus sur colonne capillaire SE 30.	23		
9	Chromatogramme de l'analyse par GC de l'huile «MC1» de Cymbopogon schoenanthus sur colonne capillaire SE 30.	24		
10	Chromatogramme de l'analyse par GC de l'huile «EE» de Cymbopogon schoenanthus sur colonne SE30.			
11	Chromatogramme de l'analyse par GC de 1'huile «EH» de Cymbopogon schoenanthus sur colonne SE30.	26		
12	Chromatogramme de la fraction volatile de Cympobogon schoenanthus obtenu par HDMO (MC1),			
13	Spectres de masse de quelques composés identifiés dans l'H.E. de la plante Cymbopogon schoenanthus.			
14	Taux en monoterpènes (Mo) et en sesquiterpènes (Se) identifiés par la GC/MS, dans les extraits MC1, H60, EH			
15	Protocole expérimental utilisé pour l'obtention de l'HE de la plante Cymbopogon schoenanthus			
16	le pourcentage des monoterpènes (Mo) et des sesquiterpènes (Se) dans l'huile extraîte par l'entraînement à la vapeur d'eau.			
17	Taux en monoterpènes (Mo) et en sesquiterpènes (Se) dans l'huile essentielle extraite par hydrodistillation.			
18	Evolution du rendement cumulatif en fonction du temps	57		

Liste des tableaux

Nº du tableau	Titre	Page
I	les avantages et les inconvenants des méthodes d'extraction étudiées	11
11	Quelques variétés de Cymbopogon avec leurs composition et origine.	13
Ш	la variation de la composition chimique d'H.E.de <i>Cympobogon shoenanthus</i> en fonction l'origine de l'espèce te la méthode d'extraction utilisée	17
IV	Indices de rétention de quelques constituants sur colonne capillaire SE30 de l'huile essentielle de Cymbopogon schoenanthus.	27
V	Composés détectés dans l'analyse de l'extrait MC1 par GC-MS.	32
VI	Composés identifiés par GC/MS avec leurs taux et indices des rétention pour trois extraits H60, MC1 et EH	33
VII	Composés identifiés dans l'huile essentielle extraite par entraînement à la vapeur.	50
VIII	Quelques caractéristiques physico-chimiques des extraits obtenus par hydrodistillation à des températures différentes.	
IX	Composés identifiés dans l'huile essentielle extraite par hydrodistillation à différentes températures.	
X	Quelques caractéristiques de l'huile essentielle obtenue par extraction assistée aux micro ondes.	56
XI	les composés identifient dans l'huile essentielle extrait par le micro ondes	59
ХП	Résultats obtenus dans l'extraction par l'éthanol et par l'hexane au Soxhlet.	61
XIII	Composés identifiés dans l'extrait au Soxhlet.	63
XIV	Rendements en huile extraite selon les méthodes d'extraction utilisées.	65
XV	Composés identifiés dans l'huile de Cymbopogon schoenanthus selon les différents modes d'extraction (sur la colonne SE 30).	67

Sommaire

	Titre	Page
Introd	iction générale	1
Chapit	re I : Généralités sur les techniques d'extraction	4
1.1	Description des techniques d'extraction des huiles essentielles utilisées	5
1.1.1	Entraînement a la vapeur d'eau	5
1.1.2	L'hydrodistillation	7
I.1.3	L'extraction par solvants volatils	8
1.1.4	L'extraction par micro ondes	9
1.2	Conclusion	11
Chapit	re II : présentation de la plante Cymbopogon schoenantuhs	12
П.1	Généralités sur le genre de Cymbopogon	13
11.2	La variété cymbopogon schænanthus L. Spreng	14
Chapit	re III: Identification de quelques composes des huiles essentielles de la plante étudiée	19
111.1	Caractérisation analytique des huiles essentielles par CPG	21
ПІ.1.1	Partic expérimentale	22
III.1.2	Résultats et discussion	22
111.2	Analyse des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée a la spectrométrie de masse (GC-MS) en mode impact électronique.	28
III.2.1	Partie expérimentale	29
III.2.2	Résultats et discussion	29
111.3	Conclusion	43
Chapit	re IV: Evaluation des modes d'extractions utilisés	44
IV.1	Description des paramètres d'évaluation	46
IV.2	Résultats et discussion	48
IV.2.1	Caractéristiques principales des modes d'extraction utilisés	48
IV.2.2.	Etude comparative des méthodes d'extraction utilisées	65
IV.3	Conclusion	69
Conclu	sion générale	70
Bibliog	raphie	73.

Introduction Generale

L'extraction et l'identification des «principes actifs» des plantes ont eu de tous temps beaucoup d'intérêt et de succès dans le monde scientifique.

Les extraits naturels bruts sont produit en général selon l'origine des plantes (espèce, variété), l'écologie du milieu et le soin apporté par les opérateurs (modes de récolte, de collecte, de préparation, de séchage, ...).

A titre d'exemple, pour qu'il soit intéressant d'extraire l'huile essentielle d'une plante par entraînement à la vapeur, il faut que cette huile représente une quantité non négligeable de la plante fraîche ou séchée.

En outre, par leur diversité structurale, les produits naturels constituent un casse tête tant leur analyse dans les mélanges les plus complexes tels que les huiles essentielles, ne cesse d'évoluer dans les divers laboratoires de recherche.

C'est dans ce contexte et dans un souci de valorisation de produits naturels de notre vaste Sahara que nous nous proposons d'étudier une plante de la famille des poacées : Cymbopogon schoenanthus L., déjà connue pour ses propriétés antifongiques vis-à-vis de champignons pathogènes de l'homme. Elle est connue sous le nom de paille de la Mecque et fréquemment utilisée dans la pharmacopée traditionnelle en usage externe pour traiter les piqures d'insectes veineuses ou encore en infusion pour traiter les maux de ventre, les rhumatismes, l'anorexie ...etc.

Notre travail constitue une contribution à l'évaluation de quelques modes d'extraction en fonction de la composition chimique de cette plante issue de la région de ILLIZI. Bien que les tests chimiques préliminaires effectués sur la plante aient donné des résultats intéressants pour quelques familles de composés (tableau ci-dessous), notre choix s'est porté sur les modes d'extraction des huiles essentielles qui ont donné une réaction positive à l'éther diéthylique.

Familles chimiques	Degré de présence
Saponosides	+++
Tanins	1++
Stérols insaturés et terpènes	4++
Huiles essentielles	4++
Flavonoïdes	++

Notre mémoire s'échelonne sur deux grandes parties réparties en quatre chapitres. La première partie regroupe quelques généralités sur les modes d'extraction suivie de la présentation de la plante *Cymbopogon schoenanthus L.* En deuxième partie, nous présentons d'abord les analyses qualitatives et semi quantitatives des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse seule et couplée à la spectrométrie de masse. Nous avons ensuite entamé une évaluation des modes d'extraction utilisés selon les rendements en huiles essentielles et leurs compositions

CHAPITRE

Généralités sur les techniques d'extraction

Basée sur différents phénomènes physiques : la distillation, l'extraction ou la séparation, ces techniques d'extraction seront présentées selon le principe sur lequel elles sont basées, et classées en deux catégories distinctes selon le produit final obtenu : une huile essentielle ou un extrait aromatique.

Les huiles essentielles sont composées par des molécules aromatiques d'origines végétales présentant une très grande diversité de structure. Cependant ces huiles essentielles sont obtenues avec des rendements très faibles (de l'ordre de 1%) ce qui en fait des substances fragiles, rares, mais toujours précieuses. Ainsi les différentes techniques d'extraction des huiles essentielles ou extraits aromatiques doivent d'une part, tenir compte de ces caractéristiques et d'autre part, apporter des performances quantitatives satisfaisant une forte demande toujours plus exigeante.

Parmi les méthodes de leur obtention, on cite : l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion, l'expression, l'enfleurage à froid ou à chaud (80°) , par CO₂ liquide, et la technique utilisée récemment : l'extraction par micro ondes.

Comme indiqué dans l'introduction, nous nous sommes intéressé seulement aux huiles essentielles et nous n'allons présenter dans ce chapitre que les techniques d'extraction utilisés dans notre travail pour leur évaluation en terme de rendement et de composition chimique.

I.1. Description des techniques d'extraction des huiles essentielles utilisées I.1.1. Entraînement à la vapeur d'eau :

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au dessus d'une grille (figure 1). Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange "eau + huile essentielle". Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques, évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile¹,

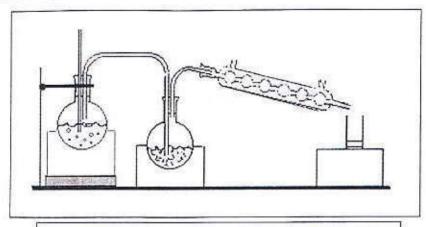


Figure 1 : le montage de l'entraînement à la vapeur

- Principe de l'entraînement à la vapeur d'eau des huiles essentielles

Le procédé, correspondant à une distillation hétérogène, met en jeu l'application de deux lois physiques :

 La loi de Dalton: dans laquelle la pression du mélange de vapeurs est égale à la somme des pression partielles de divers constituants.

$$P_T = \sum_{i=1}^{N} P_{pi}$$

 La loi de Raoult: le rapport des quantités des entités distillées simultanément est fonction de la tension et des densités des vapeurs (donc des masses moléculaires) à la température de distillation choisie.

$$P_{pi} = P_{si} * x_i$$

$$P_T = \sum_{i=1}^{N} P_{pi} = \sum_{i=1}^{N} P_{si} * x_i$$

La relation de ces deux lois donne respectivement la pression totale et la composition des vapeurs en fonction des pressions partielles, d'où le calcul du taux de corps entraîné appelé également rapport d'entraînement :

$$R = \frac{T_H}{T_E} * \frac{M^{\circ}_H}{M^{\circ}_E} = \frac{P_H}{P_E}$$

H et E désignent respectivement l'huile essentielle et l'eau

P_T: Pression totale.

Pp= Pression partielles

P_s: Pression de saturation.

T= Tension de vapeur

 X_i : la fraction de la constituant (i). M° -Masse molaire

R= rapport d'entraînement.

P= Poids. N= nombre de constituant de la phase liquide.

I.1.2. L'hydrodistillation :

Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique (Figure 2)

La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Sachant que la température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation, elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures 1, 2.

La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait.

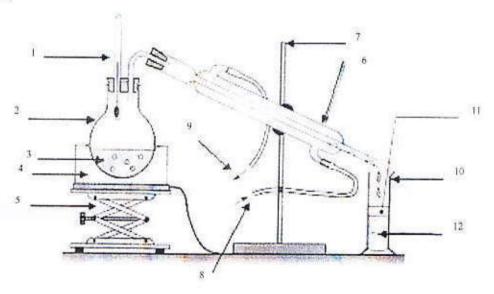


Figure 2: le montage de l'hydrodistillation

1-thermomètre	5-élévateur	9-la sortir de l'eau
2-le ballon	6-réfrigérant	10-éprouvette pour la récupération
3-la plante + l'eau	7-le support	11-l'huile essentielle
4-chauffe-ballon	8-l'entre de l'eau	12-l'eau aromatique

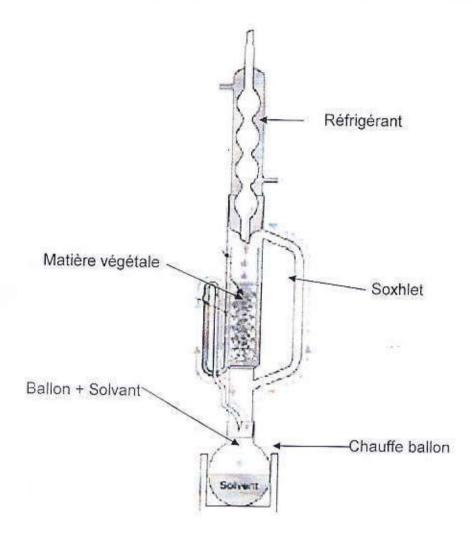
I.1.3. L'extraction par solvants volatils :

La technique d'extraction « classique » par solvant, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique. Le produit ainsi obtenu est appelé « concrète ». Cette concrète pourra être par la suite brassée avec de l'alcool absolu, filtrée et glacée pour en extraire les cires végétales. Après une dernière concentration, on obtient une « absolue ». Les rendements sont généralement plus importants par rapport à la distillation et cette technique évite l'action hydrolysante de l'eau ou de la vapeur d'eau.

Du fait de l'utilisation de solvants organiques, cette technique présente toutefois des inconvénients qu'il est important de noter. En effet, l'intervention de solvants organiques peut entraîner des risques d'artéfacts et des possibilités de contamination de l'échantillon par des impuretés parfois difficiles à éliminer. Le choix du solvant d'extraction va s'avérer très délicat, d'autant que la législation sur les produits à destination de l'industrie agro-alimentaire est extrêmement rigoureuse. Le solvant choisi, en plus d'être autorisé devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène, sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. Parmi les solvants les plus utilisés, on recense : le méthanol, l'éthanol, l'éther de pétrole ou encore le dichlorométhane.

Cependant, depuis quelques décennies, l'extraction par solvant a connu d'intéressantes améliorations. L'hydrodistillation-extraction simultanée et l'extraction par Soxhlet en sont les principales¹.

L'extraction par l'appareil de Soxhlet (Figure 3) consiste à faire passer à travers la matière à traiter contenue dans une cartouche de cellulose, un flux descendant de solvant toujours neuf puisque distillé à chaque cycle¹.



I.1.4 l'extraction par micro ondes :

Le pouvoir énergétique des micro-ondes a été mis en évidence à la fin de la seconde guerre mondiale, fin 1945, d'une façon ancedotique par un physicien, le Dr Spencer, suite à l'oubli de son sandwich sur un émetteur d'ondes! Alors que jusqu'ici, les micro-ondes ou hyperfréquences étaient uniquement utilisées comme vecteur d'information, elles investirent les foyers puis les laboratoires de chimie dans les années 80 ¹.

Les premiers travaux utilisant les micro-ondes pour extraire des composés organiques ont été publiés par Ganzler et coll. et Lanc et Jenkins en 1986. Depuis cette date, l'extraction végétale assistée par micro-ondes a été le fruit de nombreuses recherches et de brevets¹. L'extraction par micro-ondes regroupe différents procédés parmi lesquels :

- l'extraction par solvant
- l'entraînement à l'air
- l'hydrodistillation sous pression réduite

- l'hydrodistillation

Récemment, Stashenko et coll., ont utilisé un procédé d'hydrodistillation par microondes, basé entièrement sur le principe de l'hydrodistillation classique et qui consiste à placer
une partie du montage d'hydrodistillation dans le four à micro-ondes. Le matériel végétal est
donc placé en présence d'une quantité d'eau suffisante dans un ballon disposé dans l'enceinte
du four à micro-ondes. Le système de réfrigération ainsi que la partie prévue pour la
récupération des essences sont situés à l'extérieur du four. Les avantages cités sont la rapidité
et la similitude de la composition de l'huile par rapport à une hydrodistillation classique.

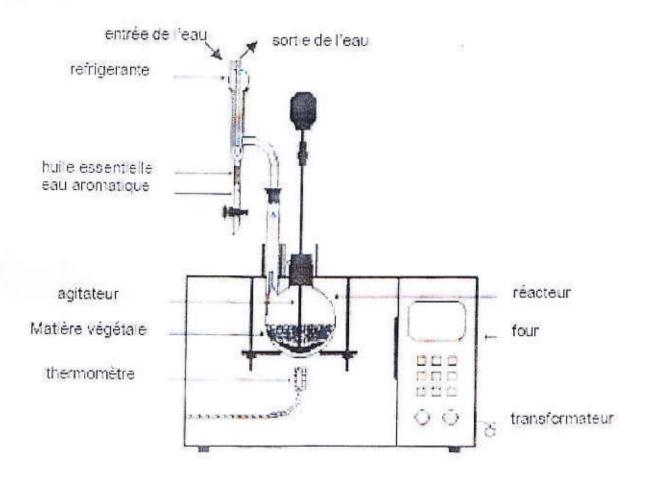


Figure 4 : le montage de l'extraction par micro ondes

I.2. Conclusion:

Suite à la lecture bibliographique sur les nouveaux procédés d'extraction, ou conventionnels, des huiles essentielles et extraits aromatiques, nous présentons dans le tableau I suivant quelques avantages et inconvenants concernant les méthodes utilisées dans ce travail.

Méthode	Avantages	Inconvenants	
L'hydrodistillation	- Rendement en huile pure grande	Les réactions d'hydrolyse augmentent avec le temps de l'opération ¹	
L'entraînement à la vapeur d'eau	- Pas des réactions d'hydrolyse - Rendement acceptable	5)	
L'extraction par des solvants volatils	Rendements plus importants par rapport aux autre techniques ¹	-Difficulté d'éviter le solvant totalement qui nuit à la qualité d'huile ¹ - L'extrait brute contient d'autres produits que ceux de l'huile ^{1,3}	
L'extraction par micro ondes	Le temps d'extraction est très court par rapport aux autres techniques avec un rendement acceptable 1.4.5 - Le rendement en fraction sesquiterpène est très grand 4.5	€#.	

Tableau I : les avantages et les inconvenants des méthodes d'extraction étudiées

CHAPITRUII

Présentation de la plante Cymbopogon schoenanthus

II.1 Généralités sur le genre Cymbopogon :

Le genre cymbopogon (famille des poaceae) englobe environs 140 espèces dont :

- 52 cn Afrique.
- 45 en Inde.
- 6 en Australie et sud d'Amérique
- 4 en Europe
- 2 dans le nord d'Amérique
- le reste se retrouve dans le sud d'Asie.

Parmi ces espèces qui sont caractérisées par leurs huiles essentielles⁶, on peut citer quelques unes dans le tableau suivant :

Tableau II : Quelques variétés de Cymbopogon avec leurs composition et origine.

LA PLANTE	Nom commun	Origine	Composants majoritaires de Phuile essentielle extraite (%)
cymbopogon schoenanthus	Camel grass	1	Voir le tableau (III)
cymbopogon nardus	Ceylon citronella	Sri Lanka	Geraniol (19.11), limonene (9.92), camphene (9.02) ⁷
cymbopogon citratus	Lemongrass	Guatemala	Geranial (45.28), neral (31.95), limonene (8.52) ⁷
Cymbopogon martinii var. motia	Indian palmarosa	India	Geraniol (80.14), geranyl acetate (8.59) ⁷
Cymbopogon flexuosus	Indian lemongrass	India	Geranial (46.12), neral (31.45) ³
Cymbopogon winterianus	Java citronella	Vietnam	Citronnellal (34.11), geraniol (21.47), Citronnellol (11.48) 7
Cymbopopon giganteus		Abidjan	Trans-p-Mentha-2,8-dièn-2-ol (20.7), Trans-p- Mentha-1(7),8- dièn -2-ol(19.6), Cis-p-Mentha- 1(7), 8-dièn-2-ol (19) ⁸

II.2. La variété Cymbopogon schoenanthus :

Ce nom <u>Cymbopogon</u> à l'origine se rapporte à l'apparence de la fleur comme un épi, et le terme <u>Schænanthus</u>, est un mot Grec (scheinos, rope, rush-like stems).

Les références nominatives de cette plante nous donnent :

- Arabe : el lemad, idjhir
- Berbère: tébarimt
- Anglais: camel'hay, camel grass.
- Français: schoenanthe officinale, herbe à chameau, paille de la Mecque

Situation géographique:

Cymbopogon schoenanthus (L.) Spreng, est originaire d'Asie, d'Afrique de l'ouest en zone sèche (Algérie, Egypte, Lybie, Maroc, Tunisie, Sahel - Niger, Burkina Faso.)

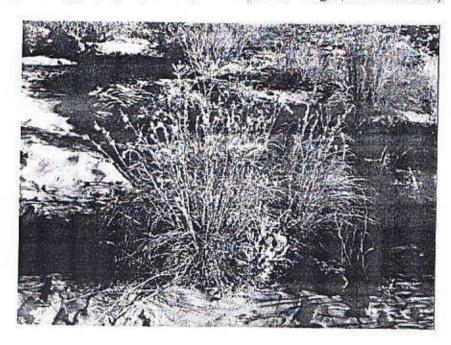


Figure 5: Cymbopogon schoenanthus (L.) Spreng

Description

Cette plante se présente sous forme de touffes épaisses, serrées avec de nombreux rejets, de longues feuilles étroites s'enroulant sur elles-mêmes et des tiges florales dressées pouvant atteindre 60 à 80 cm. Elle présente des inflorescences en panicules aux épis plus ou moins teintés de violet. La plante dégage une odeur agréable et puissante, surtout en séchant.

Elle favorise la digestion et est utilisée pour les aigreurs d'estomac, la mauvaise haleine due aux reflux de l'estomac. On peut par exemple parfumer le troisième thé en cas de gaz ou de diarrhée. Cette plante est aussi broutée par les mouflons, les gazelles, les dobes, les lapins.

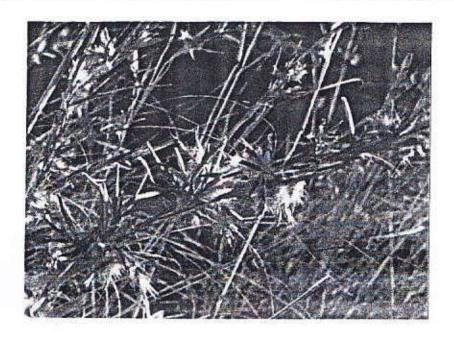


Figure 6 : le fleure de Cymbopogon schoenantus

L'usage traditionnel de Cymbopogon schoenanthus :

L'usage traditionnel de cette plante est varié d'une région à une autre

Localement en Algérie :

- El Goléa: courbatures, myalgies odontalgies, anurie 9
- Béni Abbes : fortifiant (mixtures) 9
- Ouargla: refroidissements, anurie 9
- Djanet : apéritif d'appétit, infusion diurétique, médicament pour la gastroentérite et aide la digestion. Les jeunes feuilles sont utilisées avec la salade et à la place du thé.
- La plante Cymbopogon schoenanthus dans la région de Illizi :

D'après l'enquête que nous avons mené auprès de la population locale sur l'utilisation de cette plante a fait apparaître une nette variation d'une personne à une notre.

Notre enquête s'est portée sur seulement 22 personnes dont l'âge varie de 23 à 50 ans (avec 36.37 % de femmes et 63.63 % d'hommes)

Cette petite enquête nous a conduit aux constatations suivantes :

- 31.8 % utilisent la plante pour des maladies de femmes.
- 13.64 % des personnes l'utilisent pour faciliter la digestion d'estomac et le dégagement des gaz ou encore comme une épice.
- 4.54 % des cas l'utilisent comme antibiotique

 9.09 % des personnes l'ont utilisé dans le cas de problème du colon ou l'hernie et dans d'autres maladies assez variées.

Remarque: les personnes qui ont été consulté, ont indiqué que la préparation de la plante se fait comme le thé avec des ingrédients variables selon le cas d'utilisation.

Autres régions d'Afrique du nord :

- Maroc: dans la région de Haouz les fleurs et la totalité de la plante sont utilisées comme infusion diurétique, antirhumatismal et anti-gastralgie.
- Egypte: la plante est utilisée comme antirhumatismal, fébrifuge, astringent calmant, sudorifique et aussi cataplasme pour les chameaux blessés.

Importance de la plante dans l'industrie :

Cymbopogon schoenanthus (L.) spreng est l'un des ingrédients d'une crème de protection contre les impacts environnementaux (traitement des problèmes de la peau) commercialisée aux USA.

Description de quelques travaux sur les variétés de Cymbopogon :

Un grand nombre de références ont rapporté des études assez variées sur les variétés du Cymbopogon quelque soit l'espèce ou l'origine et ce, en raison surtout de l'importance de leurs huiles essentielles et leurs applications dans le domaine cosmétique et thérapeutique et pour leur propriétés comme anti-bactérienne.

Les études concernant la variété que nous présentons dans ce travail sont peu nombreux à cause de sa localisation et la distribution limitée.

Parmi ces études on peut citer :

- Koba k, et ses collaborateurs, ont étudié les activités antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois Cymbopogon vis à vis des germes pathogènes d'animaux de compagnie.
- Elisa Maria Bittencourt et ses collaborateurs, ont évalué l'extraction d'huile essentielle de la plante Cymbopogon schoenanthus par l'utilisation de CO₂ supercritique et une autre extraction réalisée par l'utilisation de l'éthanol³.
- Guillaume K.Ketoh et ses collaborateurs ont étudié l'effet de l'huile essentielle de Cymbopogon schoenanthus sur des guêpes Callosobruchus maculates. Et dans un autre article, ils ont présenté une étude comparative entre l'effet du piperitone isolé et l'huile essentielle de Cymbopogon schoenanthus L. sur le Callosobruchus maculates (10,11).

<u>Tableau III</u>: la variation de la composition chimique d'H.E.de *Cympobogon shoenanthus* en fonction l'origine de l'espèce et la méthode d'extraction utilisée ^{3, 12}.

L'origine de la plante	Al	Togo	
La méthode d'extraction utilisée	CO ₂	Ethanol	Hydroditillation
Le rendement de l'opération (%)	2.78	2.27	3
Isosilvestrene	1.3	1	(#1)
Carène 2	2	4	16.9
Limonène	2.4	<u> </u>	2.15
Cis-para-menth-2en-1-ol	17.78	3.1	-
Cis pinène hydrate	15	Wg 853	0.53
Trans-para-menth-2en-1-ol	10.83	2.49	-
Trans-pinène hydrate	.50	海影	0.28
α-Terpinéol	5.59	2.05	0.56
Estragol	12	.2	0.14
Cis pipéritol	9.14	4.02	-
Trans pipéritol	6.26	4.54	11:1
Pipéritone	•		69.01
Thymol	0.73	3.87	o = 3
β-Elmène		•	0.82
Cis -Trimenal	3.79	-	848
β-Caryophyllène			1.10
Gérmacrène D	1.19	T.	-
Trans .β.Farnesène	*		0.20
β-Sélinène	1.05	*	S E ()
δ-Cadinène	0.54	3.11	0.18
Elemol	13.71	27.19	5.76
γ-Eudesmol	2.23	3.74	0.33
α-Eudesmol	1.07	1.53	
Deoxycayophyllene	4		0.20
β-Eudesmol	=	i i i	0.79
Citryl tiglate	-	15	0.96

La collecte du Cymbopogon schoenanthus:

Dans ce travail, la collecte de cette plante s'est effectuée dans la région de ILLIZI en fin du mois d'avril 2007. La plante a été séchée sur place puis transportée au laboratoire de Biogéochimie des milieux désertiques (Université de Ouargla) et soumise aux opérations d'extraction et d'analyses.

CHAPITRUM

Identification de quelques composés des huiles essentielles de la plante étudiée

CHAPITALII

Identification de quelques composés des huiles essentielles de la plante étudiée Les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme dans des cellules glandulaires situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule, les huiles essentielles sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante¹³.

Ces produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première destinée à différents secteurs d'activité tels que la pharmacie, la cosmétique, la parfumerie et l'agroalimentaire.

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes constitués de plusieurs dizaines, voir plus d'une centaine de composés, principalement des terpènes. Les terpènes sont construits à partir de plusieurs entités isopréniques, constituant une famille très diversifiée tant au niveau structural que fonctionnel. On rencontre principalement des mono et des sesquiterpènes (possédant respectivement 10 et 15 atomes de carbone) plus rarement des diterpènes (20 atomes de carbone). Les huiles essentielles peuvent contenir également des composés aliphatiques (non terpéniques) ou des phényles propanoïdes¹⁴.

Quel que soit le secteur d'activité, l'analyse des huiles essentielles reste une étape importante qui, malgré les progrès constants des différentes techniques de séparation et d'identification, demeure toujours une opération délicate nécessitant la mise en oeuvre simultanée ou successive de diverses techniques¹⁴.

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) qui est une méthode d'analyse permettant d'opérer la séparation de composés volatils de mélanges très complexes, s'avère être la technique usuelle la plus indiquée dans l'analyse des huiles essentielles, seule ou couplée à d'autres techniques spectroscopiques.

La meilleure carte d'identité quantitative et qualitative d'une huile essentielle reste cependant le profil chromatographique en phase gazeuse. Il permet de connaître très exactement la composition chimique et de rechercher d'éventuelles traces de produits indésirables tels des pesticides ou des produits chimiques ajoutés.

Une huile essentielle pure et naturelle est caractérisée par sa composition strictement «végétale», contrairement aux essences synthétiques ou «identiques naturelles» intégralement reconstituées à partir de composés chimiques de synthèse.

Ainsi le couplage CPG/SM (ou GC-MS) en mode impact électronique (SM-IE) permet de connaître, dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation.

III-1. Caractérisation Analytique des huiles essentielles par CPG

La chromatographie en phase gazeuse est une technique universellement utilisée aussi bien à l'échelle de laboratoire qu'à celle de l'industrie, surtout après l'avènement des colonnes capillaires avec des résolutions et des efficacités très performantes.

La diversité des proportions des constituants d'une huile essentielle, fait que la CPG sur colonne capillaire en programmation de température soit la mieux adaptée pour son analyse. L'identification des constituants peut se faire sur la base des grandeurs de rétention moyennant l'utilisation de phases stationnaires de polarités différentes.

Lorsque la CPG est utilisée sans couplage à d'autres techniques, les données de rétention telles que les temps de rétention relatifs ou les indices de rétention peuvent être exploités pour une caractérisation analytique qualitative d'une huile essentielle. Néanmoins, seule la méthode liée aux indices de rétention peut engendrer des études comparatives entre différentes études pour des identifications structurales par l'usage de banques de données. En effet, cette méthode est très peu soumise aux variations de conditions opératoires qui peuvent être perçues entre différents laboratoires, puisqu'ils utilisent des grandeurs relatives rapportées à des étalons voisins des pies étudiés et analysés sous les mêmes conditions..

Pour chacun des composés, deux indices de rétention, polaire et apolaire, peuvent être obtenus. Ils sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcanes ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) ou en programmation de température (indice de rétention de Van Den Dool). Ils sont ensuite comparés avec ceux de produits de référence (mesurés au laboratoire ou décrits dans la littérature) ¹⁶. Cet indice est calculé à partir des temps de rétention fournis par les chromatogrammes de l'HE totale et du mélange HE – Alcanes normaux. L'indice de rétention I_R d'un produit inconnu x est ainsi donné par l'équation suivante (en programmation de température):

$$I_R = 100 \left[n + \frac{t_R(x) - t_R(n)}{t_R(n+1) - t_R(n)} \right]$$

n : nombre d'atomes de earbone de la paraffine éluée avant le produit inconnu x

 $t_R(x)$: temps de rétention du produit inconnu x

 $t_R(n)$; temps de rétention de l'aleane normal à n atomes de carbone précédant le produit x

t_R(n+1) : temps de rétention de l'alcane normal à n+1 atomes de carbone élué après le produit x.

III.1.1. Partie expérimentale :

Toutes nos analyses de CPG sans couplage reportées dans ce mémoire ont été réalisées sur un appareil de type SHIMADZU GC 17A, équipé d'un détecteur FID et muni d'une colonne capillaire apolaire (de longueur 25 m, diamètre intérieur de 0.25 mm, et un épaisseur de film de 0.22μm). Le choix des colonnes dans notre travail était limité par leur disponibilité au laboratoire. Les conditions d'analyse utilisées sont les suivantes :

- température de l'injecteur : 280 °C
- Température du détecteur : 300 °C
- La programmation de température adoptée est
 - * de 50 °C à 150 °C à 3 °C/min,
 - * de 150 °C à 250 °C à 5 °C/min
 - * Une fois atteinte la température de 250 °C est maintenue pendant 5 min.
- Le gaz vecteur est l'azote avec un débit optimum de 0.2 ml/min.
- La quantité injectée (mode Split de1/97) est comprise entre 0.1 μl et 0.2 μl.

Remarque: Une série d'alcane, de C₆ à C₁₇, est injectée dans chaque cas, pour calculer les indices de rétention selon l'équation citée plus haut.

III-1-2 Résultats et discussion :

Les résultats obtenus par chromatographie en phase gazeuse sur colonne apolaire SE30 sont illustrés par les figures 7 à 11. Ces figures font apparaître un même profil chromatographique pour l'ensemble des extraits, mais le taux de chaque constituant varie d'une méthode d'extraction à une autre. Dans certains cas, et au sein de la même technique d'extraction, on observe des variations de ces taux en fonction de la durée d'extraction, la température de chauffage, et la polarité du solvant utilisé dans l'extraction.

Le nombre de constituants apparaissant sur les chromatogrammes varie entre 43 et 59 composés. Nous avons calculé les indices de rétention pour les composés qui se retrouvent dans l'ensemble des extraits. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau IV. Par comparaison des indices de rétention avec ceux de la littérature, nous avons proposés les composés reportés dans ce tableau. Nous constatons que le produit majoritaire dans tous les extraits est la Pipéritone avec un taux qui varie entre 27 et 83 %.

Une analyse structurale par couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse (GC-MS) s'avère nécessaire pour confirmer les propositions données par les indices de rétention de Van Den Dool.

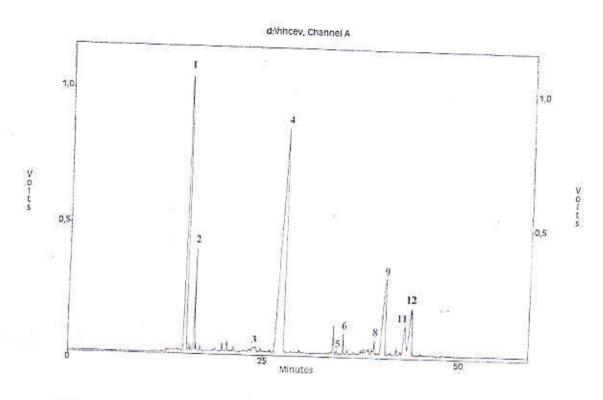


Figure 7 : Chromatogramme de l'analyse par GC de l'huile «EV» de Cymbopogon schoenanthus sur colonne capillaire SE 30.

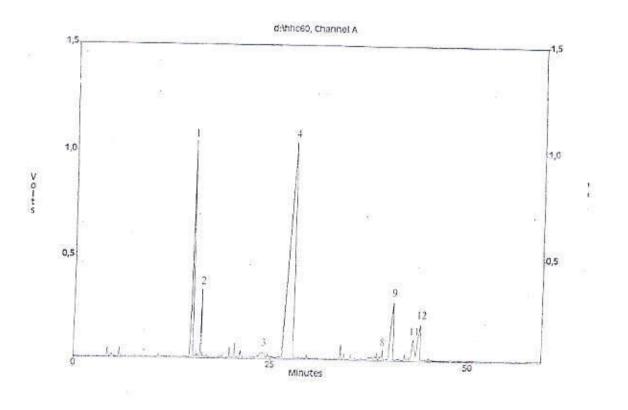


Figure 8 : Chromatogramme de l'analyse par GC de l'huile H60 de Cymhopogon schoenanthus sur colonne capillaire SE 30.

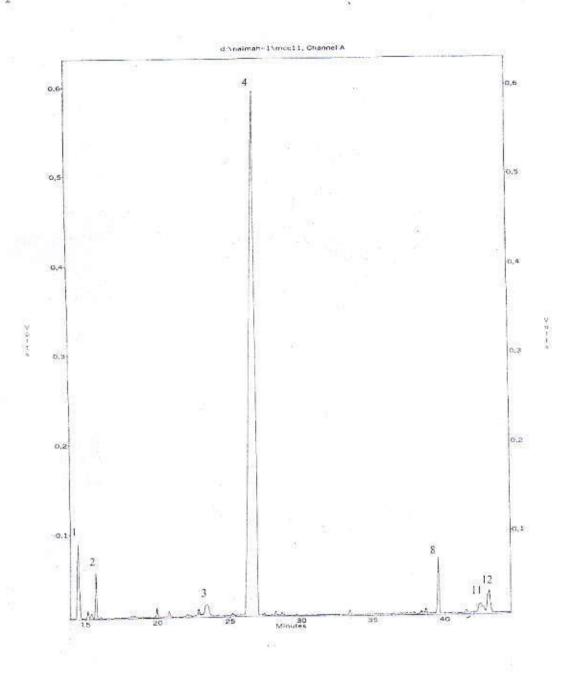


Figure 9 : Chromatogramme de l'analyse par GC de l'huile «MC1» de Cymbopogon schoenanthus sur colonne capillaire SE 30.

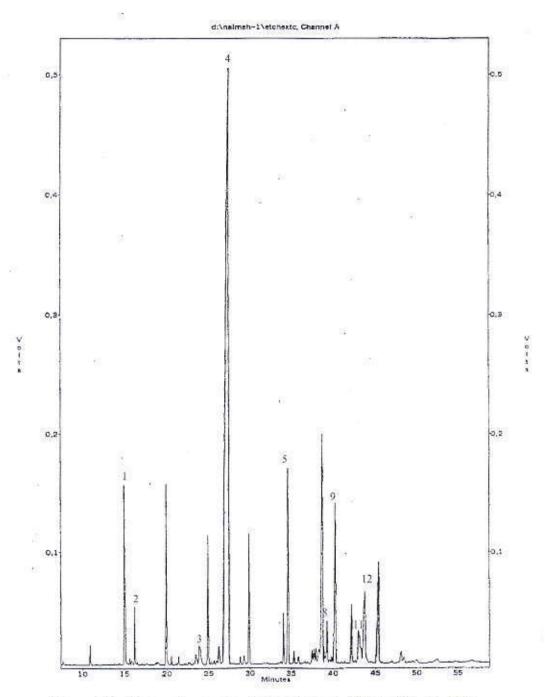


Figure 10 : Chromatogramme de l'analyse par GC de l'huile «EE» de Cymbopogon schoenanthus sur colonne SE30.

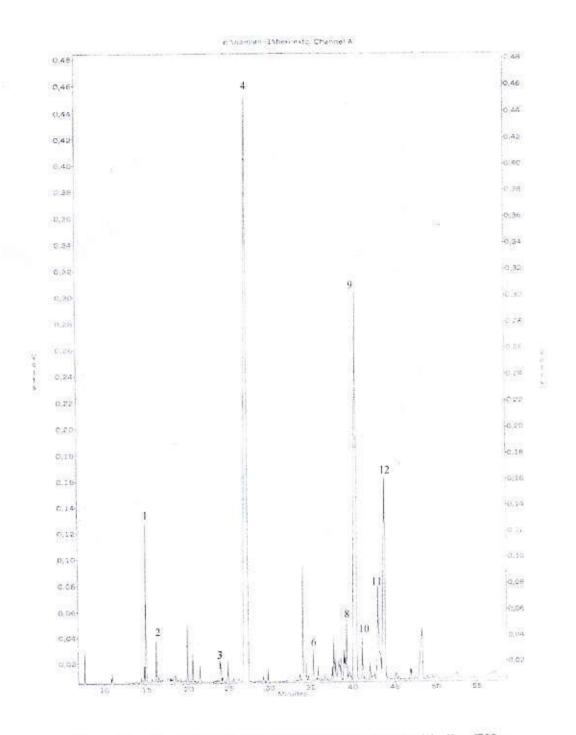


Figure 11 : Chromatogramme de l'analyse par GC de l'huile «EH» de Cymbopogon schoenanthus sur colonne SE30.

<u>Tableau IV</u>: Indices de rétention de quelques constituants sur colonne capillaire SE30 de l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus*.

N° du pic	Composé	I _R (Ce travail)	I _R (Littérature)	Référence
1	Carène 2	1000	1002	1
2	Limonène	1025	1029	1,9
3	α-Terpinéol	1181	1189	9
4	Pipéritone	1250	1253	1, 9
5	β-Caryophyllène	1418	1419	9
6	Calarène	1433	1434	9
7	γ-Cadinène	1513	1514	9
8	δ-Cadinène	1517	1523	1, 9
9	Elemol	1546	1550	1
10	Oxyde de caryophyllène	1578	1583	1, 9
11	γ-Eudesmol	1631	1653	34
12	α-Eudesmol	1659	1656	3

III-2. Analyse des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) en mode impact électronique.

L'identification des constituants d'un mélange complexe représente le principal objectif des analystes, ouvrant ainsi plusieurs champs d'investigation et d'applications.

L'association de techniques séparatives telle que la chromatographie avec les techniques spectroscopiques telle que la spectrométrie de masse, l'infra rouge ou encore la résonance magnétique nucléaire, a conduit à des gains de temps considérables dans l'identification des constituants dans les mélanges les plus complexes tels que les huiles essentielles.

Au vu des développements technologiques qu'ont connu la chromatographie en phase gazeuse (avec l'avènement des colonnes capillaires et de nouvelles phases stationnaires) et la spectrométrie de masse (avec le développement des modes d'ionisation), le couplage GC-MS est devenu une technique de choix incontournable dans l'analyse des huiles essentielles.

Dans ce travail, nous présenterons l'analyse de nos huiles essentielles extraites selon différentes méthodes de la plante *Cymbopogon schoenanthus* par GC-MS en mode impact électronique. Ce mode d'ionisation fait appel à une forte énergie et présente l'avantage de favoriser une fragmentation importante, ce qui conduit à une véritable fiche d'identité (empreinte digitale) de l'échantillon. Notons que la plupart des composés organiques ont des potentiels d'ionisation compris entre 7 et 20 eV. L'efficacité de l'ionisation s'accroit avec l'énergie des électrons, pour atteindre un seuil entre 50 et 100 eV. L'interaction d'un électron accéléré avec une molécule organique AB par exemple, peut donner les réactions suivantes :

AB +
$$e^{-}$$
 \rightarrow AB⁺ + 2 e^{-} : ionisation simple

AB + e^{-} \rightarrow AB²⁺ + 3 e^{-} : ionisation double (rare)

Ensuite, AB⁺ peut subir les réactions conduisant à une perte de radical et/ou une perte d'une molécule. La connaissance des mécanismes de fragmentations sera d'un apport très important dans l'identification des constituants des huiles essentielles.

La collecte des données spectrales et leur regroupement dans des bases de données universelles vont constituer un outil assez performant dans l'identification des huiles essentielles. Néanmoins, et dans certains cas, des données complémentaires, soit en changeant de mode d'ionisation ou encore l'utilisation d'autres techniques d'identification s'avércront

nécessaires pour la résolution de certaines ambiguïtés ou similitudes spectrales, ce que nous n'avons pu faire en raison de l'indisponibilité de l'appareillage adéquat dans notre laboratoire.

III.2.1. Partie expérimentale :

Les huiles essentielles ont été analysées sur un chromatographe de type Agilent GC6890A, équipé d'une colonne capillaire HP5MS (longueur : 30 m, et de 0,25 mm de diamètre intérieur. L'épaisseur du film est de 0,25 μm) couplé à un spectromètre de masse de type Agilent 5973 EI, avec un détecteur à impact d'électrons, 70 eV, Scanning 30-550 uma. Les conditions analytiques sont les suivantes:

- Température de l'injecteur : 250°C
- Température de quadripôle : 150°C
- Température de auxiliaire : 280°C.
- Température de source : 230°C.
- Température du four : 50°C (1 min), 50 à 150°C (3°C/min) et de 150°C à 250°C (5°C/min) et en isotherme à (250°C) pendant 5 min.
- Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 0,5 ml/mn et les gaz auxiliaires sont l'hydrogène et l'air.
- Mode d'injection Split de 1/20. Pour toutes les analyses, on injecte manuellement $0.2\mu l$ d'échantillon d'huile essentielle pure.

III.2.2. Résultats et discussion :

Comme nous l'avons signalé précédemment, l'ensemble des extraits présentant en gros le même profil chromatographique, il nous est apparu inutile de faire les analyses de tous les extraits par GC-MS car l'utilisation de l'appareillage a été restreinte à 3 analyses seulement. Nous avons donc choisi les extraits obtenus aux micro-ondes (figure 12), puisque ceux-ci sont obtenus sur place.

Dans ce travail les différents constituants des huiles essentielles ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux des bases de données Willey et NIST (National Institute of Standards and Technology). L'identification des molécules a été confirmée par comparaison de leurs indices de rétention avec ceux connus dans la littérature.

Selon les données de la littérature seuls 28 terpènes on été identifiés, dans les extraits d'huiles essentielles de la plante Cymbopogon schoenanthus. Les composes élucides sont principalement : pipéritone, carène 2, limonène, élemol, γ -cudesmol, α -eudesmol, β -eudesmol, et le β - élemène.

Dans le tableau V nous avons reporté les principaux fragments des composés les plus importants détectés dans l'analyse de l'huile essentielle MC1.

Trente cinq (35) composés seulement ont été identifiés en conformité avec leurs indices de rétention. Le tableau VI regroupe ces composés ainsi que leurs taux respectifs dans l'extrait de la plante Cympobogon schoenanthus.

Sur les trente cinq composés identifiés, on retrouve essentiellement des cétones monoterpéniques (ex : Pipéritone, produit majoritaire), des hydrocarbures monoterpéniques (Carène 2, Limonène, p Cymène, ...), et des alcools sesquiterpéniques (Elemol, le γ-Eudesmol, α-Eudesmol, et β-Eudesmol).

D'après les résultats obtenus par GC-MS, de nouveaux constituants sont détectés pour la première fois dans l'huile de Cymbopogon schoenanthus, comparativement aux résultats publiés jusqu'à ce jour. Ces composés sont : α-terpinène, p-cymène, Cis ocimène, trans ocimène, D-fonchone, Dill ether, Calarène, α-muurolène, δ-cadinol selon des taux assez appréciables.

Comparativement aux données de la littérature et pour la même espèce, nous constatons que les taux des composés: γ -eudesmol, α - eudesmol, β -eudesmol et la plupart des sesquiterpènes sont plus important dans nos extraits (voir tableau III). Par ailleurs, le produit majoritaire en l'occurrence la pipéritone se retrouve avec un taux plus élevé que ceux reportés par la littérature pour la même plante dans d'autres régions $^{3, 12}$.

L'absence ou la présence d'un constituant dans un extrait par rapport à un autre est étroitement lié au mode d'extraction utilisé. Les composés, qui n'ont pas pu être confirmés par les deux méthodes d'identification n'ont pas été reportés. L'utilisation d'autres colonnes de polarités de phase stationnaires variées s'avère donc nécessaire pour compléter ce travail.

Nous avons reporté dans la figure 13, des exemples d'identification par confrontation des spectres de masse de quelques composés identifiés avec leur spectre de référence obtenu par les bases des données.

: C:\HPCHEM\1\DATA\MC1.D File

Operator : karim

: 1 May 2007 15:10 : GC/MS Ins using AcqMethod HELLALI Acquired

Instrument :

Sample Name: huile essentielles micro onde Misc Info : 0.2 ul split1/20 hydro-distilation

Vial Number: I

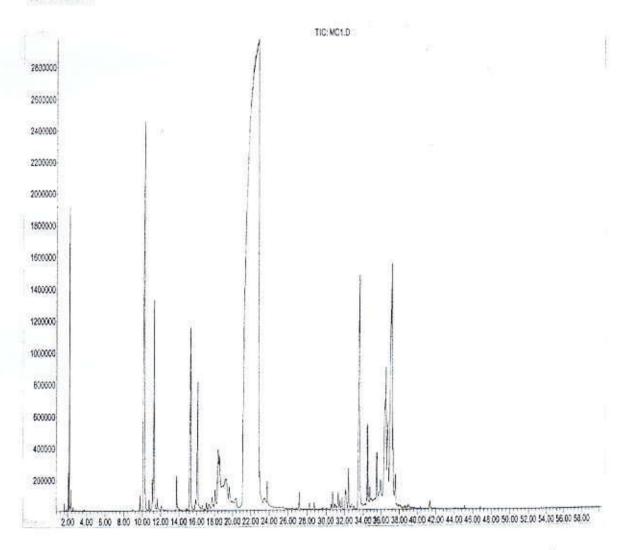


Figure 12 : Chromatogramme de la fraction volatile de Cympobogon schoenanthus obtenue par HDMO (MC1),

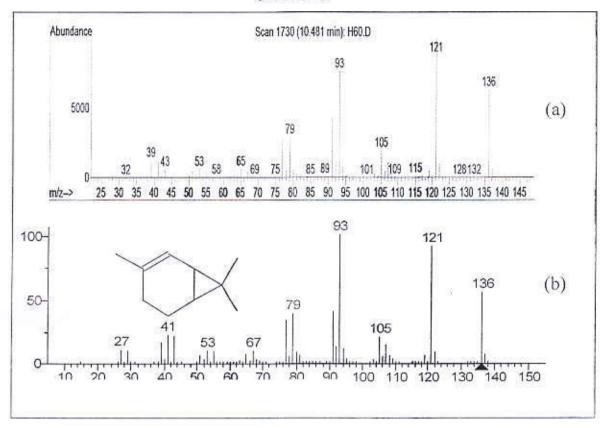
Tableau V : Composés détectés dans l'analyse de l'extrait MC1 par GC-MS.

Nº	Tr (min)	%	Principaux fragments
1	9.73	0.11	109, 79, 94, 124, 94, 43, 152, 69, 53
2	10.23	5.32	121, 93, 136, 77, 105, 39,43, 53
3	10.75	0.07	121,93, 136, 77, 105,41, 65, 51.
4	11.08	0.24	119, 134, 91, 77, 65, 39, 103.
5	11.28	1.83	68, 93, 79, 136, 121, 107, 53, 39.
6	11.63	0.08	93,79, 41, 105, 121, 53, 67, 136.
7	12.08	0.04	93, 79, 41, 121, 105, 53, 67, 136.
8	13.73	0.34	81, 69, 41, 152, 136, 121, 93, 109.
9	15.33	2.23	43, 139, 93, 111, 79, 121, 71, 154.
10	16.11	1.33	43, 139, 93, 69, 121, 111, 81, 55, 154.
11	17.35	0.11	59, 94, 79, 69, 41, 111, 121, 152
12	17.71	0.2	109, 43, 91, 119, 69, 59, 137, 53, 152
13	18.07	0.11	137, 109, 69, 79, 91, 41, 119, 152.
14	18.34	0.98	59, 93, 121, 136, 81, 43, 67, 152.
15	19.66	0.43	135, 43,91, 84, 150, 59, 77, 67, 51
16	19.97	0.13	84, 139, 43, 55, 91, 112, 54
17	20.37	0.23	84, 139, 41, 55, 93, 69, 111, 154
18	21.67	61.9	110, 82, 95, 137, 152, 39, 54, 124.
19	26.86	0.01	81, 110, 123, 161, 95, 41, 105, 67.
20	27.16	0.13	93, 81, 107, 67, 147, 121,41, 161, 189.
21	28.26	0.05	133, 41, 93, 69, 79, 105, 120, 161, 147, 204
22	28.77	0.05	161, 105, 119, 91, 189, 133, 204
23	29.64	0.02	93, 121, 80, 147, 41, 110, 67, 204
24	30.58	0.19	161, 105, 119, 91, 79, 133, 41, 204, 189
25	30.76	0.15	161, 105, 91, 119, 81, 41, 133, 204
26	30.97	0.05	105, 93, 79, 161,121, 41, 133, 67, 204, 189.
27	31.06	0.03	207, 137, 109, 81, 189, 41, 95.
28	31.21	0.02	161, 105, 91, 119, 204, 133, 81, 147, 189.
29	31.32	0.17	161, 207, 105, 119, 43, 133, 81, 189.
30	31.53	0.28	105, 161, 93, 119, 204, 81, 41, 189, 133.
31	31.73	0.1	93, 107, 68, 119, 132, 81, 147, 161, 189, 202.
32	32.08	0.15	161, 105, 119, 91, 1333, 204, 79, 41.
33	32,44	0.34	161, 119, 134, 105, 204, 91, 189.
34	32.50	0.07	161, 119, 105, 207, 93, 43, 55, 81, 69
35	23.99	0.03	105, 161, 119, 91, 204, 81, 41, 133, 189.
36	33.95	3.43	59, 93, 161, 107, 81, 41, 121, 135, 189, 207.
37	34.48	0.7	81, 43, 161, 123, 105, 93, 207, 67.
3.8	34.72	0.24	93, 79, 43, 107, 69, 121, 161, 189, 204.
39	34.92	0.18	161, 93, 59, 107, 43, 81, 121, 207, 135, 149, 67, 189.
40	35.52	0.73	59, 109, 149, 93, 161, 204, 189, 135, 121, 81.
41	35.96	0.48	161, 189, 59, 93, 133, 107, 204, 149, 81, 121, 43, 67, 222.
42	36.43	1.72	161, 189, 204, 59, 133, 109, 91, 149, 81, 119, 43, 175, 222.
43	36.74	1.48	161, 95, 121, 43, 204, 105, 59, 81, 189, 147, 222.
44	37.07	2.64	59, 149, 161, 109, 93, 122, 135, 81, 189, 204, 41
45	37.16	2.45	161, 95, 121, 149, 204, 59, 43, 109, 189, 81, 135, 222.
46	37.37	0.71	161, 122, 43, 81, 93, 107, 204, 189, 59, 67, 135, 149, 222.
47	37.58	0.42	59, 93, 161, 107, 81, 119, 41, 67, 189, 204, 135, 147, 175.
48	40.33	0.45	149, 59, 43, 164, 109, 123, 135, 81, 95, 71, 189, 207,53.
49	41.33	0.08	149, 109, 43, 59, 126, 164, 81,69, 95, 135,207, 222,

<u>Tableau VI</u>: Composés identifiés par GC/MS avec leurs taux et indices des rétention pour trois extraits H60, MC1 et EH

N	Composé	I _R De ce travail	I _R Littérature	Référence	H60 (%)	MC1 (%)	EH (%)
1	Carène 2	1000	1002	14	10.79	5.32	2.59
2	α-terpinène	1013	1017	17	0.26	0.07	-
3	p-cymène	1018	1025	17	0.17	0.24	-
4	limonène	1025	1029	14, 17	3.21	1.83	0.51
5	Cis ocimène	1031	1037	17	0.23	0.08	
6	Trans ocimène	1042	1050	17	0.11	0.04	-
7	D-fenchone	(4)	128	-	0.34	0.030	1 23
8	trans -1methyl-4-[methylethyl]- cyclohex-2-ène	1112	•	23/4	1.54	2.23	0.27
9	1-terpinéol	1129	-	344	1.08	1.33	0.21
10	Dill ether	1171	1170		0.11	0.11	1050
11	α-terpinéol	1181	1189	17	1.39	0.98	0.41
12	Cis pipéritol	14.5	•	- 1	4	0.13	
13	Trans pipéritol		-	107.0	0.11	0.3	-
14	Pipéritone	1250	1253	14, 17	42.46	61.9	34.91
15	β-élemène	1377	1391	17	0.66	0.13	1.34
16	β-caryophyllène	1418	1419	17	0.47	0.05	0.68
17	Calarène	1433	1434	17	0.15	0.05	0.33
18	α-caryophyllène	1448	1455	17	0.07	0.02	0.09
19	Gérmacrène-D	1477	1485	14	0.47	0.15	1.22
20	β-sélinène	1483	1490	17	0.19	0.05	0.54
21	α-sélinène	1490	1493	17	0.30	0.02	0.83
22	α-muurolène	1495	1500	17	0.28	0.28	0.39
23	1-ethenyl-1methyl-2,4bis [methylethenyl] - Cyclohexane	1508	*	2	0.30	0.10	0.77
24	γ-cadinène	1513	1514	17	0.44	0.15	0.81
25	δ-cadinène	1517	1523	14, 17	1.19	0.34	1.73
26	Elemol	1546	1550	14	8.25	3.43	12.27
27	1, 6 gérmacradine-5-ol	1572	1576	17	0.48	0.70	1.33
28	Oxyde de Caryophyllène	1578	1583	14, 17	0.50	0.24	-
29	1,2,3,4,4a,5, 6,8a-octahydro-α,α, 4a,8,tetra-methyl-[2α,4aα,8aα]- 2- naphthylmethanol	1600			1.40	0.73	0.84
30	10-epi-γ-cudesmol	1616	-		1.11	0.48	0.92
31	γ-eudesmol	1631	1653	12	5.24	1.72	4.49
32	δ-cadinol	1636	1657	1849	2.35	1.48	2.64
33	β-eudesmol	77.81		25%	6.17	2.64	7.40
34	α-eudesmol	1659	1656	7	2.99	2.45	8.74
35	Tau-cadinol				-	0.71	2,34

Carène- 2



a- Terpinène

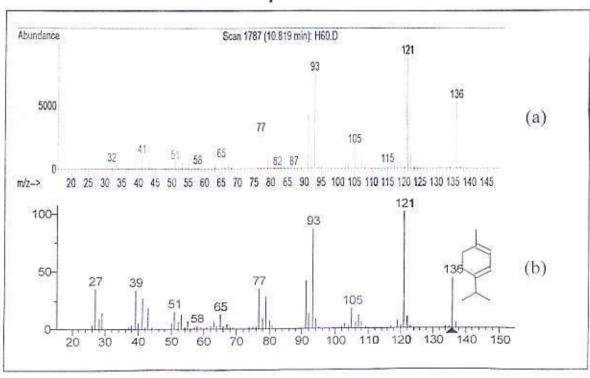
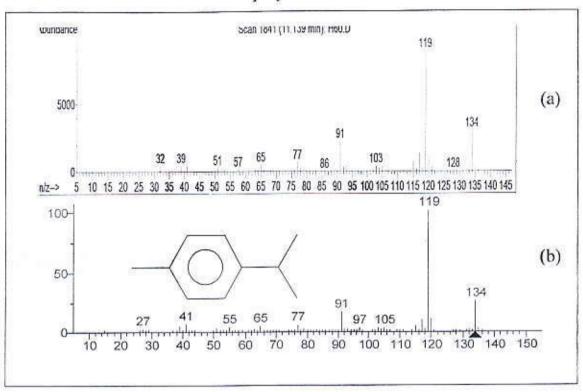


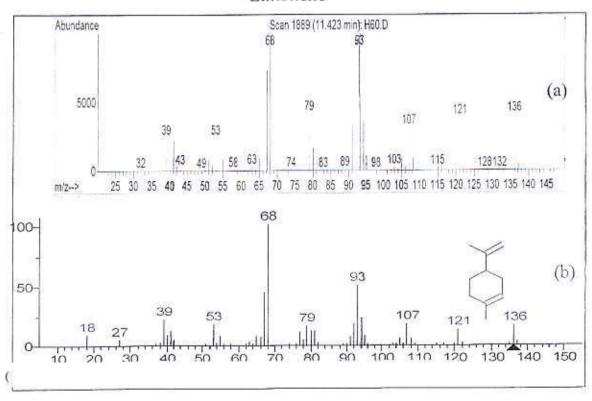
Figure 13 : Spectres de masse de quelques composés identifiés dans l'II.E. de la plante Cymbopogon schoenanthus.

- (a) : le spectre obtenu dans notre travail
- (b) : le spectre de référence

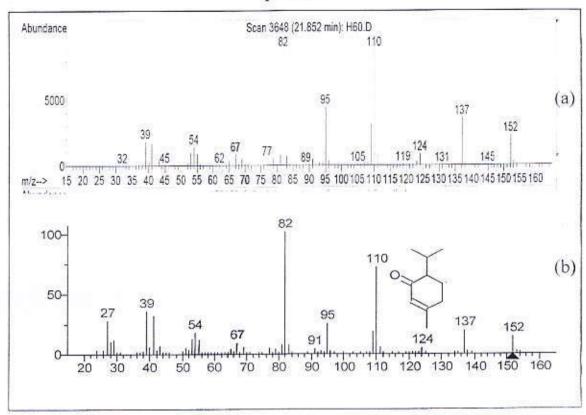
p-cymène



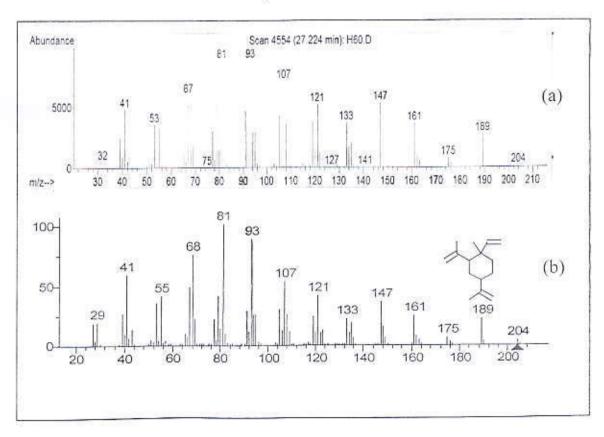
Limonène



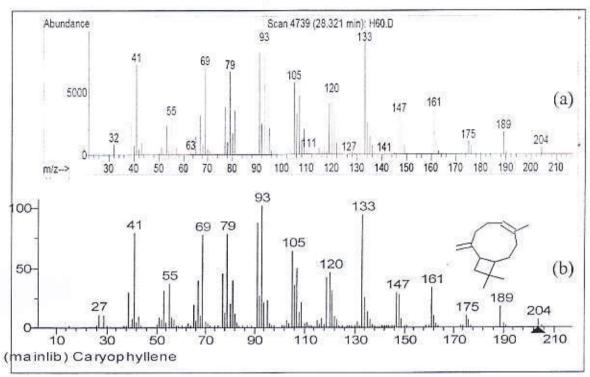
Pipéritone



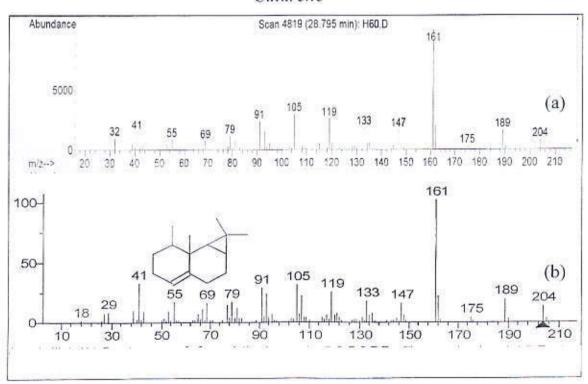
β-élemène



Trans-\(\beta\)-Caryophyll\(\ext{e}ne\)

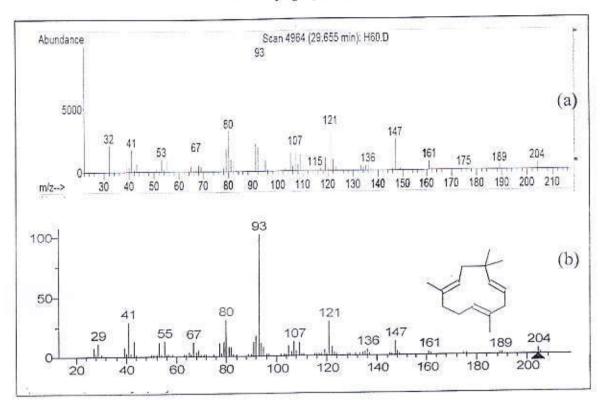


Calarène

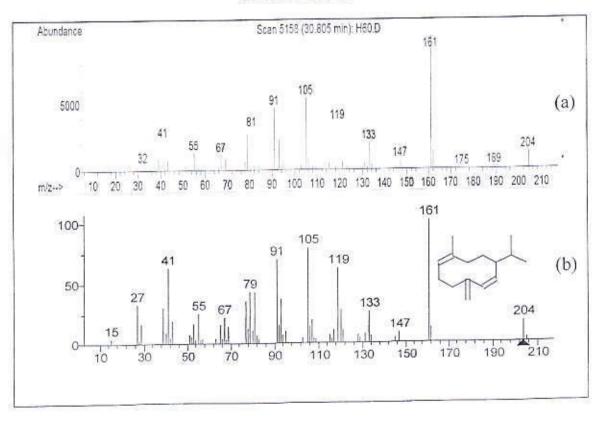


Suite de la figure 13

a-Caryophyllène

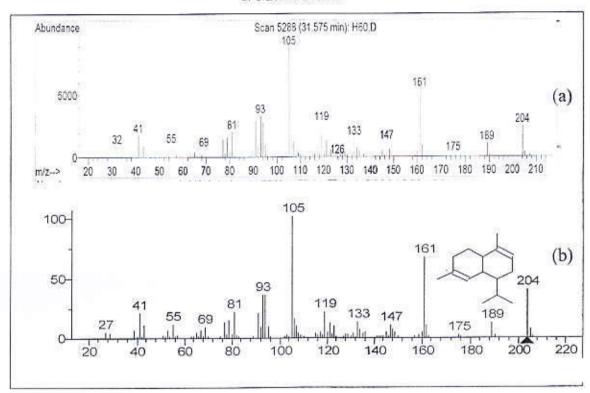


Gérmacrène D

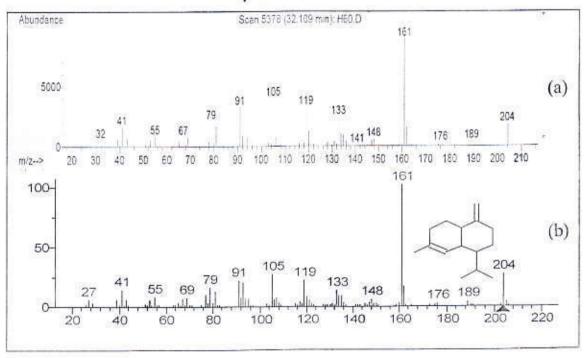


Suite de la figure 13

a-Muurolène

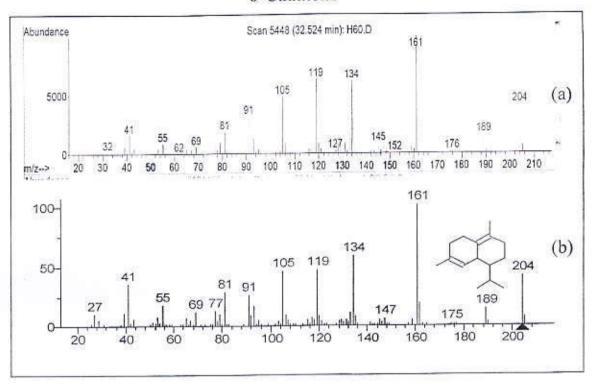


y-Cadinène

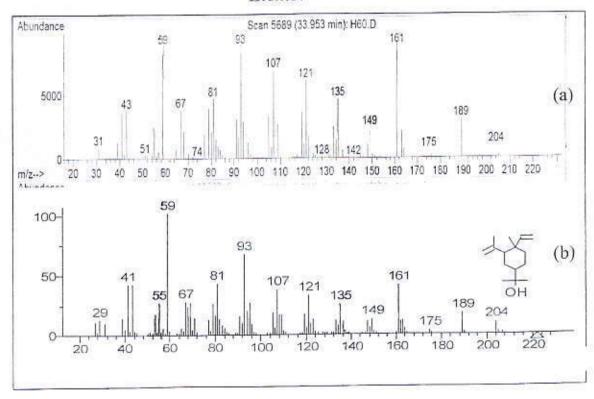


Suite de la figure 13

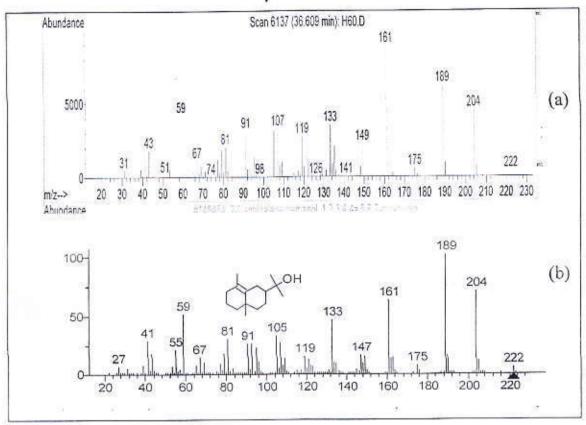
δ-Cadinène



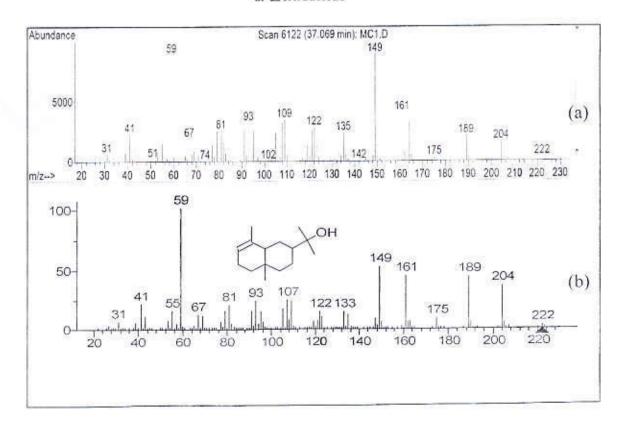
Elemol



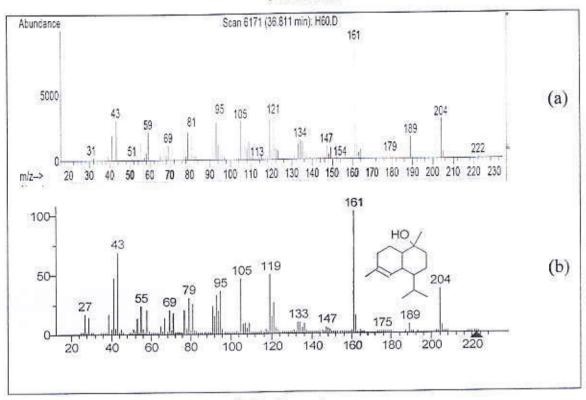
y-Eudesmol



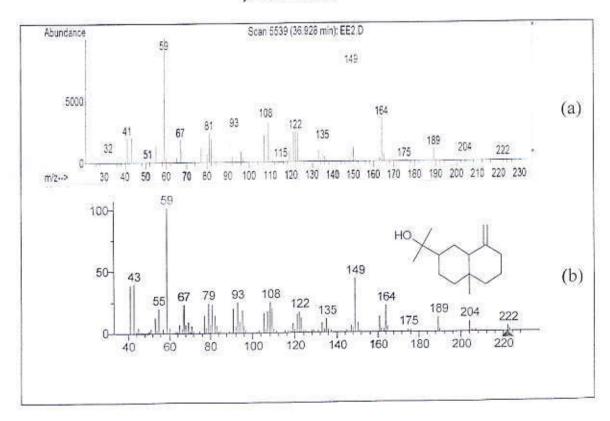
a-Eudesmol



δ -Cadinol

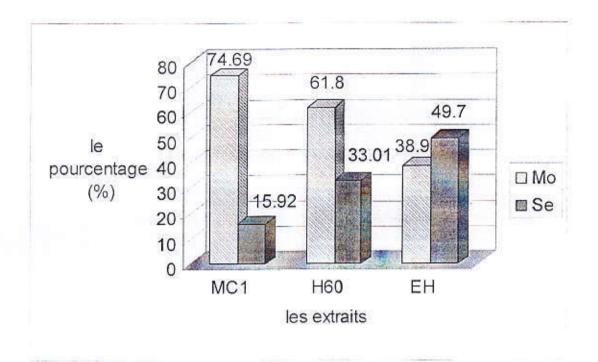


β-Eudesmol



Suite de la figure 13

La figure 14, illustre les taux en monoterpènes et sesquiterpènes identifiés par la GC/MS pour les trois extraits utilisés comme références dans l'identification de constituants de nos huiles essentielles. Pour les monoterpènes, leurs taux varie entre 38.9 et 74.69 %, alors que pour les sesquiterpènes, les taux sont compris entre 15.92 et 49.7%.



<u>Figure 14</u>: Taux en monoterpènes (Mo) et en sesquiterpènes (Se) identifiés par la GC/MS, dans les extraits MC1, H60 et EH

III.3. Conclusion:

L'analyse de nos huiles essentielles par la chromatographie en phase gazeuse seule et couplée à la spectrométrie de masse nous a permis d'identifier plus de trente constituants dont le produit majoritaire qui est le pipéritone. L'ensemble des constituants identifiés étant soit des monoterpènes, soit des sesquiterpènes. Notons toutefois, que la présence d'isomères dans nos extraits engendre des difficultés d'identification absolue, vu la similitude des spectres de certains composés terpéniques. La résolution de ces difficultés pourra être entreprise dans des travaux ultérieurs par l'association d'autres techniques telles que la GC-FtIR et la GC-RMN, avec l'utilisation de colonnes expillaires plus performantes en matière de séparation d'isomères et de stéréoisomères telles que les phases stationnaires chirales. Enfin, pour une meilleure optimisation des protocoles d'extraction et au vu des différences observées dans la composantes des extraits analysés dans ce chapitre, une évaluation de quelques techniques d'extraction des huiles essentielles est entreprise dans le chapitre suivant.

CHAPITREIV

Evaluation des modes d'extractions utilisés

Dans la plante, les huiles essentielles peuvent être stockées dans divers organes : fleurs, feuilles, écorces, racines et/ou fruits. La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles, classées parmi les métabolites secondaires, se font généralement au niveau des structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur la surface de la plante. Parmi les composants majoritaires des huiles essentielles, nous trouvons les terpénoïdes qui possèdent un rôle écologique lors des interactions végétales, comme agents allélopathiques, c'est-à-dire inhibiteur de la germination, mais aussi lors des interactions végétal-animal, comme agent de protection contre les prédateurs tels que les insectes. Ils interviennent également, par leurs odeurs caractéristiques, dans l'attraction de pollinisateurs.

Quelques recherches sont développées afin de comparer qualitativement les extraits obtenus par différentes méthodes d'extraction telles que l'hydrodistillation conventionnelle, l'extraction par solvant, l'hydrodistillation assisté par micro ondes et l'extraction par fluide à l'état supercritique. A travers les résultats de ces recherches, nous avons constaté que l'extraction par solvant (ES) s'est révélée la plus efficace pour l'obtention de monoterpènes hydrocarbonés, suivie par l'extraction aux micro ondes (EMO), puis de l'hydrodistillation conventionnelle (EH) et enfin de l'extraction par fluide à l'état supercritique (EFS).

En outre, l'extrait le plus riche en monoterpènes oxygénés a été obtenu par EFS, puis ES, EII et enfin EMO. La concentration la plus élevée en sesquiterpènes hydrocarbonés a été obtenue par EFS, puis ES, EMO et enfin EH. Pour les sesquiterpènes oxygénés l'ordre est le même, sauf que l'extraction par solvant a été la plus faible (Stashenko et col. 2004)¹⁶.

Dans notre travail, nous avons étudié et évalué quatre méthodes d'extraction de l'huile essentielle de la plante Cymbopogon schoenanthus: l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodistillation, l'extraction par des solvants volatils avec un appareil de Soxhlet et enfin une extraction aux micro ondes assisté par un appareil de distillation de type Clavenger.

IV.1. Description des paramètres d'évaluation

IV.1.1. Le rendement :

Le rendement en huile essentielle ou sa concentration dans les tissus de la plante¹⁷, pour chaque opération, a été calculé par la formule suivante :

Rendement en huile essentielle (%) =
$$\frac{Quantit\'{e} \ d'huile essentielle \ (g)}{Quantit\'{e} \ de \ la plante utilis\'{e} e \ (g)} \times 100$$

IV.1.2. Les caractéristiques physico-chimiques :

Eu égard à l'importance des huiles essentielles (H.E) du point de vue industriel, une analyse des propriétés physiques et de la composition chimique est nécessaire pour les caractériser et les évaluer.

IV.1.2.1. Caractéristiques organoleptiques

L'aspect, la couleur et l'odeur d'une H.E seront déterminés afin de pouvoir apprécier la qualité, tant sur le plan économique que scientifique. Les huiles essentielles sont généralement liquides à la température ordinaire, d'odeur aromatique, rarement colorées quand elles sont fraîches.

IV.1.2.2. Caractéristiques physiques

La densité des H.E est le plus souvent inférieure à celle de l'eau. Parmi les essences officinales, seules celles des Cannelles, Girofle et Sassafras sont plus denses que l'eau. Elles ont un indice de réfraction élevé et, le plus souvent, sont douées de pouvoir rotatoire. Elles sont volatiles et entraînables par la vapeur d'eau. Très solubles dans l'eau, elles lui communiquent leur odeur. Elles sont solubles dans l'alcool, l'éther et la plupart des solvants organiques.

a) La densité relative à 20°C : NFT 75-111

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

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

Où m_1 est la masse du pycnomètre avec l'eau, m_2 la masse du pycnomètre avec l'HE et m_0 la masse du pycnomètre vide.

b) L'indice de réfraction à 20°C : NFT 75-112

L'indice de réfraction d'une H.E 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'onde déterminée passant de l'air dans l'HE maintenue à une température constante. La longueur d'onde spécifiée est : 589,3 nm, correspondant aux radiations D1 et D2 du sodium. La valeur de l'indice de réfraction de référence est calculée selon l'équation (où t est la température de référence) :

$$n_D^t = n_D^{t'} + 0.0004(t'-t)$$

 n_D^t : Valeur de la lecture obtenue à la température t' (expérimentale)

c) Le pouvoir rotatoire : NFT 75-113

Le pouvoir rotatoire d'une H.E est l'angle exprimé en milli radians et /ou degrés d'angle dont tourne le plan de polarisation d'une radiation lumineuse de longueur d'onde : λ = 589.3 nm, correspondant à la raie D du sodium, lorsque celles-ci traversent une épaisseur de cuve de 100 mm d'HE dans des conditions déterminées de température.

IV.1.2.3. Caractéristiques chimiques

a') L'indice d'acide, NFT 75-103

L'indice d'acide IA est la quantité en milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres dans un gramme d'H.E.

$$IA = \frac{5.61 * V}{m}$$

V : Volume en millilitres de la solution de KOH et m : Masse en grammes de la prise d'essai.

b') L'indice d'ester, NFT 75-104

L'indice d'ester IE est la quantité en milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans un gramme d'huile essentielle.

$$IE = \frac{28.05}{m}(V_0 - V_1) - IA$$

Vo : volume, en millilitres de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour l'essai à blanc.

V1 : volume, en millilitres de la solution d'HCl utilisée pour la détermination.

m : masse, en grammes, de la prise d'essai et IA : valeur de l'indice d'acide déterminé selon les normes NFT 75 103.

IV.2. RESULTATS EST DISCUSSION:

IV.2.1 Caractéristiques principales des modes d'extraction utilisés

IV.2.1.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :

Cette technique déjà décrite dans le chapitre I, et dont le protocole est illustré par la figure 15, est effectuée sur la plante entière séchée pendant 3 heures.

Elle a conduit à une huile jaune blanche de densité de 0.726 g/ml et un indice de réfraction de 1.4926 avec un rendement de 2,13 %.

Suite aux identifications réalisées dans le chapitre précédent, nous avons comparait les pourcentages en monoterpènes et en sesquiterpènes (hydrocarbonés et oxygénés dans les deux cas). A noter que les résultats pour ce mode d'extraction sont obtenus pour la colonne SE 30.

Dans le tableau VII nous avons regroupé les différents constituants identifiés avec leurs taux dans l'huile essentielle calculés sur la base des aires de pies chromatographiques et donnés par le traitement informatique.

La constatation principale est l'apparition de la pipéritone comme produit majoritaire avec un pourcentage de 43.14 %. Les deux composés suivants sont le carène-2 et l'élemol avec des taux de 18.41 % et de 9.18% respectivement.

En terme de famille de composés, Le pourcentage en monoterpènes et sesquiterpènes illustrés par la figure 16 sont respectivement 69.05% et 22.99%.

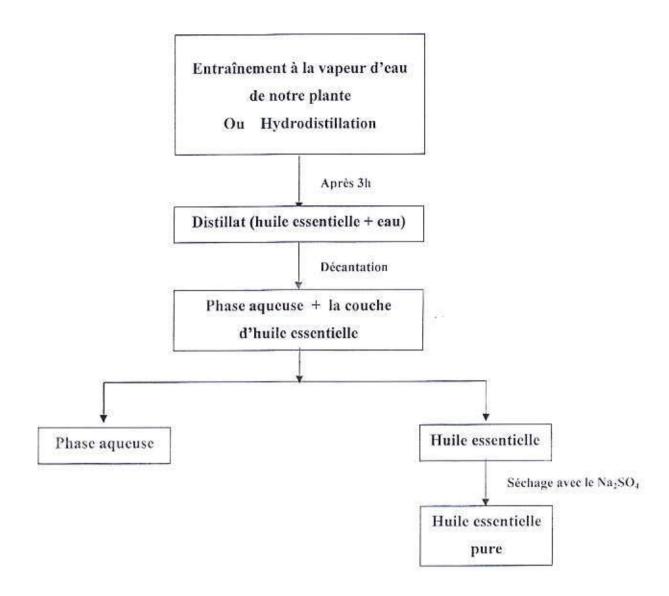


Figure 15 : Protocole expérimental utilisé pour l'obtention de l'HE de la plante Cymbopogon schoenanthus

<u>Le tableau VII</u> : Composés identifiés dans l'huile essentielle extraite par entraînement à la vapeur.

N°	Les composés identifiés	Taux %	N°	Les composés identifiés	Taux
1	Carène-2	18.41	16	Gérmacrène-D	0.23
2	α-terpinène	0.23	17	β-sélinène	0.37
3	p-cymène	0.22	18	α-sélinène	0.54
4	Limonène	3.23	19	α-muurolène	5
5	Cis ocimène	0.35	20	1-ethenyl-1methyl-2,4bis [methylethenyl]- Cyclohexane	0.38
6	Trans ocimène	0.38	21	γ-cadinène	0.26
7	trans -1methyl-4- [methylethyl]- cyclohex-2- ène	0.40	22	δ-cadinène	0.70
8	1-terpinéol	0.73	23	Elemol	9.18
9	Dill ether	0.40	24	1,6 gérmacradine-5-ol	0.07
10	α-terpinéol	0.56	25	Oxyde de Caryophyllène	0.10
11	Pipéritone	43.14	26	1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro- α,α,4a,8,tetra-methyl-[2α,4aα,8aα]- 2-naphthylmethanol	0.32
12	β-élemène	1.18	27	10-epi-γ-eudesmol	0.14
13	β-caryophyllène	0.33	28	γ-eudesmol + δ-cadinol	2.94
14	Calarène	0.67	29	α-eudesmol et le β-eudesmol	5.34
15	α-caryophyellène	0.24			

Taux des monoterpènes Hydrocarbonés (%)	22.82
Taux des monoterpènes Oxygénés (%)	45.23
Taux des sesquiterpènes Hydrocarbonés (%)	4.90
Taux des sesquiterpènes Oxygénés (%)	18.09

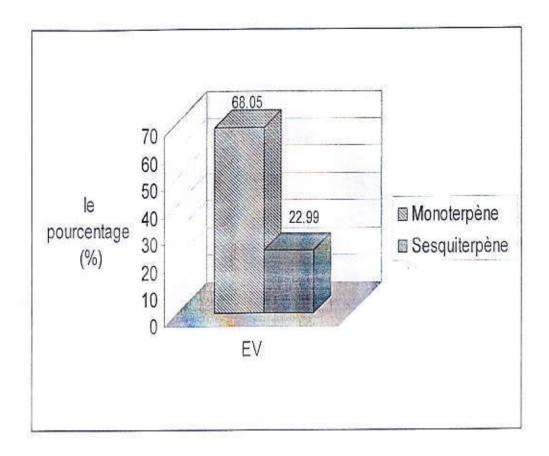


Figure 16 : le pourcentage des monoterpènes (Mo) et des sesquiterpènes (Se) dans l'huile extraite par l'entraînement à la vapeur d'eau.

IV.2.1.2. Extraction par hydrodistillation:

Cette méthode basée sur plusieurs phénomènes comme le transfert de chaleur et de matière et soumis à des lois thermodynamiques va dépendre des conditions de température de l'opération engendrant une influence soit sur le rendement soit sur la qualité de l'huile extraite. Ainsi, nous avons travaillé à différentes températures et qui sont 60, 70, 80 et 90 °C, pour évaluer l'influence de la température sur les aspects qualitatifs et quantitatifs de l'huile essentielle obtenue. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau VIII.

Il ressort de ce tableau des caractéristiques physiques assez différentes. On observe ainsi un rendement optimum de 4.5 %, obtenu à la température de 70 °C, les autres conditions conduisant à un taux comparable légèrement supérieur à 3 %.

L'huile obtenue est d'une couleur jaune blanche et une odeur très caractéristique. Les indices de réfraction des extraits sont assez différents, on observe des différences de l'ordre de 0.0084 pour une variation en température de 30 °C.

Seul le pouvoir rotatoire de l'H60 a été mesuré en raison des faibles quantités de plantes disponibles. Sa valeur qui est de + 51.565 °, indique que notre huile est dextrogyre. Et enfin, l'indice d'acide mesuré pour ce même extrait à 60 °C est supérieur à 2 mettant en évidence l'acidité de notre huile.

<u>Tableau VIII</u>: Quelques caractéristiques physico-chimiques des extraits obtenus par hydrodistillation à des températures différentes.

Caractéristiques	H60	H70	H80	H90
Le rendement de l'opération en %	3.11	4.50	3.25	3.03
Densité	0.7768	-	0.7387	0.6591
Indice de réfraction	1.4898	1.4922	1.4933	1.4984
Pouvoir rotatoire	+ 51.565	12		-
Indice d'acide	2.805	•	H)	

Le tableau IX et la figure 17, mettent en évidence les résultats analytiques qualitatifs et semi-quantitatifs obtenus par GC et GC-MS pour l'extraction par hydrodistillation et qui apparaissent en gros comparables à ceux obtenu par entraînement à la vapeur.

Toutefois, les taux de certains constituants varient considérablement avec la température. Ceci peut être illustré par les constatations suivantes :

- Le taux en pipéritone diminue avec l'augmentation de la température en partant de 56.98 % à 60 °C et atteignant 46.29 % à 90 °C.
- Pour le deuxième produit majoritaire, on note une variation irrégulière avec la température puisqu'on obtient les taux : de 14.16 ; 14.38 ; 12.20 et enfin 17.06 % pour 60, 70, 80 et 90 °C respectivement.
- Le taux du troisième produit majoritaire évolue d'une manière croissante avec l'augmentation de la température en passant de 7.37 % pour 60 °C à 12.027 % pour 90°C.

En considérant les taux globaux en sesquiterpènes et en monoterpènes, on constate un pourcentage élevé en monoterpènes oxygénés à 60 °C (59.2 %) alors que pour les monoterpènes hydrocarbonés, le taux le plus élevé est obtenu à 90 °C (20.53 %). Par contre, les sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés atteignent leur taux le plus élevé à 80 °C et 90 °C avec les valeurs de 25.65 % et de 3.57 % respectivement.

Par conséquent, les conditions de température pour une extraction d'huile essentielle peuvent être dictées par le taux souhaité pour l'un des constituants majoritaires.

<u>Tableau IX</u>: Composés identifiés dans l'huile essentielle extraite par hydrodistillation

A différentes températures.

Comments Islandice		Taux	en %	
Composés identifiés	H60	H70	H80	H90
Carène-2	14.16	14.38	12.2	17.00
α-terpinène	0.18	0.32	0.40	0.21
p-cymène	0.14	0.22	0.19	0.10
Limonène	2.54	2.54	2.27	2.90
cis ocimène	0.22	0.50	0.19	0.19
Trans ocimène	0.12	0.11	0.17	0.07
trans -1methyl-4-[methylethyl]- cyclohex-2-ène	0.64	0.54	0.53	0.42
1-terpinéol	0.42	0.35	0.35	0.35
dill ether	0.14		little a	0.23
α-terpinéol	1.02			0.58
Pipéritone	56.98	55.95	49.23	46.29
β-élemène	0.64	0.70	0.96	0.85
β-caryophyllène	0.26	0.09	0.18	0.07
Calarène	0.21	0.28	0.29	0.34
α-caryophyellène	0.10	0.11	0.17	0.14
Gérmacrène-D	0.16	0.17	0.21	0.19
β-sélinène	0.37	0.15	- Control of the Cont	0.14
α-sélinène	0.17	0.16	0.21	0.19
α-muurolėne	0.13	0.17	0.60	0.20
I-ethenyl-Imethyl-2,4bis[methylethenyl]- Cyclohexane	0.49	0.48		0.56
y-cadinène	0.17	0.16	0.21	0.19
δ-cadinène	0.49	0.48	0.74	0.56
Elemol	7.37	8.77	11.12	12.03
1,6 gérmacradine-5-ol	0.05	0.07	0.12	0.05
Oxyde de Caryophyllène	0.09	0.12	0.18	0.10
1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-α,α,4a,8,tetra-methyl- 2α,4aα,8aα]- 2-naphthylmethanol	0.32	0.36	0.39	0.45
0-epi-γ-eudesmol	0.14	0.26	0.30	0.33
-eudesmol+ δ-cadinol	2.74	3.21	3.86	4.66
t-eudesmol + β-eudesmol	4.57	5.20	7.11	8.03
Monoterpènes	76.56	74.91	65.53	68.4
lydrocarbonés	17.36	18.07	15.42	20.53
Oxygénés	59.2	56.84	50.11	47.87
esquiterpènes	18.47	20.94	26.65	29.08
lydrocarbonés	3.19	2.95	3.57	3.43
Dxygénés	15.28	17.99	23.08	25.65

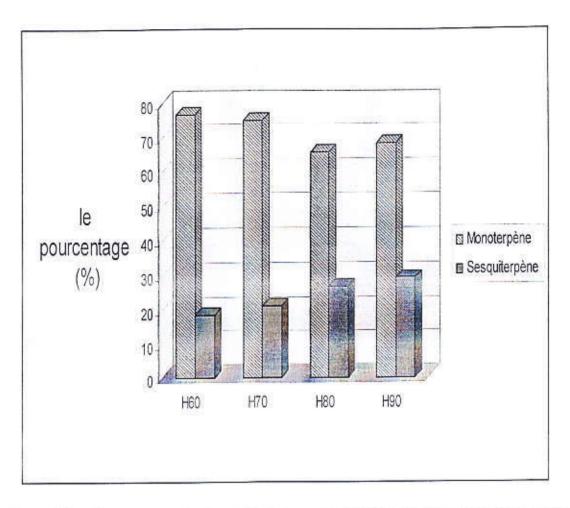


Figure 17: Taux en monoterpènes (Mo) et en sesquiterpènes (Se) dans l'huile essentielle extraite par hydrodistillation.

IV.2.1.3. Extraction par l'utilisation de micro-ondes :

Cette méthode a été effectuée au Laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnelle de la Faculté de chimie de l'USTHB.

L'extraction a été réalisée avec un appareil de Clevenger assisté d'un four micro-ondes de type SAMSUNG TDS,

Les conditions opératoires sont les suivantes :

- La quantité de la plante : 75 g + 20 ml d'cau distillée.
- La puissance du micro-ondes appliquée : 850 Watt.
- Pour effectuer une étude cinétique de l'extraction, nous avons réalisé cinq extractions successives. La durée totale de l'extraction est donc répartie en 5 périodes avec récupération distincte des extraits.

Les résultats obtenus pour le rendement et les deux caractéristiques physiques, masse volumique et indice de réfraction, sont regroupées dans le tableau X:

<u>Tableau X</u>: Quelques caractéristiques de l'huile essentielle obtenue par extraction assistée aux micro ondes.

Les extraits	MC1	MC2	MC3	MC4	MC5	Total
Durée d'extraction (min)	10	9	13	20	20	72
Rendement pour chaque période (en %)	0.735	0.426	0.579	0.2036	0.0904	2.034
Densité	0.551	0.640	0.724	0.53	0.226	-
Indice de réfraction (n)	1.4860	1.4882	1.4900	1.4922	727	-

On observe une nette variation du rendement et de la masse volumique en fonction du temps (figure 18). Au cours des dix premières minutes, le rapport (quantité extraite /temps de l'extraction) est maximal. La variation constatée pour l'indice de réfraction reflète les différences en terme de composition des différents extraits ainsi que leurs quantités.

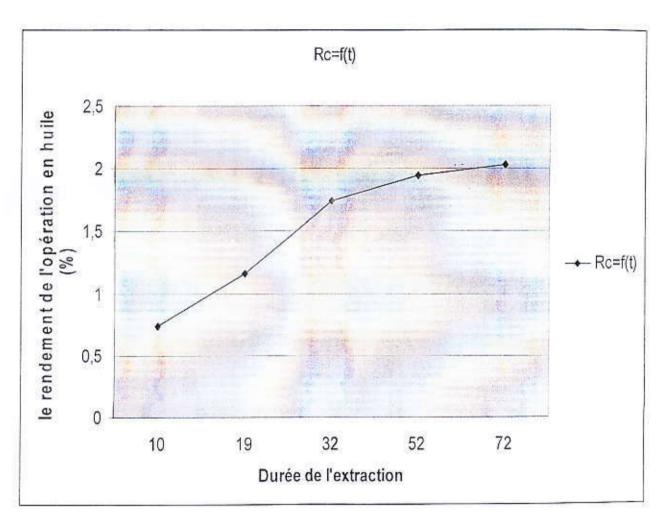


Figure 18: Evolution du rendement cumulatif en fonction du temps

Les résultats d'analyse des extraits MC1, MC2, MC3, MC4, MC5 par CPG et GC-MS sont illustres dans le tableau XI, où sont reportés les taux des différents composés identifiés dans ce travail. A travers ces résultats, il apparaît que le taux en produit majoritaire est optimum des les dix premières minutes de l'extraction (82.47 %). Ce taux qui va varier ensuite en diminuant tout en constatant qu'après 13 minutes le taux est assez important comparativement à la première période puisqu'il atteint la valeur de 70.19 %. Pour pouvoir exploiter ces résultats cinétiques, il nous apparaît plus raisonnable de réaliser d'autres expériences pour s'assurer de la reproductibilité des résultats avant d'entreprendre des interprétations de façon rigoureuse.

Tableau XI: les composés identifient dans l'huile essentielle extrait par le micro ondes

C	Taux en %					
Composés identifiés	MC1	MC2	MC3	MC4	MC5	
Carène-2	3.85	13.28	9.48	12.152	12.30	
α-terpinène	0.26	0.11	0.10	0.20	0.23	
p-cymène	0.21	0.15	0.09	0.14	0.09	
Limonène	1.66	2.81	1.98	2.94	2.62	
cis ocimène	0.05	0.15	0.12		0.12	
trans ocimène	0.04	0.09	0.07	0.08	0.08	
trans -1methyl-4-[methylethyl]- cyclohex-2-ène	0.24	0.61	0.54	0.19	0.27	
1-terpinéol	0.38	0.10	0.11	0.52	0.26	
dill ether	1.42	1.18	1.13	0.61	0.68	
α-terpinéol	0.08	0.33	0.28	0.11	0.06	
Pipéritone	82.47	69.35	70.02	57.49	57.50	
β-élemène	0.18	0.20	0.27	0.95	0.79	
β-caryophyllène	0.02	0.06	0.10	0.23	0.26	
Calarène	0.04	0.05	0.07	0.23	0.19	
α-caryophyellène	0.02	0.005	0.006	0.06	0.04	
Gérmacrène-D	0.04	0.11	0.15	0.23	0.27	
β-sélinène	0.05	0.04	0.05	0.27	0.17	
α-sélinène	0.05	0.08	0.10	0.41	0.12	
α-muurolène	0.126	0.062	0.181	0.216	0.219	
1-ethenyl-1methyl-2,4bis[methylethenyl]-	0.10	0.13	0.17	0.32	0.29	
Cyclohexane						
γ-cadinène	0.04	0.08	0.13	0.19	0.16	
δ-cadinène	0.21	0.19	0.29	0.69	0.67	
Elemol	2.50	3.62	5.63	9.24	8.95	
1,6 gérmacradine-5- ol	0.05	0.22	0.25	0.11	0.12	
Oxyde de Caryophyllène	0.03	0.07	0.08	0.06	0.07	
1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-α,α,4a,8,tetra-methyl- [2α,4aα,8aα]- 2-naphthylmethanol	0.16	0.21	0.29	0.41	0.40	
10-epi-γ-eudesmol	0.05	0.09	0.14	0.15	0.16	
γ-eudesmol	0.89	1.13	1.63	2.51	2.47	
δ-cadinol	0.36	0.39	0.58	0.77	0.84	
α-eudesmol + β-eudesmol	1.85	2.20	3.32	4.82	4.85	
Monoterpènes	90.66	88.16	83.92	74.432	74.21	
Hydrocarbonés	6.07	16.59	11.84	15.512	15.44	
Oxygénés	84.59	71.57	72.08	58.92	58.77	
Sesquiterpènes	6.766	8.937	13.437	21.866	21.039	
Hydrocarbonés	0.876	1.007	1.517	3.796	3.179	
Oxygénés	5.89	7.93	11.92	18.07	17.86	

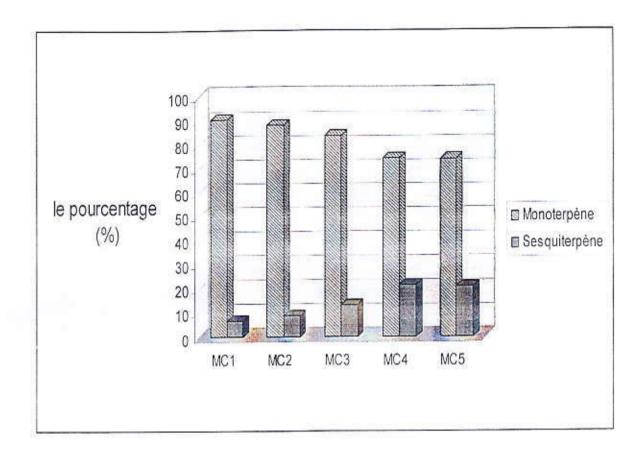


Figure 19: Taux des monoterpènes (Mo) et des sesquiterpènes (Sc) dans l'huile extraite par hydrodistillation assistée par micro ondes

IV.2.1.4. Extraction au Soxhlet:

Dans cette méthode, nous avons utilisé deux solvants de polarités différentes : l'éthanol et l'hexanc. Dans chaque cas, nous avons utilisé 50 g de la plante coupée en petits morceaux. Le protocole utilisé est illustré par la figure 20. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau XII.

Tableau XII: Résultats obtenus dans l'extraction par l'éthanol et par l'hexane au Soxhlet.

Caractéristiques	Ethanol	Hexane
Point d'ébullition du solvant (°C)	78.5	68
Durée de l'extraction (h)	5	4
Masse de la partie lourde (g)	4.096	0.953
Quantité d'essence extraite (g)	3.297	0.457
Rendement en essence (%)	6.593	0.913
Indice de réfraction (n)	1,4190	1.4961
Couleur	Vert	Jaune

Nous constatons que le rendement en essence est plus important dans le cas de l'utilisation de l'éthanol (6.593 %) que celui dans le cas de l'hexane, ce qui expliquerait la polarité des constituants majoritaires de l'essence de même que la confirmation de la miscibilité des huiles essentielles avec les alcools.

Cette méthode d'extraction étant totalement différente par rapport aux autres méthodes du point de vue du mécanisme d'extraction, le rendement sera donc très différent de par la composition d'essence obtenue. Ceci est visible à travers les résultats d'analyse par CPG en terme de taux des constituants identifiés, illustrés par le tableau XIII et la figure 21.

Le produit majoritaire reste toujours la pipéritone pour les deux solvants, avec des taux de 35.14 % dans le cas de l'éthanol et de 27.30 % pour l'hexane.

Nous constatons aussi la grande différence entre le taux des monoterpènes et celui des sesquiterpènes dans le cas de l'éthanol, alors que pour l'hexane, ces taux sont presque similaires. Notons aussi, le faible taux en monoterpènes et sesquiterpènes hydrocarbonés par rapport aux oxygénés dans le cas de l'hexane. Tandis que dans le cas de l'éthanol, les monoterpènes oxygénés sont plus importants que les hydrocarbonés et inversement pour les sesquiterpènes.

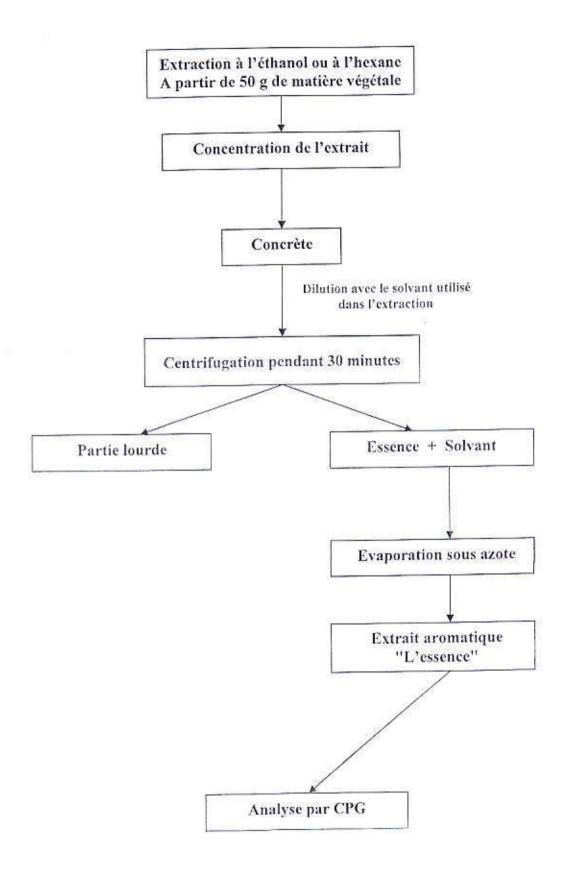


Figure 20 : Différentes étapes de l'extraction au Soxhlet

Tableau XIII: Composés identifiés dans l'extrait au Soxhlet.

		x en %
Composés identifiés	EE	EH
Carène-2	3.45	2.1
α-terpinène	0.10	0.09
p-cymène	0.09	0.05
Limonène	0.80	0.52
cis ocimène	0.05	0.11
trans ocimène	0.06	0.08
trans -1methyl-4-[methylethyl]- cyclohex-2-ène	0.13	0.36
1-terpinéol	0.14	0.27
dill ether	0.35	
a-terpinéol	0.92	0.55
Pipéritone	35.14	27.30
β-élemène	0.83	1.68
β-caryophyllène	4.05	0.24
Calarène	0.23	0.46
α-caryophyellène	0.21	0.22
gérmacrène-D	0.30	0.65
β-sélinène	0.29	0.34
α-sélinène	0.29	0.45
α-muurolène	0.36	0.18
1-ethenyl-1methyl-2,4bis[methylethenyl]- Cyclohexane	5.64	0.32
γ-cadinène	0.30	0.47
δ-cadinène	0.89	0.91
Elemol	3.90	14.29
1,6 gêrmacradine-5-ol	0.04	0.72
Oxyde de Caryophylène	0.06	0.08
1,2,3,4,4a,5, 6,8a-octahydro-α,α,4a,8,tetra-methyl- [2α,4aα,8aα]- 2-naphthylmethanol	1.33	0.29
10-epi-γ-eudesmol	0.10	0.12
y-eudesmol	1.24	2.60
δ-cadinol	0.41	0.63
x- eudesmol + β-eudesmol	2.71	7.71
Monoterpènes	41.23	31.43
Hydrocarbonés	4.55	2.95
Oxygénés	36.68	28.48
Sesquiterpènes	23.18	32.36
lydrocarbonés	13.39	5.92
) Dxygénés	9.79	26.44

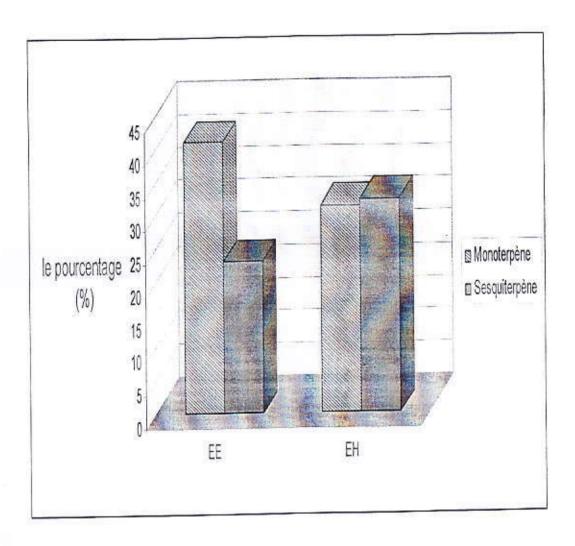


Figure 21 : Taux en monoterpènes (Mo) et en sesquiterpènes (Se) dans l'huile extraite par l'éthanol (EE) et l'hexane (EH) au Soxhlet.

IV.2.2. Etude comparative des méthodes d'extraction utilisées :

Après avoir passé en revue les caractéristiques physico-chimiques et analytiques des différents modes d'extraction de façons distinctes, nous nous proposons de mener une évaluation relative de ces techniques les unes par rapport aux autres.

IV.2,2.1. Le rendement:

Nous avons reporté dans le tableau XIV une récapitulation des rendements obtenus pour les différents modes d'extraction utilisés dans ce travail.

La constatation la plus remarquable c'est les deux valeurs extrêmes qui sont obtenues dans l'extraction au Soxhlet avec la valeur la plus importante dans le cas de l'utilisation de l'éthanol. Toutefois, comme une huile essentielle doit préférentiellement être dépourvue de traces de solvants organiques, l'hydrodistillation nous semble être la technique la plus adaptée pour l'extraction de l'huile essentielle de la plante étudiée dans notre travail, au vu du rendement obtenu (3.47 %) comparativement à l'entrainement à la vapeur et à l'extraction assistée aux micro-ondes

Tableau XIV: Rendements en huile extraite selon les méthodes d'extraction utilisées.

L'extrait	EV	HD	MC	EE	EH
Le rendement	2.130	3.470	2.034	6.593	0.913

IV.2.2.2. Les caractéristiques physico-chimiques

Comme les quantités d'huile extraites selon les différents modes sont assez faibles, il nous a été difficile de procéder aux caractérisations physiques de tous nos échantillons puisque nous voulions surtout étudier et évaluer ces modes surtout en terme de composition chimique. Néanmoins nous pouvons résumer certaines constatations comme suit :

- Faibles indice de réfraction des huiles extraites (1.4190 à 1.4961) indiquant ainsi leur faible réfraction de la lumière, ce qui pourrait favoriser leur utilisation dans les produits cosmétiques¹⁰.
- Des masses volumiques assez proches entre les différents extraits.
- La couleur de notre huile est en général jaune blanche sauf pour les extraits au Soxhlet (éthanol et hexanc) où la couleur passe du vert au jaune respectivement, ce qui laisse supposer la présence de composés non volatils influençant l'aspect de l'extrait.

 Et enfin le caractère dextrogyre de notre huile est illustré par le pouvoir rotatoire positif obtenu.

IV.2.2.3. La composition chimique

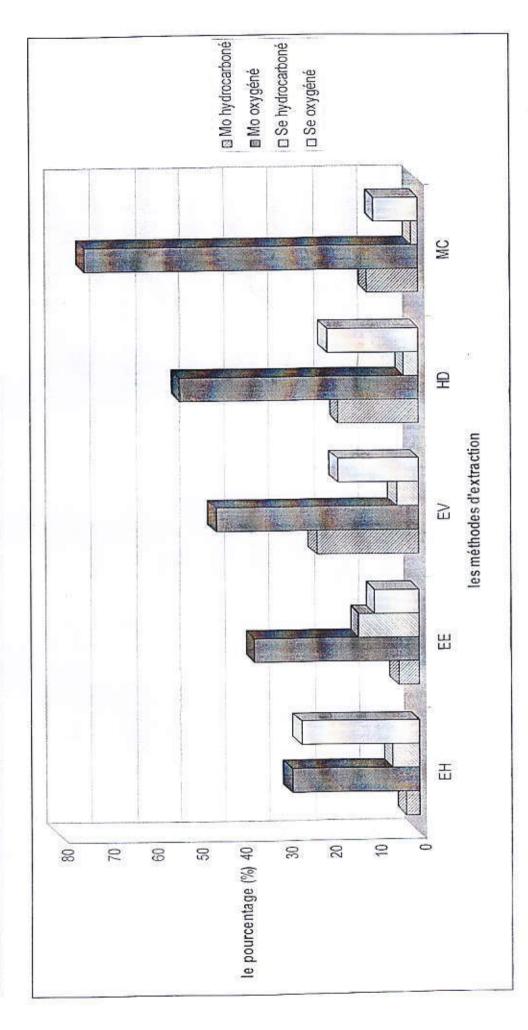
Le tableau XV regroupe les résultats analytiques obtenus par CPG et GC-MS, selon les différents modes d'extractions utilisés dans ce travail. Afin de pouvoir effectuer une étude comparative globale, nous avons pris la moyenne des taux obtenus à différentes températures dans le cas de l'hydrodistillation, tandis que pour l'extraction assistée aux micro-ondes, la somme des taux corrigée a été prise comme référence de comparaison.

D'après les résultats obtenus et représentés par le tableau XV et illustrés par la figure 22 nous pouvons tirer les observations suivantes :

- l'hydrodistillation assisté par le four micro-ondes, a fourni le taux le plus élevé en produit majoritaire en l'occurrence la pipéritone (72.6 %). Ce produit isolé et purifié par Keton et al, a montré une grande activité insecticide contre Callosobruchus maculatus ¹¹. Comme la pipéritone possède un pouvoir texique plus grand que l'extrait brut d'huile ¹⁷, nous pouvons dire que la toxicité de l'extrait de l'HDMO sera plus importante que celle des extraits obtenus par les autres modes d'extraction.
- En dehors de la pipéritone, les modes d'extraction présentent des taux, pour certains produits, différents des autres. Ceci est illustré par le grand taux de l'élémol dans le cas de l'extrait à l'hexane alors que dans le cas de l'entrainement à la vapeur, l'hydrodistillation ou encore l'extrait aux micro-ondes, le carène-2 se retrouve avec un taux assez important avec la plus grande valeur pour le premier mode cité. Le limonène qui possède certaines propriétés biologiques intéressantes ³ se retrouve en plus grande quantité dans l'extrait obtenu par entraînement à la vapeur que pour les autres modes, bien que l'hydrodistillation donne un taux assez proche de celui-ci.

<u>Tableau XV</u>: Composés identifiés dans l'huile de Cymbopogon schoenanthus selon les différents modes d'extraction (sur la colonne SE 30).

Composés identifiés		Taux	en % dans	l'extrait	
	EH	EE	EV	HD	Me
Carène-2	2.10	3.45	18.41	14.5	8.6
α-terpinène	0.09	0.10	0.23	0.28	0.1
p-cymène	0.05	0.09	0.22	0.16	0.1
Limonène	0.52	0.80	3.23	2.56	2.1
cis ocimène	0.11	0.05	0.35	0.28	0.0
trans ocimène	0.08	0.06	0.38	0.12	0.0
trans -1methyl-4-[methylethyl]- cyclohex-2-ène	0.36	0.13	0.40	0.53	0.40
I-terpinéol	0.27	0.14	0.73	0.37	0.2
dill ether	-	0.35	0.40	0.09	1.1
α-terpinéol	0.55	0.92	0.56	0.40	0.19
Pipéritone	27.30	35.14	43.14	52.10	72.0
β-élemène	1.68	0.83	1.18	0.79	0.3
β-caryophyllène	0.24	4.05	0.33	0.15	0.08
Calarène	0.46	0.23	0.67	0.28	0.08
α-caryophyellène	0.22	0.21	0.24	0.13	0.02
Gérmacrène-D	0.65	0.30	0.23	0.18	0.12
B-sélinène	0.34	0.29	0.37	0.17	0.08
x-sélinène	0.45	0.29	0.54	0.18	0.11
z-muurolène	0.18	0.36	(54)	0.28	0.14
l-ethenyl-1methyl-2,4bis[methylethenyl]- Cyclohexane	0.32	5.64	0.38	0.38	0.16
-cadinène	0.47	0.30	0.26	0.18	0.09
ò-cadinène	0.91	0.89	0.70	0.57	0.30
Elemol	14.29	3.90	9.18	9.82	4.59
.6 gérmacradine-5-ol	0.72	0.04	0.07	0.07	0.15
Oxide de Caryophyllène	0.08	0.06	0.10	0.12	0.06
.2,3,4,4a,5, 6,8a-octahydro-α,α,4a,8,tetra-methyl- 2α,4aα,8aα]- 2-naphthylmethanol	0.29	1.33	0.32	0.38	0.24
0-epi-γ-eudesmol	0.12	0.10	0.14	0.26	0.10
-eudesmol	2.60	1.24	2.94	3.62	1.38
-cadinol	0.63	0.41		-	0.49
-eudesmol + β-eudesmol	7.71	2.71	5.34	6.23	2.77
lo hydrocarbonés	2.95	4.55	22.82	17.80	11.30
to oxygénés	28.48	36.68	45.23	53.50	74.60
Ionoterpènes	31.43	41.23	68.05	71.30	85.90
e hydrocarbonés	5.92	13.39	4.90	3.29	1.48
e oxygénés	26.44	9.79	18.09	20.50	9.79
esquiterpènes	32.36	23.18	22.99	23.79	11,27



Evaluation des modes d'extractions utilisés

Figure 22: Taux en composés monoterpèniques et sesquiterpèniques, selon les différents mode d'extraction utilisés dans ce travail

Globalement les deux modes d'extraction au Soxhlet fournissent des ordres inversés en taux comparativement aux autres modes d'extraction.

A travers la figure 22, nous pouvons comparer les principales classes des constituants identifiés dans les différents extraits d'huiles essentielles et que l'on peut résumer par ce qui suit :

- Pour les monoterpènes oxygénés illustré par le produit majoritaire (pipéritone) se retrouve comme indiqué précédemment en plus grand taux dans l'extrait aux micro-ondes alors que pour les sesquiterpènes oxygénés (Elemol, eudesmol, cadinol....) l'extraction au Soxhlet (avec l'hexane) fournit le taux le plus important.
- Pour les monoterpènes hydrocarbonés (Carène, terpinène, cymène...), l'extrait obtenu par entraînement à la vapeur d'eau présente le taux le plus élevé avec une valeur de 22.82 % et qui est illustrée surtout par le taux élevé du carène-2.
- Et enfin, dans la série des sesquiterpènes hydrocarbonés (élemène, caryophyllène, cadinène....), l'extraction au Soxhlet (avec l'éthanol) présente le taux le plus important (13.39 %) comparativement aux autres modes d'extraction.

IV.3. Conclusion

A travers les résultats obtenus et les interprétations décrites dans cette partie de notre travail, nous avons montré que le choix des techniques d'extraction est très important pour quelque usage que ce soit, puisque la composition de l'extrait varie d'une méthode à une autre. En conséquence, ce choix sera dicté par la classe de composés et parfois même par le composé lui-même qu'on souhaite avoir en grande quantité selon l'objectif visé par l'opérateur. A titre d'exemple, si nous souhaitons obtenir de la pipéritone à partir de la plante Cymbopogon schoenanthus, il serait préférable d'utiliser le mode d'extraction adéquat à savoir l'hydrodistillation assistée aux micro-ondes. Néanmoins, cette conclusion reste valable pour notre travail, car d'autres techniques que n'avons pas pu tester peuvent s'avérer plus performantes.

Conclusion Générale

Les produits naturels qui présentent un grand intérêt comme matière première destinée à différents secteurs d'activités, constituent un vaste champ de recherche et d'investigation dans le monde scientifique. Notre travail qui s'inscrit dans le cadre d'une valorisation de ces produits naturels de notre vaste Sahara, s'est porté sur l'étude de la plante Cymbopogon schoenanthus, appelée paille de la Mecque et provenant de la région de Illizi. L'enquête menée auprès de la population locale a révélé une diversité dans l'usage en médecine traditionnelle de cette plante.

Vu la diversité structurale des principes actifs présents dans une plante médicinale, il était nécessaire d'entreprendre des tests chimiques préliminaires qui nous ont permis d'orienter notre travail. Ces tests ont révélé une forte présence des Saponosides et des flavonoïdes mais aussi des terpènes dans les huiles essentielles. Nous avons donc choisi d'évaluer quelques méthodes d'extraction de ces HE dans un souci d'optimisation de l'exploitation de nos ressources naturelles. Parmi les procédés que nous avons étudiés, figure l'extraction assistée par micro-ondes, utilisée pour la première fois pour la plante Cymbopogon schoenanthus. Les huiles essentielles, connues pour être des mélanges très complexes, sont composées principalement de terpènes.

L'outil principal utilisé universellement pour la résolution de ces mélanges, étant La chromatographie en phase gazeuse, nous avons entrepris une étude analytique qualitative et semi-quantitative de nos extraits obtenus selon quatre protocoles expérimentaux par cette technique seule, puis couplée à la spectrométrie de masse en mode impact électronique.

L'identification des constituants a pu être effectuée sur la base des indices de rétention et complétée par l'exploitation des spectres de masse obtenus par GC-MS, et ce après confrontation de nos résultats avec les banques de données disponibles. Trente cinq (35) composés ont été ainsi identifiés, parmi lesquels on retrouve essentiellement des cétones monoterpéniques (ex : Pipéritone, comme produit majoritaire), des hydrocarbures monoterpèniques (Carène 2, Limonène, p Cymène, ...), et des alcools sesquiterpèniques (Elemol, le γ-Eudesmol, α-Eudesmol, et β-Eudesmol). Notons que le produit majoritaire est la pipéritone.

De nouveaux constituants sont détectés pour la première fois dans l'huile de Cymbopogon schoenanthus, comparativement aux résultats publiés jusqu'à ce jour. Ces composés sont : Dill éther, muuroléne, D-fenchone, α -terpinène, p-cymène, Cis-ocimène, trans-ocimène, Calarène et δ -cadinol, avec des taux appréciables.

Comparativement aux données de la littérature et pour la même espèce, nous avons constaté que les taux de la plupart des sesquiterpènes sont plus important dans nos extraits. Cette constatation est valable aussi pour le produit majoritaire, en l'occurrence la pipéritone.

Une fois les étapes intermédiaires achevées, nous avons entamé l'évaluation des protocoles expérimentaux d'obtention des HE, qui constitue l'objectif de notre travail. Il ressort de cette étude que le meilleur rendement est obtenu dans l'extraction par l'éthanol au Soxhlet avec une composition très riche en monoterpènes et sesquiterpènes. A travers les résultats obtenus et les interprétations décrites, nous avons montré que le choix des techniques d'extraction est très important pour quelque usage que ce soit, puisque la composition de l'extrait varie d'une méthode à une autre. En conséquence, ce choix sera dicté par la classe de composés et parfois même par le composé lui-même qu'on souhaite avoir en grande quantité selon l'objectif visé par l'opérateur.

Billographic Stations of the Station of the Station

- I- M. E. Lucchesi, extraction sans solvant assistée par Micro-ondes conception et Application à l'extraction des huile essentielles. Thèse de doctorat (2005), université de la Reunion (France).
- 2- 1.. R. H. Ochoa, substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combine (solvant/actifs) d'origine végétale, Thèse de doctorat (2005), université de Toulouse (France).
- 3- E. M. B. Dutra de Sousa, A. P. C. Câmara, W. A. Costa, A. Cezar, J. Costa, H. N. M. Oliveira, E. L. Galvão and M. M. O. Marques, journal of biology and technology, (2005)231-236.
- 4- G. Flamini, M. Tebano, P. L. Cioni, L. Eccarini, A. S. Ricci, L. Longo, Journal of chromatography A, 1143(2007) 36-40.
- M. El-Hattb, G. Culioli, L. Piovetti, S. E. Chitou, R. valls, Journal of chromatography A, 1143 (2007)1-7.
- 6- S. P. S. Khanuja, A. K. Shasany, A. Pawar, R. K. Lal, M. P. Darokar, A. A. Naqvi, S. Rajkumar, V. Sundaresan, N. Lal, S. Kumar, journal of Biochemical Systematics and Ecology 33 (2005)171–186.
- 7- M. Oussalah, S. Saucier, M. Lacroix, journal of Meat Science, 73 (2006) 236-244
- 8- C. Kanko, B. El-Hadj Sawaliho, S. Kone, G. Koukoua, Y. Thomas, Comptes Rendus .Chimie 7 (Côte d'Ivoire), (2004)1039–1042.
- 9- K. Maiza, R. A. Brac De La Perriere., V. Hammiche, Médicaments et aljments: l'approche ethnopharmacologique, (1993) p171.
- G. K. Ketoh, Honore K. Koumaglo, I. A. Glitho, J. Huignard, development Fitoterapia 77 (2006) 506–510.
- 11- G. K. Ketoh, H. K. Koumaglo, I. A. Glitho, Journal of Stored Products Research 41 (2005)363 –371.
- K. Koba, K. Sanda, C. Raynaud, Y. A. Nenonene, J. Millet, J. Chaumont Ann. Méd. Vét. (2004) 202-206.
- 13- E. Ttteuscher, R. Anton, A. Lobteim, plantes aromatiques edition tec et doc, Lavoisier 2005.
- 14- J. F. Cavalli, caracterisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du CARBONE-13 d'huiles essentielles de Madagascar, Thèse de doctorat (2002), université de Corse Pascal Paoli (France).
- G. Sacchetti, S. Maietti, M. Muzzoli, M. Scaglianti, S. Manfredini, M. Radice, R. Bruni, journal of Food Chemistry, 91 (2005) 621–632.
- E. E. Stashenko, B. E. Jaramillo, J. R. Martienez, Journal of Chromatography A, 1025 (2004) 105–113.
- 17- B.R.Rajeswara Rao , P.N.Kaul ,K.V.Syamasundar ,S.Ramesh journal of Industrial Crops and Products 21 (2005)121–127