



HAL
open science

Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthe de Corse et de Kumquats

Sylvain Sutour

► **To cite this version:**

Sylvain Sutour. Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthe de Corse et de Kumquats. Chimie. Université de Corse, 2010. Français. NNT: . tel-00603340

HAL Id: tel-00603340

<https://theses.hal.science/tel-00603340>

Submitted on 28 Jun 2011

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

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

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

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE CORSE

Discipline : Chimie Organique et Analytique

Présentée et soutenue publiquement

par

Sylvain SUTOUR

le 11 juin 2010

**ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE
D'HUILES ESSENTIELLES ET D'EXTRAITS
DE MENTHES DE CORSE ET DE KUMQUATS**

Directeur de thèse : Pr. Félix TOMI

Co-Directeur de thèse : Dr. Pascale Bradesi

JURY

| | | |
|-----|---------------|--|
| Mme | L. SALGUEIRO | Professeur, Université de Coimbra (Rapporteur) |
| M. | H. CASABIANCA | Ingénieur de Recherche CNRS (HDR) Solaize (Rapporteur) |
| M. | P. PAQUET | Docteur en Chimie, Corsica Essences. |
| M. | J. COSTA | Professeur, Université de Corse |
| M. | J. CASANOVA | Professeur, Université de Corse |
| M. | F. TOMI | Professeur, Université de Corse |

SOMMAIRE

| | |
|---|--------------|
| INTRODUCTION | p. 1 |
| CHAPITRE I: LES DIFFERENTES TECHNIQUES D'EXTRACTION ET D'ANALYSE DES METABOLITES SECONDAIRES | p. 7 |
| I. TECHNIQUES D'EXTRACTION DES METABOLITES SECONDAIRES | p. 8 |
| I.1 Techniques d'extraction dans le domaine de l'industrie et de la recherche | p. 9 |
| I.1.1 Techniques de l'hydrodistillation/l'entraînement à la vapeur | p. 9 |
| I.1.2 Technique de l'extraction par les solvants | p. 11 |
| I.1.3 Technique de l'extraction par les fluides supercritiques | p. 12 |
| I.2 Techniques d'extraction exclusivement utilisées dans le domaine de la recherche | p. 13 |
| I.2.1 Technique de l'hydrodistillation | p. 13 |
| I.2.2 Technique de « l'espace de tête » | p. 14 |
| I.2.3 Technique de l'extraction assistée par micro-ondes | p. 15 |
| II. IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS DANS UN MELANGE COMPLEXE | p. 19 |
| II.1 Méthodes analytiques | p. 20 |
| II.2 Analyse par des couplages « en ligne » : Voie A | p. 21 |
| II.2.1 La CPG et les indices de rétention | p. 21 |
| II.2.2 Couplage d'une technique chromatographique avec une technique spectroscopique | p. 24 |
| II.2.2.1 Les couplages CPG-SM, CPG-SM(ICP) et CPG-SM(ICN) | p. 24 |
| II.2.2.2 Les couplages CPG-IRTF et CPG-IRTF-SM | p. 25 |
| II.2.2.3 Le couplage CLHP-SM | p. 26 |
| II.2.2.4 Le couplage CLHP-RMN ¹ H | p. 27 |
| II.2.3 La CPG bidimensionnelle et le couplage CLHP-CPG-SM | p. 27 |
| II.2.4 Les couplages CPG-SM-SM et CLHP-SM-SM | p. 28 |
| II.2.5 Bilan des techniques d'analyse en ligne | p. 29 |
| II.3 Identification des constituants après purification : Voie B | p. 30 |
| II.4 Analyse par RMN du ¹³ C sans séparation préalable : Voie C | p. 32 |

| | | |
|----------|---|-------|
| II.4.1 | Intérêt de la RMN du ¹³ C | p. 32 |
| II.4.2 | Identification des constituants en mélange par RMN du ¹³ C | p. 34 |
| II.4.2.1 | Observation et individualisation des signaux | p. 35 |
| II.4.2.2 | Attribution des signaux | p. 37 |
| II.4.3 | La méthode d'analyse développée au laboratoire | p. 39 |
| II.4.3.1 | Application à l'analyse d'huiles essentielles ainsi qu'à d'autres mélanges naturels | p. 42 |
| II.4.3.2 | Caractérisation d'huiles essentielles | p. 43 |
| II.4.3.3 | Identification de stéréoisomères | p. 44 |
| II.4.3.4 | Identification de molécules thermosensibles | p. 44 |
| II.4.3.5 | Étude de la variabilité chimique | p. 45 |
| II.4.3.6 | L'Analyse structurale de nouvelles molécules | p. 45 |

CHAPITRE II CARACTERISATION CHIMIQUE DES MENTHES POUSSANT A L'ETAT SAUVAGE EN CORSE

| | | |
|--------|---|-------|
| I. | INTRODUCTION | p. 48 |
| II. | <i>MENTHA AQUATICA</i> L. | p. 50 |
| II.1 | Aspects botaniques | p. 50 |
| II.2 | Etude bibliographique | p. 50 |
| II.3 | Composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de <i>M. aquatica</i> | p. 52 |
| II.3.1 | Analyse détaillée après fractionnement de l'huile essentielle de <i>M. aquatica</i> | p. 55 |
| II.4 | Identification des lactones p-menthaniques | p. 58 |
| II.4.1 | La menthofurolactone et l'épi-menthofurolactone | p. 58 |
| II.4.2 | La mintlactone et l'isomintlactone | p. 59 |
| II.4.3 | L'hydroxymintlactone | p. 60 |
| II.5 | Etude de la variabilité chimique des huiles essentielles de <i>M. aquatica</i> L. | p. 60 |
| III. | <i>MENTHA PULEGIUM</i> L. | p. 62 |
| III.1 | Aspects botaniques | p. 62 |
| III.2 | Etude bibliographique | p. 63 |
| III.3 | Composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de <i>M. pulegium</i> | p. 64 |
| IV. | <i>MENTHA SUAVEOLENS</i> EHRH. | p. 67 |
| IV.1 | Aspects botaniques | p. 67 |

| | | |
|----------|--|--------|
| IV.2 | Etude bibliographique | p. 68 |
| IV.3 | Composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de <i>M. suaveolens</i> ssp. <i>suaveolens</i> | p. 70 |
| IV.3.1 | Profil Chromatographique 1 (PC1) | p. 70 |
| IV.3.2 | Profil Chromatographique 2 (PC2) | p. 73 |
| IV.4 | Composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de <i>M. suaveolens</i> ssp. <i>insularis</i> de Corse | p. 76 |
| IV.4.1 | Analyse directe de l'huile essentielle | p. 76 |
| IV.4.2 | Fractionnement et étude détaillée de l'huile essentielle | p. 78 |
| IV.4.2.1 | Etude des fractions hydrocarbonées F1 et F2 | p. 78 |
| IV.4.2.2 | Etude des Fractions oxygénées F3 à F13 | p. 78 |
| IV.5 | Composition chimique de l'extrait de l'hydrolat de <i>M. suaveolens</i> ssp. <i>insularis</i> | p. 81 |
| IV.5.1 | Analyse directe de l'extrait d'hydrolat | p. 81 |
| IV.5.1 | Fractionnement et étude détaillée de l'extrait d'hydrolat | p. 83 |
| IV.6 | Identification de molécules absentes de nos bibliothèques de spectres de RMN du ¹³ C et analyse structurale de composés non identifiés | p. 85 |
| IV.6.1 | Constituants p-menthaniques absents de nos banques « Terpènes » et/ou « Littérature » | p. 85 |
| IV.6.1.1 | L'isopipériténone | p. 85 |
| IV.6.1.2 | L'acétate de néoiso-isopulégyle | p. 86 |
| IV.6.1.3 | La 8-hydroxymenthone | p. 87 |
| IV.6.1.4 | La 8-hydroxy-p-menth-4-èn-3-one | p. 88 |
| IV.6.1.5 | La 8-hydroxyisomenthone | p. 88 |
| IV.6.2 | Lactones p-menthaniques absentes de notre banque « Terpènes » | p. 91 |
| IV.6.2.1 | La <i>cis-cis</i> -dihydro-p-menthénolide A et B | p. 91 |
| IV.6.2.2 | La <i>cis-cis</i> -p-menthénolide | p. 92 |
| IV.7 | Variabilité des huiles essentielles de l'espèce <i>M. suaveolens</i> Ehrh. | p. 96 |
| V | BILAN DE L'ETUDE SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES DE MENTHES POUSSANT A L'ETAT SPONTANE EN CORSE. | p. 100 |

CHAPITRE III CARACTERISATION CHIMIQUE DU GENRE *FORTUNELLA*

| | | |
|--------|---|--------|
| I. | INTRODUCTION | p. 105 |
| II. | LE GENRE <i>FORTUNELLA</i> | p. 107 |
| III. | COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE FRUITS DE <i>FORTUNELLA JAPONICA</i> (THUMB.) SWING. | p. 110 |
| IV | COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE FEUILLES DE <i>FORTUNELLA JAPONICA</i> (THUMB.) SWING | p. 113 |
| IV.1 | Analyse par CPG(Ir) et RMN du ¹³ C de l'échantillon | p. 113 |
| IV.2 | Fractionnement et étude détaillée de l'huile essentielle | p. 115 |
| IV.2.1 | Etude des Fractions hydrocarbonée F1-F6 | p. 116 |
| IV.2.1 | Etude des fractions oxygénée F7-F11 | p. 118 |
| IV.3 | Bilan de l'étude HE | p. 120 |
| V | COMPOSITION CHIMIQUE DE L'EXTRAIT D'HYDROLAT DE <i>FORTUNELLA JAPONICA</i> (THUMB.) SWING | p. 122 |
| VI | COMPOSITION CHIMIQUE DE L'EXTRAIT MICRO-ONDE DE <i>FORTUNELLA JAPONICA</i> (THUMB.) SWING | p. 125 |
| VI.1 | Analyse de l'extrait micro-ondes (EM) par CPG(Ir) et RMN du ¹³ C | p. 125 |
| VI.2 | Fractionnement et étude détaillée de l'extrait microonde | p. 126 |
| VI.2.1 | Etude de la Fraction hydrocarbonée F1 | p. 128 |
| VI.2.2 | Etude des Fractions oxygénée F2-F8 | p. 128 |
| VI.3 | Bilan de l'étude concernant l'extrait microonde | p. 129 |
| VII | ETUDE DE LA VARIABILITE CHIMIQUE DANS LE GENRE <i>FORTUNELLA</i> | p. 132 |
| VII.1 | Les huiles essentielles de fruits des cinq espèces de <i>Fortunella</i> | p. 132 |
| VII.2 | Les huiles essentielles de feuilles des cinq espèces de <i>Fortunella</i> | p. 134 |
| VII.3 | Les extraits micro-ondes de feuilles des cinq espèces de <i>Fortunella</i> | p. 137 |
| VII.4 | Conclusion | p. 139 |

| | | |
|----------|--|--------|
| VIII | IDENTIFICATION DE CONSTITUANTS ABSENTS DE NOS BANQUES ET ANALYSE STRUCTURALE DE COMPOSES NON IDENTIFIES | p. 140 |
| VIII.1 | Identification de constituants à partir de données de la littérature | p. 141 |
| VIII.1.1 | Germacrène B | p. 141 |
| VIII.1.2 | Amorphen-4-èn-10- α et β ol | p. 142 |
| VIII.1.3 | <i>trans</i> guai-6-èn-10- β ol | p. 143 |
| VIII.2 | Analyse structurale du germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol | p. 145 |
| | CONCLUSION | p. 155 |
| | PARTIE EXPERIMENTALE | p. 162 |
| | BIBLIOGRAPHIE | p. 170 |
| | ANNEXES | p. 187 |

INTRODUCTION

Les travaux qui font l'objet de ce mémoire de doctorat s'inscrivent dans le thème « Ressources naturelles » qui constitue un des sept thèmes de recherche structurants de l'université de Corse. Ils ont été réalisés au sein de l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse qui fait partie de l'UMR-CNRS 6134, SPE (Sciences Pour l'Environnement). La problématique générale de ce thème de recherche concerne la qualité, la caractérisation et la valorisation des substances naturelles végétales et plus particulièrement celles qui sont spécifiques aux milieux insulaires. Trois grands domaines d'application sont concernés :

- les plantes à parfum, aromatiques et médicinales, (PPAM)
- les produits agroalimentaires typiques (huile d'olive, agrumes, fruits, ...)
- et plus généralement, les produits issus de la biomasse végétale terrestre.

Cette approche relative à l'utilisation des ressources renouvelables contribue également à la protection de l'environnement, au maintien de la biodiversité et à l'instauration d'un mode de développement durable.

Le secteur des Plantes à Parfum Aromatiques et Médicinales (PPAM) connaît dans le monde, mais aussi en France, une nette croissance. En France, la surface dévolue à plus d'une centaine d'espèces cultivées a augmenté de près de 20% ces vingt dernières années et atteint aujourd'hui 33000 ha pour 3600 exploitations. Une centaine d'espèces est cultivée mais de nombreuses espèces spontanées sont aussi récoltées en l'absence de mise en culture. Le secteur des PPAM concerne majoritairement des marchés tels que la parfumerie, la cosmétique, l'aromathérapie et l'agroalimentaire. Malgré son dynamisme, le développement de cette filière en France est entravé par une forte concurrence au plan international et par un contexte réglementaire européen de plus en plus contraignant (REACH).

En dépit d'une taille modeste avec une dizaine de producteurs d'huiles essentielles et 4 ou 5 TPE dans le domaine de la cosmétique, le secteur PPAM en Corse, bénéficie d'une très bonne image autour d'un produit-phare (l'immortelle) et d'une ressource végétale diversifiée et spécifique. A l'exception de l'immortelle qui a fait l'objet de mises en culture sur plusieurs hectares, la production des huiles essentielles est encore très majoritairement issue de la cueillette, ce qui induit des problèmes liés à la gestion et à la préservation de la ressource végétale. Par conséquent, un des principaux enjeux pour le développement de cette filière réside d'une part, dans la diversification de l'offre, et d'autre part, dans la nécessaire mise en

culture qui présente de nombreux avantages (maîtrise de la ressource, meilleurs rendements, rentabilité, ...).

La diversification de la production d'huiles essentielles ne peut être envisagée que si la caractérisation de ces substances naturelles est réalisée et celle-ci passe par la connaissance de la composition chimique, qui constitue un facteur déterminant en vue de leur commercialisation. Ainsi, l'accès à des données complètes et fiables constitue un des objectifs prioritaires car les substances végétales se présentent, pratiquement toujours, sous forme de mélanges complexes de molécules volatiles ou non, constitués de plusieurs dizaines de composés en proportions variables et pouvant présenter des structures et des fonctions chimiques très variées. La caractérisation de ces substances naturelles nécessite la mise en œuvre de diverses techniques analytiques qui permettent non seulement d'apprécier sa valeur marchande, mais aussi de réaliser le contrôle de la qualité ou encore de mettre en évidence une éventuelle spécificité. Ces deux derniers points sont tout particulièrement importants dans le cas des produits originaires d'une région insulaire comme la Corse. En effet, étant donné l'étroitesse du marché, l'accent doit être mis sur la définition de signes de qualité et de reconnaissance qui peut constituer un atout pour une éventuelle commercialisation.

Aujourd'hui, de nombreuses techniques analytiques sont disponibles et la démarche analytique adoptée est différente, suivant qu'il s'agit d'identifier des composés connus et dont les caractéristiques spectrales sont disponibles ou lorsque l'objectif est l'élucidation d'une structure non décrite dans la littérature. D'une manière générale, la fiabilité des résultats constitue le premier critère à prendre en compte et implique souvent la mise en œuvre de plusieurs techniques complémentaires. Globalement, on distingue les deux voies analytiques suivantes.

La première voie est basée sur le couplage «en ligne» d'une technique chromatographique, qui permet d'individualiser les différents constituants, généralement la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) ou la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP), avec une technique spectroscopique, la Spectrométrie de Masse (SM) et/ou la spectrométrie Infra-Rouge par Transformée de Fourier (IRTF), permettant l'identification des constituants par comparaison des données spectrales avec celles de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres. Les données spectrales sont systématiquement associées à l'utilisation des indices de rétention, qui sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcane. Dans certains cas, plus difficiles,

comme par exemple celui des stéréoisomères qui présentent souvent des spectres de masse insuffisamment différenciés et des indices de rétention proches, il est souvent nécessaire de combiner les techniques d'analyses si l'on veut garantir un résultat exact.

En revanche, si le mélange contient soit des molécules nouvelles ou des composés dont les données spectrales n'ont été que partiellement décrites dans la littérature, une autre approche est souvent envisagée. Elle nécessite le fractionnement jusqu'à la purification des composés par les différentes techniques chromatographiques, en vue de les identifier par les méthodes spectroscopiques traditionnelles employées pour les études structurales (SM, spectroscopie infra-rouge, ultra-violet et Résonance Magnétique Nucléaire du ^1H et du ^{13}C ...). Cette démarche est sans aucun doute plus longue à mettre en œuvre mais aussi plus fiable, en partie grâce à la RMN du ^{13}C qui apporte des informations extrêmement précieuses sur le squelette carboné de la molécule.

Parallèlement, l'utilisation de la RMN du ^{13}C comme outil analytique a connu ces dernières années un essor important dans plusieurs domaines. Ainsi, à la suite des travaux de Formáček et Kubeczka (1982a/1982b), notre équipe a mis au point et développé une nouvelle méthode d'identification des constituants des mélanges complexes naturels, par RMN du ^{13}C , sans séparation préalable. Le principe de cette méthode repose sur la comparaison, assistée par un logiciel d'aide à l'identification, des raies de résonance du spectre du mélange avec celles de composés purs contenus dans une bibliothèque de spectres de référence. Elle est particulièrement intéressante car elle permet de prendre en compte des informations intrinsèques du squelette carboné des molécules (déplacement chimique des carbones). Cette technique permet l'analyse de molécules quels que soient leur squelette et leur fonctionnalisation, incluant les molécules thermosensibles et les stéréoisomères difficilement différenciables par les techniques conventionnelles. Elle a été appliquée avec succès à diverses familles de produits naturels comme les huiles essentielles, les extraits végétaux ou bien encore les huiles végétales.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse est double :

- d'un point de vue appliqué, nous nous sommes proposés d'étudier la composition chimique d'huiles essentielles de menthes poussant à l'état spontané en Corse en relation avec les producteurs du secteur Plantes à Parfum Aromatique et Médicinale installés (PPAM) dans la région. Cette étude complète, qui prend en compte plusieurs facteurs (aspects botaniques,

mode d'extraction, variabilité chimique) est indispensable dans une démarche de diversification de la gamme de produits. Nous nous sommes aussi intéressés aux hydrolats qui font l'objet depuis quelques années d'un intérêt croissant. La caractérisation de cette phase aqueuse chargée en composés hydrosolubles qui est un co-produit de l'huile essentielle s'inscrit aussi dans une démarche de production plus écologique en valorisant une phase jusqu'alors considérée comme un effluent. Enfin, nous avons poursuivi l'étude initiée au laboratoire sur les *Citrus* en nous intéressant à des variétés du genre *Fortunella* qui sont présentes dans le verger de l'INRA-GEQA de San Ghjuliano. Dans le but d'une connaissance complète des métabolites secondaires, différentes techniques d'extraction appartenant à la chimie verte ont été utilisées et comparées entre elles.

- d'un point de vue méthodologique, notre travail s'inscrit dans une démarche globale initiée depuis près de 10 ans sous le terme de « métabolomique ». La métabolomique est constituée par une série de méthodes utilisées pour étudier tous les types d'organismes vivants et doit compléter les données obtenues par la génomique, la protéomique ou la transcriptomique. Ce concept peut être défini comme l'identification et la quantification des métabolites dans un système biologique. Le double objectif identification/quantification est difficile à atteindre à cause de la complexité des matrices végétales mais surtout à cause de l'absence de méthodes standardisées car les techniques sont souvent spécifiques en fonction du domaine d'application. Ainsi la communauté scientifique s'efforce de s'accorder sur une méthode analytique universelle à la source de données fiables, reproductibles et facilement intégrables dans des banques de données. Ainsi l'utilisation de la RMN du ^{13}C et par conséquent la méthode d'identification des mélanges complexes développée au laboratoire pourrait répondre à la majorité des critères d'une méthode robuste et exempte de biais.

Dans un premier chapitre, nous procéderons à un tour d'horizon des principales techniques d'extraction dont celles utilisées pour l'analyse des huiles essentielles et nous mettrons en évidence, à travers divers exemples, leurs avantages et leurs limites. Nous présenterons également la méthode d'analyse par RMN du ^{13}C développée au laboratoire en soulignant ses potentialités comme outil d'identification et de quantification des composés de mélanges naturels et sa complémentarité avec les autres techniques.

Dans un deuxième chapitre, nous appliquerons la technique d'identification des mélanges naturels par RMN du ^{13}C à l'analyse des huiles essentielles et hydrolats de diverses menthes poussant à l'état spontané en Corse. Nous nous sommes tout particulièrement

intéressés à trois espèces : *Mentha aquatica*, *M. pulegium* et *M. suaveolens*. L'espèce *suaveolens* est représentée en Corse par deux sous-espèce, la sous-espèce *suaveolens* très répandue et la sous-espèce *insularis* endémique à la Corse et la Sardaigne. Pour cette espèce, nous avons réalisé une étude complète pour caractériser les huiles essentielles et les hydrolats (variabilité intraspécifique et interspécifique, mode de production, stades végétatifs) en utilisant aussi des outils statistiques de partition (ACP, K-means). L'identification de molécules qui présentent le squelette menthanique absentes de nos bibliothèques de spectres de RMN du ^{13}C est détaillée à la fin de ce chapitre.

Nous proposerons dans le troisième chapitre, l'identification par RMN du ^{13}C , CPG(Ir) et CPG-SM des composés des huiles essentielles de fruits et de feuilles, d'hydrolats et extraits micro-ondes de feuilles de *Fortunella japonica* plus communément nommé kumquat. Nous avons aussi étudié la variabilité interspécifique en nous intéressant à quatre autres espèces du genre *Fortunella* (*Fortunella margarita*, *F. obovata*, *F. hindsii*, et *F. crassifolia*). Les huiles essentielles de fruits et de feuilles ainsi que les extraits micro-ondes de feuilles des cinq espèces ont fait l'objet d'une étude comparative. L'identification de sesquiterpènes oxygénés qui présentent une grande variété de squelettes est détaillée à la fin du chapitre et contribue à l'enrichissement des banques de données spectrales.

CHAPITRE I

LES DIFFERENTES TECHNIQUES D'EXTRACTION ET D'ANALYSE DES METABOLITES SECONDAIRES

I. TECHNIQUES D'EXTRACTION DES METABOLITES SECONDAIRES

Les métabolites secondaires constituent un ensemble de molécules qui ne sont pas strictement nécessaires à la survie d'une plante, d'une bactérie ou d'un champignon. Il s'agit majoritairement de molécules de taille et de masse faibles comparées aux molécules du métabolisme primaire (glucides, lipides et acides aminés). Elles sont majoritairement à la source d'odeurs jouant le rôle à la fois de répulsif envers les prédateurs (concurrents écologiques) et d'attractif, de pigments permettant de capter le rayonnement solaire mais aussi de protéger la plante contre ce rayonnement. Parmi les métabolites secondaires, les huiles essentielles sont les plus étudiées et présentent une grande importance commerciale. Il s'agit de mélanges naturels généralement dominés par des composés mono- ou sesquiterpéniques, plus rarement diterpéniques, et parfois par des phénylpropanoïdes. Les huiles essentielles trouvent des emplois dans des secteurs assez divers, principalement en parfumerie, en cosmétique et font aussi l'objet d'une consommation importante de la part de l'industrie agroalimentaire où elles sont appréciées pour leurs propriétés organoleptiques.

Les méthodes d'extraction des huiles essentielles obéissent à des normes comme celle de l'AFNOR NF T 75-006 qui précise que seul l'entraînement à la vapeur, les procédés mécaniques à partir de l'épicerpe des *Citrus* et la distillation à sec peuvent produire une huile essentielle. Nous allons donc rappeler d'abord les différentes méthodes d'extraction les plus utilisées. Nous détaillerons dans une première partie les techniques utilisés dans l'industrie et en laboratoire puis dans une deuxième partie celles qui sont exclusivement destinées à un usage en laboratoire.

I.1 Techniques d'extraction dans le domaine de l'industrie et de la recherche

I.1.1 Techniques de l'hydrodistillation/l'entraînement à la vapeur

L'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation constituent les procédés d'extraction ou de séparation de certaines substances organiques les plus anciens, apportés par les Arabes au IX^{ème} siècle. Cette opération s'accomplit traditionnellement dans un alambic (Bruneton, 1993).

Le chauffage permet, dans une première étape de l'hydrodistillation et de l'entraînement à la vapeur, de former de la vapeur d'eau qui détruit la structure des cellules végétales, libère les molécules contenues et entraîne les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique. Le courant de vapeur ainsi crée permet l'entraînement d'un mélange hétérogène d'eau et de molécules organiques. Il s'agit plus précisément de la formation d'un azéotrope entre l'eau et chacun des constituants du mélange qui permet dans la majorité des cas une volatilisation de ces métabolites secondaires à une température d'ébullition inférieure à celle de chaque composé et à celle de l'eau. Nous donnons ci après l'exemple de l'azéotrope formé par le limonène et l'eau (**Figure 1**). Ainsi, des substances possédant des points d'ébullition assez élevés peuvent être extraites. La vapeur, chargée de l'essence de la matière première distillée, se condense dans le serpentin de l'alambic avant d'être récupérée dans un essencier. Les parties insolubles dans l'eau de condensation sont décantées et, en raison de sa plus faible densité, l'huile essentielle se place au dessus de la phase aqueuse. La phase aqueuse contenant les composés hydrosolubles est appelée eau de distillation (ou hydrolat).

L'entraînement à la vapeur constitue la technique la plus utilisée et la plus aisée à mettre en œuvre pour la production d'huiles essentielles et elle reste sans doute la plus rentable, l'investissement matériel étant relativement peu important par rapport à celui des autres techniques. Elle peut être utilisée au laboratoire avec un appareil de type Clevenger tout autant qu'à grande échelle (« procédé en continu », « cuve mobile »).

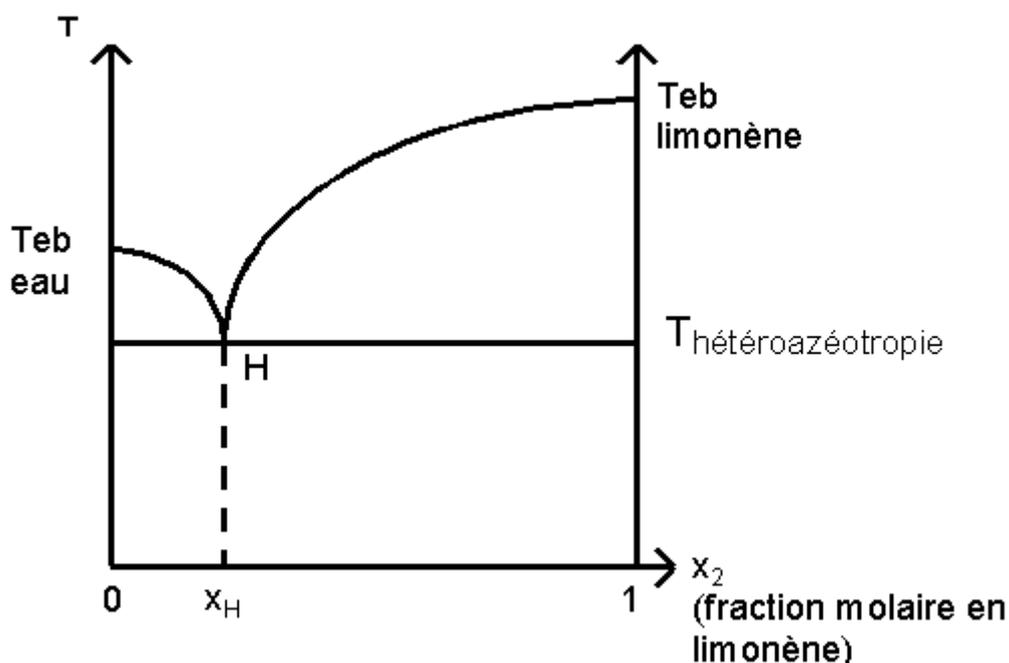


Figure 1 : Température d'ébullition de l'azéotrope eau-limonène.

L'hydrodiffusion est utilisée par certains producteurs. Le principe de l'extraction est basé sur l'action descendante d'un flux de vapeur qui traverse le végétal (utilisation de la pesanteur) ce qui permet globalement un gain de temps d'extraction, et donc une économie d'énergie par rapport à la technique précédente où le courant de vapeur est ascendant.

La définition d'une huile essentielle donnée par la pharmacopée française est aussi restrictive puisqu'elle exclut aussi bien les produits obtenus par extraction à l'aide de solvants que ceux obtenus par tout autre procédé (Bruneton, 1993). Ceux-ci occupent cependant une place considérable sur les marchés de la pharmacie, des produits d'hygiène et de l'industrie cosmétique de la parfumerie, de nombreux secteurs de l'industrie agroalimentaire, mais aussi de la recherche. Il nous semble donc utile de définir ci-dessous les techniques les plus utilisées dans ces domaines. De plus, le domaine de la recherche scientifique ne se limite plus qu'à une seule et même technique d'extraction. Ainsi, la complémentarité des différentes méthodes d'extraction est souvent mise en œuvre soit dans un but de connaissance complète d'un végétal terrestre ou marin, soit pour étudier une famille de constituants spécifiques.

I.1.2 Technique de l'extraction par les solvants

Les métabolites secondaires des végétaux peuvent également être obtenus par l'extraction liquide-liquide avec des solvants organiques (éthanol, pentane, hexane, acétate d'éthyle, dichlorométhane, oxyde de diéthyle, etc...). Il faut noter que l'emploi de solvants chlorés est en très forte régression au profit souvent de l'acétate d'éthyle qui présente des propriétés d'extraction assez voisines. La mise en œuvre de cette technique est indispensable lorsque les composés ne sont pas extractibles par entraînement à la vapeur en raison de leur faible volatilité ou que le rendement de celui-ci est trop faible. L'extraction permet non-seulement la récupération des composés présents dans l'huile essentielle mais également celle de composés « lourds » qui présentent un intérêt spécifique en fonction de leur structure moléculaire (flavonoïdes, triterpènes etc.). L'industrie cosmétique et agro-alimentaire différencie les extraits selon le type de solvant utilisée, le type de matière première, etc... (Bruneton, 1993).

- **Concrète** : produits obtenus à partir d'une matière première fraîche d'origine végétale, par extraction au moyen d'un solvant non aqueux. Dans la pratique courante, le vocabulaire utilise les termes d'essence concrète ou, plus simplement encore d'essence.

- **Résinoïde** : obtenu à partir d'une matière première sèche d'origine naturelle, par extraction à l'aide d'un solvant non-aqueux. Il faut noter que le terme de matière première d'origine naturelle est ici pris dans le sens : « ...d'origine végétale, animale ou microbiologique, y compris les produits dérivés de ces matières premières obtenus par une voie enzymatique » selon la norme AFNOR.

- **Pommade florale** : corps gras parfumé obtenu à partir de fleurs soit par « enfleurage à froid » où des constituants odorants des fleurs diffusent dans le corps gras, soit par « enfleurage à chaud » où il y a immersion des fleurs dans le corps gras fondu.

- **Absolue** : obtenu à partir d'une concrète, d'une pommade florale ou d'un résinoïde par extraction à l'éthanol à température ambiante. La solution éthanolique obtenue est généralement refroidie et filtrée dans le but de supprimer les cires ; l'éthanol est ensuite éliminé par distillation.

I.1.3 Technique d'extraction par les fluides supercritiques

L'extraction par les fluides supercritiques s'est considérablement développée ces dernières années et a fait l'objet de très nombreuses publications scientifiques. Reverchon et De Marco (2006) ont publié une revue sur l'utilisation de cette technique pour l'extraction et le fractionnement des matières naturelles végétales. Le principal avantage de cette technique réside dans la possibilité de travailler à basse température. Cette méthode d'extraction s'est rapidement imposée pour la récupération des composés thermosensibles à haute valeur ajoutée. Il s'agit par exemple de l'extraction des gingérols à partir des rhizomes du gingembre, de la caféine de *Theobroma cacao* et *Paullinia cupana* (Guaranà), de l'hyperforin (antidépresseur) de *Hypericum perforatum*.

Les fluides supercritiques ont des propriétés différentes de celles d'un gaz ou d'un liquide, comprises entre les deux. Ils ont ainsi une viscosité proche de celle d'un gaz, une densité proche de celle du liquide avec un pouvoir de diffusivité très élevé par rapport au fluide liquide, ce qui facilite leur pénétration dans des milieux poreux.

Le point critique est atteint lorsque le changement d'état liquide-gaz n'est plus observé. Le fluide est alors dans un état supercritique intermédiaire entre l'état liquide et l'état gazeux. Les conditions d'obtention du CO₂ supercritique sont assez faciles à atteindre (303°K, 73,8 bar) alors que pour l'eau puisqu'il faut atteindre une température de 374,2°C et surtout une pression de 218 bar (**Tableau 1**). Pour ces raisons, l'utilisation du CO₂ comme fluide supercritique s'est imposée. La température opératoire permet ainsi d'extraire des constituants sans les dénaturer et en conservant les qualités biologiques et/ou organoleptiques. De plus, l'extrait sera exempt de tout solvant à pression et température ambiante. Le CO₂ présente aussi les avantages d'être inerte, inodore, non-toxique, non inflammable.

Certains extraits obtenus par extraction au CO₂ supercritique présentent un arôme plus intense que ceux obtenus par hydrodistillation. Cependant, les conditions expérimentales (pression, température) doivent être parfaitement maîtrisées pour une extraction optimale ou pour extraire sélectivement certains composés. Cette technique nécessite un investissement important et ne concerne pour l'instant que des produits spécifiques à très haute valeur ajoutée.

| Solvant | Masse moléculaire ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) | Température critique ($^{\circ}\text{C}$) | Pression critique (bar) |
|--------------------------------------|---|--|----------------------------|
| Dioxyde de carbone (CO_2) | 44,10 | 31,1 | 73,80 |
| Eau (H_2O) | 18,02 | 374,2 | 218,00 |
| Méthane (CH_4) | 16,04 | -82,7 | 45,96 |
| Ethane (C_2H_6) | 30,07 | 32,2 | 48,80 |
| Propane (C_3H_8) | 44,10 | 96,6 | 42,50 |
| Ethylène (C_2H_4) | 28,05 | 9,5 | 50,76 |
| Propylène (C_3H_6) | 42,08 | 91,0 | 46,10 |

Tableau 1 : Température critique, pression critique et masse moléculaire de solvants.

I.2 Techniques d'extraction utilisées exclusivement dans le domaine de la recherche

I.2.1 Technique de l'hydrodistillation

L'hydrodistillation est la technique de référence dans l'étude des composés volatils d'une plante dans le domaine de la recherche. Le phénomène physique est identique à celui décrit précédemment. Cependant une verrerie adaptée a été mis en place permettant à la fois la circulation en circuit quasi-fermé de l'eau sous forme aqueuse et gazeuse et la cohobation de l'huile essentielle. Ces phénomènes ont été rendus possibles à l'échelle du laboratoire grâce à l'utilisation d'un appareillage de type Clévenger.

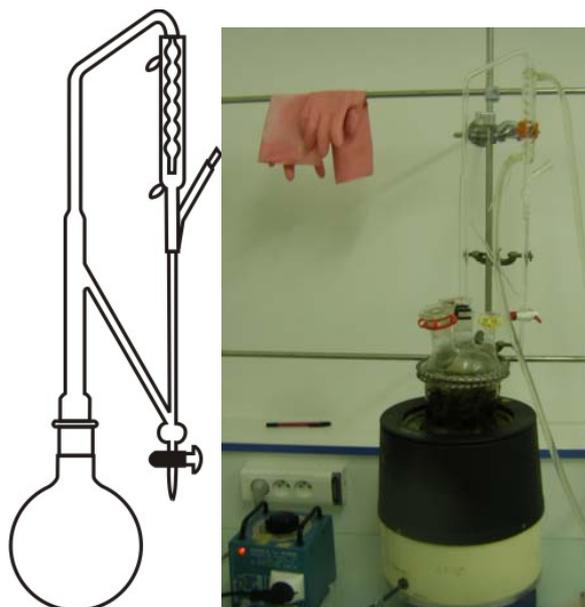


Figure 2 : montage d'hydrodistillation

I.2.2 Technique de « l'espace de tête »

Cette technique d'extraction est surtout un procédé d'analyse des constituants très volatiles. Le végétal, enfermé dans un pilulier étanche, est placé dans une étuve thermostatée chauffée à une température prédéterminée. Un équilibre thermodynamique entre l'échantillon solide et la couche de vapeur s'établit dans le pilulier. La phase gazeuse est ensuite transférée dans une colonne CPG pour que les constituants soient individualisés. Cette technique permet d'étudier uniquement les composés volatils tandis que les substances non volatiles restent dans le pilulier. Bien que cette technique soit rapide et facile à mettre en œuvre, l'extraction des composés n'est pas toujours totale ou reproductible. Diverse variantes de cette technique ont été mises en place depuis près de 25 ans consistant en des modifications du type des fibres. Celles-ci sont majoritairement constituées de polymères: un liquide [polydimethylsiloxane (PDMS)] pour les constituants les moins polaires et deux solides [divinylbenzene (DVB) et carboxene (CAR)] pour les plus polaires, permettant une plus grande capacité d'extraction.

I.2.3 Technique de l'extraction assistée par micro-ondes

En 1986, Ganzler *et al.*, furent les premiers à présenter une technique d'extraction par solvant assistée par micro-ondes en vue d'une analyse chromatographique. Cette technique permettait de réduire les temps d'extraction et donc les dépenses en énergie par rapport à une méthode conventionnelle. En 1990, Paré *et al.*, ont déposé un premier brevet européen, sur « l'extraction de produits naturels assistée par micro-ondes ». Ils proposaient d'irradier le matériel végétal en présence d'un solvant transparent aux micro-ondes de type hexane. Ainsi les micro-ondes atteindraient directement les systèmes glandulaires et vasculaires du végétal.

Depuis différentes techniques d'extraction par micro-ondes ont été développées et de nombreux brevets ont été déposés :

- le procédé d' « hydrodistillation par microondes » est basé entièrement sur le principe de l'hydrodistillation classique. 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.

- extraction par solvant assistée par micro-ondes. MAE (Microwave Assisted Extraction) et MAP™ (Microwave Assisted Process). Cette méthode est la plus utilisée. Si sa rapidité de mise en œuvre en fait une technique de choix pour l'extraction et plus particulièrement pour l'extraction de composés aromatiques d'origine végétale, le produit obtenu ne peut réglementairement être considéré comme une huile essentielle. De plus l'utilisation de solvant organique présente certains inconvénients : contamination du produit fini, problème pour son élimination totale. Rappelons que l'industrie agro-alimentaire applique des lois très strictes sur l'origine des produits utilisés.

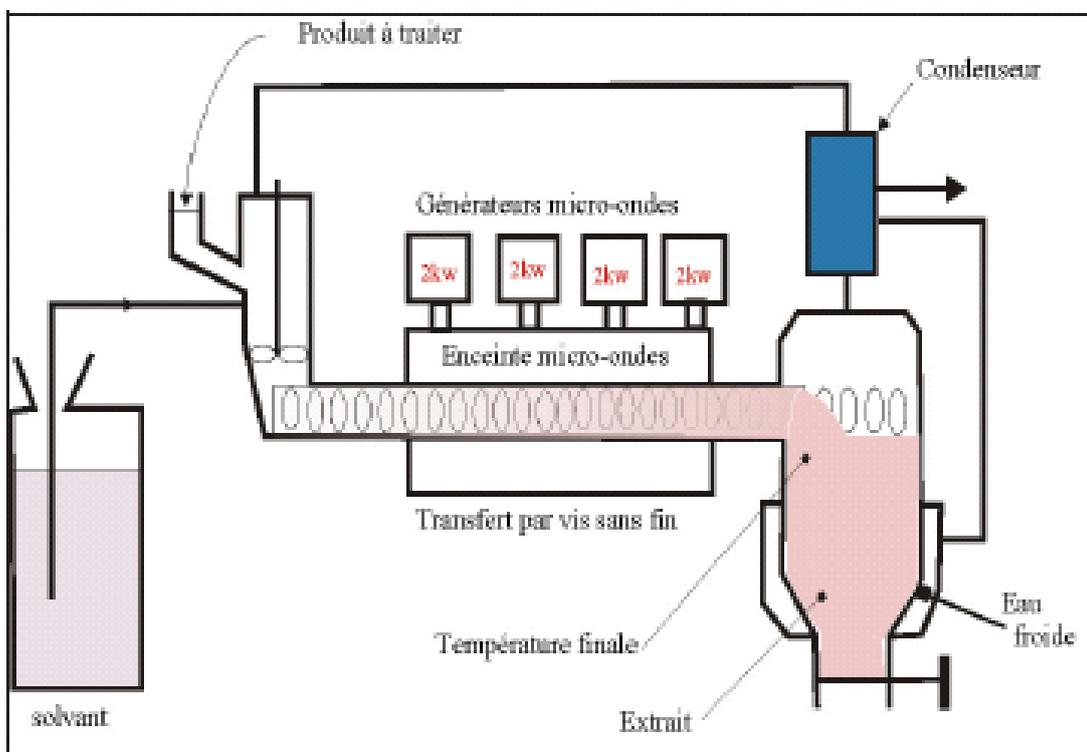


Figure 3: Schéma d'extraction par solvant assistée par micro-ondes. MAE (Microwave Assisted Extraction) et MAP™ (Microwave Assisted Process) selon la thèse de M. Lucchesi.

- le « VMHD » (Vaccum Microwave HydroDistillation) ou hydrodistillation assistée par micro-ondes sous vide pulsé. Cette technique d'extraction, dont l'origine est l'hydrodistillation classique, est basée sur l'utilisation conjointe des micro-ondes et d'un vide pulsé. D'après les concepteurs du VMHD l'extraction serait dix fois plus rapide que l'hydrodistillation pour un rendement équivalent et un extrait de composition identique. Les composés responsables des notes « crues » les plus thermosensibles semblent être conservées après une extraction par VMHD contrairement à une hydrodistillation classique.

- SFME (Solvent Free Extraction Microwave) est le mode d'extraction le plus récent et a été, en particulier, développée par le groupe Chemat-Smadja à l'Université de la Réunion. Cette technique a été rebaptisée « Dry-Dist » et est commercialisée à travers le monde par la société Milestone (Bergame-Italie). Elle associe un four micro-ondes et une distillation sèche. L'extraction est réalisée à la pression atmosphérique, en l'absence de solvant et d'eau ajoutée. Les principaux avantages de cette technique résident dans l'augmentation de la cinétique d'extraction ainsi que son caractère plus respectueux de l'environnement (absence de solvant) qui constitue un des exemples de chimie verte.

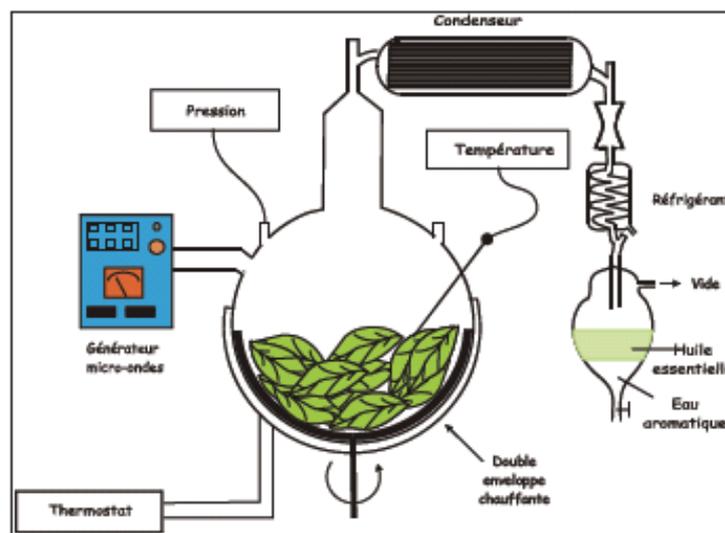


Figure 4: schéma du montage d'extraction selon le principe « VMHD » (Vaccum Microwave HydroDistillation) selon la thèse de M. Lucchesi.

Le mécanisme de chauffage par micro-ondes repose sur le fait que certaines molécules telles que l'eau présentent des excès et des défauts de charges dus à la différence d'électronégativité entre les atomes d'oxygène et d'hydrogène. Ces molécules polaires présentent alors un moment dipolaire ou dipôle. Les dipôles sont susceptibles de s'orienter lorsqu'ils sont soumis à un champ électrique et génèrent alors un moment dipolaire induit. Sous l'effet d'un champ électrique alternatif, les dipôles s'orientent dans la direction du champ, puis se désorientent à la disparition du champ et enfin se réorientent dans l'autre sens. Il s'agit de la rotation dipolaire.

Cependant, l'alignement des dipôles par rapport au champ électrique est contrarié par l'existence de liaisons hydrogène et de liaisons de Van der Waals qui freinent la libre rotation

et conduisent à un dégagement de chaleur. L'énergie cinétique est alors transformée partiellement en chaleur. Le chauffage de l'eau présente dans la plante provoque l'éclatement des glandes contenant l'huile essentielle. L'huile essentielle ainsi libérée est entraînée par la vapeur d'eau contenue elle aussi dans la matière végétale. Un essencier de type Clévenger permet de condenser le distillat et de récupérer l'huile essentielle par simple décantation en tenant compte la différence de densité.

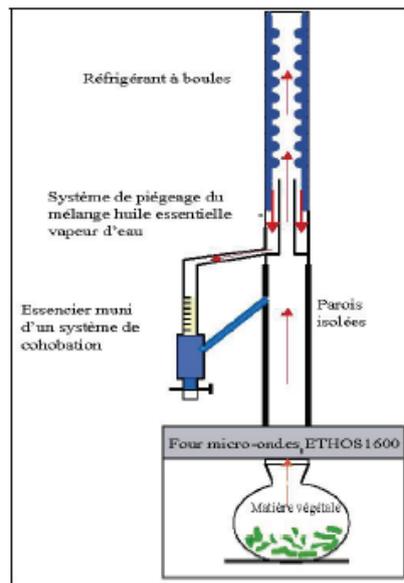


Figure 5 : schéma d'extraction selon le principe SFME (Solvant Free Extraction Microwave) selon la thèse de M. Lucchesi.

Malgré l'utilisation d'un essencier de type Clévenger pour condenser et refroidir les vapeurs issues du chauffage du végétal par les micro-ondes, l'échantillon obtenu par SFME ne peut en toute rigueur être considéré comme une huile essentielle. En effet, le terme « huile essentielle » nécessite l'utilisation du principe de l'hydrodistillation, de l'entraînement à la vapeur ou de l'expression à froid. Les deux modes d'extraction, bien que voisins, diffèrent cependant par la nature du chauffage. Or les phénomènes de solubilité des composés organiques dans l'eau sont particulièrement importants dans une hydrodistillation ou encore dans un entraînement à la vapeur.

Dans la très grande majorité des cas, les rendements de l'extraction par micro-ondes sont proches voire supérieurs à ceux obtenus par hydrodistillation, le temps d'extraction est plus court, de l'ordre de 30 minutes alors qu'une hydrodistillation nécessite classiquement trois heures au minimum. A rendement équivalent, il est constaté une augmentation de la

proportion des composés oxygénés dans les extraits obtenues par SFME (Fehrat *et al.*, 2006 ; Lucchesi *et al.*, 2007). Plusieurs explications sont avancées pour expliquer ces différences :

- l'observation des végétaux par Microscopie Electronique à Balayage montre des différences en termes d'altération des glandes à huile essentielle. Celles-ci semblent totalement détruites sous l'effet des micro-ondes ;

- les composés oxygénés plus polaires et plus solubles dans l'eau seraient distillés en priorité par rapport aux hydrocarbures terpéniques dont la température d'ébullition est pourtant plus faible.

- Dans une huile essentielle obtenue par hydrodistillation, les composés oxygénés ont une plus grande affinité que les hydrocarbures pour la phase aqueuse et se retrouve donc l'hydrolat. Lors d'une extraction micro-onde, il est ainsi possible qu'étant donné le faible volume de la phase aqueuse, les composés oxygénés qui sont souvent assez solubles dans l'eau, demeurent dans l'extrait obtenu par SFME.

II. IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS DANS UN MELANGE COMPLEXE

Les produits naturels d'origine végétale - extraits, huiles essentielles, résines - sont de nos jours très recherchés. Ils se présentent pratiquement toujours sous forme d'un mélange complexe constitué de plusieurs dizaines – voire d'une centaine et plus – de composés en proportions variables. 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. De plus, dans le domaine industriel, les molécules qui peuvent en être isolées, dans la plupart des cas optiquement actives, constituent des substrats intéressants pour l'hémi-synthèse de produits pharmaceutiques, de vitamines, de substances odorantes, etc (Bruneton, 1993).

Les mélanges naturels peuvent être schématiquement repartis en deux groupes : les volatils et les non volatils. Les molécules volatiles présentes dans les mélanges naturels proviennent du métabolisme secondaire et elles sont très souvent formées à partir d'entités isopréniques et constituent la famille des terpènes (ou terpénoïdes) tels les monoterpènes et les sesquiterpènes, et plus rarement les diterpènes. On trouve également dans ces mélanges de volatils des phénylpropanoïdes obtenus par biosynthèse à partir de l'acide shikimique (Bruneton, 1993) et des composés linéaires non terpéniques. Les composés non volatils du métabolisme secondaire appartiennent à diverses familles. Nous distinguerons, à titre d'exemple, les terpènes et stéroïdes (diterpènes, triterpènes, phytostérols), les dérivés phénoliques (flavonoïdes, tanins,...), les alcaloïdes, les coumarines, etc. (Teisseire, 1991).

La valorisation ou la commercialisation de ces mélanges naturels, quelle que soit leur application, est en général précédée d'une étape de caractérisation. Celle-ci peut être considérée comme une application de la métabolomique (Verpoorte *et al.*, 2010). La métabolomique est devenue une technique très répandue permettant l'étude de tous les types d'organismes vivants et doit compléter les données obtenues par la génomique, la protéomique ou la transcriptomique. Ainsi le métabolome est une manifestation biochimique du génome ; et plus précisément une caractérisation de la partie fonctionnelle du génome. Ce concept introduit, voici une dizaine d'années dans l'analyse phytochimique, a été défini par Schripsema (2010) comme l'identification et la quantification de tous les métabolites dans un système biologique. Ainsi il s'agit de mesurer les réponses du métabolisme d'un système vivant en réponse à un stimulus ou à une modification génétique. Le double objectif

identification/quantification est difficile à atteindre à cause de la complexité des matrices végétales mais surtout à cause de l'absence de méthodes standardisées car les techniques sont souvent spécifiques en fonction du domaine d'application. A titre d'exemple et ce malgré près d'un demi-siècle d'études des huiles essentielles par CPG, il n'existe aucune banque de données publique où chacun puisse déposer ses résultats. Ainsi, même l'identification d'un composé, déjà connu, peut s'avérer délicate en l'absence de comparaison aisée avec des données antérieures (Verpoorte *et al.*, 2010).

II.1 Méthodes analytiques

Le double objectif identification/quantification consiste à déterminer la composition chimique de chaque huile essentielle et extraits par différentes méthodes analytiques spectroscopique et/ou chromatographiques. De manière conventionnelle, l'étude de la composition chimique d'un mélange naturel complexe peut être réalisée selon différentes voies (**Figure 6**):

- La voie A est particulièrement bien adaptée aux analyses de routine (par exemple, contrôle de la qualité) d'échantillons d'huiles essentielles ou d'extraits végétaux dont les constituants ont déjà été décrits dans la littérature. Elle fait intervenir le couplage « en ligne » d'une technique chromatographique (CPG, CLHP), qui permet l'individualisation et la quantification des constituants, avec une technique spectroscopique (SM, IRTF, ...), qui permet leur identification par combinaison de leurs données spectrales avec celles de produits connus.
- La voie B, en deux étapes, s'impose lorsque les constituants d'un mélange présentent des difficultés d'identification (structures complexes et/ou très proches). Ainsi, le travail d'analyse comporte une étape préalable de purification de tous les composés par différentes techniques chromatographiques suivie d'une étude spectroscopique, incluant la RMN du ^1H et du ^{13}C , en vue de leur identification.
- Enfin, l'analyse peut également être menée selon la voie C (**Figure 6**), plus récente, qui met en œuvre la Résonance Magnétique Nucléaire du ^{13}C (RMN) pour l'identification des composés en mélange sans séparation préalable ou précédée d'une étape de fractionnement réduite au minimum. Cette technique peut également être employée pour la quantification des constituants lorsque celle-ci ne peut être réalisée par les méthodes usuelles.

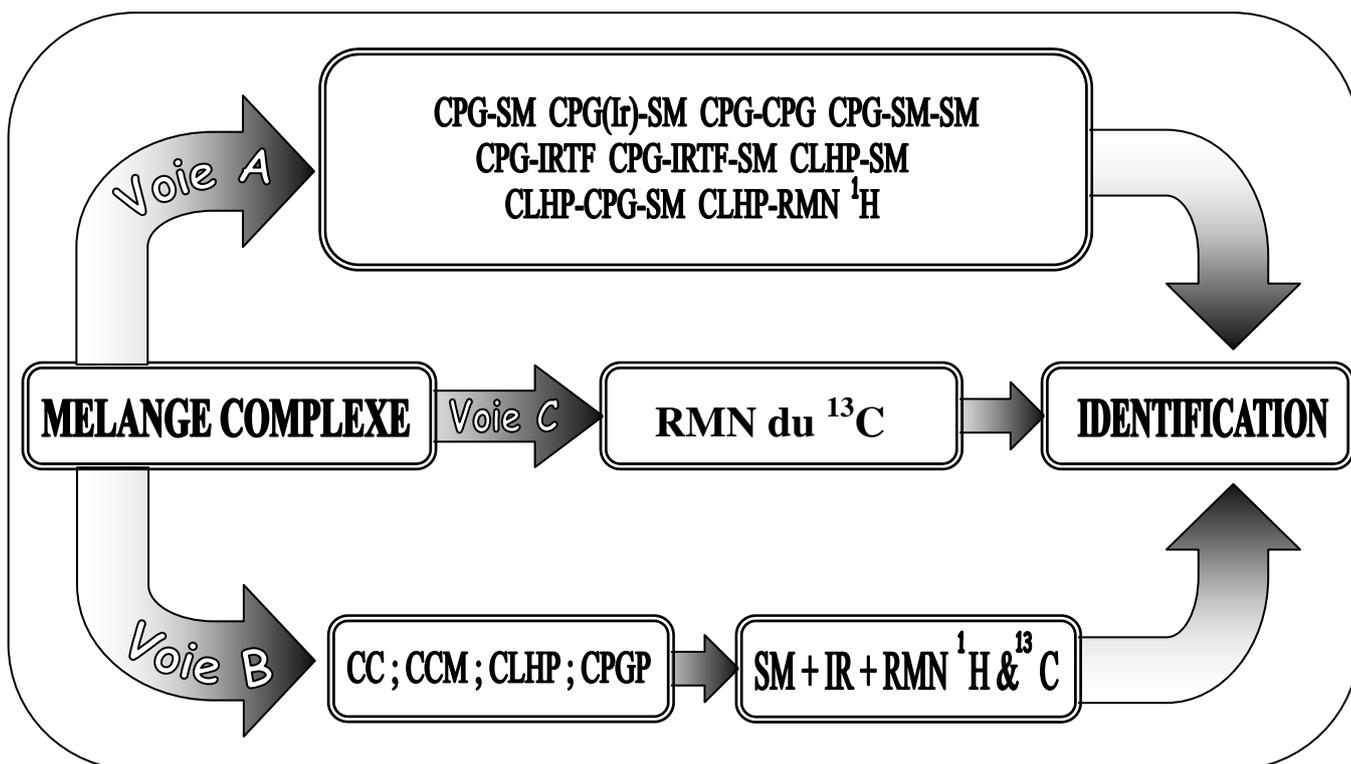


Figure 6 : les méthodes d'analyses d'un mélange complexe.

II.2 Analyse par des couplages « en ligne » : Voie A

Nous allons décrire dans un premier temps les différents couplages utilisés dans des domaines très divers entre une technique chromatographique et une technique spectroscopique. Cette partie traitera dans un premier temps des différents couplages avec une technique de chromatographie en phase gazeuse et dans un deuxième temps avec une technique de chromatographie en phase liquide.

II.2.1 La CPG et les indices de rétention

On attribue la découverte de la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) à Archer John Porter MARTIN et Richard Laurence Millington SYNGE, qui publient dès 1941 la théorie de la chromatographie de partage. Ils reçoivent en 1950 le prix Nobel de chimie pour cette découverte qui bouleversera le monde de l'analyse. Depuis 1955, avec la mise sur le marché du premier appareil de chromatographie en phase gazeuse (CPG), grâce aux progrès de l'instrumentation (colonne capillaire, détecteurs, ...) et à sa relative facilité d'emploi cette technique de séparation est l'une des plus utiles et des plus répandues dans les laboratoires de chimie analytique. De nos jours, elle doit sa performance aux conditions optimales liées à

l'utilisation des phases stationnaires de mieux en mieux adaptées à l'analyse spécifique des mélanges complexes (Arpino *et al.*, 1995).

La CPG est une méthode de séparation mais aussi d'analyse. En effet, les temps de rétention peuvent donner une information sur la nature des molécules et les aires des pics fournissent une quantification relative. Depuis peu de temps, la quantification relative par CPG est remise en cause. En effet, l'utilisation des détecteurs les plus répandus à ionisation de flamme (DIF) et/ou de spectrométrie de masse (DSM), ne donnent pas un facteur de réponse unique. Pour certaines familles de composés chimiques, il peut y avoir une erreur relative pouvant atteindre 60% (Bicchi *et al.*, 2008). En effet, le squelette et surtout la composition élémentaire des constituants organiques influent sur le facteur de réponse. Ainsi des méthodes de quantification réelle avec étalons interne et externe qui sont quasiment les seuls utilisés aujourd'hui et développées pour répondre aux exigences de la pharmacie, la cosmétique, l'agro-alimentaire et surtout le domaine de la recherche scientifique (Bicchi *et al.*, 2008).

L'identification d'une substance peut être facilitée par la connaissance de son temps de rétention qui est une valeur caractéristique pour une phase stationnaire donnée. En effet, les temps de rétention de chaque composé dépendent des conditions expérimentales (nature et épaisseur de la phase stationnaire, programmation de la température, état de la colonne, etc).

Une meilleure information peut être obtenue grâce à l'utilisation des indices de rétention, mesurés sur les colonnes apolaire et polaire, qui sont plus fiables que les temps de rétention. Ils sont calculés à partir d'une gamme étalon d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires. Le calcul peut se faire pour une expérimentation à température constante par interpolation logarithmique: indices de Kováts (IK) (1965), ou en programmation de température par interpolation linéaire indices de rétention ou indices de Van Den Dool et Kratz (Ir) (1963). Bien que dans la grande majorité des cas, chaque molécule possède des indices de rétention sur colonne apolaire et polaire qui lui sont propres, deux molécules peuvent fortuitement co-éluer et présenter des indices de rétention identiques. Par ailleurs, on observe fréquemment pour un même composé des écarts d'indice de rétention pouvant atteindre 10 et même 20 unités, entre les données de la littérature et celles du laboratoire surtout sur colonne polaire et ce pour les molécules les plus polaires qui sont éluées en dernier (Grundschober, 1991). De meilleurs résultats sont obtenus quand les produits de référence et les mélanges naturels à analyser, sont traités rigoureusement dans les mêmes conditions

expérimentales, c'est-à-dire lorsque les indices des composés de référence sont mesurés au laboratoire.

La CPG est préférentiellement utilisée dans le cas des molécules volatiles comme celles qui sont présentes dans les huiles essentielles (mono et sesquiterpènes, certains diterpènes hydrocarbonés, phénylpropanoïdes, molécules linéaires,...). Elle peut être utilisée avec des molécules plus lourdes (stéroïdes, triterpènes,...) en utilisant une température isotherme élevée (CPG haute température CPGHT). Ces molécules lourdes peuvent également être rendues volatiles à des températures ne provoquant pas leur décomposition par des réactions de dérivation (acétylation, silylation) (Bielicka-Daszkiwicz *et al.*, 2004; Rojas-Escudero *et al.*, 2004). Encore faut-il s'assurer que la réaction de dérivation est complète pour toutes les molécules et qu'il ne se produit pas d'artéfacts (énolisation d'une cétone suivie de silylation de l'énol par exemple).

Bien que la CPG reste l'une des techniques d'analyse les plus utilisées, car les temps de rétention donnent une information sur la nature des molécules et les aires des pics fournissent une quantification relative, l'identification des constituants d'une huile essentielle est difficilement réalisable uniquement par CPG. En effet, le temps de rétention, propre à chaque composé qui dépend des conditions opératoires (nature de la phase stationnaire, programmation de la température, vieillissement de la colonne, etc.), ne représente pas une base suffisante pour une identification.

Ainsi, Joulain (1994) relate que 230 sesquiterpènes de même masse moléculaire se répartissaient sur une plage de seulement 300 unités d'indices. Enfin, si on tient compte des cas de coélutions qui sont presque systématiquement observés avec certains composés (par exemple le limonène qui coélue avec le 1,8-cinéole sur colonne apolaire, ou le β -eudesmol qui est superposé à l' α -cadinol sur colonne apolaire (BP-1) et sur la colonne polaire (BP-20), on admet aisément que les indices de rétention ne constituent pas une base suffisante pour l'identification des constituants d'une huile essentielle. Même l'utilisation des indices de rétention sur deux colonnes de polarité différentes ne permet pas l'identification des constituants. Sauf dans le cas de compositions chimiques déjà préétablie et d'analyses répétitives (contrôle de qualité d'huile essentielle commerciales).

Ainsi dans le but de rendre fiable l'identification des constituants des huiles essentielles, divers couplages de la CPG avec des techniques spectroscopiques ont été développés.

II.2.2 Couplage d'une technique chromatographique avec une technique spectroscopique

II.2.2.1 Les couplages CPG-SM, CPG-SM(ICP) et CPG-SM(ICN)

D'un point de vue analytique, d'important progrès ont été réalisés en couplant la CPG avec un spectromètre de masse (SM). En effet, le couplage CPG-SM en mode impact électronique (IE), dit CPG-SM(IE), est la technique utilisée en routine pour l'analyse dans le domaine des huiles essentielles. Le principe de la spectrométrie de masse consiste à bombarder à l'aide d'électrons une molécule qui sera fragmentée ; les différents fragments obtenus, chargés positivement constituent le spectre de masse de la molécule. Cette technique permet d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux contenus dans des bibliothèques de spectres informatisées ou sous format papier construites au laboratoire ou commerciales (Sandra et Bicchi, 1987; Mc Lafferty et Stauffer, 1994; Adams, 1989 et 2001 ; Jennings et Shibamoto, 1980 ; Masada, 1976 ; Joulain et König, 1998).

Cependant, il faut utiliser les bibliothèques commerciales avec précaution, car bien que très utiles, elles ne sont pas les plus performantes. En effet, compte tenu de la diversité et du nombre très important de composés qu'elles contiennent, il est très rare qu'une interrogation n'obtienne pas de réponse ; même si cette proposition d'identification est attachée à une note de concordance très moyenne. C'est pourquoi, les bibliothèques élaborées avec des spectres de masse enregistrés avec des conditions expérimentales rigoureusement identiques, demeurent les plus performantes et permettent des identifications plus fiables. Ceci est particulièrement vrai pour l'analyse des huiles essentielles comprenant un grand nombre de sesquiterpènes, qui, construits à partir d'un même synthon isoprénique, présentent des spectres de masse souvent identiques ou insuffisamment différenciés.

En fait, dans la pratique, l'utilisation conjointe de la spectrométrie de masse (utilisation conjointe de banques laboratoire et littérature) et des indices de rétention calculés sur deux colonnes de polarité différente en CPG, permet, en général l'identification d'un grand nombre de constituants dans les mélanges complexes tels que les huiles essentielles (Lianga *et al.*, 2004; Maia *et al.*, 2004; Chericoni *et al.*, 2004; Bilia *et al.*, 2002; Senatore *et al.*, 2004; Adio

et al., 2004). Ainsi, Vernin *et al.*, (1988), d'une part Cavaleiro (2001) d'autre part ont développé un logiciel leur permettant de combiner les résultats de la spectrométrie de masse avec les valeurs des indices de rétention sur colonne apolaire et polaire.

Dans le cas des huiles essentielles riches en sesquiterpènes et diterpènes, des problèmes d'identification peuvent subsister même si on utilise la SM-IE associée aux indices de rétention mesurés sur deux colonnes de polarité différente. Des informations complémentaires peuvent être obtenues avec des techniques « d'ionisation douce » telles que l'ionisation chimique positive (ICP) ou l'ionisation chimique négative (ICN) (Schultze *et al.*, 1992; Lange et Schultze, 1988). L'ICP et ICN produisent des ions quasi moléculaires correspondant à des ions qui ne sont pas visibles en mode impact électronique. Ainsi, la SM-ICP a permis de différencier les quatre stéréoisomères de l'isopulégol grâce à leur spectre de masse obtenu en utilisant l'isobutane comme gaz réactif (Lange et Schultze 1988). La SM(IC) permet également de différencier les alcools et leurs esters par l'observation de leurs pics moléculaires. Plus précisément, il s'agit des ions quasi moléculaires $[M+H^+]$ et $[M+H^-]$. L'observation de ces pics permet d'obtenir la masse molaire de ces composés et donc de savoir s'il s'agit de l'alcool ou d'un ester. C'est le cas par exemple, du (E)-nérolidol et de l'acétate de nérolidyle lorsque l'ammoniac est utilisé comme gaz réactif (Schultze *et al.*, 1992). Plus récemment, la connaissance de ces ions $[M+H^+]$, $[M+H^-]$ et des adduits $[M+CH_4]^+$, $[M+NH_4]$, a permis l'identification des esters de thymyle, de néryle, de bornyle et de lavandulyle dans l'huile essentielle d'*Eupatorium cannabinum*, l'ammoniac ou le méthane étant employés comme gaz réactifs (Paolini *et al.*, 2005). Toutefois cette technique a montré ses limites pour l'identification de molécule ayant des structures voisines. Ainsi, le géraniol et le nérol qui ne diffèrent que par la stéréochimie d'une des doubles liaisons, possèdent des spectres de masse ICN identiques. (Bruins, 1979) De plus, la difficulté d'obtenir des spectres en SM(ICN) ou la SM(ICP), reproductibles d'un laboratoire à l'autre ont fait que cette technique doit surtout être considérée comme une technique complémentaire de la SM(IE) pour l'identification des constituants des huiles essentielles (Zupanc *et al.*, 1992).

II.2.2.2 Les couplages CPG-IRTF et CPG-IRTF-SM

La spectroscopie infrarouge renseigne en général sur les fonctions chimiques présentes dans les molécules et permet également de différencier les isomères, par l'examen de la partie du spectre dite « des empreintes digitales » ou « fingerprint ». L'avènement de la spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IRTF) autorisant une grande vitesse

d'acquisition a permis de réaliser le couplage CPG-IRTF. Les limites de détection de l'IRTF ont considérablement été améliorées grâce au développement d'interfaces performantes (Sasaki et Wilkins, 1999). Le spectre obtenu peut être comparé à ceux contenus dans une bibliothèque informatisée de spectres Infra-Rouge. Le couplage CPG-IRTF peut s'appliquer à l'analyse de diverses familles de composés : les produits pétroliers et leurs additifs, les arômes, les essences naturelles, les produits de synthèse (Iob *et al.*, 1998; Thomaidis et Georgiou, 1999). Son efficacité a été démontrée notamment pour l'étude de molécules présentant des spectres de masse superposables tels que les stéréoisomères du farnésol et du menthol (Coleman *et al.*, 1989). Par ailleurs, Joulain et Laurent (1989) ont pu différencier, sur la base de leurs spectres IR et leurs indices de rétention sur colonne polaire et apolaire, le 1-endo-bourbonanol et le 1,6-germacradièn-5-ol, deux alcools sesquiterpéniques qui présentent des spectres de masse identiques. L'appareil de chromatographie peut être couplé en parallèle à la fois au détecteur IR et au spectromètre de masse (Hedges et Wilkins, 1991). Ainsi la CG permet dans la grande majorité des cas une individualisation des constituants nécessaire pour une bonne identification. Cependant de nombreux métabolites secondaires trop lourds pour être volatilisés nécessite l'utilisation d'une technique chromatographique en phase liquide.

II.2.2.3 Le couplage CLHP-SM

La Chromatographie Liquide Haute Performance s'adresse à des substances peu ou pas volatiles et parfois thermolabiles ou polaires. Le couplage CLHP-SM a été utilisé pour l'identification d'esters sesquiterpéniques, d'alcaloïdes, xanthones, des séco-iridoïdes, dans des extraits méthanoliques mais aussi des psoralènes et des flavones à partir d'huiles essentielles (Cremin *et al.*, 1995 ; Mroczek *et al.*, 2004 ; Dugo *et al.*, 2000). D'autres travaux ont mis en œuvre ce couplage pour l'analyse de terpènes (diterpènes acides ou glycosylés, triterpènes) dans des extraits au dichlorométhane de plusieurs espèces de *Potamogeton* (Waridel *et al.*, 2004), ou bien encore de composés phénoliques dans des vins rouges de Sardaigne (La Torre *et al.*, 2006). Il est cependant à noter que l'utilisation de conditions opératoires très variées surtout concernant les colonnes ne permet pas des comparaisons faciles. Par exemple, la séparation par CLHP, de deux alcaloïdes : hyoscyamine et scopolamine a fait l'objet depuis le premier article publié en 1976 de plus d'une centaine de publications. Aucune standardisation n'a été proposée ou ne s'est imposée. Il s'avère donc difficile de choisir les conditions opératoires, que ce soit en laboratoire ou dans l'industrie (Verpoorte *et al.*, 2010).

II.2.2.4 Le couplage CLHP-RMN ^1H

La RMN du ^1H apporte des informations extrêmement précieuses sur la structure des molécules, mais présente l'inconvénient d'être beaucoup moins sensible que les techniques spectroscopiques décrites précédemment (IR et surtout SM). Néanmoins, la mise en œuvre de couplage CLHP-RMN ^1H a été rendu possible grâce au développement d'aimants supraconducteurs de plus en plus puissants (jusqu'à 23,5 Tesla), permettant ainsi d'abaisser le seuil de détection pour les composés à des valeurs de l'ordre du nanogramme. Ce couplage a aussi été rendu possible grâce au développement de colonnes capillaires dont la faible consommation en éluant permet d'employer des solvants deutérés, évitant ainsi d'avoir recours à des techniques d'irradiations sélectives (Victoria et Elipe, 2003 ; Wolfender *et al.*, 1998 ; Albert *et al.*, 1999).

La CLHP-RMN ^1H est utilisée selon deux modes : le « flux interrompu » (stopped flow) et le « flux continu » (continuous flow). Dans le premier mode, l'élution est arrêtée lorsqu'un constituant est présent dans la sonde du spectromètre alors que dans le second l'acquisition des données est faite tout au long du passage du flux chromatographique dans la cellule RMN (Grenier-Loustalot *et al.*, 1990).

L'utilisation de la CLHP couplée à la RMN s'est révélée efficace pour l'identification de molécules thermosensibles responsables de l'amertume de la bière (Pusecker *et al.*, 1999) et de flavonoïdes dans un extrait méthanolique de feuille de *Sorocea bomplandii* du Brésil (Andrade *et al.*, 2002). Plus récemment, la CLHP-RMN ^1H a permis l'identification des produits de dégradation issus de l'acide 5-aminosalicylique dans un médicament générique (Novak *et al.*, 2006).

II.2.3 La CPG bidimensionnelle et le couplage CLHP-CPG-SM

Dans le domaine de l'analyse des huiles essentielles, l'objectif qui se décline en trois étapes : individualisation/identification/quantification reste, dans certain cas, difficile à atteindre parce que chaque étape pose des problèmes. Pour ces raisons, d'autres couplages sont apparus avec l'objectif d'améliorer soit l'étape d'individualisation en associant deux techniques chromatographiques, soit l'étape d'identification en couplant deux techniques spectroscopiques.

La résolution de pics en CPG est parfois insuffisante pour parvenir à la caractérisation complète de mélanges très complexes. Afin de pallier ce manque de résolution, la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle (CPG-2D) constitue une alternative particulièrement intéressante (Dallüge *et al.*, 2003, Philips et Beens, 1999 ; Mondello *et al.*, 2002). Le dispositif permet de recueillir une fraction non résolue à la sortie de la première colonne pour la réinjecter ensuite dans la seconde colonne. L'installation comporte deux détecteurs et une vanne d'introduction entre les deux colonnes. L'optimisation des conditions chromatographiques a permis d'obtenir la caractérisation par CPG-2D d'effluents pétrochimiques pour lesquels la résolution en CPG est insuffisante (Vendeuvre *et al.*, 2004) ce qui souligne ainsi l'intérêt de la CPG-2D par rapport à la CPG conventionnelle. La chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle est aussi utilisée dans d'autres domaines comme l'analyse de médicaments (Songa *et al.*, 2004) ou d'aliments (Trachinda *et al.*, 2004). Elle est également utile pour l'analyse fine des huiles essentielles complexes, soit parce qu'elles contiennent de nombreux sesquiterpènes, voire des diterpènes, soit quand il y a possibilité de co-élution de certaines oléfines sesquiterpéniques avec des monoterpènes oxygénés (Mariott *et al.*, 2000 ; Mondello *et al.*, 2005). À titre d'exemple, Mondello *et al.*, ont élué séparément le β -bisabolène, l'acétate de néryle et le bicyclogermacrène qui co-élueraient en CPG conventionnelle dans une huile essentielle de *Citrus*. De plus par un couplage avec la spectrométrie de masse, l'identification des constituants par interrogation des bibliothèques de spectres donne de meilleures notes de concordances que par simple couplage CPG-SM.

Dans le couplage, CLHP-CPG-SM, la CLHP réalise une séparation préalable des constituants du mélange en fonction de la famille à laquelle ils appartiennent. Ce dispositif permet de supprimer ou de limiter le nombre de co-élutions et de ce fait une plus grande fiabilité dans l'identification de constituants présents à l'état de traces dans des huiles essentielles d'agrumes (Mondello *et al.*, 1995).

II.2.4 Les couplages CPG-SM-SM et CLHP-SM-SM

Diverses difficultés rencontrées lors de l'analyse de mélanges complexes, que ce soit dans le domaine médical (drogues, poisons), dans la recherche de polluants dans l'environnement ou dans l'étude de coupes pétrolières, ont conduit à la mise en œuvre de la spectrométrie de masse multidimensionnelle à double analyseur (SM-SM) (Cambon, 1989) ou à triple analyseur (Yost et Enke, 1979). En effet, cette technique consiste à sélectionner les ions

correspondants à un rapport m/z choisi au moyen d'un premier analyseur qui joue ainsi le rôle d'un filtre et à les envoyer sur un deuxième analyseur. Les fragments de l'ion secondaire constituent un deuxième spectre de masse qui diffère en fonction de l'origine de l'ion primaire (Rouessac et Rouessac, 2004). Cette méthode peut présenter une utilité dans le domaine des huiles essentielles. Ainsi les quatre stéréoisomères du dihydrocarvéol ont pu être différencier à partir des fragments caractéristiques obtenus, qui diffèrent en fonction de la stéréochimie axiale ou équatoriale des groupements hydroxyle et méthyle (Decouzon *et al.*, 1990). Par ailleurs, le couplage CPG-SM-SM a été utilisé dans l'analyse de l'huile essentielle de Vétiver de Chine. Les auteurs ont identifié 118 composés dans cette huile essentielle et surtout ils ont confirmé la présence de l' α -cédrene, de l'acoradiène et du khusimène dont l'identification n'était pas évidente par l'utilisation de la CPG-SM (Sellier *et al.*, 1991). Cependant cette technique malgré son efficacité, ne règle pas les problèmes d'identification dans le cas de coélutions.

II.2.5 Bilan des techniques d'analyse en ligne

Les couplages en ligne d'une technique chromatographique d'individualisation des composés avec une technique spectroscopique d'identification se sont rapidement développés ces dernières années. Les plus utilisées sont les couplages CPG-SM, CLHP-SM et CLHP-RMN ^1H . Dans le domaine des mélanges naturels d'origine végétale, leur extrême complexité due à une multitude de composés ainsi qu'à une très grande diversité des familles chimiques n'a pas permis l'émergence d'une méthode d'analyse et de couplage standardisée. Dans ce domaine, la fiabilité de l'analyse des constituants d'un mélange complexe naturel ne peut être obtenue qu'en associant plusieurs techniques d'analyse. La RMN du ^1H a démontré son efficacité pour l'étude des fluides biologiques. Cependant son application aux matrices végétales s'avère plus compliquée à cause de la complexité de celles-ci. En effet, certains auteurs signalent la présence d'au moins 30 000 métabolites secondaires. Nous citerons comme exemple la banque de spectre RMN mise en place pour déterminer l'effet de toxines sur l'urine de rongeurs (Nicholson et Lindon, 2008).

En ce qui concerne, plus spécifiquement les huiles essentielles, même l'utilisation conjointe de la CPG-SM avec les Ir sur deux colonnes de polarité différentes ne donne pas entièrement satisfaction. Certains auteurs ont souligné des erreurs ou des abus d'interprétation, provenant d'une utilisation abusive des banques informatisées (Joulain, 1994). La quantification par CPG est elle aussi remise en cause. Aujourd'hui, la prise en

compte des indices de rétention avec des facteurs de correction associée à l'utilisation d'au moins deux techniques d'identification complémentaires est vivement recommandée.

L'utilisation du couplage de deux techniques chromatographiques améliore considérablement l'étape d'individualisation et élimine partiellement ou totalement les phénomènes de coélution. Cependant, pour l'étape d'identification, les limites de la spectrométrie de masse pour l'identification d'isomères et de certains composés comme les sesquiterpènes oxygénés sont toujours présentes. Pour des huiles essentielles extrêmement complexes (ciste, vétiver, ...), certains auteurs ont choisi d'abandonner les couplages et de séparer l'analyse en deux étapes : individualiser/concentrer/isoler puis identifier. Cette stratégie est illustrée dans la voie B décrite ci-dessous.

II.3 Identification des constituants après purification : Voie B

La séquence opérationnelle développée ici s'apparente à ce qui est fait lors de l'isolement et la caractérisation spectroscopique d'une nouvelle molécule. Le mélange est d'abord fractionné par différentes techniques chromatographiques, telles la chromatographie sur colonne (CC), la chromatographie sur couche mince (CCM), la CLHP et la CPG préparative (CPGP) précédées ou non d'une distillation fractionnée ou d'une cristallisation. Les différents constituants isolés ou présents dans des fractions enrichies sont ensuite identifiés par comparaison de leurs données spectrales avec celles de composés de références : spectre de masse, spectre IR, spectres de RMN du ^1H ou du ^{13}C (lorsque la quantité de produit isolé est suffisante), éventuellement RMN bidimensionnelle. Cette voie est extrêmement fiable et permet d'identifier les composés présents dans les mélanges naturels et décrits dans la littérature.

Cette séquence en deux étapes « purification-identification » est la première qui a été utilisée dans le domaine des huiles essentielles. Par la suite, elle a été supplantée par la voie A, plus rapide. Mais elle est toujours utilisée dans le cas des huiles essentielles complexes car sa grande fiabilité compense l'investissement en temps qu'elle requiert. Pour illustrer l'intérêt de cette méthode de travail, nous pouvons citer à titre d'exemple, les travaux de Weyerstahl *et al.*, qui ont décrit la composition chimique de diverses huiles extrêmement complexes (Weyerstahl *et al.*, 1996/1997/2000a/2000b/2000c ; Weyerstahl et Schlicht, 1997). Ainsi, l'huile essentielle de Vétiver d'Haïti est réputée pour être l'une des plus complexes du monde car elle est composée de très nombreux composés minoritaires sesquiterpéniques aux

propriétés physico-chimiques et aux données spectroscopiques voisines. Il est par conséquent très difficile d'isoler ces composés et de les identifier. L'huile essentielle a été fractionnée suivant une partition acido-basique. La partie neutre a été soumise à une distillation fractionnée qui a permis de séparer les produits lourds des produits légers, puis les différents constituants ont été séparés par CC répétitives puis éventuellement par CCM. Ces constituants ont ensuite été analysés par CPG-SM, RMN ^1H , et parfois RMN du ^{13}C . La partie acide a été soumise à une réaction d'estérification ou de réduction avant la séparation des constituants. Ainsi, près de 170 composés sesquiterpéniques mono- ou polyfonctionnalisés, ont été identifiés. Certains de ces composés possèdent des squelettes originaux et rares tels que prézizaane, zizaane, khusiane, cyclopacamphane, spirovétivane, épi-, seco- et nor-eudesmanes, oppositane...

Parmi les travaux récents, nous pouvons citer les travaux de Delort et Jaquier (2009) sur l'huile essentielle de fruits de *Citrus australasica*. L'analyse par CPG-SM et RMN du ^{13}C de chaque fraction obtenue après séparation par chromatographies répétitives a permis l'identification de 195 composés dont 4 nouveaux esters menthaniques. Ici et dans de nombreux cas l'individualisation des constituants n'est plus nécessaire. L'enrichissement, combiné à des techniques spectroscopiques tels la RMN du ^1H et du ^{13}C , permet une identification des constituants.

De la même manière, nous citerons l'exemple de l'huile essentielle de *Cistus creticus* ssp. *eriocephalus* and *Cistus creticus* ssp. *corsicus* qui par analyse par CPG-SM et par RMN du ^{13}C de fractions obtenues après des étapes de séparations a permis l'identification de 164 constituants qui représentent 83% de l'huile essentielle globale. Le 13-oxo-15,16-bis-norent-labd-8(17)-ène et du 13-oxo-15,16-bis-nor-ent-labd-7(8)-ène ont été identifiés par RMN du ^{13}C et pour la première dans une huile essentielle du genre *Cistus* (Paolini *et al.*, 2009).

Actuellement cette voie, n'est plus que rarement utilisée. Elle est cependant incontournable pour la caractérisation de nouveaux constituants, mais aussi pour déterminer les composés responsables d'activités biologiques. Nous citerons comme exemple les tests concernant l'activité spasmolytique de l'huile essentielle et l'extrait au solvant (CH_2Cl_2 -MeOH) d'*Arracacia toluensis* var. *multifida*. Le fractionnement « bio-guidé » sur colonne ouverte suivi de test biologique ont permis l'isolation et caractérisation de 4 coumarines dans l'extrait dont 2 sont présentes dans l'huile essentielle (osthol et subérosine). Ainsi, l'activité

de cet extrait serait principalement du à l'isoimpératorine, l'osthol, le subérosine et le 8-méthoxypsoralene mais aussi à une synergie entre ces constituants (Figuroa *et al.*, 2007).

Nous citerons aussi, les travaux d'Adio et König (2005), concernant une huile riche en sesquiterpènes de *Plagiochila asplenioides*. La combinaison de techniques analytiques chromatographiques (CPG, CPG préparative, CCM) et spectroscopiques (SM, RMN) a permis d'une part de caractériser et d'isoler trois nouveaux sesquiterpènes hydrocarbonés : bisabola-1,3,5,7(14)-tetraène, bisabola-1,3,5,7-tetraène, et (-)-aromadendra-1(10),3-diène, et quatre nouveaux sesquiterpènes oxygénés (+)-muurolan-4,7-peroxide, (+)-plagiochiline W, (+)-plagiochiline X et ent-4-épi-maaliol. Il a aussi été possible de caractériser un constituant jamais identifié par une source naturelle : le plagio-4,7-peroxide. La complémentarité de ces méthodes a aussi permis d'identifier près de 40 constituants de l'huile essentielle, majoritairement des sesquiterpènes.

Après ce bref tour d'horizon des principales méthodes d'analyses des mélanges complexes naturels, il nous est possible de formuler quelques observations. La voie A, s'illustre par sa rapidité, particulièrement bien adaptée aux analyses de routine et aux composés volatils, notamment dans le domaine des huiles essentielles. La voie B, plus longue, s'adresse à un plus grand nombre de familles chimiques et présente des applications allant des mélanges non volatils (huiles essentielles complexes) jusqu'aux extraits (coumarines, flavonoïdes,...). Elle permet d'utiliser, en tant que de besoin, les données de la RMN pour l'identification des constituants d'un mélange naturel. Une troisième voie, la Voie C, intermédiaire par rapport aux précédentes, fonde l'identification et si besoin la quantification des principaux constituants des mélanges naturels (huiles essentielles, huiles végétales, résines, extraits, ...) sur l'étude du spectre de RMN du ^{13}C du mélange, sans séparation préalable. Elle permet de tirer profit des informations fournies par la RMN en supprimant ou tout au moins en diminuant considérablement les étapes de séparation. Cette technique a été développée au Laboratoire et a fait l'objet de divers travaux depuis plusieurs années.

II.4 Analyse par RMN du ^{13}C sans séparation préalable : Voie C

La RMN du ^{13}C a été utilisée depuis le début des années quatre vingt pour confirmer la présence d'un constituant dans un mélange complexe naturel, préalablement identifié par une autre technique, la SM par exemple. Le principe de cette méthode est simple : il s'agit d'observer dans le spectre du mélange, les raies de résonance appartenant à un composé donné et ce faisant identifier ce composé. Comme nous l'avons mentionné, l'objectif de cette méthode est donc d'éviter, ou tout au moins de réduire, les étapes fastidieuses de purification des constituants. La RMN du ^{13}C , en tant qu'outil d'analyse des mélanges, a fait l'objet de travaux dans différents domaines d'investigation : coupes pétrolières, produits agroalimentaires, huiles essentielles. Dans le droit fil des travaux précurseurs de Formàcek et Kubeczka (1982a ; 1982b) dans le domaine des huiles essentielles, la plupart des études continuent à utiliser la RMN comme méthode de confirmation plutôt que méthode d'identification. Depuis le début des années 1990, les travaux menés par l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse, ont fait de la RMN du ^{13}C un véritable outil d'analyse des mélanges complexes naturels (Corticchiato et Casanova, 1992 ; Tomi *et al.*, 1995) complémentaire des techniques conventionnelles développées. Nous allons développer dans les paragraphes suivants l'intérêt ainsi que les différents paramètres permettant par cette méthode une identification optimale.

II.4.1 Intérêt de la RMN du ^{13}C

Malgré sa faible abondance isotopique naturelle (1,1%) et son moment gyromagnétique qui le rendent environ 5700 fois moins sensible que le proton (Günther, 1994) le ^{13}C est malgré tout préféré aux autres noyaux dans le domaine de l'analyse des mélanges complexes car il présente les avantages suivants :

- Le carbone constitue le squelette de toutes les molécules organiques et les différents atomes présents sont, à quelques exceptions près, magnétiquement non équivalents. Donc, on observe en général dans un spectre de RMN du ^{13}C autant de raies de résonance qu'il y a de carbones dans la molécule ;
- Les spectres de RMN du ^{13}C peuvent être simplifiés par irradiation par découplage total des noyaux d'hydrogène, ce qui permet de n'observer dans le spectre qu'une seule raie de résonance par carbone. En plus l'Effet NOE (Nuclear Overhauser Enhancement)

résultant de ce découplage des protons produit une augmentation d'intensité du signal (Williamsion et Neuhaus, 1989);

- Le temps de relaxation transversal T2 (temps de relaxation spin-spin) est plus important pour le carbone que pour le proton. La largeur à mi-hauteur du signal de résonance étant inversement proportionnelle à T2, il en résulte un gain dans la finesse des pics et donc en résolution ;
- Le domaine de résonance du carbone s'étend sur une plage beaucoup plus vaste que celle du proton (schématiquement, 240 ppm par rapport à 12 ppm), ce qui améliore notablement la résolution effective c'est-à-dire la dispersion spectrale (Tomi *et al.*, 1995) ;
- L'enregistrement des spectres de RMN du ^{13}C est réalisé à température ambiante. Cela évite la dégradation ou la transformation éventuelle des molécules thermosensibles ;
- La RMN étant une technique non destructive, l'échantillon peut être récupéré et soumis à d'autres analyses.

Il résulte donc, de tous les points cités jusqu'ici qu'il est possible d'identifier par RMN du ^{13}C la plupart des molécules organiques, même dans les cas de molécules ayant des structures très proches. En effet, la moindre modification structurale induit des variations, plus ou moins importantes mais toujours mesurables, des déplacements chimiques des carbones d'une molécule, permettant son identification. En fait, le spectre de RMN du ^{13}C peut être considéré comme « l'empreinte digitale » de la molécule. A contrario des autres techniques chromatographiques et spectroscopiques, la standardisation des conditions d'enregistrement des spectres de RMN permet d'obtenir des données spectrales reproductibles aisément intégrables dans des bases de données et utilisables par de nombreux opérateurs sur des spectromètres différents (Verpoorte, 2010). Même l'augmentation du champ des spectromètres ne constitue pas un problème. A titre d'exemple, l'identification du bornéol a été réalisée pour la première fois au laboratoire en 1989 sur un spectromètre de 4,8 T avec une console analogique. Les variations de déplacements chimiques observés actuellement avec un spectromètre de champ magnétique de 9,4 T (console numérique) est inférieure à 0,05 ppm.

II.4.2 Identification des constituants en mélange par RMN du ^{13}C

L'identification des constituants d'un mélange par RMN du ^{13}C est réalisée par comparaison des déplacements chimiques du mélange avec ceux des composés de référence

contenus dans une ou plusieurs bibliothèques de spectres. Par rapport aux précédentes techniques de couplage entre un chromatographe et un spectromètre, dans le cas de la RMN, chaque composé ne fait pas l'objet d'une individualisation. Pour identifier un composé au sein d'un mélange, il faut être à même de pouvoir observer les signaux qui lui appartiennent et de les individualiser, puis d'attribuer les déplacements chimiques à une molécule donnée. Pour cela, les conditions expérimentales d'enregistrement des spectres doivent être optimisées et standardisées de façon à permettre une bonne reproductibilité des résultats obtenus. Il est également important de savoir apprécier la concentration minimale d'un produit minoritaire dans le mélange, permettant l'observation de ses signaux dans le spectre.

II.4.2.1 Observation et individualisation des signaux

L'observation des raies de résonance des carbones d'une molécule dans le spectre d'un mélange dépend de divers paramètres :

- la sensibilité de l'appareil qui s'exprime par le rapport signal sur bruit (S/B) ;
- la masse de produit disponible ;
- la solubilité du produit dans le solvant choisi ainsi que de sa viscosité ;
- le nombre d'acquisitions.

L'individualisation des raies de résonance dépend de la résolution de l'appareil de RMN (puissance de l'aimant et caractéristiques du système informatique permettant l'acquisition du signal). Plusieurs aspects doivent être considérés :

- grâce au développement des aimants supraconducteurs, la RMN voit sa sensibilité augmenter avec l'intensité du champ magnétique des aimants (23,5 Tesla pour le plus performant). Il est donc possible d'utiliser des quantités de plus en plus faibles de produit, ce qui peut être utile dans des cas particuliers, mais qui ne constitue pas, d'une manière générale, un handicap majeur, car les produits naturels sont en général disponibles en quantités appréciables. C'est pourquoi, il est possible de réaliser des spectres de RMN de mélanges naturels avec des appareils de routine, 1,9 Tesla lors des premières expériences, 4,7 Tesla pendant longtemps, 9,4 Tesla de nos jours. Par ailleurs, certaines séquences impulsives permettent d'augmenter la sensibilité. Ainsi, l'irradiation des protons liés aux noyaux de carbone, produit par l'intermédiaire de l'Effet Overhauser Nucléaire (NOE), une augmentation d'intensité pouvant s'élever à 200% (Günther, 1994 ; Hesse *et al.*, 1997). Cette technique est couramment utilisée lors de l'enregistrement des spectres de mélanges, ne serait ce que pour simplifier les spectres.

- l'amélioration du rapport S/B et l'observation du maximum de signaux dans le spectre, nécessitent d'augmenter le nombre d'acquisitions. Néanmoins, le rapport S/B étant proportionnel à la racine carrée du nombre d'acquisitions, au-delà d'un certain seuil, le temps d'analyse – et donc le temps d'occupation de l'appareil - devient prohibitif par rapport au gain. Si les composés sont en trop faible quantité (teneur trop faible dans le mélange), il est difficile d'obtenir un rapport S/B correct, même en augmentant considérablement le nombre d'acquisitions.

- Pour réduire le temps d'utilisation de l'appareil, il est parfois possible de disposer de sondes de 10 mm (au lieu des sondes habituelles de 5 mm) ce qui permet quasiment de tripler la quantité de substance disponible pour l'enregistrement du spectre.

- Le choix du solvant est également importants, surtout quand certains constituants du mélange ont une masse molaire élevée et/ou sont polyfonctionnalisés. Cependant une large gamme de solvants deutérés est actuellement disponible.

Parallèlement à la sensibilité, il faut tenir compte de la résolution de l'appareil qui permet d'individualiser les signaux dans le spectre du mélange. On peut définir la limite de résolution comme la plus petite différence de fréquence entre deux signaux de résonance pouvant encore être enregistrés séparément (Williamson et Neuhaus, 1989). L'individualisation des signaux d'un composé pur pose rarement des problèmes, les superpositions fortuites des signaux de deux carbones étant assez exceptionnelles. En revanche, dans le cas du spectre d'un mélange complexe, le nombre de constituants et le nombre de carbones qui composent chaque molécule, sont autant de facteurs qui augmentent la probabilité de superposition de raies de résonance. La résolution est donc un facteur essentiel pour l'identification des constituants d'un mélange complexe. Divers paramètres influent sur la résolution :

- plus le champ magnétique est élevé, meilleure est la résolution. Cette meilleure séparation des signaux de résonance des différents noyaux permet de limiter le nombre de superpositions se produisant fortuitement et donc de faciliter l'identification. Il en résulte une interprétation plus facile des spectres, ce qui est primordial dans le cas des études réalisées sur les composés ayant une masse moléculaire élevée (oligomères et protéines par exemple) dont les spectres sont extrêmement complexes ;

- d'un point de vue informatique, diverses techniques d'acquisition des données et/ou de traitement du signal permettant d'améliorer la résolution sont disponibles. L'utilisation de convertisseurs numériques performants améliore le traitement des données tout comme l'utilisation de multiplications exponentielles effectuées directement sur le signal de la FID

(décroissance libre d'induction) avant la transformée de Fourier (Günther, 1994 ; Claridge, 1999) ;

- enfin, l'utilisation d'une largeur spectrale réduite, permettant d'enregistrer le spectre sur une zone d'intérêt, ou en plusieurs portions, permet une amélioration de la résolution. A titre d'exemple, en utilisant cette technique pour enregistrer le spectre d'un mélange des deux diastéréoisomères du farnésane (2,6,10-triméthylododécane) avec un appareil opérant à 5,8T, Alemany (1989) a pu observer 29 signaux sur les 30 attendus, certains d'entre eux n'étant séparés que de 0,003 ppm.

En conclusion, il est possible d'enregistrer et de tirer des informations intéressantes sur les constituants des mélanges en utilisant un appareil de routine. L'opérateur peut effectuer toute une série d'opérations, lors de la préparation de l'échantillon, directement sur la FID et ensuite sur le spectre lui-même, permettent d'adapter l'analyse à l'objectif à atteindre en tenant compte de l'appareillage disponible.

II.4.2.2 Attribution des signaux

L'identification d'un composé par RMN du ^{13}C dans un mélange complexe repose principalement sur l'attribution des déplacements chimiques des carbones. L'intérêt de la spectroscopie de RMN réside dans sa capacité à reconnaître un noyau déterminé par rapport à son environnement dans la molécule. Contrairement à la majorité des autres techniques spectroscopiques, il est très peu probable que deux composés de structure différente présentent des spectres de RMN du ^{13}C superposables ou insuffisamment différenciés.

La fréquence de résonance des carbones d'une molécule donnée est très sensible à l'environnement stérique et électronique. Le déplacement chimique est le paramètre essentiel pour l'identification d'un composé par RMN du ^{13}C . Il est donc nécessaire d'avoir une excellente reproductibilité des valeurs des déplacements chimiques, dans le spectre du mélange, par rapport aux spectres des composés de référence. Divers paramètres doivent être pris en compte :

- la valeur du déplacement chimique est indépendante de la valeur du champ magnétique B_0 de l'appareil utilisé, des séquences d'impulsion, des paramètres d'acquisition et de traitement du signal ;

- *a contrario*, et en fonction de la fonctionnalisation des molécules, les valeurs de déplacements chimiques peuvent être influencées, majoritairement par liaisons hydrogènes, par la concentration et la présence d'autres molécules.

Ainsi, afin d'obtenir une meilleure reproductibilité des déplacements chimiques, il faut que les conditions expérimentales d'analyse (nature du solvant, concentration) des spectres des mélanges soient identiques à celles des composés de référence. Quand cela est possible, il y a intérêt à utiliser de faibles concentrations pour l'enregistrement des spectres. Ceci permet également l'utilisation des spectres décrits dans la littérature récente comme données de référence pour l'identification des composés en mélange.

Nous détaillerons ci-dessous, quelques exemples d'utilisation de la RMN du ^{13}C pour l'identification des constituants de mélanges complexes, dans les domaines de la pétrochimie et de l'agroalimentaire :

- Markowetz *et al.*, (1990) ont travaillé sur les constituants de miel et de jus de fruits. Ils ont pu ainsi mettre en évidence la présence de glucose et de fructose accompagnés de quelques di- et trisaccharides minoritaires dans le miel, et de glucose, de fructose, d'acide ascorbique (vitamine C) ainsi que divers acides aminés (proline, arginine, etc.) dans les jus de fruits. ;

- Chon *et al.*, (1996) ont analysé les constituants du vin (alcools, sucres, acides organiques, acides aminés). Plus récemment Kosir et Kidric (2001) ont identifié en mélange, avec l'utilisation de séquences de RMN 1D et 2D, 17 acides aminés présentés comme des constituants minoritaires du vin ;

- dans le cas des mélanges lipidiques naturels (huiles végétales et graisses animales), il est possible, à partir de l'observation des signaux relatifs à certains carbones, d'accéder à la classe lipidique (Gunstone, 1991), à la distribution des acides gras sur le glycérol (Bonnet *et al.*, 1990 ; Wollenberg, 1990 ; Sacchi *et al.*, 1992), à la position et à la stéréochimie des doubles liaisons (Gunstone et Pollard, 1977).

Dans le domaine des huiles essentielles, nous rappellerons que l'utilisation de la RMN du ^{13}C pour l'identification des constituants majoritaires est due à Formáček et Kubeczka (Formáček et Kubeczka, 1982a/1982b/1982c ; Kubeczka et Formáček, 1984). Ces auteurs ont constitué leur propre bibliothèque de spectres et en analysant les huiles essentielles dans les mêmes conditions expérimentales. Ils ont montré qu'il était possible de confirmer la présence de terpènes dans une huile essentielle, par ailleurs mis en évidence par CPG-SM. Les

variations des déplacements chimiques, par rapport à celles des composés de référence, sont parfois importantes à cause des concentrations élevées qui devaient être utilisées par ces auteurs pour pallier le manque de sensibilité des appareils de l'époque (2,1 T).

Par la suite, diverses études ont été réalisées ponctuellement. Ainsi, la RMN du ^{13}C a permis l'identification des principaux composés de l'huile essentielle de *Echinophora sibthorpiana* (Ahmad et Jassbi, 1999) et de 12 sesquiterpènes présents dans une fraction chromatographique de l'huile essentielle de bois de *Guarea guidonia* (Núñez et Roque, 1999). Plus récemment, une méthode d'identification des constituants d'un mélange complexe par RMN du ^{13}C a été développée par Ferreira *et al.*, (2001). Elle est basée sur la comparaison du spectre du mélange avec de mono- et sesquiterpènes décrits dans la littérature. Les valeurs des déplacements chimiques du mélange et la multiplicité de chacun des carbones déterminée par des séquences DEPT sont pris en compte par un logiciel informatique. Il propose une identification après consultation de la banque de spectres décrits dans la littérature. Cette méthode a été appliquée à l'étude de la composition chimique des huiles essentielles de *Piper cernum* et *P. regnellii* (10 et 5 composés identifiés, respectivement).

Depuis près de 10 ans, la métabolomique met en exergue les nombreux avantages de la RMN du ^{13}C et surtout du ^1H . Elle a permis par exemple de contrôler la qualité des graines de conifères. La composition en monoterpènes constitue un critère important pour mesurer les performances de survie de la graine (Terskikh *et al.*, 2005). Une étude récente (Palama *et al.*, sous presse) concernant le métabolome des feuilles de *Vanilla planifolia*, a permis de montrer que la composition chimique de 8 constituants subit plus l'influence du stade de développement que de la variation saisonnière ou l'heure du prélèvement durant la journée.

II.4.3 La méthode d'analyse développée au laboratoire

Depuis 1989, l'équipe « Chimie et Biomasse » utilise la RMN du ^{13}C comme outil d'analyse des mélanges naturels. L'objectif à atteindre a pour but l'identification, et éventuellement la quantification, des constituants de mélanges naturels sans étape préalable de purification ou avec un fractionnement réduit autant que possible (Corticchiato et Casanova, 1992 ; Tomi *et al.*, 1995).

Selon la méthode mise au point et développée au laboratoire, l'identification des composés dans le spectre RMN du ^{13}C du mélange, est réalisée par comparaison des

déplacements chimiques des carbones du mélange avec ceux de produits de référence contenus dans des banques de données spectrales conçues à cet effet. L'enregistrement des spectres de référence et des mélanges sont réalisés dans les mêmes conditions expérimentales (nature du solvant, concentration, paramètres d'enregistrement des spectres). Cette méthode de la même manière que celle initiée par Formáček et Kubeczka ne nécessite aucune individualisation préalable des constituants, il s'agit d'une véritable méthode analytique d'identification et non de confirmation des constituants d'un mélange. De plus, son originalité réside dans l'informatisation du traitement des données spectroscopiques grâce à un logiciel d'aide à l'identification spécialement élaboré au laboratoire (**Figure 7**). Ce logiciel permet en plus, l'édition de toutes les informations nécessaires à la caractérisation des constituants d'un mélange, à savoir l'attribution des pics, les variations des déplacements chimiques et les superpositions.

Ainsi, l'identification des composés présents dans un mélange est réalisée par la prise en compte de trois paramètres directement accessibles par le logiciel :

- le nombre de pics observés par rapport au nombre de pics attendus pour chaque molécule ;
- le nombre de superpositions de pics qui peuvent se produire quand deux carbones appartenant à des molécules différentes présentent fortuitement le même déplacement chimique ;
- les variations des déplacements chimiques des carbones dans le spectre du mélange par rapport aux valeurs de références.

De plus, l'intensité des pics permet éventuellement de contrôler l'appartenance du signal d'un carbone à tel ou tel composé.

Cette méthode a été appliquée à différentes familles de molécules (terpènes, lipides, sucres, phénols) selon un protocole expérimental spécifiquement adapté à chaque famille (nature du solvant, dilution, paramètres d'enregistrement des spectres). Ainsi, différentes bibliothèques de spectres ont été créées à partir de produits commerciaux et sont continuellement enrichies avec les spectres des produits isolés à partir de mélanges naturels ou bien encore préparés par héli-synthèse. A l'heure actuelle, la banque de composés la plus importante enregistrée au Laboratoire est celles des terpènes. Elle contient les données de plus de 700 molécules (mono-, sesqui- et diterpènes). D'autres bibliothèques de spectres ont également été construites : composés linéaires, triterpènes, Ces lipides, phénols, sucres,

coumarines, etc. Par ailleurs, d'autres bibliothèques de données spectrales, correspondant aux mêmes familles de composés, ont été élaborées à partir de données décrites dans la littérature. La mise en œuvre de cette méthode d'analyse et son application aux familles de composés citées ci-dessus a fait l'objet de revues (Bradesi *et al.*, 1996 ; Tomi et Casanova 2000 ; Tomi et Casanova, 2006 ; Bighelli et Casanova, 2010).

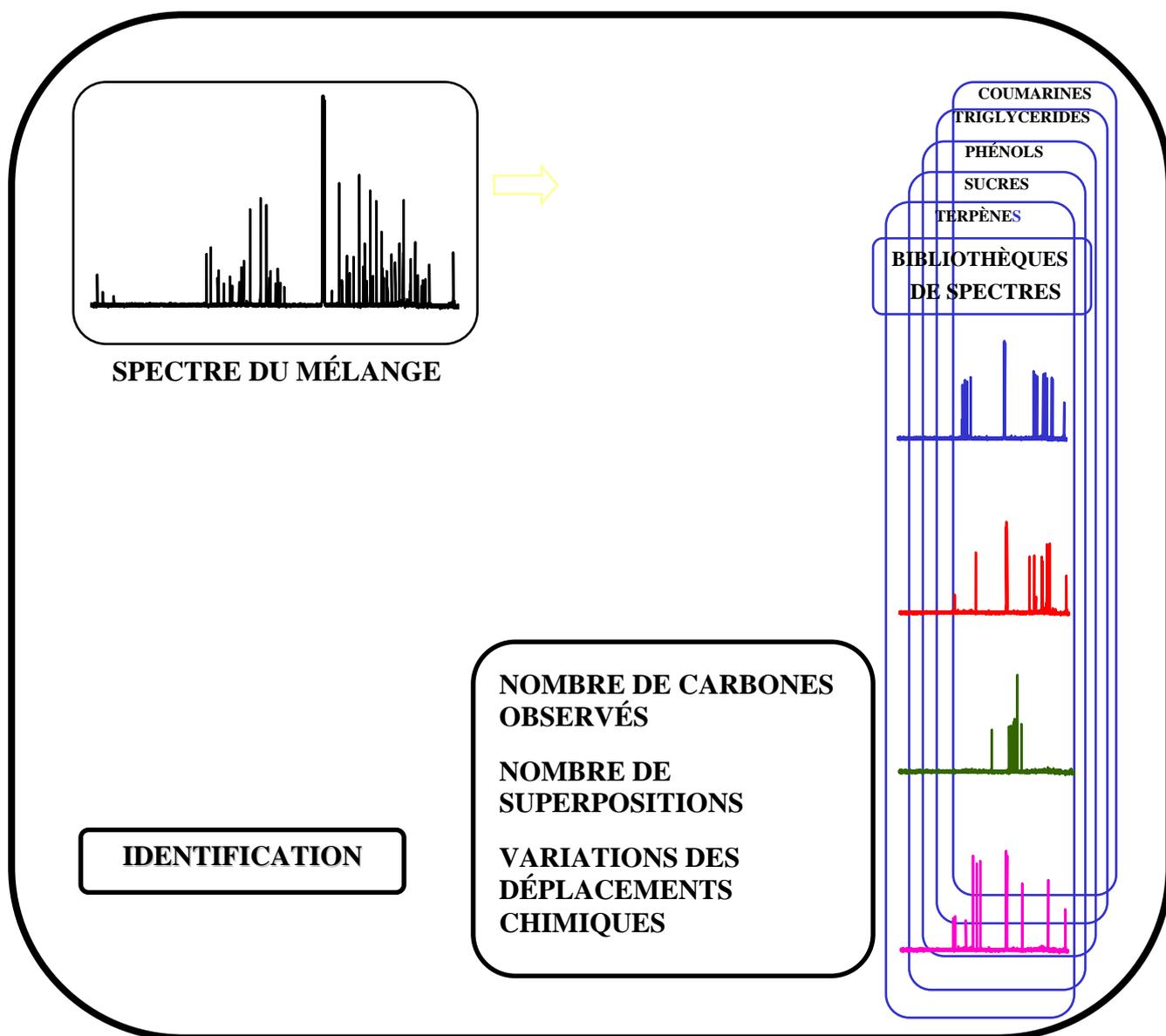


Figure 7 : Identification des constituants d'un mélange complexe par RMN du ^{13}C .

L'utilisation de la RMN du ^{13}C devient particulièrement intéressante lorsqu'elle permet d'identifier rapidement et sans ambiguïté, des composés délicats à analyser par les techniques conventionnelles. Dans le domaine des huiles essentielles, des résultats très intéressants ont été obtenus. Avec l'expérience acquise par notre équipe, après l'enregistrement de plusieurs milliers de spectres, nous pouvons faire le bilan suivant :

- dans un même mélange, deux douzaines de composés avaient été identifiés dans une huile essentielle avec un spectromètre pourvu d'un aimant de puissance 4,7 Tesla. L'utilisation d'un appareil fonctionnant avec un aimant de 9,4 Tesla a permis un gain pouvant atteindre 50%. Ainsi, dans le meilleur des cas – une huile essentielle de *Piper bavinum* du Viêt-Nam – 38 constituants, présents avec des teneurs comprises entre 0,4 et 10% ont pu être identifiés sans aucune séparation préalable (Lesueur *et al.*, 2009) ;

- La teneur minimale des composés identifiables avec notre spectromètre (9,4T) est de l'ordre de 0,5%. Parfois des composés présents à des teneurs inférieures peuvent être identifiés (0,4% et même 0,3%) ;

- En général, tous les carbones des molécules identifiées sont observés, à l'exception de certains carbones quaternaires (qui relaxent moins bien que les carbones liés à des protons et donnent donc un signal moins intense dans les conditions de l'expérience) appartenant aux composés minoritaires ;

- Le nombre de superpositions est limité et ne constitue pas, dans la grande majorité des cas, un facteur limitant ;

- Les variations des déplacements chimiques ($\Delta\delta$) sont généralement inférieures à 0,05 ppm pour la très grande majorité des cas. Il y a quelques exceptions, en particulier avec les composés phénoliques (thymol, carvacrol...) dont certains carbones présentent de plus importantes variations des déplacements chimiques selon la polarité et la fonctionnalisation des autres constituants du mélange. Dans ce cas précis une dilution permet de diminuer ces variations importantes des déplacements chimiques.

II.4.3.1 Application à l'analyse d'huiles essentielles ainsi qu'à d'autres mélanges naturels

L'analyse par RMN du ^{13}C , qui allie rapidité et fiabilité, est complémentaire des techniques conventionnelles exposées précédemment dans les voies A et B. Nous rappelons ici quelques études réalisées au sein du Laboratoire.

II.4.3.2 Caractérisation d'huiles essentielles

La caractérisation des huiles essentielles – et d'ailleurs de tout mélange naturel – peut prendre plusieurs aspects en fonction du besoin et de l'objectif assigné. Ainsi, dans la très grande majorité des huiles essentielles, les 15-25 composés majoritaires représentent 80-95% de la composition globale et sont donc suffisants pour caractériser cette huile essentielle. Il faut toutefois signaler que la connaissance des composés minoritaires est parfois un paramètre important de la qualité biologique ou organoleptique du produit et qu'en conséquence une analyse fine est nécessaire. Il faut également signaler qu'une analyse peut être totalement faussée par la mauvaise identification d'un seul constituant.

Au laboratoire, la méthode d'analyse basée sur la RMN du ^{13}C , utilisée en complément de la CPG(Ir) ou en combinaison avec la CPG(Ir) et CPG-SM, a permis de caractériser un grand nombre d'huiles essentielles obtenues à partir de plantes de Corse, de Sardaigne et du pourtour méditerranéen, d'Afrique, d'Asie, d'Amérique centrale et du sud.

- Nous avons vu que 38 constituants de l'huile essentielle de *Piper bavinum* du Viêt-Nam (Lesueur *et al.*, 2009) avaient été identifiés par RMN du ^{13}C sans aucune séparation préalable. Cette analyse ne présentait pas toutefois de difficulté majeure, tous les composés étant présents dans notre bibliothèque de spectres construite au laboratoire. Dans cet exemple, la quantification des constituants, préalablement identifiés par RMN et repérés sur le chromatogramme par leurs indices de rétention (colonnes apolaire et polaire) a été réalisée par CPG(FID),

- l'analyse du spectre de RMN du ^{13}C de l'huile essentielle de feuilles d'*Eupatorium coelestinum* du Viêt-Nam, a clairement montré la présence, parmi les composés majoritaires, du *cis*-cadin-4-èn-7-ol, dont les indices de rétention et le spectre de masse n'étaient pas présents dans les bibliothèques commerciales (Dung *et al.*, 1998),

- un sesquiterpène inhabituel, le 1,5-epoxysalvial-4(14)-ène, qui n'avait jamais été décrit dans les huiles essentielles d'aucune espèce de *Piper*, a été identifié dans l'huile essentielle de *Piper obliquum* de Panama (Mundina *et al.*, 1998),

- le presifiperfolan-9 α -ol a été détecté pour la première fois dans l'huile essentielle d'*Artemisia vulgaris* du Viêt-Nam (Nguyen Thi Phuong Thao *et al.*, 2004),

- le 9-hydroxynérolidol et un de ses isomères ont été trouvés dans l'huile essentielle de *Fokienia hodgibsi* du Viêt-Nam (Lesueur *et al.*, 2006),

- la 5-[(E)-hexylidène]-5H-furan-2-one et son isomère Z ont été identifiées dans l'huile essentielle de feuilles d'*Isolona cooperi* de Côte d'Ivoire alors que ces molécules n'étaient

présentes dans aucunes des bibliothèques informatisées dont nous pouvons disposer (Boti *et al.*, 2005),

- de nombreuses autres plantes ont été ainsi étudiées et leur huile essentielle caractérisée (Corse, Sardaigne, Algérie, Côte d'Ivoire, Guinée, Benin, de Sao Tomé et Príncipe, Viêt-Nam, Panama, Bolivie et du Costa Rica etc...).

II.4.3.3 Identification de stéréoisomères

La RMN du ^{13}C est un bon moyen d'identifier certains stéréoisomères dont l'analyse par les techniques conventionnelles est délicate. A titre d'exemple, nous pouvons citer l'identification des stéréoisomères du dihydrocarvéol réalisée au laboratoire (Bradesi *et al.*, 1994), dont nous avons vu, dans un paragraphe précédent que l'identification avait nécessité l'utilisation de la SM-SM(ICN) (Decouzon *et al.*, 1990). De même, les isomères géométriques des sequiterpènes linéaires farnésol, acétate de farnésyle et farnésal ont pu être différenciés malgré la similitude des structures (Bradesi *et al.*, 1995).

Tout aussi intéressante est la distinction de l' α -cédrene et de l' α -funébrène d'une part, du β -cédrene et du β -funébrène d'autre part, dans les huiles essentielles de bois de cèdre (Tomi *et al.*, 1995) et de *Cupressus funebris* (Hoi *et al.*, 1997). En effet, chaque couple de molécule, qui ne diffère que par la stéréochimie de la jonction des cycles, possède des spectres de masse superposables et des indices de rétention très proches. La RMN du ^{13}C a également permis l'identification, toutefois, après un fractionnement partiel, des quatre diastéréoisomères du bisépoxyfarnésatriène et des quatre diastéréoisomères de l'époxyfarnésatriénol dans l'huile essentielle d'*Inula viscosa* de Corse (Blanc *et al.*, 2003).

II.4.3.4 Identification de molécules thermosensibles

La RMN du ^{13}C a également pu être utilisée pour analyser des molécules thermosensibles dans des huiles essentielles. Ainsi l'identification et la quantification du furanodiène et du furanoélémente ont été rendues possibles dans l'huile essentielle de rhizomes et fleurs de *Smyrniium olustrum* de Corse (Baldovini *et al.*, 2001). Le furanodiène se transforme thermiquement (réaction sigmatropique [3.3] ou transposition de Cope) au cours de l'analyse CPG en furanoélémente. Les deux composés ont donc les mêmes indices de rétention et ne sont pas différenciables en CPG(Ir) et en CPG-SM. Une appréciation correcte

de la teneur des différents constituants de l'huile essentielle à été obtenue en combinant les analyses par CPG et RMN.

De même, cette technique analytique a également permis d'identifier et de quantifier l'ascaridole et son isomère (isoascaridole) dans l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* de Madagascar (Cavalli *et al.*, 2004). En effet une partie de l'ascaridole s'isomérisse thermiquement en isoascaridole au cours de l'analyse en CPG.

II.4.3.5 Étude de la variabilité chimique

En permettant l'identification, des composés jusqu'à une teneur de 0,3-0,5% la RMN du ^{13}C , combinée à une quantification par CPG (indices de rétention), est bien adaptée à l'étude de la variabilité chimique puisqu'elle permet d'identifier, à partir d'un spectre unique, les composés majoritaires d'une huile essentielle ou d'une résine. Elle a été appliquée avec succès à de nombreuses huiles essentielles dont *Thymus herba barona* de Corse (Corticchiato *et al.*, 1998), *Thymus carnosus*, *T. caespititius*, *T. camphoratus* du Portugal (Salgueiro *et al.*, 1995/1997a/1997b), et *Baeckea frutescens* du Viêt-nam (N'Guyen Thi Tam *et al.*, 2004), *Pistacia lentiscus* (Mecherara-Idjeri *et al.*, 2008a/2008b) d'Algérie. Par ailleurs, plus de 200 variétés d'agrumes cultivées en Corse ont fait l'objet d'une étude (Lota *et al.*, 2001/2002a/2002b/2003) destinée à proposer une aide à leur classification taxonomique, sur la base de la composition chimique de leurs huiles essentielles.

II.4.3.6 L'analyse structurale de nouvelles molécules

A contrario de ce qui a été exposé jusqu'à présent, l'analyse structurale d'un composé inconnu, c'est-à-dire non décrit dans la littérature, ne peut être réalisée qu'à partir d'un produit purifié par différentes techniques, généralement chromatographiques (CC, CCM, CLHP ou CPGP). Elle requiert donc une quantité suffisante de produit pur (quelques milligrammes) afin de réaliser une étude complète par toutes les méthodes spectroscopiques habituelles (SM, IRTF, UV, RMN du ^1H , RMN du ^{13}C et RMN 2D). A partir de la combinaison de toutes ces techniques complémentaires, il est possible d'établir la structure chimique de la molécule inconnue.

De nos jours, la RMN (1D et 2D) constitue manifestement la technique analytique la plus performante et la plus utilisée pour l'élucidation structurale des molécules. La RMN 2D,

en particulier, permet la mise en évidence des interactions homo- et hétéronucléaires entre les différents noyaux (Claridge, 1999). Parmi les diverses séquences, les expériences de corrélation entre les différents protons d'une molécule, voisins (COSY) et à longue distance (COSY Long Range, NOESY), ou entre protons et carbones (HSQC, HMBC), fournissent des renseignements précieux sur la structure moléculaire et facilitent considérablement l'analyse structurale. La séquence de corrélation homonucléaire carbone-carbone (INADEQUATE) conduit à la structure sans ambiguïté mais nécessite une quantité de produit plus importante que pour la mise en œuvre des autres séquences (Derome, 1987).

Au laboratoire, de nouvelles molécules ont été isolées et caractérisées lors de l'analyse de certaines huiles essentielles. Après séparation et purification par chromatographies successives (colonnes de silice, Sephadex), ces molécules ont été caractérisées par les techniques spectroscopiques conventionnelles incluant la RMN du ^1H , la RMN du ^{13}C et la RMN 2D. Ainsi, le *trans*-dauc-8-èn-4 β -ol a été identifié dans l'huile essentielle de *Daucus carota* (Mazzoni *et al.*, 2003), le 4-épi-*cis*-dihydroagarofurane dans l'huile essentielle de *Cedrelopsis grevei* de Madagascar (Cavalli *et al.*, 2004), l'eudesm-5-èn-11-ol dans l'huile essentielle d'*Helichrysum italicum* de Corse (Bianchini *et al.*, 2004), les esters de β -cyclolavandulyle et de β -isocyclolavandulyle dans l'huile essentielle de *Peucedanum paniculatum* de Corse (Vellutini *et al.*, 2005). On peut également citer l'isolement et la caractérisation structurale, à partir d'un extrait au solvant de cette même plante, de deux coumarines très originales dont le squelette présente un motif β -cyclolavandulyle lié au noyau coumarinique par une liaison carbone-carbone (Vellutini *et al.*, 2007).

En conclusion, il ressort de cette synthèse bibliographique, que la méthode mise au point et développée au laboratoire, d'identification (et éventuellement de quantification) des constituants des mélanges naturels, basée sur l'analyse informatisée du spectre de RMN du ^{13}C du mélange, sans séparation préalable, est efficace et complémentaire des techniques conventionnelles. Elle peut être appliquée à toute sorte de mélanges naturels, contenant des composés volatils ou non volatils, huiles essentielles, résines, extraits aux solvants, biocombustibles, biocarburants, huiles végétales, miels, etc. Elle permet d'identifier et de quantifier des composés volatils ou non, des stéréoisomères, des molécules thermolabiles, sans séparation ni dérivatisation préalable, après optimisation et validation des conditions expérimentales à chaque famille de composés.

CHAPITRE II

CARACTERISATION CHIMIQUES DES MENTHES POUSSANT A L'ETAT SAUVAGE EN CORSE

I. INTRODUCTION

Les menthes font parties de la famille des Labiées (*Lamiaceae*) qui forment, avec près de 3500 espèces et 8 sous-familles (*Ajugoideae*, *Chloranthoideae*, *Lamioideae*, *Nepetoideae*, *Pogostemonoideae*, *Scutellarioideae*, *Teucroideae* et *Viticoideae*), une vaste et importante famille très typique du monde végétal. Près de la moitié (47 %) des *Lamiaceae* sont regroupées dans la sous-famille des *Nepetoideae*. Cette famille regroupe des plantes herbacées, répandues dans le monde entier (à l'exception de l'Antarctique), mais particulièrement présentes dans les régions tempérées et surtout méditerranéennes. Elles sont pour la plupart aromatiques (basilic, lavande, marjolaine, mélisse, menthe, origan, romarin, sarriette, sauge, serpolet, thym,...), partiellement ligneuses et forment des arbustes et très rarement des arbres. Leurs caractéristiques communes sont les suivantes : les fleurs sont hermaphrodites, le calice persistant est formé de 5 sépales diversement soudés et présente souvent deux lèvres.

Des feuilles de menthe poivrée ont été trouvées dans des pyramides égyptiennes datant du premier millénaire av. J.-C. L'étymologie du mot « menthe » a beaucoup été discutée. Certains auteurs disent qu'elle proviendrait du grec « *minuto* » (rendre stérile), d'autres affirment que le nom de la plante proviendrait de « Minthe », une nymphe de la mythologie grecque qui conquiert le cœur de Platon et que Proserpine, épouse jalouse, transforma en fleur « poivrée ». Elle devint populaire en Europe occidentale au XVIII^e siècle puisqu'on la cultivait dans les jardins des couvents et des monastères d'Europe.

Au sein de la famille des *Nepetoideae*, le genre *Mentha* est représenté par 18 espèces et environ 11 hybrides. L'hybridation intra spécifique est relativement aisée et rend la taxonomie particulièrement délicate. La menthe est une plante herbacée vivace, dicotylédone et gamétopétale, susceptible de se reproduire par des rhizomes, par marcottage ou par bouturage. Elle apprécie les situations fraîches, moyennement éclairées, des sols riches en éléments nutritifs, affectionnant un pH plutôt neutre (Bruneton, 1993). Il existe de très nombreuses variétés dont la « menthe verte » et la « menthe poivrée » sont les plus connues. La plupart des menthes sont originaires de l'Europe et de l'Asie. Cependant, en suivant les flux de migration, les menthes sont présentes sur la quasi-totalité des continents.

Les huiles essentielles de menthe font parties des huiles les plus produites dans le monde dont la valeur commerciale s'élève à plus de 400 millions de \$US/an. Les États-Unis occupent une position dominante et sont les plus gros producteurs d'huile essentielle de menthe, suivi par

l'Inde et la Chine. Les menthes sont utilisées en médecine traditionnelle dans les pays producteurs. En Chine la dynastie des Song (969-1279) utilisait *M. canadensis* pour traiter des ennuis de santé comme la fièvre et les coups de chaleur. Aux U.S.A c'est la menthe poivrée (*M. piperita*) qui était utilisée pour lutter contre de simples migraines jusqu'aux brûlures intestinales (Lawrence, 2007). *Mentha canadensis* est à l'origine de l'huile essentielle de « cornmint » (>15 000 tonnes/an) qui est la plus grande source de (-)-menthol ; *M. piperita* donne l'huile essentielle de « peppermint » (> 3 500 t/an) composée de menthol, de menthone et d'acétate de menthyle ; *M. spicata* ssp. *spicata*, *M. viridis* (native spearmint) et *M. gracilis* (scotch spearmint) sont la source d'huiles essentielles riches en carvone ; *M. citrata* est une source de linalol et d'acétate de linalyle. Nous citons ici, certaines menthes très répandues mais qui présente un intérêt commercial plus limité : *M. pulegium* est à l'origine de l'huile essentielle « pennyroyal » riche en pulégone et l'huile essentielle de *M. aquatica* est dominée par le menthofurane. Afin de répondre à cette forte demande, de nombreuses espèces font l'objet de mise en culture. L'industrie agroalimentaire est le principal consommateur : liquoristerie, confiserie ainsi que l'industrie des tabacs et la parfumerie. La valeur commerciale des huiles essentielles de menthes, leurs facilités de propagation et de clonage, a poussé les recherches vers une meilleure connaissance des voies de biosynthèse des monoterpènes caractéristiques des menthes. Cette étude a permis de favoriser la production de constituants d'un grand intérêt économique comme le menthol.

Il nous a semblé opportun de poursuivre et de compléter l'étude initiée au laboratoire sur la composition chimique des huiles essentielles de Labiées, par celle de menthes poussant à l'état spontané en Corse (Tomi et Casanova, 2000 ; Bekhechi *et al.*, 2007 ; Baldovini *et al.*, 2000). Nous traiterons en particulier de quatre menthes : *M. aquatica*, *M. pulegium*, *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* et *M. suaveolens* ssp. *insularis*. Les divers extraits naturels de ces quatre menthes (huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur ou par hydrodistillation, hydrolat) ont été analysés, dans la grande majorité des cas, par combinaison de diverses techniques : la CPG(Ir), CPG-SM, RMN du ¹³C. Nous allons tout d'abord nous intéresser à l'étude de la composition chimique des huiles essentielles de *M. aquatica* et *M. pulegium*. Ensuite, nous traiterons de l'espèce *suaveolens* représentée en Corse par deux sous-espèces *suaveolens* et *insularis*. Enfin, nous avons entrepris une étude statistique à partir d'une soixantaine d'échantillons de *M. suaveolens*. Au cours du chapitre, nous développerons une approche plus fondamentale avec l'identification de composés absents de nos bibliothèques de spectres.

II. *MENTHA AQUATICA* L.

II.1 Aspects botaniques

M. aquatica L., plus connue sous le nom de « menthe aquatique » ou de « pedirossu » en Corse, est une plante, souvent un peu rougeâtre, de 80 cm de hauteur, qui croît dans les lieux humides, parfois même dans l'eau jusqu'à une altitude de 1400 m. Elle trouve son origine en Eurasie et en Afrique et couvre de nos jours la totalité du territoire français métropolitain. Les feuilles sont ovales, plus ou moins bordées de dents aiguës et espacées. Les fleurs roses d'un diamètre de 8 mm sont groupées en une ou quelques têtes terminant les rameaux. Les dents du calice sont sensiblement égales. Cette plante à l'odeur de berlingot et fleurit de juillet à septembre. Comme les autres menthes, l'hybridation est assez fréquente et peut conduire à une variation de certaines caractéristiques botaniques (Gamisans et Jeanmonod, 1993).



Figure 8 : Pieds de *Mentha aquatica* L. (Mandriolu région d'Ajaccio, mai 2006).

II.2 Etude bibliographique

L'huile essentielle de *M. aquatica* L. est caractérisée par la présence majoritaire du menthofurane (> 38%) en Italie, Croatie, Allemagne et USA (Avato *et al.*, 1995 ; Maffei, 1988 ; Bertoli *et al.*, 1997 ; Jerkovic et Mastelic, 2001 ; Sticher et Flück, 1968 ; Murray et Hefendehl, 1973) (**Tableau 2**). Ce composé est présent à des teneurs plus faibles en

Yougoslavie et Hollande (<20%) (Mimica-Dukic *et al.*, 2003 ; Lawrence, 1978) (**Tableau 3**). Nous citons les constituants caractéristiques des huiles essentielles de *M. aquatica* L. de huit origines différentes.

| Constituants | Allemagne | USA | Italie (1986) | Italie (1985) |
|-----------------------------|--------------------|-------------|---------------|---------------|
| myrcène | - | 1,3 | 1,5 | 2,0 |
| limonène | - | 4,9 | 5,8 | 6,8 |
| 1,8-cinéole | 2,1-7,8 | 7,7 | 8,1 | 7,3 |
| menthofurane | 70,0 - 89,0 | 66,4 | 59,7 | 50,7 |
| terpinèn-4-ol | - | - | 13,4 | 7,5 |
| (Z)- β -caryophyllène | - | 7,0 | - | - |
| germacrène D | - | - | 1,0 | 0,7 |
| viridiflorol | - | - | 3,5 | 0,8 |

| Constituants | Italie (1995) | Croatie (2001) | Italie (1997) | |
|-----------------------------|---------------|----------------|---------------|-------------|
| myrcène | 0,6 | 1,8 | 0,7 | 0,8 |
| limonène | 2,0 | - | 2,6 | 5,3 |
| 1,8-cinéole | 21,6 | 18,4 | 16,2 | 11,9 |
| menthofurane | 40,0 | 42,8 | 38,4 | 55,9 |
| terpinèn-4-ol | - | - | 0,2 | - |
| (E)- β -caryophyllène | - | 11,9 | 0,5 | 0,8 |
| germacrène D | - | - | 7,1 | 4,6 |
| viridiflorol | 0,1 | 3,4 | 7,6 | 4,2 |

Tableau 2 : Composition chimique d'huiles essentielles de *M. aquatica* à menthofurane majoritaire.

A coté du menthofurane, nous notons la présence à des teneurs importantes de viridiflorol, du 1,8-cinéole, du β -élémol, du β -caryophyllène, du germacrène D, de l'oxyde de caryophyllène et du terpinèn-4-ol (Lawrence, 2007). Le pourcentage élevé en sesquiterpènes (>12%) dans les huiles essentielles d'Italie (Bertoli *et al.*, 1997), de Yougoslavie (Mimica-Dukic *et al.*, 2003) (**Tableau 3**) et de Croatie (Jerkovic et Mastelic, 2001) (**Tableau 2**) permet de différencier ces huiles essentielles du bassin méditerranéen des autres.

La composition d'un échantillon provenant d'Iran est vraiment remarquable par l'absence totale de menthofurane ; le 1,8-cinéole (10,3%), l'oxyde de piperiténone (25,7%) et le β -caryophyllène (22,4%) étant les constituants majoritaires (Esmali *et al.*, 2006) (**Tableau 3**).

| Constituants | Japon | Yougoslavie | Hollande | Iran |
|-----------------------------|------------|-------------|-------------|------|
| myrcène | 1,1 - 6,6 | 1,6 | - | 0,7 |
| limonène | 1,4 - 5,7 | - | - | 3,6 |
| 1,8-cinéole | 4,0 - 8,3 | 14,2 | 23,5 | 10,3 |
| menthofurane | 2,8 - 45,5 | 16,9 | 8,1 | - |
| oxyde de pipériténone | - | | | 25,7 |
| β -caryophyllène* | | | | 22,4 |
| (Z)- β -caryophyllène | - | 7,1 | - | |
| (E)- β -caryophyllène | 2,9 - 6,7 | 9,4 | - | |
| germacrène D | 2,3 - 7,8 | | | 4,6 |
| β -élémol | 6,2 - 16,3 | | | - |
| viridiflorol | 4,5 - 11,4 | 6,3 | - | 7,5 |

* isomère non déterminé

Tableau 3 : Composition chimique d'huiles essentielles de *M. aquatica* provenant de différentes origines.

Nous nous proposons de déterminer la composition chimique de divers échantillons d'huile essentielle de *M. aquatica* L. de Corse. Un échantillon d'huile essentielle, commercialisée par un producteur local obtenue par entraînement à la vapeur des parties aériennes de différents plants poussant à l'état spontané, ainsi que 7 échantillons d'huiles essentielles de *M. aquatica* L. récoltée en Corse et obtenus par hydrodistillation avec un appareillage de type Clévenger. L'ensemble de ces échantillons a été analysé par combinaison de la CPG(Ir) et de la RMN du ^{13}C , alors que l'échantillon industriel a été analysé en plus par CPG-SM.

II.3 Composition chimique de l'huile essentielle commerciale de feuilles de *M. aquatica*

Dans ce chapitre, l'ensemble des constituants identifiés sont numérotés suivant leur ordre d'élution sur colonne apolaire. Ces mêmes numéros sont présents dans les **Tableaux 4, 5 et 6** donnant la composition chimique des huiles essentielles et extraits de chacun des plants de menthe étudiés.

L'analyse directe par RMN du ^{13}C de l'échantillon d'huile essentielle commerciale de *M. aquatica* nous a permis d'identifier vingt trois composés (vingt monoterpènes et trois sesquiterpènes) qui représentent 93,7% de la composition chimique globale (**Tableau 4**). Le couplage CPG-SM permet d'identifier un composé minoritaire (la *cis*-jasmone).

Cette huile essentielle est principalement composée de monoterpènes oxygénés, tels que, le menthofurane majoritaire **18** (50,7%) et le 1,8-cinéole **8** présent à une teneur

d'environ 6%. Le monoterpène oléfinique le plus important est le limonène (5,0%), les taux des autres monoterpènes hydrocarbonés n'excédant pas 2,1%. Enfin, la fraction sesquiterpénique est représentée par deux hydrocarbures, le germacrène D **31** (2,0%) et le (E)- β -caryophyllène **29** (2,6%) et un alcool, le viridiflorol **34** (2,9%).

Tout les composés identifiés étaient présents dans notre bibliothèque de spectres « Terpènes » constituée au laboratoire. Pour chacun de ces composés, tous les signaux des carbones ont été observés, à l'exception des carbones quaternaires de certains composés minoritaires (teneur inférieure ou égale à 0,7%) les variations de déplacements chimiques ($\Delta\delta$) de ces carbones par rapport aux valeurs de référence sont en général faibles ($\Delta\delta < 0,05$ ppm). De plus, pour tous les composés, le nombre de superpositions de pics est limité (inférieur ou égal à 5) et ne gêne en rien l'identification des constituants, puisque, même dans le cas le plus défavorable au moins la moitié des carbones appartiennent en propre à la molécule. Une fois identifiés par RMN du ^{13}C , les constituants sont aisément repérés sur le chromatogramme par leurs indices de rétention, sur colonne polaire et apolaire, ce qui permet de les quantifier (**Tableau 4**).

Au terme de cette analyse directe, près de 94% de la composition chimique de l'huile essentielle a été déterminée. Seuls demeurent non identifiés les constituants présents à des teneurs inférieures ou égales à 0,3%, à l'exception d'un composé avec une teneur d'environ 1%. Il nous est ainsi possible de relever sur les spectres de RMN du ^{13}C une série de dix raies de résonance appartenant selon toute vraisemblance à ce dernier constituant. Ainsi, afin de le concentrer, nous avons réalisé un fractionnement de cet échantillon d'huile essentielle.

| N° [♦] | Constituants | Ir ^a | Ir ^p | % ^a | RMN | SUP |
|-----------------|---------------------|-----------------|-----------------|----------------|---------|-----|
| 1 | α-pinène | 931 | 1026 | 2,2 | 10 / 10 | 5 |
| 2 | camphène | 945 | 1071 | 2,4 | 10 / 10 | 3 |
| 3 | sabinène | 965 | 1124 | 0,9 | 8 / 10 | 1 |
| 4 | β-pinène | 971 | 1114 | 1,6 | 10 / 10 | 0 |
| 5 | myrcène | 981 | 1163 | 0,9 | 8 / 10 | 2 |
| 6 | p-cymène | 1012 | 1272 | 0,3 | 4 / 7 | 0 |
| 7 | limonène | 1021 | 1205 | 5,3* | 10 / 10 | 3 |
| 8 | 1,8-cinéole | 1021 | 1213 | 5,9* | 7 / 7 | 2 |
| 9 | (Z)-β-ocimène | 1025 | 1235 | 0,7 | 8 / 10 | 1 |
| 10 | γ-terpinène | 1047 | 1243 | 0,3 | 8 / 10 | 3 |
| 13 | linalol | 1083 | 1545 | 1,2 | 10 / 10 | 4 |
| 15 | menthone | 1134 | 1466 | 2,6 | 10 / 10 | 3 |
| 17 | isomenthone | 1144 | 1495 | 1,3 | 10 / 10 | 3 |
| 18 | menthofurane | 1152 | 1485 | 50,7* | 10 / 10 | 4 |
| 20 | bornéol | 1152 | 1704 | 3,5* | 10 / 10 | 2 |
| 21 | menthol | 1160 | 1639 | 1,7 | 10 / 10 | 3 |
| 22 | terpinèn-4-ol | 1163 | 1601 | 0,4 | 8 / 10 | 3 |
| 23 | α-terpinéol | 1172 | 1699 | 0,6 | 9 / 10 | 1 |
| 24 | pulégone | 1218 | 1651 | 2,3 | 10 / 10 | 1 |
| 25 | acétate de bornyle | 1269 | 1580 | 0,5 | 9 / 12 | 4 |
| 29 | (E)-β-caryophyllène | 1420 | 1596 | 2,9 | 15 / 15 | 3 |
| 31 | germacrène-D | 1478 | 1711 | 2,0 | 15 / 15 | 2 |
| 34 | viridiflorol | 1584 | 2085 | 3,5 | 15 / 15 | 4 |
| Total | | | | 93,7 | | |

RMN : nombre de carbones observés dans le spectre de RMN-¹³C par rapport au nombre de pics attendus. SUP : nombre de superpositions. L'ordre d'élution est donné sur colonne apolaire. Ir^a et Ir^p : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et polaire (BP20). %^a : pourcentages mesurés sur colonne apolaire, excepté les pourcentages suivis d'un astérisque (colonne polaire). ♦ : numérotation associée à chaque constituant faisant référence au **Tableau 6**.

Tableau 4 : Composés identifiés par RMN du ¹³C dans l'huile essentielle de *M. aquatica*.

II.3.1 Analyse détaillée après fractionnement de l'huile essentielle de *M. aquatica*

Nous avons soumis 2 g d'huile essentielle à un fractionnement sur colonne ouverte de gel de silice de type « flash » (200-500 μm). La fraction F2 oxygénée a de nouveau été chromatographiée sur colonne ouverte avec de la silice plus fine (63-200 μm) : trois fractions (F2-1 à F2-3) sont alors obtenues (**Figure 9**). Toutes ces fractions ont été analysées par RMN du ¹³C et CPG(Ir).

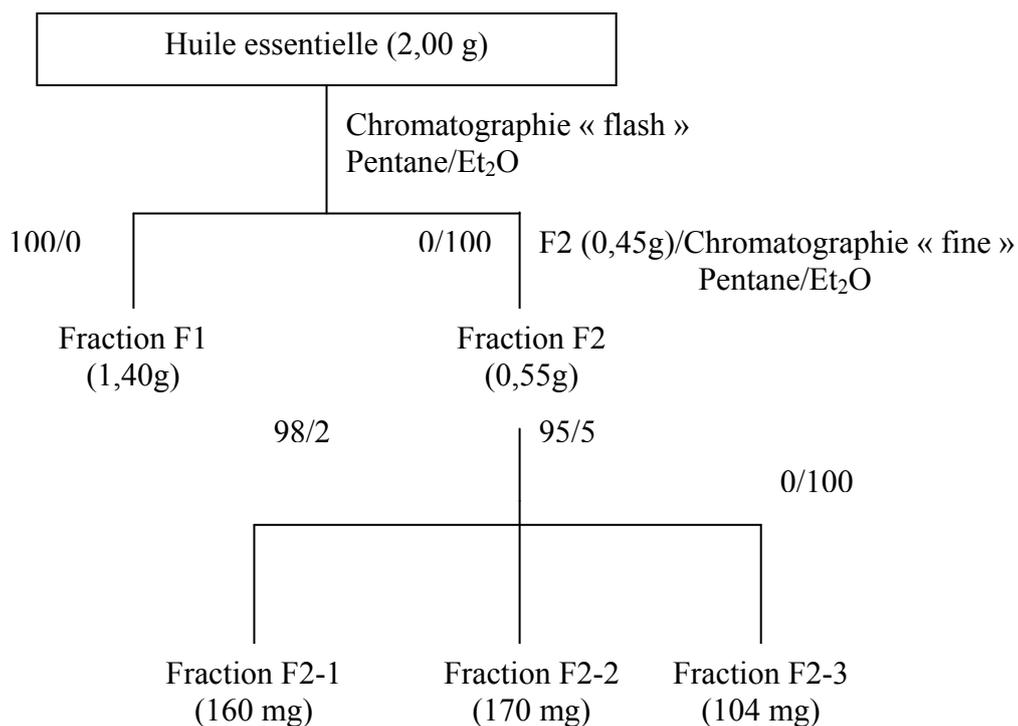


Figure 9 : Schéma de fractionnement de l'huile essentielle de *M. aquatica*.

- **Etude de la fraction hydrocarbonée**

L'étude du spectre de RMN du ^{13}C de la fraction F1 ne nous permet pas d'identifier de composés oléfiniques supplémentaires. En revanche, on constate la présence inattendue du menthofurane **18**. En effet, cet oxyde bicyclique ultra majoritaire dans l'huile essentielle est élué directement au pentane, en raison probablement de sa très faible polarité.

- **Etude des fractions oxygénées**

Le fractionnement de l'huile essentielle a permis de mettre en évidence douze composés oxygénés supplémentaires identifiés, pour la plupart dans la fraction F2-3 (**Tableau 5**). Il s'agit de i) cinq alcools monoterpéniques (lyratol **16**, néomenthol **19**, *cis*-hydrate de sabinène **12**, *trans*-hydrate de sabinène **11**, *trans*-vérbenol **14**), ii) d'un alcool sesquiterpénique (α -cadinol **35**) et iii) d'une cétone (*cis*-jasmone **28**), ainsi que des cinq lactones parmenthaniques. Il est à noter que les cinq lactones ont été identifiées à partir de notre bibliothèque « Littérature ». Il s'agit de quatre lactones isomères, stéréoisomères deux à deux :

- (mintlactone **30** 23,5% / isomintlactone **32** 2,5% et menthofurolactone **26** 0,6% / épimenthofurolactone **27** 0,8%)
- et une hydroxy lactone (hydroxy-mintlactone **33** 3,1%), dont les données spectrales sont décrites dans le paragraphe **II.4** « Identification des lactones p-menthaniques ».

Ainsi le constituant présent à 1% dans l'huile essentielle est l'une de ces cinq lactones p-menthaniques puisqu'il s'agit de la mintlactone **30**. Par ailleurs, l'identification du lyratol, monoterpène irrégulier, présent dans les huiles essentielles de la famille des *Asteraceae* (santoline, armoise), doit être soulignée (Liu *et al.*, 2007).

| N° [♦] | constituants | pentane / oxyde de diéthyle | | | | | |
|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------|------|------|------|-------|
| | | Ir ^a | Ir ^p | F2 | 98/2 | 95/5 | 100/0 |
| 8 | 1,8-cinéole | 1021 | 1213 | 17,3 | 20 | - | - |
| 11 | <i>trans</i> -hydrate de sabinène | 1053 | 1461 | - | - | - | 0,9 |
| 12 | <i>cis</i> -hydrate de sabinène | 1083 | 1545 | - | - | - | 1,1 |
| 13 | linalol | 1083 | 1545 | 5,2 | - | 9 | - |
| 14 | <i>trans</i> -vérbenol | 1128 | 1677 | - | - | - | 1,1 |
| 15 | menthone | 1134 | 1466 | 8 | 18 | - | - |
| 16 | lyratol | 1139 | 1776 | - | - | - | 3,7 |
| 17 | isomenthone | 1144 | 1495 | 5,4 | 14 | - | - |
| 19 | néo-menthol* | 1152 | 1596 | 0,5 | - | 1,1 | 0,4 |
| 20 | bornéol* | 1152 | 1704 | 15,6 | - | 34,1 | 20,5 |
| 21 | menthol | 1158 | 1639 | 7,7 | - | 18,5 | 1,6 |
| 22 | terpinèn-4-ol | 1163 | 1601 | 1,4 | - | 3 | - |
| 23 | α -terpinéol | 1172 | 1699 | 2,9 | - | - | 14,6 |
| 24 | pulégone | 1215 | 1649 | 10 | 27 | 0,8 | - |
| 25 | acétate de bornyle | 1269 | 1580 | 1,7 | 4,5 | - | - |
| 26 | menthofurolactone | 1315/1317 | nd | - | - | - | 0,6 |
| 27 | épi-menthofurolactone | | nd | - | - | - | 0,8 |
| 28 | <i>cis</i> -jasmone | 1366 | 1946 | - | - | - | 5,6 |
| 30 | mintlactone | 1453 | 2323 | 2,7 | - | - | 23,5 |
| 32 | isomintlactone | 1487 | 2498 | - | - | - | 2,5 |
| 33 | hydroxy-mintlactone | 1514 | nd | - | - | - | 3,1 |
| 34 | viridiflorol | 1584 | 2089 | 9,1 | - | 24,4 | 0,8 |
| 35 | α -cadinol | 1639 | 2234 | - | - | - | 1,5 |

L'ordre d'élution est donné sur colonne apolaire. Ir^a et Ir^p : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et polaire (BP20). %^a : pourcentages mesurés sur colonne apolaire, excepté les pourcentages suivis d'un astérisque (colonne polaire). nd : indices de rétention non défini. ♦ : numérotation associée à chaque constituant faisant référence au **Tableau 6**.

Tableau 5 : Composés identifiés par RMN du ¹³C dans les fractions oxygénées de l'huile essentielle commerciale de *M. aquatica*.

Nous identifions 35 composés qui représentent 97.0% de la composition globale de l'huile essentielle (**Tableau 6**).

| N° | Constituants | Ir ^a | Ir ^p | % a | identification |
|---------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|------|-----------------------------|
| 1 | α -pinène | 931 | 1026 | 2,2 | Ir, MS, ¹³ C NMR |
| 2 | camphène | 945 | 1071 | 2,4 | Ir, MS, ¹³ C NMR |
| 3 | sabinène | 966 | 1124 | 0,9 | Ir, MS, ¹³ C NMR |
| 4 | β -pinène | 971 | 1114 | 1,6 | Ir, MS, ¹³ C NMR |
| 5 | myrcène | 981 | 1163 | 0,9 | Ir, MS, ¹³ C NMR |
| 6 | p-cymène | 1012 | 1273 | 0,3 | Ir, MS, ¹³ C NMR |
| 7 | limonène | 1021 | 1205 | 5,3* | Ir, MS, ¹³ C NMR |
| 8 | 1,8-cinéole | 1021 | 1213 | 5,9* | Ir, MS, ¹³ C NMR |
| 9 | (Z)- β -ocimène | 1025 | 1235 | 0,7 | Ir, ¹³ C NMR |
| 10 | γ -terpinène | 1049 | 1247 | 0,3 | Ir, ¹³ C NMR |
| 11 | <i>trans</i> -hydrate de sabinène | 1053 | 1461 | 0,2 | Ir, ¹³ C NMR |
| 12 | <i>cis</i> -hydrate de sabinène* | 1083 | 1545 | 2,1 | Ir, ¹³ C NMR |
| 13 | linalol* | 1083 | 1545 | | Ir, ¹³ C NMR |
| 14 | <i>trans</i> -verbénol | 1128 | 1677 | tr | Ir, ¹³ C NMR |
| 15 | menthone | 1134 | 1466 | 2,6 | Ir, MS, ¹³ C NMR |
| 16 | lyratol | 1139 | 1776 | tr | Ir, ¹³ C NMR |
| 17 | isomenthone | 1144 | 1495 | 1,3 | Ir, MS, ¹³ C NMR |
| 18 | menthofurane* | 1152 | 1490 | 50,7 | Ir, MS, ¹³ C NMR |
| 19 | néo-menthol* | 1152 | 1596 | tr | Ir, ¹³ C NMR |
| 20 | bornéol* | 1152 | 1704 | 3,5 | Ir, MS, ¹³ C NMR |
| 21 | menthol | 1158 | 1639 | 1,7 | Ir, ¹³ C NMR |
| 22 | terpinèn-4-ol | 1163 | 1601 | 0,4 | Ir, MS, ¹³ C NMR |
| 23 | α -terpinéol | 1172 | 1699 | 0,6 | Ir, MS, ¹³ C NMR |
| 24 | pulégone | 1215 | 1649 | 2,3 | Ir, MS, ¹³ C NMR |
| 25 | acétate de bornyle | 1269 | 1580 | 0,5 | Ir, MS, ¹³ C NMR |
| 26 | menthofuro lactone | 1315/1317 | nd | 0,3 | Ir, ¹³ C NMR |
| 27 | épi-menthofuro lactone | | | 0,3 | Ir, ¹³ C NMR |
| 28 | <i>cis</i> -jasmone | 1366 | 1946 | 0,2 | Ir, MS, ¹³ C NMR |
| 29 | (E)- β -caryophyllène | 1420 | 1596 | 2,9 | Ir, ¹³ C NMR |
| 30 | mintlactone | 1453 | 2323 | 1,6 | Ir, ¹³ C NMR |
| 31 | germacrène D | 1478 | 1711 | 2,0 | Ir, MS, ¹³ C NMR |
| 32 | isomintlactone | 1487 | nd | 0,3 | Ir, ¹³ C NMR |
| 33 | hydroxy-mintlactone | 1514 | nd | 0,3 | Ir, ¹³ C NMR |
| 34 | viridiflorol | 1584 | 2089 | 3,5 | Ir, MS, ¹³ C NMR |
| 35 | α -cadinol | 1639 | 2234 | 0,1 | Ir, ¹³ C NMR |
| Total : | | | | 97,0 | |

L'ordre d'éluion est donné sur colonne apolaire. Ir^a et Ir^p : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et polaire (BP20). %^a : pourcentages mesurés sur colonne apolaire, excepté les pourcentages suivis d'un astérisque (colonne polaire). nd : indices de rétention non défini.

Tableau 6 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha aquatica* commerciale de Corse.

II.4 Identification des lactones p-menthaniques

Dans ce paragraphe, nous apportons une attention particulière aux molécules absentes de notre bibliothèque « Terpènes » et qui ont été identifiées à partir de notre bibliothèque « Littérature ». Nous présentons pour chaque molécule la structure, l'attribution des déplacements chimiques de chaque carbone observé dans la fraction dans laquelle la proportion du composé est la plus importante. Par ailleurs, dans certain cas litigieux, une séquence appropriée (« spin-echo ou écho de spin ») a été réalisée pour vérifier la multiplicité des différents atomes de carbone.

II.4.1 La menthofurolactone et l'épi-menthofurolactone

Les valeurs de déplacements chimiques de la menthofurolactone et de son diastéréoisomère l'épi-menthofurolactone observées dans la fraction F2-3 (respectivement 0,6 et 0,8%) de l'huile essentielle de *M. aquatica* sont conformes à celles publiées par Frérot *et al.*, (2002) (**Figure 10**). Il nous est possible de confirmer la présence d'un ou des deux épimères, cependant les quantités de produit ne sont pas assez importantes pour différencier et caractériser les deux composés. Le spectre masse en mode Impact Electronique (IE) de ces deux épimères est donné en **Annexe 1 et 2** p 188

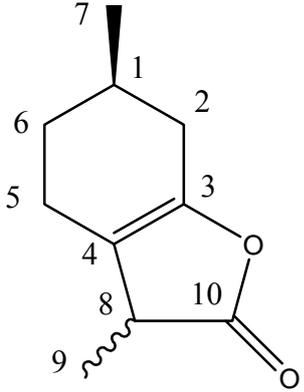
| | δ (ppm) | | |
|---|------------------------|---------------|---------------|
| | Frérot <i>et al.</i> , | 26/27 | |
|  | 10 | 180,60/180,50 | 180,79/180,70 |
| | 3 | 148,40 | 148,39 |
| | 4 | 115,30 | 115,39 |
| | 8 | 41,10/40,70 | 41,11/40,71 |
| | 2 | 30,60/30,40* | 30,54/30,37* |
| | 6 | 30,13/30,08* | 30,09/30,04* |
| | 1 | 29,16/29,11 | 29,13/29,08 |
| | 5 | 21,30 | 21,31 |
| | 7 | 20,70/20,50 | 20,65/20,50 |
| | 9 | 14,20 | 14,17/14,14 |

Figure10 : Structure et déplacements chimiques de de la menthofurolactone et de son stéréoisomère **26 /27** décrits dans la littérature (Frérot *et al.*, 2002) et observés dans la fraction F2-3 de l'huile essentielle de *M. aquatica*.

II.4.2 La mintlactone et l'isomintlactone

Les valeurs de déplacements chimiques de la mintlactone et de l'isomintlactone observées dans la fraction F2-3 (respectivement 23,5 et 2,5%) de l'huile essentielle de *M. aquatica*, sont conformes à celles publiées d'une part, par Crisp et Meyer (1995) et d'autre part, par Schenk *et al.*, (1992) (**Figure 11**). L'ensemble des déplacements chimiques des carbones de ces deux composés a été observé. Les séries de déplacements chimiques sont conformes à celles de littérature même si on observe des écarts importants pour les carbones de la fonction lactone pour les deux molécules.

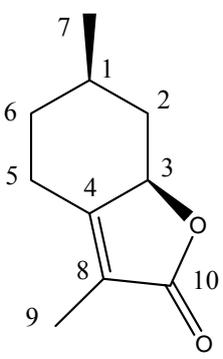
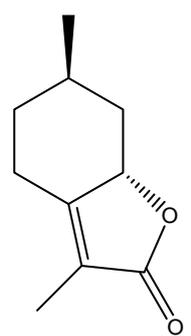
| | δ (ppm) | | δ (ppm) | |
|---|----------------------|----------------|---------|--------|
| | Schenk <i>et al.</i> | Crisp et Meyer | 30 | |
|  | 10 | 174,86 | 174,9 | 175,17 |
| | 4 | 162,32 | 162,3 | 162,43 |
| | 8 | 119,56 | 119,5 | 119,59 |
| | 3 | 79,92 | 79,9 | 80,00 |
| | 2 | 41,94 | 41,9 | 42,00 |
| | 6 | 34,51 | 34,5 | 34,56 |
| | 1 | 29,75 | 29,7 | 29,80 |
| | 5 | 25,44 | 25,4 | 25,48 |
| | 7 | 21,24 | 21,2 | 21,26 |
| | 9 | 8,20 | 8,2 | 8,20 |
|  | δ (ppm) | | δ (ppm) | |
| | Schenk <i>et al.</i> | | 32 | |
| | 10 | 174,96 | 173,03 | |
| | 4 | 163,00 | 162,93 | |
| | 8 | 119,36 | 119,30 | |
| | 3 | 77,48 | 77,69 | |
| | 2 | 39,57 | 39,57 | |
| | 6 | 31,68 | 31,65 | |
| | 1 | 27,34 | 27,35 | |
| 5 | 21,76 | 21,79 | | |
| 7 | 17,26 | 17,25 | | |
| 9 | 8,17 | 8,17 | | |

Figure 11 : structures et déplacements chimiques de la mintlactone 30 et l'isomintlactone 32 décrits dans la littérature (Schenk *et al.*, 1967) et (Crisp et Meyer, 1995) et observés dans la fraction F2-3 de l'huile essentielle de *M. aquatica*.

II.4.3 L'hydroxymintlactone

Les valeurs des déplacements chimiques de RMN du ^{13}C de l'hydroxymintlactone **33** observées dans l'huile essentielle de *M. aquatica* et dans la fraction F2-3 de l'huile essentielle de *M. aquatica* sont conformes à celles publiées par Frérot *et al.*, 2002 (**Figure 12**).

| N° | δ (ppm) | δ (ppm) |
|----|----------------------|----------------|
| | Frérot <i>et al.</i> | 33 |
| 10 | 172,8 | 172,72 |
| 4 | 160,8 | 160,80 |
| 8 | 121,1 | 120,98 |
| 3 | 103,7 | 103,76 |
| 2 | 45,9 | 45,94 |
| 5 | 35,1 | 35,05 |
| 1 | 29,2 | 29,16 |
| 6 | 24,4 | 24,38 |
| 7 | 21,1 | 21,10 |
| 9 | 8,1 | 8,12 |

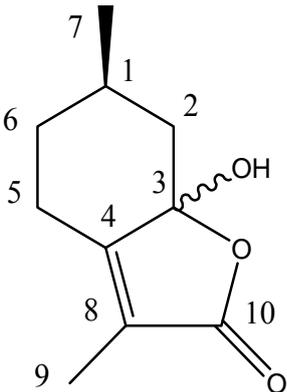


Figure 12 : structure et déplacements chimiques de l'hydroxy-mintlactone **33** décrits dans la littérature (Frérot *et al.*, 2002) et observés l'huile essentielle de *M. aquatica*.

L'utilisation de la RMN du ^{13}C , selon la méthode développée au laboratoire, s'est révélée particulièrement intéressante dans l'identification de ces lactones p-menthaniques. Leurs structures diffèrent l'une de l'autre soit :

- par la stéréochimie d'un méthyle ou d'une jonction de cycle
- par la position d'une double liaison
- ou par la présence d'un groupement hydroxyle supplémentaire.

Nous avons pu vérifier que la moindre modification structurale se traduit, en RMN du ^{13}C , par une variation plus ou moins importante mais mesurable des déplacements chimiques de pratiquement tous les carbones d'une molécule. Ainsi, même à des teneurs comparables, l'identification de ces cinq lactones p-menthaniques en mélange n'a posé aucun problème.

II.5 Étude de la variabilité chimique des huiles essentielles de *M. aquatica*

Dans le but de mettre en évidence une éventuelle variabilité chimique, nous avons analysé 7 échantillons d'huile essentielle préparés à partir de parties aériennes. Ceux-ci proviennent

de différentes localisations (Castagniccia, Bavella, Bocognano, Ospedale, Porto, région ajaccienne). Nous avons récolté le matériel végétal durant les mois de Juin-Octobre en 2008 et 2009. Le matériel végétal frais a été hydrodistillé pendant 4 heures dans un appareil de type Clévenger. Les rendements en huile essentielle, calculés par rapport à la masse de matériel végétal frais, sont compris entre 0,25-0,43%.

Sur l'ensemble des échantillons, nous avons identifié 35 constituants qui représentent de 95,6% à 98,3% de la composition globale, nous avons choisi de représenter dans le **Tableau 7** les constituants dont la teneur est au moins une fois supérieure à 1,0%. Les échantillons de population préparés par hydrodistillation et celui de l'huile commerciale (échantillon n°2) présentent des compositions chimiques qualitativement et quantitativement proches. Dans l'huile essentielle produite industriellement 35 constituants sont identifiés tandis que 32 sont trouvés dans les huiles produites au laboratoire. La composition chimique des échantillons est caractérisée par la prédominance du menthofurane **18** (50,7-72,9%), associé au 1,8-cinéole **8** (0,1-11,6%), au bornéol **20** (0,3-12,6%) et à la menthone **15** (0,1-8,6%). Les cinq lactones p-menthaniques qui ont été trouvées dans l'échantillon commercial sont aussi présentes dans les huiles essentielles distillées au laboratoire.

| Constituants | Ir ^a | Ir ^P | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-------------------------|-----------------|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| α-pinène | 931 | 1026 | 1,8 | 2,2 | 0,9 | 2,4 | 1,6 | 1,9 | 0,7 | 0,7 |
| camphène | 945 | 1071 | 3,4 | 2,4 | 1,5 | 3,6 | 2,1 | 2,0 | 0,7 | 0,7 |
| β-pinène | 971 | 1114 | 0,6 | 1,6 | 0,5 | 1,3 | 1,0 | 1,7 | 0,5 | 0,5 |
| limonène | 1021* | 1205 | 6,4 | 5,3 | 5,1 | 2,8 | 4,0 | 4,2 | 3,6 | 1,7 |
| 1,8-cinéole | 1021* | 1213 | 3,5 | 5,9 | 3,6 | 5,1 | 5,2 | 11,6 | tr | 0,1 |
| cis hydrate de sabinène | 1083* | 1546 | 1,6 | 1,2 | 1,6 | 1,7 | 1,2 | 0,7 | 1,3 | 1,1 |
| linalol | 1083* | 1545 | 1,6 | 1,2 | 1,6 | 1,7 | 1,2 | 0,7 | 1,3 | 1,1 |
| menthone | 1134 | 1466 | 4,2 | 2,6 | 4,5 | 5,6 | 3,8 | 2,0 | 4,1 | 4,3 |
| isomenthone | 1144 | 1495 | - | 1,3 | 1,1 | 0,3 | 1,2 | - | 2,4 | 0,7 |
| menthofurane | 1152* | 1490 | 47,5 | 50,7 | 55,7 | 57,7 | 58,8 | 59,2 | 67,0 | 72,9 |
| bornéol | 1152* | 1704 | 8,4 | 3,5 | 5,5 | 9,4 | 4,0 | 0,3 | 1,5 | 0,6 |
| menthol | 1158 | 1639 | 0,5 | 1,7 | 3,3 | 1,2 | 2,4 | 0,4 | 4,7 | 5,9 |
| pulégone | 1215 | 1649 | 1,7 | 2,3 | 2,6 | 1,1 | 1,6 | 3,1 | 0,7 | 0,7 |
| (E)-β-caryophyllène | 1420 | 1594 | 2,6 | 2,9 | 1,6 | 0,5 | 2,0 | - | 2,5 | 1,3 |
| mintlactone | 1453 | 2323 | 0,1 | 1,6 | 1,1 | 0,3 | 0,7 | 2,8 | tr | 0,1 |
| germacrène D | 1478 | 1711 | 3,2 | 2,0 | 1,7 | 0,5 | 1,4 | 0,8 | 1,5 | 0,6 |
| viridiflorol | 1584 | 2089 | 4,8 | 3,5 | 1,9 | 0,6 | 2,0 | - | 2,0 | 1,2 |
| Total | | | 90,3 | 90,7 | 92,2 | 94,1 | 93,0 | 90,7 | 93,2 | 93,1 |

L'ordre d'éluion est donné sur colonne apolaire. Ir^a et Ir^P: indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et polaire (BP20).le pourcentages est mesurés sur colonne apolaire, excepté les pourcentages suivis d'un astérisque (colonne polaire). 1 : Bocognano, 2 : échantillon industriel, 3 Ospedale, 4 Castagniccia, 5 Bavella, 6 Bocognano, 7 Porto, 8. région ajaccienne.

Tableau 7 : Composés identifiés par RMN du ¹³C dans les huiles essentielles de *Mentha aquatica* obtenues par entrainement à la vapeur et hydrodistillation.

III. *MENTHA PULEGIUM*

III.1 Aspects botaniques

M. pulegium, très répandue dans l'aire méditerranéenne, est connue sous le nom de « menthe pouliot ». Elle est fréquente dans les milieux humides et elle est parfois cultivée comme plante condimentaire pour ses feuilles très aromatiques. Le nom de « pouliot » vient du latin *pulegium*, qui dérive de *pulex* : la puce ; la plante ayant la propriété d'éloigner les puces. Malgré son utilisation ancestrale pour aromatiser les sauces, les desserts et les boissons, son intérêt économique demeure limité.

Les feuilles, opposées, petites, sont ovales presque entières (légèrement dentelées) et munies d'un court pétiole. Les fleurs, qui apparaissent l'été, de juillet à fin septembre, sont rose lilas, parfois blanches échelonnées le long de la tige. C'est une espèce spontanée dans l'ensemble de l'Europe, l'Asie, l'Amérique et le nord de l'Afrique (du Maroc à l'Égypte). En France, cette plante est très commune jusqu'à 1800m d'altitude. (Gamisans et Jeanmonod, 1993).



Figure 13 : *Mentha pulegium* L.

III.2 Etude bibliographique

La composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* L. a fait l'objet de nombreuses publications. Elle est caractérisée par la présence majoritaire de cétones possédant un squelette menthanique. En effet, les compositions décrites sont dominées soit par la pulégone 80,3% au Maroc (Bouchra *et al.*, 2003), 65,9-83,1% en Inde (Agnihotri *et al.*, 2005), 73,4% en Uruguay (Lorenzo *et al.*, 2002) et 43,5% en Egypte (El-Ghorab, 2006); soit par la pipériténone 83,7-97,2% en Grèce (Kokkini *et al.*, 2002) ou encore la pipéritone 70,0% en Autriche (Zwaving et Smith, 1971) (**Tableau 8**).

| constituants | Maroc | Inde Hymalaya | Egypte | Uruguay | Autriche | Grèce |
|-----------------|-------|---------------|--------|---------|----------|-----------|
| menthone | 0,3 | 8,3-8,7 | - | 3,6 | 8,0 | - |
| isomenthone | - | 3,8-4,0 | - | 12,9 | - | - |
| cis-isopulégone | - | - | - | 1,4 | - | - |
| menthol | 0,7 | - | - | 0,1 | - | - |
| néomenthol | - | - | - | - | - | - |
| pulégone | 80,3 | 65,9-83,1 | 43,5 | 73,4 | - | - |
| pipéritone | 0,9 | 1,3-3,2 | 12,2 | 0,1 | 70,0 | - |
| pipériténone | - | - | - | 0,9 | - | 83,7-97,2 |

Tableau 8 : Composition chimique d'huiles essentielles de la littérature de différentes origines.

Les autres compositions chimiques (**Tableau 9**) résultent de l'association de la pulégone avec :

- la pipériténone au Portugal 35,1/27,4% (Mata *et al.*, 2007), en Bulgarie 27,2-49,7/19,4-57,7% (Stoyanova *et al.*, 2005) et en Grèce 32,8-75,8/5,1-35,0% (Cook *et al.*, 2000),
- l'isomenthone en Suisse 20,0-34,6/18,9-42,1% (Sticher et Flück, 1968), en Grèce 32,8-75,8/4,3-28,6% (Kokkini *et al.*, 2004) et en Turquie 32,1-43,8/41,7-52,0% (Başer *et al.*, 1999),
- la menthone en Iran 37,8-20,3% (Aghel *et al.*, 2004), en Turquie 26,6-57,3/ 25,1-59,1% (Başer *et al.*, 1999) et au Japon 50,5/26,4% (Fujita et Fujita, 1967).

Il est à noter que des extraits, obtenus par macération à l'hexane à partir de plants récoltés en Tunisie, possèdent une composition très proche des huiles essentielles décrites ci dessus. La pulégone (17,5-70,2%) et l'isomenthone (2,9-34,2%) sont les principaux constituants (Mkaddem *et al.*, 2007).

| Constituants | Grèce | Bulgarie | Grèce | Turquie | Japon |
|-------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------|
| menthone | 0,1-2,8 | 1,1-5,8 | 2,2-8,8 | 25,1-59,1 | 26,4 |
| isomenthone | 4,3-28,6 | 3,8-14,3 | 7,5-20,5 | - | - |
| <i>cis</i> -isopulégone | - | 3,8-14,3 | tr-0,1 | - | - |
| menthol | tr-1,4 | tr-1,8 | - | - | - |
| pulégone | 32,8-75,8 | 27,2-49,7 | 40,8-53,7 | 26,6-57,3 | 50,5 |
| pipéritone | 0,5-5,2 | 5,1-6,5 | 2,0-11,4 | - | - |
| pipériténone | 5,1-35,0 | 19,4-57,7 | 3,9-10,6 | - | - |

| Constituants | Turquie | Iran | Portugal | Suisse | Turquie | Iran |
|--------------|------------------|-------------|-------------|------------------|-------------|-------------|
| menthone | - | 20,3 | - | 1,4-4,4 | 36,4 | 3,0 |
| isomenthone | 41,7-52,0 | - | - | 18,9-42,1 | - | - |
| néomenthol | - | - | - | - | 19,0 | - |
| pulégone | 32,1-43,8 | 37,8 | 35,1 | 20,0-34,6 | 25,2 | 2,3 |
| piperitone | - | - | - | tr-0,8 | - | 38,0 |
| piperiténone | - | 6,8 | 27,4 | - | - | 33,0 |

Tableau 9 : Composition chimique d'huiles essentielles provenant de différentes origines.

III.3 Composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de *M. pulegium*

Nous avons analysé par combinaison de la CPG(Ir) et de la RMN du ^{13}C , six échantillons de population obtenus par hydrodistillation durant 4h avec un appareillage de type Clévenger à partir de matériel végétal récoltés sur six sites (Asco, Bocognano, Campo, Cervione, Morosaglia, Sari d'Orcino). Le rendement en huile essentielle calculé en fonction de la masse de végétal préfané varie de 0,62 à 0,84%.

Deux échantillons de population (collectif) ont été fournis par un producteur installé en Corse et obtenus par entraînement à la vapeur dans un appareil industriel (cuve de 3000 L). Cette huile essentielle a été obtenue à partir des parties supérieures du végétal récolté dans la région de Cargèse. Ces échantillons ont été analysés par combinaison de la CPG(Ir), du couplage CPG-SM et de la RMN du ^{13}C .

A titre d'exemple pour l'échantillon 1 (Industriel), les monoterpènes oxygénés sont les constituants majoritaires puisqu'ils représentent près de 95% de la composition chimique. A partir du spectre de RMN du ^{13}C de l'huile essentielle et par consultation de la banque « Terpènes », nous avons identifié 8 composés : la pulégone **15** (87,7%), la pipériténone **17** (2,9%), la menthone **9** (1,7%), le limonène **8** (1,5%), l'octan-3-ol **5** (1,1%), l'isomenthone **10** (0,6%), le menthofurane **11** (0,7%) et la *cis*-isopulégone **12** (0,6%) (**Tableau 10**). Pour

chacun de ces composés, tous les signaux des carbones ont été observés, à l'exception des carbones quaternaires de certains composés minoritaires (teneur inférieure ou égale à 0,7%). Les variations de déplacements chimiques ($\Delta\delta$) de ces carbones par rapport aux valeurs de référence sont en général faibles ($\Delta\delta < 0,05$ ppm). De plus, pour tous les composés, le nombre de superpositions de pics est limité (inférieur ou égal à 3) et ne gêne en rien l'identification des constituants, puisque, même dans le cas le plus défavorable au moins la moitié des carbones appartiennent en propre à la molécule. Une fois identifiés par RMN du ^{13}C , les constituants sont aisément repérés sur le chromatogramme par leurs indices de rétention, sur colonne polaire et apolaire, ce qui permet de les quantifier (**Tableau 10**). Le couplage CPG-SM a permis l'identification de quatre constituants minoritaires l'oct-1-èn-3-ol **2**, le sabinène **3**, le 1,8-cinéole **7** et le germacrène D **22**.

Nous avons ensuite analysé les six échantillons hydrodistillés au laboratoire. L'ensemble de ces huiles essentielles est caractérisé par la présence majoritaire de monoterpènes oxygénés (89,7-95,6%) et plus précisément de cétones à squelette p-menthanique (85,6-95,5%). Onze composés ont été identifiés par RMN du ^{13}C par consultation directe de la banque « Terpènes ». Ces constituants ont aisément été repérés sur le chromatogramme par leurs indices de rétention sur colonne apolaire et polaire. Les composés minoritaires ne sont pas identifiés dans l'ensemble des échantillons si leurs teneurs sont inférieures à un seuil voisin de 0,4%. Nous nous sommes alors référés à leurs indices de rétention sur colonne apolaire et polaire. Il s'agit par exemple de la carvone **16** identifiée par RMN du ^{13}C (1,8%) dans l'échantillon n°6, mais qui ne dépasse pas 0,2% dans les autres huiles essentielles. Nous citerons aussi le cas de l'oxyde de pipériténone **18** qui atteint 5,5% dans l'échantillon n°7 mais qui est présent à des teneurs inférieures à 0,4% dans les échantillons.

L'examen du chromatogramme des deux échantillons (1 et 2) d'huiles essentielles produites industriellement permet d'observer que les différences qualitatives et quantitatives sont très faibles. En effet, nous pouvons noter que les plus grosses variations sont observées pour l'isomenthone (0,6/2,2 %), la *trans*-isopulégone (0,1/0,8 %) et le menthofurane (0,7/0,0 %). Par contre la teneur en pulégone pour les six échantillons «laboratoire» varie de manière plus sensible passant de 50,5% dans l'échantillon 8 à 90,0% dans l'échantillon 3. La menthone atteint des valeurs remarquables dans les échantillons 8 et 7 (respectivement 12,3% et 16,9%). De la même manière l'isomenthone atteint 20,7% dans l'échantillon 8. Ce dernier échantillon présente une composition chimique originale pour les huiles essentielles de

Mentha pulegium. En effet, la présence de la pulégone dans ces huiles essentielles ne constitue pas une originalité mais l'association de ce constituant avec à la fois, la menthone et l'isomenthone dans une huile essentielle de *M. pulegium* n'a jamais été décrite dans la littérature.

| Constituants | Ir ^a | Ir ^p | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1 α -pinène | 932 | 1024 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,5 | 0,3 | 0,5 | 0,2 | 0,3 |
| 2 oct-1-èn-3-ol | 959 | 1447 | 0,1 | 0,1 | - | - | - | 0,3 | 0,3 | - |
| 3 sabinène | 965 | 1122 | tr | - | 0,1 | 0,1 | - | 0,4 | 0,2 | 0,2 |
| 4 β -pinène | 972 | 1108 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | - | - | 0,2 |
| 5 octan-3-ol | 977 | 1398 | 1,1 | 1,4 | 1,5 | 1,3 | 1,5 | 2,0 | 1,5 | 1,4 |
| 6 myrcène | 980 | 1195 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | - | - | - | - |
| 7 1,8-cinéole | 1020 | 1211 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | - | - |
| 8 limonène | 1024 | 1207 | 1,5 | 0,9 | 0,6 | 0,6 | 0,8 | 1,1 | - | 0,3 |
| 9 menthone | 1134 | 1473 | 1,7 | 1,0 | 0,5 | 1,8 | 1,2 | 3,9 | 16,9 | 12,3 |
| 10 isomenthone | 1143 | 1501 | 0,6 | 2,2 | 1,3 | 0,9 | 3,2 | 8,4 | 4,6 | 20,7 |
| 11 menthofurane | 1147 | 1485 | 0,7 | - | - | 0,9 | - | - | - | 0,1 |
| 12 <i>cis</i> -isopulégone* | 1149 | 1572 | 0,6 | 0,6 | 0,2 | 0,6 | 0,5 | 1,0 | 0,7 | 0,8 |
| 13 <i>trans</i> -isopulégone* | 1149 | 1583 | 0,1 | 0,8 | 1,3 | - | 0,7 | - | - | 0,2 |
| 14 terpinèn-4-ol | 1162 | 1590 | - | - | - | - | - | - | - | 0,3 |
| 15 pulégone | 1221 | 1651 | 87,7 | 88,1 | 90,0 | 89,9 | 87,2 | 75,0 | 61,1 | 50,5 |
| 16 carvone | 1229 | 1739 | - | - | - | 0,2 | - | 0,1 | 0,0 | 1,8 |
| 17 pipériténone | 1309 | 1927 | 2,9 | 2,0 | 2,2 | 0,8 | 1,5 | 2,4 | 2,3 | 2,3 |
| 18 oxyde de pipériténone | 1330 | 1945 | - | - | - | - | - | tr | 5,5 | 0,4 |
| 19 <i>cis</i> -jasmone | 1367 | 1963 | - | - | - | - | - | tr | tr | 0,3 |
| 20 (E)- β -caryophyllène | 1417 | 1594 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,2 | 0,4 | - | 0,5 | 0,1 |
| 21 α -humulène | 1456 | 1670 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,2 | 0,5 | 0,1 | 0,5 | 0,1 |
| 22 germacrène D | 1485 | 1704 | 0,1 | - | - | - | 0,1 | 0,1 | - | 0,2 |
| Total | | | 98,6 | 98,9 | 99,4 | 98,7 | 98,2 | 95,5 | 94,3 | 92,3 |

L'ordre d'élution est donné sur colonne apolaire. Ir^a et Ir^p : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et polaire (BP20). le pourcentages est mesurés sur colonne apolaire, excepté les pourcentages suivis d'un astérisque (colonne polaire). 1 et 2 : échantillons industriels, 3 Asco, 4 Campo, 5 Cervione, 6 Bocognano, 7 Sari d'Orcino, 8. Morosaglia

Tableau 10 : Composés identifiés par RMN du ¹³C et/ou CPG-SM dans les huiles essentielles de *Mentha pulegium* obtenues par entrainement à la vapeur et par hydrodistillation.

IV. MENTHA SUAVEOLENS EHRH.

IV.1 Aspects botaniques

L'espèce suaveolens est représentée en Corse par deux sous-espèces : la sous-espèce *suaveolens* (L) Hudson et la sous-espèce *insularis* (Req.) Greuter. Dans la littérature, *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* (L.) Hudson et *M. rotundifolia* sont parfois synonymes, cependant cette dernière est considérée aujourd'hui comme un hybride *M. longifolia* x *M. suaveolens* (Lawrence, 2007). Ainsi une certaine ambiguïté subsiste dans la littérature sur l'identification des plants de menthes étudiées.

La sous-espèce *suaveolens* est présente en Europe mais aussi en Afrique du nord, Amérique et au Japon ; alors que la sous-espèce *insularis* est uniquement présente en Corse et Sardaigne. A l'état sauvage, les deux sous-espèces sont communes dans les lieux humides. La floraison s'étale de juillet à septembre. *M. suaveolens* ssp. *suaveolens*, possède des feuilles opposées, crénelées-dentées sur les bords et fortement ridées en réseau. Chez la sous-espèce *insularis*, elles sont plus vertes et plus allongées. Les fleurs sont blanchâtres alors que chez la sous-espèce *suaveolens*, elles sont plutôt violettes. Le caractère très brièvement pétiolé des feuilles (0,5 mm) constitue la principale différence par rapport à *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* où elles sont sessiles (Gamisans et Jeanmonod, 1993).



Figure 14 : Pieds de *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* (à gauche) et de *M. suaveolens* ssp. *insularis* (à droite).

IV.2 Etude bibliographique

La composition chimique des huiles essentielles de *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* (L.) Hudson est très variable. De nombreux composés, ainsi que leurs associations sont à l'origine d'une grande diversité de compositions chimiques décrits dans la littérature (**Tableau 11**).

Néanmoins, la synthèse bibliographique montre que dans la majorité des cas, les constituants largement majoritaires sont des monoterpènes oxygénés menthaniques tels que

- la pulégone (50,0%) au Maroc (Ouzmil *et al.*, 2002),
- la carvone (62,3%) en Finlande, (48,5%) origine non-définie, (43,0%) en Argentine (Galambosi *et al.*, 1998 ; Lawrence, 2007 ; Velasco-Negueruela, 1996 ; De la Torre et Torres, 1977),
- la *cis*-dihydrocarvone (43,2%) origine non-définie (Lawrence, 2007),
- le menthol (48,3%) en Argentine (De la Torre et Torres, 1977),
- le pipéritol (57,6%) en Espagne (Perez-Raya, 1990),
- le néoiso-isopulégol (52,3% au Japon),
- l'oxyde de pipériténone (87,3%) au Japon (Lawrence, 2007),
- l'oxyde de *trans*-pipéritone (45,8%-50,8% origine non-définie, 40.5% en Italie) (Lawrence, 2007 ; Avato *et al.*, 1995)
- des acétates comme l'acétate de 1,2-époxyneomenthyle (66,5%) origine non-définie (Lawrence, 2007).

D'autres compositions décrites résultent majoritairement de la combinaison à des teneurs voisines de monoterpènes oxygénés cités au dessus. Nous citerons à titre d'exemple la présence

- de l'oxyde de pipériténone (25,0%) et l'oxyde de *cis* pipéritone (26,0%) (Ouzmil *et al.*, 2002),
- de l'oxyde de pipériténone (56,0%) et du p-cymèn-8-ol (20,6%) (Ouzmil *et al.*, 2002),
- de l'oxyde de *cis* pipéritone (21,4%) et l'oxyde de *trans* pipéritone (20,8%) (Umemoto *et al.*, 1998),
- de oxyde de *trans* pipéritone (22,3%) et l'oxyde de pipériténone (23,0%) (Umemoto *et al.*, 1996).

Enfin certaines compositions se démarquent des autres par la présence de composés peu communs comme les acétates d'1,2-époxyneomenthyle, 1,2-époxyisomenthyle et 1,2-

époxynéoisomenthyle (néo 66,4/26,4/22,5%, iso 10,2%, néoiso 27,8%/10,1%) au Japon (Lawrence, 2007) ou le 2,4(8),6-p-menthatrièn-2,3-diol (14,5%) à Cuba (Pino *et al.*, 1999). La présence du germacrène D à une teneur de 12,4% confère à cette huile essentielle de Cuba une certaine originalité.

L'huile essentielle du Maroc possède une teneur en constituants oléfiniques appréciable avec la présence du β -caryophyllène (9,8%) (Ouzmil *et al.*, 2002). En effet, les terpènes oléfiniques ne représentent qu'un pourcentage faible dans la grande majorité des cas (<10%) avec une teneur individuelle en constituants inférieure à 3%.

| Constituants | I | | | II | | | III | | IV | | V |
|-----------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|------|-------------|-------------|
| 1-8 cinéole | - | - | - | tr | tr | 0,1 | - | - | 2,9 | 2,9 | 0,5 |
| β -caryophyllène | 5,7 | 9,8 | 2,0 | - | - | - | - | - | - | - | 3,1 |
| néoiso-isopulégol | - | - | - | - | - | - | - | - | 52,3 | 0,2 | - |
| pulégone | 0,1 | 1,0 | 50,0 | - | - | - | - | - | - | - | 0,1 |
| oxyde de <i>cis</i> pipéritone | 0,3 | 26,0 | 0,6 | 8,1 | 21,4 | 15,0 | - | 15,3 | - | - | - |
| oxyde de <i>trans</i> pipéritone | - | - | - | 25,6 | 20,8 | 17,7 | 22,3 | 13,8 | - | - | 40,5 |
| acetate d'1,2-époxynéoisomenthyle | - | - | - | 27,8 | 0,6 | 0,6 | - | - | - | - | - |
| acetate d'1,2-époxynéomenthyle | - | - | - | 0,2 | 6,2 | 22,5 | - | - | - | - | - |
| acetate d'1,2-époxyisomenthyle | - | - | - | 10,2 | 0,3 | 0,2 | - | - | - | - | - |
| p-cymen-8-ol | 20,6 | 2,9 | 10,4 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| hydroxy-p-menth-3-one II | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 23,9 |
| pipériténone | 0,4 | 0,8 | 0,9 | 0,3 | 1,0 | 0,3 | - | - | 8,6 | 2,4 | 0,1 |
| isopipériténone | - | - | - | - | - | - | - | - | 13,4 | - | - |
| oxyde de pipériténone | 56,0 | 25,0 | 0,9 | 0,1 | 5,0 | 0,1 | 23,0 | 27,2 | - | 87,3 | 2,3 |
| Constituants | VI | VII | VIII | IX | X | | | | XI | | |
| 1-8 cinéole | - | - | - | 30,1 | - | - | - | - | - | - | - |
| germacrène D | 12,4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| carvone | 0,3 | 62,3 | - | 43,0 | - | - | - | - | - | 48,5 | - |
| <i>cis</i> -dihydrocarvone | - | - | - | - | - | - | - | 38,4 | 43,2 | - | - |
| <i>trans</i> -dihydrocarvone | - | - | - | - | - | - | - | 10,4 | - | - | - |
| acétate de neodihydrocarvyle | - | - | - | - | - | - | - | - | 17,0 | - | - |
| pulégone | - | - | 20,3 | 5,1 | - | - | - | - | - | - | - |
| oxyde de <i>trans</i> pipéritone | - | - | - | - | 45,8 | 50,8 | 15,0 | - | - | - | - |
| acetate d'1,2-époxynéomenthyl | - | - | - | - | - | 26,4 | 66,5 | - | - | - | - |
| oxyde de pipériténone | 1,6 | - | - | - | 28,7 | 11,6 | - | - | - | - | 10,4 |
| menthol | - | - | 48,3 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| pipéritol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 57,6 |
| 2,4(8),6-p-menthatrièn-2,3-diol | 14,5 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

I : Maroc (Ouzmil *et al.*, 2002), II : Japon (Umamoto, 1998), III : Japon (Umamoto, 1996), IV : Japon (Handa *et al.*, 1964), V : Italie (Avato *et al.*, 1995), VI : Cuba (Pino *et al.*, 1999), VII : Finlande (Galambosi *et al.*, 1998), VIII : (Velasco-Negueruela, 1996), IX : Argentine (De la Torre et Torres, 1978), X : (Lawrence PhD, 1978), XI Spain (Perez Raya *et al.*, 1990).

Tableau 11 : Principaux constituants des huiles essentielles de *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* (L.) Hudson décrites dans la littérature.

IV.3 Composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de *M. suaveolens* ssp. *suaveolens*

Les huiles essentielles ont été obtenues par hydrodistillation de plants de *Mentha suaveolens* ssp. *suaveolens* (L.) Hudson récoltés en Corse et identifiés par Mme Laetitia Hugot (Office de l'Environnement de la Corse). Le rendement calculé en fonction de la masse de végétal préfané varie entre 0,08% et 0,10%. Une analyse préliminaire réalisée par CPG sur ces huiles essentielles a mis en évidence l'existence de deux profils chromatographiques (PC1 et PC2) bien distincts. Deux échantillons, chacun représentatif d'un profil, ont fait l'objet d'une étude détaillée par CPG(Ir), CPG-SM et RMN du ^{13}C .

IV.3.1 Profil Chromatographique 1 (PC1)

L'analyse par CPG(Ir) et RMN du ^{13}C de l'huile essentielle nous a permis d'identifier dix monoterpènes représentant 85,8% de la composition chimique globale. L'huile essentielle est caractérisée par une forte teneur en monoterpènes oxygénés majoritairement représentés par la pipériténone **36** (73,5 %) alors que les monoterpènes oléfiniques ne représentent que 4,2 % (**Tableau 12**).

Pour l'identification de chaque constituant, nous avons successivement pris en compte les trois paramètres habituels, à savoir :

- le nombre de pics observés par rapport au nombre de pics attendus : tous les pics des carbones de toutes les molécules identifiées sont repérés à l'exception des carbones quaternaires de quelques produits minoritaires ;
- le nombre de superpositions des raies de résonance pouvant appartenir à deux ou plusieurs composés. Ce nombre varie entre 1 et 2. Il en résulte que toutes les molécules sont identifiées par l'observation de plus des deux tiers de leurs carbones non superposés avec ceux d'autres molécules ;
- la variation des déplacements chimiques ($\Delta\delta$) de chacun des carbones de chaque molécule par rapport aux valeurs de référence. Ces variations sont très faibles, inférieures ou égales à 0,05 ppm pour environ 90% des carbones.

En ce qui concerne les composés non identifiés, ils ont tous des teneurs inférieures ou égales à 0,5 % de la composition chimique de l'huile essentielle totale, excepté l'un d'entre eux d'indices de rétention 1245 et 1863, respectivement sur colonne apolaire et polaire, qui

représente 9,4%. Nous pouvons relever une série de dix raies de résonance. Afin de réaliser une étude détaillée de la composition chimique de cette huile essentielle, et de caractériser ce composé absent de notre banque « Terpènes », nous avons soumis l'échantillon d'huile essentielle à un fractionnement sur colonne ouverte de silice.

| N° [♦] | Constituants | Ir ^a | Ir ^p | % ^a | RMN | SUP |
|-----------------|-----------------------|-----------------|-----------------|----------------|---------|-----|
| 3 | α-pinène | 929 | 1026 | 0,5 | 8 / 10 | 2 |
| 7 | β-pinène | 971 | 1116 | 0,5 | 8 / 10 | 2 |
| 8 | myrcène | 979 | 1153 | 0,5 | 8 / 10 | 2 |
| 10 | limonène | 1020 | 1194 | 2,0 | 10 / 10 | 1 |
| 13 | (Z)-β-ocimène | 1024 | 1226 | 0,7 | 8 / 10 | 1 |
| 26 | bornéol | 1149 | 1701 | 1,3 | 10 / 10 | 1 |
| 28 | néoiso-isopulégol | 1164 | 1610 | 1,4 | 10 / 10 | 2 |
| 32 | pulégone | 1216 | 1658 | 2,5 | 10 / 10 | 2 |
| 36 | pipériténone | 1317 | 1950 | 73,5 | 10 / 10 | 2 |
| 38 | oxyde de pipériténone | 1333 | 1964 | 1,9 | 10 / 10 | 1 |
| Total | | | | 85,8 | | |

L'ordre d'élution est donné sur colonne apolaire. Ir^a et Ir^p : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et sur colonne polaire (BP20). % : pourcentages mesurés sur colonne apolaire. RMN : nombre de carbones observés par rapport au nombre de pics attendus. SUP : nombre de superpositions. ♦ : numérotation associée à chaque constituant faisant référence au **Tableau 13**.

Tableau 12 : Composés identifiés à partir du spectre RMN du ¹³C de l'huile essentielle de *Mentha suaveolens* ssp. *suaveolens* (L.) Hudson.

- Etude détaillée de l'huile essentielle après fractionnement

Nous avons soumis 2,80 g d'huile essentielle à un fractionnement par chromatographie sur gel de silice de type flash (200-500µm). Les différentes étapes de ce fractionnement sont décrites dans la **Figure 15** et détaillées dans la partie expérimentale.

- Etude des fractions hydrocarbonées.

Les fractions hydrocarbonées F1 et F2 ont été analysées par CPG(Ir) et RMN du ¹³C. Les composés identifiés représentent 95,9 et 94,8% de la composition globale de ces fractions et les composés non identifiés ont tous une teneur inférieure à 0,3%, ne justifiant pas un fractionnement supplémentaire. Nous avons ainsi identifié dix oléfines supplémentaires par rapport à celles déjà mises en évidence dans l'huile essentielle. Il s'agit de :

- huit monoterpènes : α-thujène **2**, camphène **4**, sabinène **6**, p-cymène **9**, β-phéllandène **12**, (E)-β-ocimène **14**, γ terpinène **15** et terpinolène **17** ;

- deux sesquiterpènes : β -bourbonène **40** et germacrène D **41**.

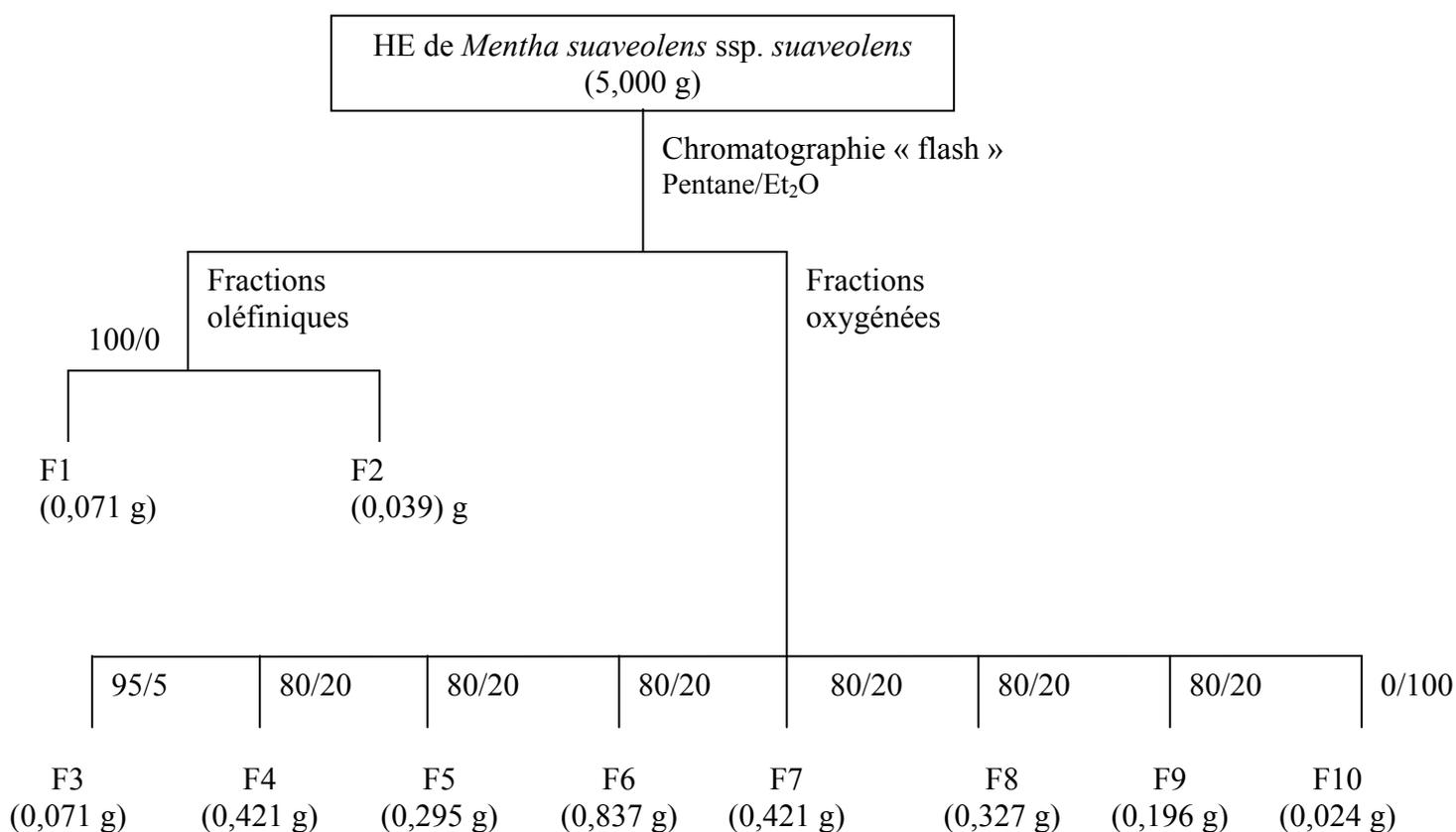


Figure 15 : Schéma de fractionnement de l'huile essentielle de *M. suaveolens* ssp. *suaveolens*.

- Etude des fractions oxygénées.

L'analyse par CPG(Ir) et RMN du ^{13}C des fractions oxygénées a conduit à l'identification par consultation de la bibliothèque de spectres « Terpènes » de dix sept composés. La plupart de ces composés sont des monoterpènes de type menthanique. Il s'agit :

- d'un oxyde : 1,8-cinéole **11** ;
- de cétones : menthone **22**, isomenthone **23**, *cis* et *trans*-isopulégones **24/25** ;
- d'alcools : terpinèn-4-ol **27**, néoiso-isopulégol **28**, *cis* et *trans*-p-menth-2,8-dièn-1-ols **20/19**, α -terpinéol **30** ;
- et d'acétates : de bornyle **34** et de néoiso-isopulégyle **35**.

Le *trans*-carvéol **31**, la *cis*-jasnone **39**, un phénylpropanoïde : l'eugénol **37**, un alcool linéaire : l'oct-1-en-3-ol **5** et un sesquiterpène : l' α -cadinol **44** sont également identifiés

directement dans ces fractions. Il est à noter que dans la fraction F9, le composé d'indice de rétention 1245/1863 absent de notre banque de spectre de RMN du ^{13}C « Terpènes » est majoritaire et identifié comme étant l'isopipériténone **33**. La présence dans la fraction F3 de l'acétate de néoiso-isopulégyle **35**, qui à notre connaissance n'a jamais été identifiée à partir d'une source naturelle, doit être soulignée. L'identification des molécules **33** et **35** est détaillée dans la partie **IV.6** de ce chapitre.

L'étude de l'huile essentielle de *Mentha suaveolens* ssp. *suaveolens* (L.) Hudson. présentant le premier profil chromatographique (PC1) réalisée par combinaison des techniques chromatographiques et spectroscopiques (CC, CPG(Ir), RMN du ^{13}C , CPG-SM) a permis l'identification de 40 composés qui représentent 97,6 % de la composition totale de l'huile essentielle (**Tableau 13**). Les composés majoritaires sont la pipériténone **36** (73,5%) et l'isopipériténone **33** (9,4%), deux cétones *p*-menthaniques isomères de position. Les autres composés présents à des teneurs supérieures à 1% sont la pulégone **32** (2,5%), le limonène **10** (2,0%), l'oxyde de pipériténone **38** (1,9%), le néoiso-isopulégol **28** (1,4%) et le bornéol **26** (1,3%).

Malgré le nombre important de types chimiques cités dans la littérature concernant les huiles essentielles de *Mentha suaveolens* ssp. *suaveolens* (L.) Hudson la présence majoritaire de la pipériténone associée avec l'isopipériténone n'a jamais été décrite, ce qui confère une certaine originalité à cet échantillon de Corse.

IV.3.2 Profil chromatographique 2 (PC2)

L'analyse par CPG(Ir) et RMN du ^{13}C de l'huile essentielle nous a permis d'identifier 19 composés représentant 93,4 % de la composition chimique globale. L'huile essentielle est principalement constituée de monoterpènes oxygénés (83,0 %) avec l'oxyde de pipériténone comme constituant majoritaire **38** (72,0 %) et à des teneurs plus faibles, la pipériténone **36** (4,4%) et l'isopipériténone **33** (1,8%). Les monoterpènes oléfiniques ne représentant que 5,9% (limonène **10** 4,2%) (**Tableau 13**).

Treize composés minoritaires dont les teneurs ne dépassent pas 0,7% de l'huile essentielle totale ont été identifiés par le couplage CPG-SM et par RMN du ^{13}C . Parmi les constituants minoritaires identifiés, il est possible de dénombrer 10 monoterpènes oxygénés (1 cétone, 7 alcools, 1 aldéhyde, 1 acétate), 9 monoterpènes oléfiniques, 1 phénylpropanoïde, 1

sesquiterpène oxygéné et 1 sesquiterpène oléfinique, ce qui amène le pourcentage de composés identifiés à 95,1%. Ces constituants très minoritaires dans cette huile essentielle ont été identifiés par CPG(Ir) (indices de rétention sur colonne apolaire et polaire), en tenant compte de la composition chimique détaillée de l'huile essentielle du premier profil chromatographique exposée précédemment et aussi identifiés par spectrométrie de masse.

Au terme de cette analyse de l'huile essentielle, le fort pourcentage d'identification (95,1%) associé aux très faibles teneurs des composés non identifiés (< 0,5%) ne justifie pas une analyse plus détaillée. De plus, des compositions d'huiles essentielles de *Mentha suaveolens* ssp. *suaveolens* (L.) Hudson décrivant l'oxyde de pipériténone **38** comme constituant majoritaire ont été décrites dans la littérature. Des teneurs aussi importantes en oxyde ne sont décrites qu'au Japon (87,3%) (Handa *et al.*, 1964). En effet, trois autres huiles associent l'oxyde de pipériténone (56,0/27,2/23,0%) avec soit le p-cymen-8-ol (20,6%) au Maroc (Ouzmil *et al.*, 2002), soit l'oxyde de *cis*-pipéritone (15,3%) et/ou l'oxyde de *trans*-pipéritone (13,8%/22,3%) au Japon (Umemoto *et al.*, 1994).

Pour confirmer et quantifier la présence de ces deux compositions chimiques, un échantillonnage a été réalisé sur la totalité du territoire Corse. Nous détaillerons les résultats de cette étude dans un paragraphe suivant.

| Constituants | Ira | Irp | Profil 1 | Profil 2 | Identification |
|--|------|------|----------|----------|-----------------------------|
| 1 tricyclène | 920 | 1020 | tr | - | Ir, SM |
| 2 α -thujène | 929 | 1023 | tr | - | Ir, SM |
| 3 α -pinène | 930 | 1026 | 0,5 | 0,5 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 4 camphène | 943 | 1071 | 0,3 | 0,2 | Ir, SM |
| 5 oct-1-èn-3-ol | 959 | 1447 | 0,7 | 0,7 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 6 sabinène | 965 | 1124 | 0,3 | 0,5 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 7 β -pinène | 971 | 1114 | 0,5 | 0,7 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 8 myrcène | 981 | 1164 | 0,5 | 0,3 | Ir, SM |
| 9 p-cymène | 1012 | 1273 | tr | 0,4 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 10 limonène* | 1020 | 1207 | 2,0 | 4,2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 11 1,8-cinéole* | 1020 | 1211 | 0,1 | 0,8 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 12 β -phellandrène | 1024 | 1012 | tr | tr | Ir, SM |
| 13 (Z)- β -ocimène | 1026 | 1236 | 0,7 | 0,1 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 14 (E)- β -ocimène | 1036 | 1251 | 0,1 | 0,1 | Ir, SM |
| 15 γ -terpinène | 1049 | 1247 | tr | tr | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 16 <i>trans</i> hydrate de sabinène | 1050 | 1454 | - | 0,4 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 17 terpinolène | 1078 | 1284 | tr | - | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 18 <i>cis</i> hydrate de sabinène | 1083 | 1545 | tr | 0,5 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 19 <i>trans</i> -p-menth-2,8-dièn-1-ol | 1103 | 1628 | 0,2 | 0,1 | Ir, SM |
| 20 <i>cis</i> -p-menth-2,8-dièn-1-ol | 1117 | 1669 | 0,1 | 0,1 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 21 p-menth-3-èn-8-ol | 1131 | 1605 | - | 1,2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 22 menthone | 1134 | 1466 | 0,3 | - | Ir, SM |
| 23 isomenthone | 1144 | 1495 | 0,2 | - | Ir, SM |
| 24 <i>cis</i> -isopulégone* | 1149 | 1572 | 0,1 | 0,7 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 25 <i>trans</i> -isopulégone* | 1149 | 1583 | tr | tr | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 26 bornéol* | 1149 | 1701 | 1,3 | 0,2 | Ir, SM |
| 27 terpinèn-4-ol | 1161 | 1600 | tr | - | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 28 néoiso-isopulégol | 1165 | 1610 | 1,4 | 0,5 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 29 myrténal | 1169 | 1628 | - | 0,6 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 30 α -terpinéol | 1172 | 1697 | tr | 0,3 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 31 <i>trans</i> -carvéol | 1197 | 1848 | tr | - | Ir, SM |
| 32 pulégone | 1218 | 1651 | 2,5 | 1,1 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 33 isopiperiténone | 1245 | 1863 | 9,4 | 1,8 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 34 acétate de bornyle | 1269 | 1580 | 0,1 | tr | Ir, SM |
| 35 acétate de néoiso-isopulégyle | 1294 | 1644 | tr | - | Ir, RMN ¹³ C |
| 36 piperiténone | 1309 | 1927 | 73,5 | 4,4 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 37 eugéol* | 1333 | 2171 | 0,2 | 0,1 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 38 oxyde de piperiténone * | 1333 | 1963 | 1,9 | 72,0 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 39 <i>cis</i> -jasmone | 1367 | 1947 | 0,4 | 1,0 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 40 β -bourbonène | 1385 | 1518 | tr | 0,1 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 41 germacrène D | 1478 | 1711 | 0,3 | 1,5 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 42 élémicine | 1515 | 2229 | tr | - | Ir, SM |
| 43 viridiflorol | 1584 | 2085 | - | tr | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 44 α -cadinol | 1639 | 2234 | tr | - | Ir, SM |
| Total | | | 97,6 | 95,1 | |

L'ordre d'éluion est donné sur colonne apolaire. Ir^a et Ir^p: indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et polaire (BP20). %^a: pourcentages mesurés sur colonne apolaire, excepté les pourcentages suivis d'un astérisque (colonne polaire).

Tableau 13: Composition chimique des huiles essentielles des deux profils chromatographiques (PC1 et PC2) de *Mentha suaveolens* ssp. *suaveolens*.

IV.4 Composition chimique de l'huile essentielle de feuilles *M. suaveolens* ssp. *insularis* de Corse

A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur la composition de l'huile essentielle concernant *M. suaveolens* ssp. *insularis*. Dans cette première partie, nous nous proposons de déterminer la composition chimique de l'huile essentielle de *M. suaveolens* ssp. *insularis* de Corse à partir d'un échantillon, obtenu par entraînement à la vapeur, par un producteur local.

IV.4.1 Analyse directe de l'huile essentielle

L'analyse du spectre de RMN du ^{13}C de l'huile essentielle nous a permis d'identifier treize composés (**Tableau 14**), directement par interrogation de la bibliothèque de spectres « Terpènes » propre au laboratoire. Pour chacun d'eux :

- tous les signaux des carbones ont été repérés, à l'exception des carbones quaternaires de huit composés dont la teneur est inférieure à 1,5;
- le nombre de superpositions de signaux est compris entre 1 et 3, et ne gêne en rien l'identification des composés, chacun d'entre eux étant identifiés au minimum à partir de 55 % des carbones lui appartenant en propre ;
- les variations des déplacements chimiques ($\Delta\delta$ ppm) observées entre les valeurs du mélange et celles des spectres de référence sont inférieures ou égales à 0,05 ppm pour environ 94 % des carbones observés, comprises entre 0,06 et 0,08 ppm pour pratiquement tous les autres signaux et sensiblement plus important (0,11 et 0,10 ppm) pour le carbonyle de la pulégone et le carbone portant la fonction alcool du bornéol qui de plus est situé dans la zone des pics de résonance du CDCl_3 .

Il s'agit de onze monoterpènes (quatre oléfines, trois oxydes, trois cétones et un alcool) et de deux sesquiterpènes (une oléfine et un alcool). La quantification de ces composés a été ensuite réalisée par CPG(Ir), en tenant compte de leurs indices de rétentions sur colonnes polaire et apolaire (**Tableau 14**). Cet échantillon d'huile essentielle de *M. suaveolens* ssp. *insularis* de Corse est majoritairement composé de pulégone **30** (44,4 %) suivie, à des teneurs bien moins importantes, de limonène **10** (4,3 %) et de bornéol **23** (1,9 %). Les autres constituants identifiés sont présents à des teneurs comprises entre 1,4 et 0,5 %. Il s'agit par ordre décroissant d'abondance de la piperiténone **34** (1,4 %), la *cis*-isopulégone **21** (1,4 %), le 1,8-cinéole **11** (1,3 %), le menthofurane (1,0 %), le β -pinène **7** (1,0 %), l'oxyde de

pipériténone **36** (0,9 %), le (Z)- β -ocimène **12** (0,8 %), le myrcène **8** (0,7 %), le viridiflorol **51** (0,6 %) et le germacrène D **45** (0,5 %).

Au terme de cette analyse directe de l'huile essentielle, seulement 60 % de la composition globale a été déterminée. Parallèlement dans le spectre de RMN du ^{13}C de l'échantillon, une série de dix raies de résonance assez intenses reste non attribuée. Elles appartiennent selon toute vraisemblance au second constituant par ordre d'importance dans l'échantillon. Ce composé, d'une teneur d'environ 27% et d'indices de rétention 1409 et 2218 respectivement sur colonnes polaire et apolaire, est absent de nos bibliothèques de spectres « Terpènes » et « Littérature ».

Par ailleurs, la teneur des autres composés non-identifiés est inférieure à 2,4 %. Par conséquent, nous avons entrepris un fractionnement de l'échantillon afin d'isoler le composé non identifié et d'en réaliser son analyse structurale. Ce fractionnement pourrait aussi permettre l'identification d'un plus grand nombre de composés et donc une meilleure caractérisation de l'huile essentielle.

| N ^o ♦ | Constituants | Ir ^a | Ir ^p | % ^a | RMN | SUP |
|------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|----------------|--------|-----|
| 7 | β -pinène | 970 | 1110 | 1,0 | 10/ 10 | 2 |
| 8 | myrcène | 979 | 1159 | 0,7 | 8/ 10 | 1 |
| 10 | limonène | 1020 | 1207 | 4,3* | 10/ 10 | 0 |
| 11 | 1,8-cinéole | 1020 | 1211 | 1,3* | 5/ 7 | 0 |
| 12 | (Z)- β -ocimène | 1024 | 1230 | 0,8 | 9/ 10 | 0 |
| 20 | menthofurane | 1148 | 1482 | 1,0 | 10/ 10 | 0 |
| 21 | cis-isopulégone | 1148 | 1587 | 1,4 | 8/ 10 | 0 |
| 23 | bornéol | 1154 | 1698 | 1,9 | 10/ 10 | 2 |
| 30 | pulégone | 1216 | 1645 | 44,4 | 10/ 10 | 1 |
| 34 | piperiténone | 1315 | 1909 | 1,4 | 8/ 9 | 3 |
| 36 | oxyde de piperiténone | 1333 | 1945 | 0,9 | 7/ 9 | 2 |
| 45 | germacrène D | 1480 | 1704 | 0,5 | 13/ 15 | 0 |
| 51 | viridiflorol | 1591 | 2089 | 0,6 | 13/ 15 | 3 |
| total | | | | 60,1 | | |

L'ordre d'élution est donné sur colonne apolaire. Ir^a et Ir^p: indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et sur colonne polaire (BP20). % : pourcentages mesurés sur colonne apolaire, exceptés les pourcentages suivis d'un astérisque (colonne polaire). RMN : nombre de carbones observés par rapport au nombre de pics attendus. SUP : nombre de superpositions. ♦: numérotation associée à chaque constituant faisant référence au **Tableau 15**.

Tableau 14 : Composés identifiés à partir du spectre RMN du ^{13}C de l'huile essentielle de *Mentha suaveolens* ssp. *insularis*.

IV.4.2 Fractionnement et étude détaillée de l'huile essentielle

Le schéma de fractionnement est proposé dans la **Figure 17** et détaillé dans la partie expérimentale et les composés identifiés dans le **Tableau 15**.

IV.4.2.1 Etude des fractions hydrocarbonées F1 et F2

L'analyse par CPG(Ir) et RMN du ^{13}C des deux fractions hydrocarbonées permet d'identifier, directement par consultation de la bibliothèque de spectres « Terpènes », 13 composés hydrocarbonés supplémentaires par rapport à ceux identifiés dans l'huile essentielle. Il s'agit de six monoterpènes (camphène **4**, sabinène **6**, p-cymène **9**, (E)- β -ocimène **13**, terpinolène **16**, p-mentha-3,8-diène **15**) et sept sesquiterpènes (β -bourbonène **38**, β -élémente **39**, (E)- β -caryophyllène **41**, α -humulène **43**, β -bisabolène **47**, *cis*-calamène **48**, δ -cadinène **48**). Comme nous l'avons observé lors du fractionnement sur colonne de silice de l'huile essentielle de *M. aquatica*, le menthofurane **20** est présent dans ces deux fractions hydrocarbonées.

IV.4.2.2 Fractions oxygénées F3 à F13

L'analyse directe par CPG(Ir) et RMN du ^{13}C des fractions oxygénées a conduit à l'identification de seize composés oxygénés supplémentaires, ayant des teneurs inférieures à 2,5 % dans l'huile essentielle. Tous ces constituants ont été identifiés par interrogation de la banque « Terpènes ». Il s'agit d'un alcool linéaire l'oct-1-èn-3-ol **5**, trois phénylpropanoïdes et de sept monoterpènes oxygénés à squelette menthanique dont six alcools (le p-menth-3-èn-8-ol **18**, le néo-isopulégol **19**, le néoiso-isopulégol **25**, l' α -terpinéol **27**, le néoiso-menthol **28** et le *cis*-p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol **29**) et une cétone (la *trans*-isopulégone **22**).

Par consultation de la banque « Littérature », nous avons identifié dans la fraction F10 trois constituants supplémentaires: deux cétones, la 8-hydroxy-menthone **31** (1,8%) et la 8-hydroxy-p-menth-4-èn-3-one **33** (7,9%) ainsi qu'une lactone, la mintlactone **42** (11,7%). Nous détaillons leur identification et par conséquent la comparaison entre les données de la littérature et celles relevées dans le spectre de RMN du ^{13}C de la fraction F10, dans dans la partie V.6.

Le second composé majoritaire dans l'huile essentielle (27%), non identifié dans l'échantillon brut a été concentré dans la fraction F8. Une série de fractionnements sur

colonne ouverte de cette fraction a permis d'isoler ce produit (90,2% F8-3-3) et ainsi de mettre en œuvre les séquences de RMN1D et 2D. Ce composé a été identifié comme étant la *cis-cis-p*-menthénolide **40**, une α -méthylène- γ -butyrolactone menthanique isolée pour la première fois d'une source naturelle. Nous détaillons l'analyse structurale dans la partie **IV.6** Identification de molécules absentes de nos bibliothèques de spectres de RMN du ^{13}C et analyse structurale de composés non identifiés.

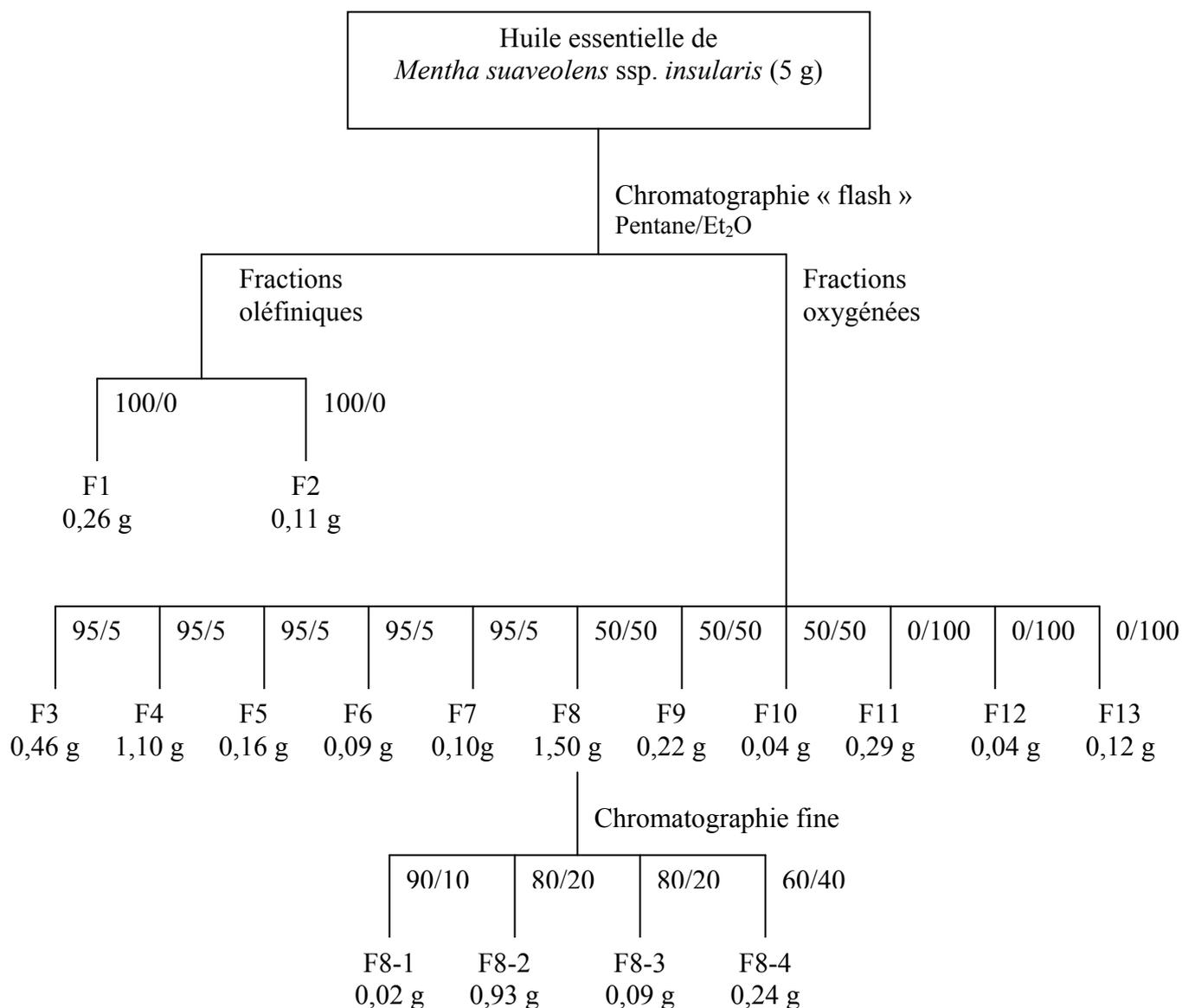


Figure 16 : Schéma de fractionnement de l'huile essentielle de *Mentha suaveolens ssp. insularis*.

Nous avons de plus relevé une série de dix raies de résonance dans la fraction F10 (1,6%) qui n'a pu être attribuée. Nous avons identifié ce constituant dans l'extrait d'hydrolat (EH) (partie IV.5) après analyse d'une fraction enrichie. Il s'agit de la 8-hydroxy-isomenthone **32**. Nous détaillerons cette analyse dans la partie **IV.6**.

| N° | Constituants | Ir ^a | Ir ^p | %HE | Fractions | identification |
|-------|---------------------------------------|-----------------|-----------------|------|-----------|-----------------------------|
| 1 | (Z)-hex-3-èn-1-ol | 851 | 1382 | 0,4 | HE | Ir, SM |
| 2 | α -thujène | 929 | 1023 | tr | HE | Ir, SM |
| 3 | α -pinène | 930 | 1026 | 0,7 | F1 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 4 | camphène | 943 | 1071 | 0,4 | F1 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 5 | oct-1-èn-3-ol | 959 | 1447 | 0,5 | F8 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 6 | sabinène | 965 | 1124 | 0,5 | F1 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 7 | β -pinène | 971 | 1114 | 1,0 | HE, F1 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 8 | myrcène | 981 | 1164 | 0,7 | HE, F1 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 9 | p-cymène | 1012 | 1273 | tr | F1 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 10 | limonène* | 1020 | 1207 | 4,3 | HE, F1 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 11 | 1,8-cinéole* | 1020 | 1211 | 1,3 | HE, F3 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 12 | (Z)- β -ocimène | 1026 | 1236 | 0,8 | HE, F1 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 13 | (E)- β -ocimène | 1036 | 1251 | 0,1 | F1 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 14 | <i>trans</i> hydrate de sabinène | 1050 | 1454 | tr | HE | Ir, SM |
| 15 | p-mentha-3,8-diène | 1059 | 1266 | tr | F1 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 16 | terpinolène | 1078 | 1284 | tr | F1, F2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 17 | <i>cis</i> hydrate de sabinène | 1082 | 1545 | 0,2 | F10 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 18 | p-menth-3-èn-8-ol | 1131 | 1605 | 0,6 | F8 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 19 | néo-isopulégol | 1141 | 1562 | tr | F6 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 20 | menthofurane | 1147 | 1485 | 1,0 | HE, F2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 21 | <i>cis</i> -isopulégone* | 1149 | 1572 | 0,3 | HE, F3 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 22 | <i>trans</i> -isopulégone* | 1149 | 1583 | 1,4 | F3 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 23 | bornéol* | 1149 | 1701 | 1,9 | HE, F8 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 24 | terpinén-4-ol | 1161 | 1600 | tr | F9 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 25 | néoiiso-isopulégol | 1165 | 1610 | 2,4 | F6 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 26 | myrténal | 1169 | 1628 | 0,5 | F3 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 27 | α -terpinéol | 1172 | 1697 | 0,2 | F9 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 28 | néoiiso-menthol | 1174 | 1626 | tr | F10 | Ir, RMN ¹³ C |
| 29 | <i>cis</i> -p-mentha-1(7),8-dièn-2-ol | 1212 | 1871 | tr | HE | Ir, SM |
| 30 | pulégone | 1218 | 1651 | 44,4 | HE, F4 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 31 | 8-hydroxy-menthone | 1222 | 1764 | tr | F10 | Ir, RMN ¹³ C |
| 32 | 8-hydroxy-isomenthone | 1239 | 1821 | tr | F10 | Ir, RMN ¹³ C |
| 33 | 8-hydroxy-p-menth-4-èn-3-one | 1256 | 1908 | tr | F10 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 34 | piperiténone | 1309 | 1927 | 1,4 | HE, F8 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 35 | eugénol* | 1333 | 2171 | 0,2 | F7 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 36 | oxyde de piperiténone * | 1333 | 1963 | 0,9 | HE, F7 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 37 | <i>cis</i> -jasmone | 1367 | 1947 | 0,6 | F9 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 38 | β -bourbonène | 1385 | 1518 | tr | F2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 39 | β -élémente | 1388 | 1588 | tr | F2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 40 | <i>cis-cis</i> -p-menthénolide | 1409 | 2218 | 27,3 | F8 | Ir, RMN ¹³ C |
| 41 | (E)- β -caryophyllène | 1417 | 1594 | 0,2 | F1 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 42 | mintlactone | 1453 | 2320 | 0,2 | F10 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 43 | α -humulène | 1458 | 1668 | 0,1 | F1, F2 | Ir, RMN ¹³ C |
| 44 | (E)-méthylisoeugénol | 1459 | 2184 | 0,2 | F7 | Ir, RMN ¹³ C |
| 45 | germacrène D | 1478 | 1711 | 0,5 | HE, F1 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 46 | bicyclogermacrène | 1494 | 1727 | tr | HE | Ir, SM |
| 47 | β -bisabolène | 1500 | 1727 | tr | F1 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 48 | <i>cis</i> -calaménène | 1510 | 1833 | tr | F2 | Ir, RMN ¹³ C |
| 49 | δ -cadinène | 1514 | 1757 | tr | F1, F2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 50 | viridiflorol | 1515 | 2229 | 0,3 | HE, F9 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 51 | élémicine | 1584 | 2085 | 0,6 | F8 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| Total | | | | 96,1 | | |

L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire (BP-1). (*): pourcentages donnés sur colonne polaire (BP-20).

Tableau 15 : Composition chimique de l'huile essentielle de *M. suaveolens* ssp. *insularis*.

IV.5 Composition chimique de l'extrait de l'hydrolat de *M. suaveolens* ssp. *insularis*

L'hydrolat commercialement nommé « eau florale » est le nom donné à la phase aqueuse qui se sépare de l'huile essentielle à la sortie de l'alambic ou dans un essencier. En région Corse, on observe depuis deux ou trois ans, à côté de la production des huiles essentielles (immortelle, romarin, myrte, agrumes...), une demande croissante pour ces hydrolats. En effet, ces mélanges qui présentent une valeur ajoutée plus faible que les huiles essentielles peuvent être obtenus en quantité beaucoup plus importante. Cependant, la conservation de ces mélanges s'avère plus délicate puisque des proliférations bactériennes peuvent survenir avec des phases aqueuses.

Contrairement aux huiles essentielles, il existe très peu de données dans la littérature concernant la composition chimique des hydrolats et a fortiori aucune étude concernant les hydrolats de *M. suaveolens* ssp. *insularis* et des autres menthes. Nous proposons donc dans cette partie une analyse détaillée de cet extrait obtenu par trois extractions successives de l'hydrolat à l'oxyde de diéthyle (3x30mL) puis évaporation du solvant.

IV.5.1 Analyse directe de l'extrait d'hydrolat

L'analyse par RMN du ^{13}C de l'extrait d'hydrolat nous a permis d'identifier directement par interrogation de la bibliothèque de spectres « Terpènes », 7 monoterpènes oxygénés. Leur quantification a été ensuite réalisée par CPG(Ir), en tenant compte de leurs indices de rétentions sur colonnes polaire et apolaire (**Tableau 16**). Ils représentent près de 90% de l'extrait. Cet échantillon d'hydrolat de *M. suaveolens* ssp. *insularis* de Corse est majoritairement composé de *cis-cis*-p-menthénolide **24** (67,3 %) et de pulégone **14** (14,8%) suivie, à des teneurs bien moins importantes, de la pipériténone **18** (2,2%) et de bornéol **9** (1,7 %). Les autres constituants identifiés sont présents à des teneurs inférieures à 1,5%.

Parmi ces composés présents en faible pourcentage, il nous est possible de faire ressortir du spectre de RMN du ^{13}C , deux séries de dix raies de résonance bien distinctes. Après consultation de notre bibliothèque de spectres « Terpènes » et « Littérature » ces deux composés demeurent non-identifiés. Dans un but premier d'isoler ces 2 composés absents de nos banques nous avons entrepris un fractionnement de l'échantillon (**Figure 17**). Cette chromatographie sur colonne ouverte de silice pourrait permettre dans un même temps

l'identification d'un plus grand nombre de composés et donc une meilleure caractérisation de l'extrait d'hydrolat.

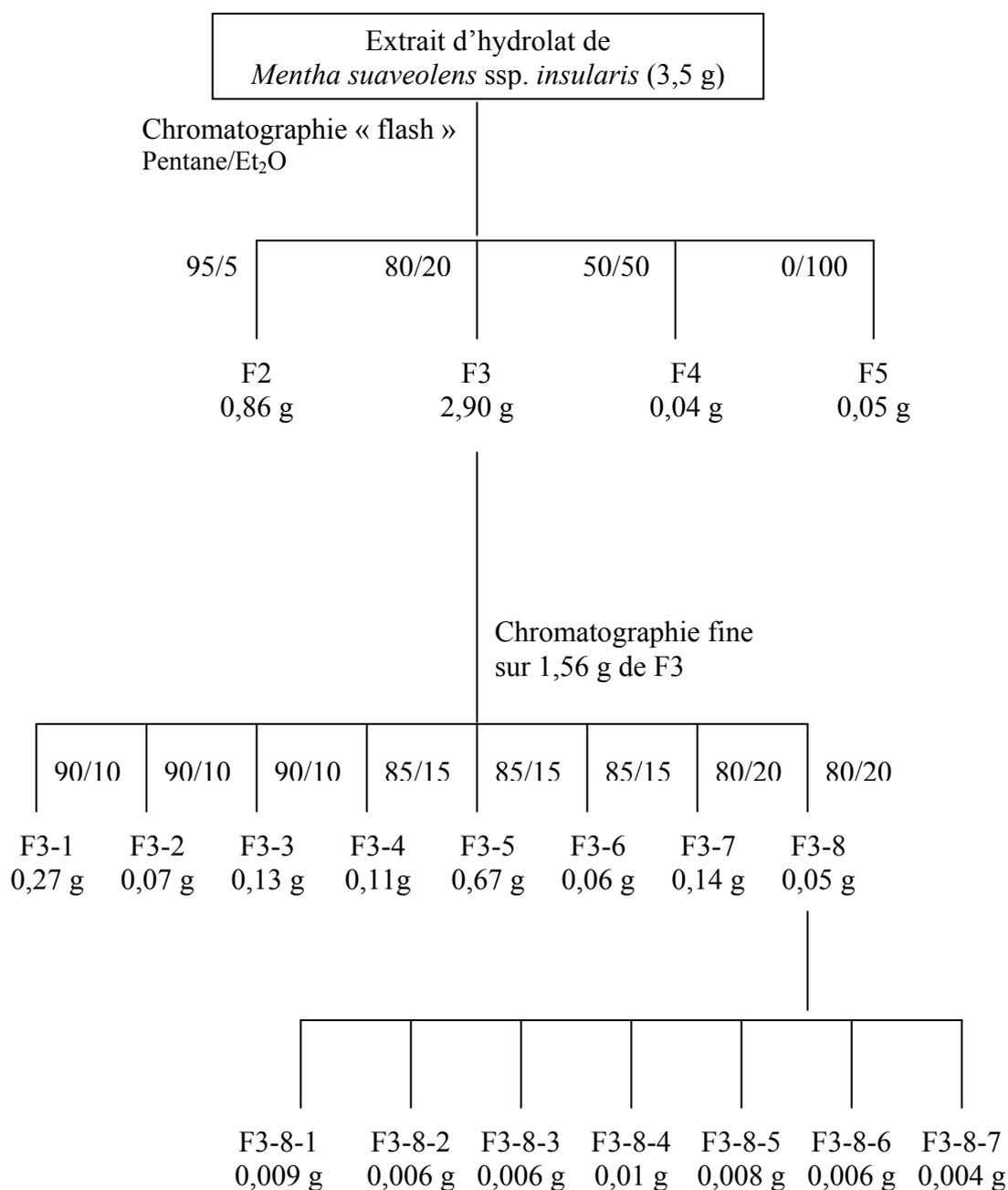


Figure 17 : Schéma de fractionnement de l'extrait d'hydrolat de *Mentha suaveolens* ssp. *insularis*.

IV.5.2 Fractionnement et étude détaillée de l'extrait d'hydrolat

Lors de ce fractionnement nous avons tout d'abord essayé de concentrer d'éventuelles oléfines en éluant au pentane. Cependant, nous n'avons identifié aucune oléfine même à l'état de traces. Ce résultat confirme la solubilité quasi nulle des oléfines dans les phases aqueuses.

L'analyse par CPG(Ir) et RMN du ^{13}C des fractions oxygénées F2 à F5 a conduit à l'identification de 10 monoterpènes oxygénés supplémentaires par rapport à ceux identifiés, ayant des teneurs inférieures à 0,7 % dans l'hydrolat brut. Ces constituants ont été identifiés par consultation de la banque « Terpènes ». Malgré la présence majoritaire de la pulégone **14** (72,8%) dans la fraction F2, cinq composés oxygénés supplémentaires sont identifiés. Il s'agit d'un aldéhyde monoterpénique (myrténal **12**), d'un phénylpropanoïde (eugénol **19**), d'un oxyde (oxyde de pipériténone **20**) et d'une cétone menthanique (*trans*-isopulégone **8**) et d'un alcool linéaire (oct-1-èn-3-ol **1**). L'analyse de la fraction F3 conduit à l'identification de 6 composés supplémentaires dont la *cis-cis*-p-menthénolide **24** majoritaire (74,6%). Il s'agit d'un phénylpropanoïde (élémicine **28**), 4 monoterpènes dont 3 sont menthaniques (α -terpinéol **13**, le terpinèn-4-ol **10**, p-menth-3-èn-8-ol **6**), la *cis*-jasmone **21** et un alcool sesquiterpénique le viridiflorol **27**. Dans la fraction F4, nous identifions en plus du *cis* hydrate de sabinène **4** minoritaire dans l'EH, et un constituant absent de notre banque « Littérature » : la 8-hydroxy-p-menth-4-èn-3-one **17**. Nous détaillerons son identification dans la partie IV.6 « Identification de molécules absentes de nos bibliothèques de spectres de RMN du ^{13}C et analyse structurale de composés non identifiés ».

Nous observons dans les fractions F3 et F4 la présence des deux séries de raies de résonance correspondant aux deux constituants absents de nos banques. Après deux séries de chromatographie sur colonne ouverte avec de la silice de faible granulométrie (35-70 μm), nous parvenons à les concentrer dans deux fractions différentes (45,0% F3-8-6 et 65,5% F3-8-7). Par consultation des données de la littérature, nous identifions le premier constituant comme étant la 8-hydroxy-menthone **15** (45,0% F3-8-6 ; 3,0% dans l'huile essentielle). A l'aide des séquences de la RMN 1D et 2D, nous identifions le second constituant (65,5% F3-8-7 ; 1,8% dans l'huile essentielle) comme étant l'épimère de la 8-hydroxy-menthone **15**, la 8-hydroxy-isomenthone **16**. De plus, ce fractionnement nous permet d'identifier deux lactone p-menthaniques saturées directement dérivées de la *cis-cis*-p-menthenolide **24** absentes de notre banque « Terpènes », il s'agit de la *cis-cis*-dihydro-p-menthenolide A **22** et B **23**

(respectivement 2,0% F'3-7 et 1,1% F'3-1). Nous détaillerons l'identification de ces quatre constituants dans la partie IV.6.

Par ailleurs, l'analyse de l'extrait brut en spectrométrie de masse permet d'identifier deux terpènes menthaniques minoritaires : les *cis* et *trans*-p-menth-2,8-dièn-1-ol **4/5** présentant une teneur de 0,1 % dans l'extrait.

| N° | Constituants | Ir ^a | Ir ^p | %EH | identification |
|-------|--|-----------------|-----------------|------|-----------------------------|
| 1 | oct-1-én-3-ol | 959 | 1447 | 0,7 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 2 | 1,8-cinéole | 1020 | 1211 | 1,3 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 3 | <i>cis</i> hydrate de sabinène | 1082 | 1545 | 0,2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 4 | <i>trans</i> -p-menth-2,8-dièn-1-ol | 1103 | 1628 | 0,1 | Ir, SM |
| 5 | <i>cis</i> -p-menth-2,8-dièn-1-ol | 1117 | 1669 | 0,1 | Ir, SM |
| 6 | p-menth-3-én-8-ol | 1131 | 1605 | 0,4 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 7 | <i>cis</i> -isopulégone | 1149* | 1572 | 0,9 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 8 | <i>trans</i> -isopulégone | 1149* | 1583 | 0,3 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 9 | bornéol | 1149* | 1701 | 1,7 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 10 | terpinén-4-ol | 1161 | 1600 | 0,3 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 11 | néoiso-isopulégol | 1165 | 1610 | 1,4 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 12 | myrténal | 1169 | 1628 | 0,2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 13 | α -terpinéol | 1172 | 1697 | 0,3 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 14 | pulégone | 1218 | 1651 | 14,8 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 15 | 8-hydroxy-menthone | 1222 | 1764 | 3,0 | RMN ¹³ C |
| 16 | 8-hydroxy-isomenthone | 1239 | 1821 | 1,8 | RMN ¹³ C |
| 17 | 8-hydroxy-p-menth-4-én-3-one | 1256 | 1908 | 0,2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 18 | pipériténone | 1309 | 1927 | 2,2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 19 | eugénol | 1333* | 2171 | 0,2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 20 | oxyde de piperitenone | 1333* | 1963 | 0,1 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 21 | <i>cis</i> -jasmone | 1367 | 1947 | 0,4 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 22 | <i>cis-cis</i> -dihydro-p-menthénolide A | 1376 | 2108 | 0,1 | RMN ¹³ C |
| 23 | <i>cis-cis</i> -dihydro-p-menthénolide B | 1392 | 2154 | 0,1 | RMN ¹³ C |
| 24 | <i>cis-cis</i> -p-menthénolide | 1409 | 2218 | 67,3 | RMN ¹³ C |
| 25 | (E)- β -caryophyllène | 1417 | 1594 | 0,2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 26 | mintlactone | 1453 | 2320 | tr | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 27 | viridiflorol | 1515 | 2229 | 0,2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 28 | élémicine | 1584 | 2085 | tr | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| Total | | | | 98,3 | |

L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire (BP-1). (*) : pourcentages donnés sur colonne polaire (BP-20).

Tableau 16 : Composition chimique de l'extrait d'hydrolat de *M. suaveolens* ssp. *insularis*.

L'ensemble des résultats sur l'huile essentielle et l'extrait d'hydrolat de *M. suaveolens* ssp. *insularis* a donné lieu à une publication : (*Flav. Fragr. J.* 2009, **23** : 107-114), et à une communications dans des congrès (International Symposium on Essential Oils ISEO Graz/Autriche 2007) (**Annexe 3**, p. 189).

IV.6 Identification de molécules absentes de nos bibliothèques de spectres de RMN du ¹³C et analyse structurale de composés non identifiés.

Dans ce paragraphe nous apportons une attention particulière aux molécules absentes de notre bibliothèque « Terpènes » et qui ont été identifiées soit à partir de notre bibliothèque « Littérature » soit par une analyse structurale en mettant en œuvre une série complète de séquences de RMN 1D et 2D. Dans le cas d'une identification à partir des données spectrales présentes dans la littérature, nous présentons la structure pour chaque molécule, l'attribution des déplacements chimiques de chaque carbone observés dans la fraction dans laquelle la proportion du composé est la plus importante. Il faut signaler que la comparaison avec les données de la littérature et ainsi l'obtention de valeurs relatant les variations de déplacements chimiques ($\Delta\delta$) ne sont pas toujours rigoureusement possible car ces données ne présentent souvent qu'un seul chiffre significatif. Par ailleurs, dans certain cas litigieux, une séquence appropriée (« spin-écho ou DEPT) a été réalisée pour vérifier la multiplicité des différents atomes de carbone.

Nous décrivons dans une première partie l'identification de molécules à squelette p-menthanique puis dans une seconde partie celle de molécules appartenant à la famille des lactones p-menthaniques particulièrement présentes dans les huiles essentielles de menthe.

IV.6.1 Constituants p-menthaniques absentes de nos banques « Terpènes » et/ou « Littérature ».

IV.6.1.1 L'isopipériténone

Les valeurs des déplacements chimiques ont été relevées dans le spectre de la fraction F9 de l'huile essentielle de *Mentha suaveolens* ssp. *suaveolens*. Les différences de valeurs des déplacements chimiques entre les données présentes dans la banque « Littérature » (Guillon *et al.*, 2000) et celles observées au laboratoire présentent des variations ($\Delta\delta$) plus grandes ($\Delta\delta > 0,07$ ppm) que celles habituellement trouvées. Ces différences sont probablement due à un mauvais positionnement du zéro et aussi liée au fait que le spectre ait été enregistré en mélange. Les valeurs de déplacement chimique caractéristique i) 199,40 ppm d'une fonction cétone ii) 113,54 ppm carbone méthylénique Csp^2 iii) 53,83 ppm carbone déblindé en α de la fonction cétone ainsi que les valeurs 162,04/143,35/126,71 ppm caractéristiques

d'insaturations. L'ensemble des ces valeurs et les observations résultantes permettent de confirmer que ce constituant est l'isopipériténone isomère de position de la pipériténone dont une des doubles liaisons n'est pas située sur les carbones 4 et 8 mais entre les carbones 8 et 9.

| N° | δ (ppm) | δ (ppm) |
|----|-----------------------|----------------|
| | Guillon <i>et al.</i> | 33 |
| 1 | 161,8 | 162,04 |
| 2 | 126,6 | 126,71 |
| 3 | 199,2 | 199,40 |
| 4 | 53,7 | 53,83 |
| 5 | 27,5 | 27,71 |
| 6 | 30,2 | 30,35 |
| 7 | 24,1 | 24,22 |
| 8 | 143,1 | 143,35 |
| 9 | 113,4 | 113,54 |
| 10 | 20,5 | 20,65 |

Figure 18 : Structure et déplacements chimiques de l'isopipériténone **33** relevés dans le spectre de RMN du ^{13}C de l'huile essentielle de *Mentha suaveolens* ssp. *suaveolens* (L.) Hudson et décrits dans la littérature (Guillon *et al.*, 2000).

IV.6.1.2 L'acétate de néoiso-isopulégyle

Les valeurs des déplacements chimiques de l'acétate de néoiso-isopulégyle ont été relevées dans le spectre de la fraction F3 de l'huile essentielle de *Mentha suaveolens* ssp. *suaveolens*. Les valeurs de déplacements chimiques de ce composé ne sont pas présentes dans la littérature. Ce constituant a été préparé au laboratoire par estérification du néoiso-isopulégol. L'identification est réalisée par comparaison des valeurs dans la fraction avec celles enregistrées pour le produit pur. En effet, le $\Delta\delta$ reste faible (0,01-0,06 ppm) malgré la présence d'autres constituants. À notre connaissance ce constituant n'a jamais été identifié à partir d'une source naturelle.

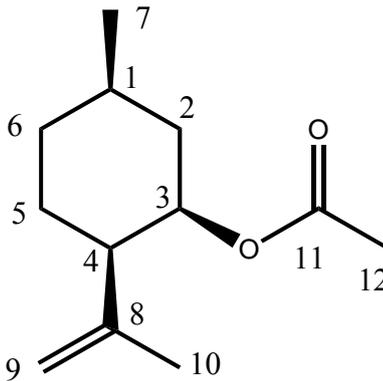
| | N° | REF | δ (ppm) 35 |
|---|----|--------|--------------------------|
|  | 1 | 28,10 | 28,04 |
| | 2 | 35,62 | 35,60 |
| | 3 | 72,20 | 72,18 |
| | 4 | 45,48 | 45,47 |
| | 5 | 22,64 | 22,71 |
| | 6 | 30,65 | 30,68 |
| | 7 | 20,87 | 20,85 |
| | 8 | 145,65 | 145,62 |
| | 9 | 111,67 | 111,65 |
| | 10 | 23,15 | 23,12 |
| | 11 | 170,58 | 170,59 |
| | 12 | 21,35 | 21,35 |

Figure 19 : Structure et déplacements chimiques de l'acétate de néoisopulégyle relevés dans du produit pur (REF) et dans le spectre de RMN du ^{13}C de la fraction F3.

IV.6.1.3 La 8-hydroxymenthone

Les données de la littérature (Von Poser *et al.*, 1996) nous ont permis d'identifier la 8-hydroxymenthone une cétone p-menthanique à partir d'une fraction enrichie (F3-8-6 45,0%) de l'extrait d'hydrolat de *Mentha suaveolens* ssp. *insularis*. Ce produit est aussi présent à l'état de traces dans l'huile essentielle de *Mentha suaveolens* ssp. *insularis*. Nous reportons ci-dessous les données spectrales de ce composé (**Figure 20**). Toutes les valeurs de déplacements chimiques des carbones de ce composé ont été observées dans les spectres de RMN du ^{13}C et sont conformes à celles décrites dans la littérature. Il est à noter que l'analyse par CPG-SM de l'hydrolat ne permet pas d'identifier ce composé (spectre de masse en mode IE en **Annexe 4**, p. 195).

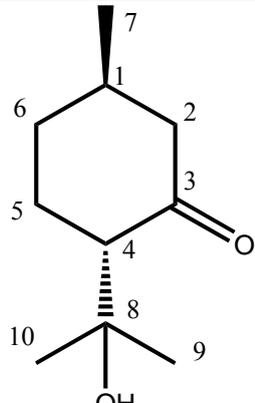
| | N° | δ (ppm) Von Poser <i>et al.</i> | δ (ppm) 15 |
|---|----|--|--------------------------|
|  | 1 | 35,5 | 35,55 |
| | 2 | 51,5 | 51,48 |
| | 3 | 215,1 | 215,24 |
| | 4 | 58,7 | 58,72 |
| | 5 | 28,7 | 28,70 |
| | 6 | 34,0 | 33,88 |
| | 7 | 22,2 | 22,25 |
| | 8 | 71,4 | 71,31 |
| | 9 | 28,5 | 28,43 |
| | 10 | 25,7 | 25,71 |

Figure 20 : Structure et déplacements chimiques de la 8-hydroxymenthone **15** décrits dans la littérature (Von Poser *et al.*, 1996) et observés dans la fraction F3-8-6 de l'extrait d'hydrolat de *Mentha suaveolens* ssp. *insularis*.

IV.6.1.4 La 8-hydroxy-p-menth-4-èn-3-one

La présence de la 8-hydroxy-p-menth-4-èn-3-one a tout d'abord été suggérée par une analyse de l'huile essentielle de *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* par le couplage CPG-SM. Ensuite nous avons relevé dans la fraction F10 (7,9 %) une série de déplacements chimiques. Cette série est conforme à celle publiée pour la 8-hydroxy-p-menth-4-èn-3-one par Von Poser *et al.*, (1996). On note pour le carbone portant la fonction alcool, une valeur de déplacement chimique anormalement élevée qui peut être reliée au mode opératoire utilisé par les auteurs. En effet, ils ont élué ce composé selon un gradient pentane – oxyde de diéthyle et une évaporation incomplète du solvant peut expliquer une confusion entre le pic fonctionnel de l'oxyde de diéthyle (65,8ppm) et le carbone C8 de la 8-hydroxy-p-menth-4-èn-3-one.

| N° | δ (ppm) | δ (ppm) |
|----|-------------------------|-----------|
| | Von Poser <i>et al.</i> | 33 |
| 1 | 30,1 | 30,13 |
| 2 | 47,5 | 47,48 |
| 3 | 202,2 | 202,30 |
| 4 | 143,6 | 143,78 |
| 5 | 143,6 | 143,57 |
| 6 | 34,2 | 34,15 |
| 7 | 21,0 | 20,97 |
| 8 | 65,8 | 71,83 |
| 9 | 29,0 | 29,07 |
| 10 | 29,0 | 28,87 |

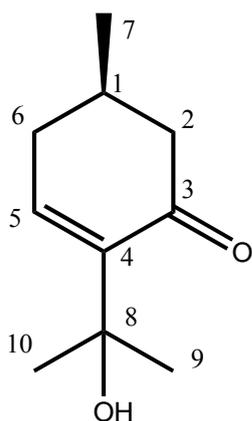


Figure 21 : Structure et déplacements chimiques de la 8-hydroxy-p-menth-4-èn-3-one (δ (**33**) ppm) observées dans la fraction F10 (7,9 %) de l'huile essentielle de *M. suaveolens* ssp. *insularis* et décrits dans la littérature (Von Poser *et al.*, 1996).

IV.6.1.5 La 8-hydroxyisomenthone

La 8-hydroxyisomenthone a été concentré dans une fraction oxygénées F3-8-7 (65,5%) obtenue par une série de chromatographie sur colonne ouverte à partir de l'extrait d'hydrolat de *M. suaveolens* ssp. *insularis* (**Figure 17**). Deux séries de déplacement chimiques sont relevées dans cette fraction, l'une correspondant à la 8-hydroxymenthone tandis que la série de signaux majoritaires appartient au composé absent de nos banques.

L'ensemble des séquences de RMN 1D et 2D, ^1H , ^{13}C , écho de spin (nombres de protons liés au carbone), COSY (corrélation ^1H - ^1H) et HSQC (corrélations ^1H - ^{13}C , ^1J) et HMBC (corrélations ^1H - ^{13}C ; ^2J , ^3J et ^4J), ont été mises en œuvre afin de déterminer la structure de ce composé et de proposer une attribution de l'ensemble des déplacements chimiques pour les spectres ^1H et ^{13}C .

La séquence d'écho de spin ainsi que le spectre de RMN du ^{13}C , combinée à l'analyse par CPG-SM (pic moléculaire à $155 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), nous permettent d'avancer la formule $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2$ et d'en déduire la présence de deux centres d'insaturation (spectre de masse en mode IE en **Annexe 5**, p. 196). D'autres précisions peuvent être apportées : d'une part le premier centre d'insaturation correspond à une fonction cétone (216,20 ppm) et d'autre part, le deuxième centre d'insaturation pourrait être un cycle. De plus, le carbone caractéristique résonnant à 71,59 ppm ainsi que son intensité sont en accord avec la présence d'une fonction alcool tertiaire (**Annexe 6**, p. 197).

Le spectre de RMN du proton est assez complexe du fait de la multiplicité importante de nombreux signaux. A l'aide de la séquence HSQC (**Annexe 7**, p. 198), il est possible de faire plusieurs observations :

- six protons équivalents résonnant à 1,23 ppm sous forme d'un singulet sont portés par le C9 (25,23 ppm) et C10 (28,49 ppm). La multiplicité de type singulet permet donc de déduire que les C9 et C10 sont liées à un carbone tétrasubstitué (C8, 71,83 ppm).
- les trois protons méthyliques résonnant sous forme de doublet à 0,96 ppm sont portés par le carbone C7 résonnant à 18,68 ppm. Cette multiplicité (doublet) permet donc de déduire que le C7 est lié au carbone méthyne C1 résonnant à 31,57 ppm.

La séquence HMBC (corrélations ^1H - ^{13}C ; ^2J , ^3J et ^4J) permet à partir des corrélations proton-carbone suivantes de tirer les conclusions suivantes :

- les protons H6a et H2b corrélaient avec respectivement les C1, 2, 4, 5 et C1, 3, 6, 7 et permettent ainsi de déduire la position du méthyle sur le cyclohexane par rapport à la fonction cétone.
- le H4 corréla avec les C3, 5, 8, 9, 10 permettent de positionner le groupement isopropyle par rapport à la fonction cétone.

Ces deux observations confirment que le squelette de cette molécule est bien de type parmenthanique et que le groupement hydroxy-isopropyle est lié au carbone en α de la fonction cétone (59,03 ppm).

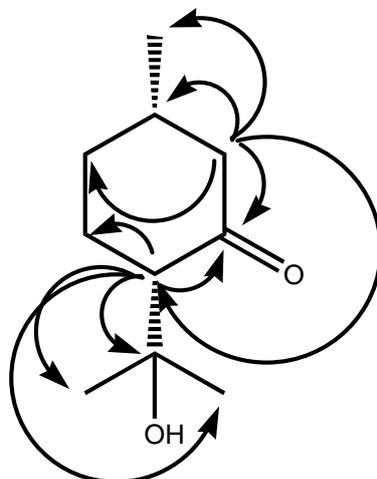
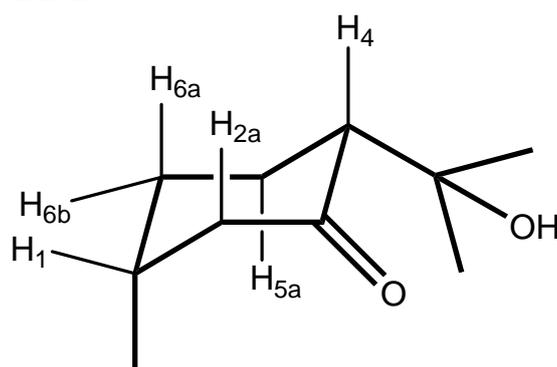


Figure 22 : Structure et corrélations HMBC (protons résonnant à 2,13 et 2,39 ppm) de la 8-hydroxyisomenthone.



| | δ (^{13}C) ppm | Spin écho | δ (^1H) H | δ (^1H) ppm | Multiplicité (J, Hz) | COSY | HMBC |
|----|-------------------------------------|-----------------|--------------------------------|----------------------------------|-------------------------|------|------------------|
| 1 | 31,57 | CH | - | 2,42 | m | | |
| 2 | 49,56 | CH ₂ | a | 2,53 | ddd (13,4 ; 5,8 ; 0,5) | 2b | C-1, 3, 6, 7 |
| | | | b | 2,13 | ddd (13,4 ; 3,0 ; 2,0) | 2a | C-1, 3, 4, 6, 7 |
| 3 | 216,20 | C | - | - | | | |
| 4 | 59,03 | CH | - | 2,39 | ddd(12,3 ; 6,0 ; 1,2) | 5b | C-3, 5, 8, 9, 10 |
| 5 | 24,34 | CH ₂ | a | 1,80 | td (12,4 ; 4,0) | | C-1, 4, 6, 8 |
| | | | b | 2,05 | dm | | C-4, 6 |
| 6 | 30,64 | CH ₂ | a | 1,92 | dt (12,9 ; 4,3) | 6b | C-1, 2, 4, 5, 7 |
| | | | b | 1,68 | dm | 6a | C-1, 2, 4, 5 |
| 7 | 18,68 | CH ₃ | - | 0,96 | d (7,1) | 1 | C- 1, 2, 6 |
| 8 | 71,59 | C | - | - | | | |
| 9 | 25,53 | CH ₃ | - | 1,23 | s | | C-4, 5, 8, 9, 10 |
| 10 | 28,49 | CH ₃ | - | 1,23 | s | | C-4, 5, 8, 9, 10 |

d : doublet, t : triplet, m : multiplet, ddd : doublet de doublet dédoublé,
dt : doublé de triplet, td : triplet dédoublé, dm : doublet de multiplet

Figure 23 : Structure, conformation et données spectrales de la 8-hydroxyisomenthone.

Cette molécule possède 2 centres chiraux, il nous est cependant possible de déterminer sa stéréochimie grâce à l'étude du spectre de RMN du ^1H . Le proton H4 résonnant à 2,39 ppm (ddd) réalise un premier grand couplage (12,4 Hz) de type axial-axial (angle dièdre proche de 180°C) avec le proton axial H5a et deux autres couplages de constantes plus faibles. L'un résultant d'un couplage en ^3J (6,0 Hz) avec le H5b due à un angle dièdre proche de 0°C et le dernier résultant d'un couplage en ^4J (1,2 Hz) avec le proton H6a axial. De plus, le proton H5a résonne à 1,80 ppm (td) et réalise un grand couplage de type triplet (12,4 Hz) avec les deux protons axiaux porté le C4 et C6 (6a). Grâce à l'ensemble de ces observations, il est possible d'affirmer que le groupement hydroxy-isopropyle est en position équatoriale énergiquement plus stable.

La stéréochimie du deuxième centre de chiralité et donc la position du méthyle C7 peut être déterminée grâce au spectre de RMN du ^1H . En effet, au couplage de type dt du proton axial 6a qui résonne à 1,92 ppm. En effet, le proton H6a axial réalise un seul et unique grand couplage (12,9 Hz) de type axial-axial (angle dièdre proche de 180°C) avec le proton H5a. Si le méthyle était équatorial on observerait un couplage de type t, le proton axial couplerait avec deux protons. Le groupement méthyle est donc en position axiale. Les deux substituants sont donc « *cis* », il s'agit du composé hydroxylé en position 8 dérivé de l'isomenthone, il s'agit de la 8-hydroxyisomenthone.

Il est à noter que la 8-hydroxyisomenthone ainsi que son stéréoisomère la 8-hydroxymenthone possèdent des spectres de masse parfaitement superposables en impact électronique. Seuls les indices de rétention sur colonne apolaire (1231 *vs.* 1238) mais surtout sur colonne polaire (1764 *vs.* 1821) dans le cas d'une identification par le couplage CPG-SM permettent de distinguer ces deux stéréoisomères.

IV.6.2 Lactones p-menthaniques absentes de notre banque « Terpènes »

IV.6.2.1 Les *cis-cis*-dihydro-p-menthénolides A et B

Les données de la littérature nous permettent d'identifier deux lactones menthaniques stéréoisomères, les *cis-cis*-dihydro-p-menthénolide A et B, saturées et dérivées de la *cis-cis*-p-

menthénolide. Elles sont respectivement identifiées dans les fractions F3-7 (2,0%) et F3-1 (1,1%) de l'hydrolat de *M. suaveolens* ssp. *insularis*. Nous reportons ci-dessous les valeurs de déplacement chimique de RMN du ^{13}C de ces deux composés qui sont conformes à celles décrites par Gaudin, 2000.

| N° | δ (ppm) | δ (ppm) | δ (ppm) | δ (ppm) |
|----|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | Gaudin | 22 | Gaudin | 23 |
| 10 | 179,6 | 179,72 | 179,7 | 179,86 |
| 3 | 77,5 | 77,48 | 77,9 | 77,91 |
| 4 | 41,7 | 41,67 | 38,8 | 38,77 |
| 2 | 37,8 | 37,76 | 33,1 | 32,93 |
| 8 | 35,3 | 35,26 | 41,3 | 41,30 |
| 1 | 29,5 | 29,42 | 25,3 | 25,13 |
| 6 | 28,7 | 28,65 | 28,9 | 28,78 |
| 5 | 24,0 | 23,99 | 17,4 | 17,27 |
| 7 | 22,0 | 22,06 | 19,8 | 19,76 |
| 9 | 13,3 | 13,23 | 9,7 | 9,76 |

Figure 24 : Structures et déplacements chimiques des *cis-cis*-dihydro-*p*-menthénolide A et B décrits dans la littérature (Gaudin, 2000) et observés respectivement dans les fractions F3-7 **22** et F3-1 **23**.

Il est à noter que la *cis-cis*-dihydro-*p*-menthénolide A a déjà été identifiée dans l'huile essentielle de *Mentha piperita* (Näf et Velluz, 1998) alors que la *cis-cis*-dihydro-*p*-menthénolide B a été décrite comme possédant une activité répulsive envers les insectes (Gaudin, 2000).

IV.6.2.2 La *cis-cis*-*p*-menthénolide

Nous avons isolé la *cis-cis*-*p*-menthénolide selon le protocole détaillé en partie expérimentale. Ainsi, l'huile essentielle *M. suaveolens* ssp. *insularis* (5,0 g) a été soumise à un fractionnement sur gel de silice de type « flash », puis sur colonne ouverte de gel de silice plus fine (63-200 μm) et finalement, la réalisation d'une chromatographie d'exclusion stérique permet d'aboutir à l'isolement de la *cis-cis*-*p*-menthénolide avec une pureté de 95% et en quantité suffisante pour réaliser l'analyse structurale.

L'ensemble des séquences de RMN 1D et 2D, ^1H , ^{13}C , écho de spin (nombre de protons liés au carbone), COSY (corrélations ^1H - ^1H) et HSQC (corrélations ^1H - ^{13}C , ^1J) et HMBC (corrélations ^1H - ^{13}C ; ^2J , ^3J et ^4J), ont été mises en œuvre afin de déterminer la structure de ce

composé et de proposer une attribution de l'ensemble des déplacements chimiques pour les spectres ^1H et ^{13}C .

La séquence d'écho de spin ainsi que le spectre de RMN du ^{13}C , combinés à l'analyse par CPG-SM (pic moléculaire à $166 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) (**Annexe 7**, p. 198), nous permet de proposer la formule brute $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_2$ et de déduire la présence de quatre centres d'insaturations. D'autres précisions peuvent être apportées : deux des insaturations correspondent d'une part, à une double liaison exocyclique (137,55 et 119,89 ppm) et d'autre part, à une fonction carbonyle dont le déplacement chimique est très blindé à 170,85 ppm (**Annexe 8**, p. 198). Les deux autres centres d'insaturations correspondent donc à deux cycles. Le carbone méthyne qui résonne à 77,56 ppm est probablement en position α d'un oxygène.

Le spectre de RMN du ^1H est assez complexe du fait de la présence de nombreuses superpositions dans la zone 0,9-1,5 ppm mais aussi de la multiplicité importante de chaque signal. A l'aide de la séquence HSQC, il est possible de faire plusieurs observations :

- les deux protons éthyléniques, aisément repérables à 5,5 et 6,3 ppm, sont portés par le carbone à 119,89 ppm et leurs signaux se présentent sous la forme de doublet résultant du couplage géminial ;
 - le signal du proton, résonnant à 4,69 ppm porté par le carbone à 77,56 ppm, présente une multiplicité de type ddd résultant de couplages avec trois protons non équivalents ;
 - Le proton résonnant à 3,14 ppm corrèle avec le carbone méthyne à 38,98 ppm est probablement en position allylique ;
 - les protons méthyliques résonnant sous forme de doublet à 0,9 ppm sont portés par le carbone à 21,90 ppm qui est donc lié au dernier carbone méthyne résonnant à 28,93 ppm.

La séquence HMBC permet d'observer les corrélations proton-carbone suivantes :

- le proton résonnant à 4,69 ppm corrèle avec les carbones 2 (39,03 ppm) et 4 (38,98 ppm), difficilement différenciables (tache large englobant les deux carbones), 10 (170,85 ppm) et 8 (137,55 ppm) (**Annexe 9**, p. 199);
 - les protons qui résonnent à 5,50 et 6,30 ppm corrèlent avec les quatre carbones du cycle furanique (3, 4, 5, 8 et 10) ainsi qu'avec le carbone 5 du cyclohexane ;
 - le proton résonnant à 3,14 ppm corrèle avec les carbones 3, 5, 6, 8 et 10 ce qui nous permet de positionner le cycle furanique par rapport au cyclohexane (**Annexe 10**, p. 199) ;

- le proton résonnant à 0,87 ppm corrèle avec les carbones 1, 3, 4 et 7, ce qui nous permet de positionner le groupement méthyle sur le cyclohexane (le groupe méthyle est en para du substituant de la jonction des cycles).

L'ensemble des corrélations observées (COSY, HSQC, HMBC) sont reportées dans la **Figure 25** et nous permettent de proposer la structure de la lactone para-menthanique représentée à la **Figure 26**.

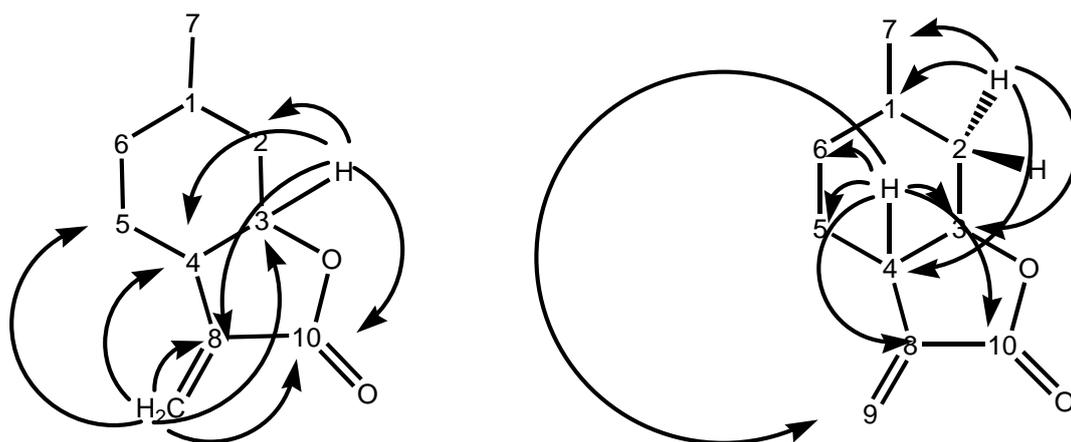


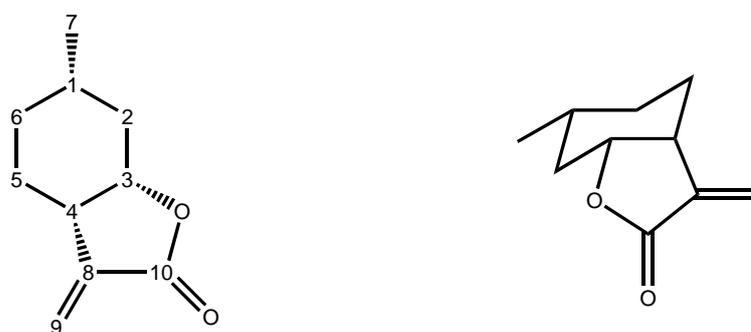
Figure 25 : Structure et corrélations HMBC (protons résonnant à 4,69, 5,50 et 6,30 ppm à gauche et protons résonnant à 0,87 et 3,14 ppm à droite) de la *cis-cis*-p-menthénolide.

Plusieurs stéréoisomères de la lactone para-menthanique identifiée sont possibles en fonction de la stéréochimie de la jonction des cycles et de la position relative du groupe méthyle. Ainsi, la multiplicité et la valeur des constantes de couplages du proton résonnant à 4,69 ppm sont en accord avec une jonction *cis* de la lactone. Cette multiplicité est de type ddd avec une constante de couplage de 13,6 Hz de type axial-axial (angle dièdre de 180°) et deux autres couplages présentant des valeurs plus faibles de 7,0 et 6,7 Hz qui sont dues à des angles dièdres proches de 0°. Une comparaison avec les données de la littérature vient confirmer cette jonction *cis* :

- les déplacements chimiques à 4,69 ppm et 3,14 ppm sont caractéristiques d'une jonction *cis*, une jonction *trans* conduisant à des déplacements chimiques plus blindés respectivement à 4,0 et 2,5 ppm (Bal et Pinnick, 1981)
- le déplacement chimique du méthylène exocyclique à 119,89 ppm est lui aussi en accord avec une jonction *cis* ; le déplacement chimique étant plus blindé pour la jonction *trans* (116,86 ppm) en présence d'effet γ -stérique (Gaudin, 2000).

Seule la stéréochimie du groupe méthyle reste à définir. La multiplicité et les valeurs des constantes de couplages du proton résonnant à 0,87 ppm permettent de déduire une stéréochimie *cis* par rapport à la jonction de cycle. La multiplicité est de type td avec une constante de couplage de 13,8 Hz avec les deux protons axiaux portés par C1 et C3 (angle dièdre 180°) et un autre couplage avec le proton géminé (11,2 Hz). De plus, le déplacement chimique du carbone tétrasubstitué à 137,55 ppm est lui aussi en accord avec une stéréochimie *cis*, celui-ci étant plus déblindé pour la jonction *trans* (139,24 ppm) en l'absence d'effet γ -stérique (Gaudin, 2000).

L'ensemble de ces informations permettent de déduire la structure et la stéréochimie de la *cis-cis*-p-menthénolide présentées dans la **Figure 26**. Nous avons alors procédé à une interrogation de la banque de données (ACS sur Scifinder). La molécule recherchée a été isolée au cours de la synthèse chirale de la mintlactone par Crisp et Meyer (1995), qui reportent la série de déplacements chimiques de RMN du carbone-13 sans toutefois les attribuer. Il s'agit de la (3*aR*,6*S*,7*aS*)-(-)-hexahydro-6-méthyl-3-méthylène-2(3*H*)benzofuranone que nous nommerons la *cis-cis*-p-menthénolide (stéréochimie *cis* de la jonction de cycle et *cis* du groupement méthyle par rapport au cycle furanique). Nous notons une parfaite concordance de nos valeurs de déplacements chimiques du ^{13}C avec celles décrites (Crisp et Meyer, 1995).



| | δ (^{13}C) ppm | Spin écho | δ (^1H) H ppm | Multiplicité (J, Hz) | COSY | HMBC |
|----|-------------------------------------|-----------------|------------------------------------|----------------------|----------------|---------------|
| C1 | 28,93 | CH | - 1,35 | m | 7 | 7, 5, 6, 2, 4 |
| C2 | 39,03 | CH ₂ | a 0,87 | td (13,8; 11,2) | 3, 2b | 1, 3, 4, 7 |
| | | | b 2,17 | m | 3, 2a | 1, 3, 4, 7 |
| C3 | 77,56 | CH | - 4,69 | ddd (13,8; 7,0; 6,7) | 4, 2b, 2a | 4, 10, 8 |
| C4 | 38,98 | CH | - 3,14 | h (3,1) | 9a, 9b, 5a, 5b | 8, 3 |
| C5 | 23,88 | CH ₂ | a 2,18 | m | 5a, | 1, 3, 4, 6, 8 |
| | | | b 1,77 | m | 6a, 6b, 5a, 4 | 1, 3, 4, 6, 8 |
| C6 | 28,57 | CH ₂ | a 0,92 | m | 6b, 5a, 5b, 1 | 1, 5 |
| | | | b 1,45 | m | 6a, 5a, 5b, 1 | 1, 5, 7, 4, 2 |

| | | | | | | | |
|-----|--------|-----------------|---|------|--------|-------|----------------|
| C7 | 21,96 | CH ₃ | - | 0,90 | m | 1 | 1, 6, 2 |
| C8 | 137,55 | C | - | - | - | - | - |
| C9 | 119,89 | CH ₂ | a | 5,50 | d(3,2) | 9b, 4 | 4, 3, 5, 8, 10 |
| | | | b | 6,30 | d(3,5) | 9a, 4 | 4, 3, 5, 8, 10 |
| C10 | 170,85 | C | - | - | - | - | - |

d : doublet, t : triplet, m : multiplet, ddd : doublé dédoublé dédoublé

Figure 26 : Structure, conformation et données spectrales la *cis-cis-p*-menthénolide.

IV.7 Variabilité des huiles essentielles de l'espèce *M. suaveolens* Ehrh.

L'espèce *suaveolens* Ehrh. est fréquemment présente en Corse et représentée par deux sous-espèces, ssp. *suaveolens* et ssp. *insularis*, qui sont très proches botaniquement. Les feuilles d'*insularis* sont plus vertes et allongées que celles de *suaveolens*, leurs fleurs sont blanchâtres alors que celles de *suaveolens* sont plus roses. Le caractère pétiolé des feuilles d'*insularis* (<5 mm) alors que celles de *suaveolens* sont sessiles constitue le critère le plus fiable permettant la discrimination des deux sous espèces. Cependant, les botanistes s'accordent à dire que l'identification botanique requiert beaucoup d'attention. Pour ces raisons, tous les échantillons récoltés ont été expertisés par Mme Laetitia Hugot, qui dirige le conservatoire botanique de Corse.

Les huiles essentielles constituent l'expression du métabolisme des plantes, leurs compositions reflètent autant les processus biogénétique et biochimique que les multiples stades de développement de la plante. Dans une partie précédente, nous avons montré que la composition chimique de l'huile essentielle de *M. suaveolens* ssp. *insularis* est caractérisée par la présence majoritaire de la pulégone associée à la *cis-cis-p*-menthénolide lactone *p*-menthanique jusqu'à présent uniquement trouvée chez cette sous espèce. Deux compositions différentes, dominées l'une par l'oxyde de piperiténone et l'autre, plus originale, par la pipériténone, ont été déterminées pour les huiles essentielles de *M. suaveolens* ssp. *suaveolens*.

Nous avons donc réalisé un échantillonnage sur l'ensemble du territoire Corse pour confirmer les compositions chimiques déjà mises en évidence. Compte tenu des profils chromatographiques mis en évidence lors des études détaillées précédentes (PC1 et PC2 de la ssp. *suaveolens* et huile essentielle de la ssp *insularis*), nous souhaitons également établir si la composition chimique des huiles essentielles peut constituer une aide à l'identification des deux sous-espèces.

Composition chimique et analyse statistique

Cinquante neuf plants individuels de *Mentha suaveolens* Ehrh. ont été récoltés sur l'ensemble du territoire Corse. Il est à noter que les lieux de récolte des deux sous-espèces sont éloignés d'au minimum 1 km, afin d'éviter tout problème d'hybridation. Tous les plants de menthe récoltés appartiennent à l'espèce *suaveolens*, 37 possèdent la plupart des caractéristiques botaniques (forme et couleur des feuilles, pétiole) de *M. suaveolens* ssp. *insularis* et 22 celles de *M. suaveolens* ssp. *suaveolens*. Nous nous sommes donc intéressés aux 59 huiles essentielles obtenues à partir des parties aériennes des menthes récoltées et hydrodistillées au laboratoire. Les rendements en huile essentielle, calculés par rapport au poids de végétal préfané varient considérablement entre les deux sous-espèces puisqu'ils sont compris entre 0,18 et 0,23% pour la sous-espèce *suaveolens* et entre 0,55-0,65% pour la sous-espèce *insularis*.

La composition chimique des huiles essentielles a été déterminée par RMN du ^{13}C et par CPG(Ir). Nous avons opéré par comparaison des indices de rétention sur deux colonnes de différentes polarités avec ceux relevés dans les études détaillées précédentes. De plus 29 échantillons ont ensuite été analysés par RMN du ^{13}C , ce qui permet d'assurer la présence de constituants présents à des teneurs supérieures à 0,4-0,5%. Au total, 29 constituants dont 10 constituants oléfiniques (dont un seul sesquiterpène) et 19 oxygénés (dont un seul sesquiterpène) ont été repérés sur chaque chromatogramme. Ainsi le pourcentage de composés identifiés varie de 86,4 à 99,6% (**Annexe 11**, p. 200).

Afin d'obtenir une description statistique de notre échantillonnage, nous avons soumis ces résultats à une Analyse en Composante Principale (ACP) et parallèlement nous avons mis en œuvre l'algorithme de partition des centres de groupes (*k*-means). Ainsi le plan défini par les deux premiers axes représente 90,21% de la variance totale de la population (X : 65,02 et Y : 24,74%), indique la présence de trois groupes distincts. (**Figure 27**). Les faibles valeurs trouvées pour les écart-types des composés majoritaires regroupés dans le **Tableau 17** montrent la très grande homogénéité de ces groupes

Le groupe le plus important (groupe I, 37 échantillons) rassemble les compositions caractérisées par la présence de la pulégone (15,7-61,6%) et de la *cis-cis*-*p*-menthénolide (5,9-57,9%) comme constituants majoritaires (**Tableau 17**). Le néoiso-isopulégol (0,7-19,8%), la pipériténone (0,6-16,1%), le 1,8-cinéole (0-12,7%) et l'oxyde de pipériténone (0-10,0%) sont

présents à des teneurs appréciables. La composition de ces 37 échantillons est qualitativement proche de celle de l'huile essentielle de *M. suaveolens* ssp. *insularis* décrite dans la précédente étude. D'ailleurs, ce groupe rassemble la totalité des échantillons identifiés comme *M. suaveolens* ssp. *insularis*.

| Constituants | groupe I (37) | | | | groupe II (17) | | | | groupe III (5) | | | |
|--------------------------------|---------------|------|------|------|----------------|------|------|------|----------------|-----|------|------|
| | M | E T | Min | Max | M | E T | Min | Max | M | E T | Min | Max |
| 1,8-cinéole | 1,9 | 2,8 | 0,0 | 12,7 | 0,5 | 0,7 | 0,0 | 2,2 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,3 |
| limonène | 3,8 | 2,2 | 0,3 | 8,4 | 4,0 | 5,0 | 0,0 | 16,0 | 2,7 | 0,6 | 2,0 | 3,5 |
| bornéol | 2,6 | 1,8 | 0,0 | 6,9 | 1,2 | 1,6 | 0,0 | 4,5 | 1,2 | 0,8 | 0,0 | 2,1 |
| <i>trans</i> -isopulégone | 0,4 | 0,2 | 0,0 | 1,0 | 0,1 | 0,3 | 0,0 | 1,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>cis</i> -isopulégone | 1,3 | 0,5 | 0,0 | 2,7 | 1,9 | 2,8 | 0,0 | 11,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| néoiso-isopulégol | 4,0 | 3,6 | 0,7 | 19,8 | 1,1 | 2,4 | 0,0 | 10,3 | 1,4 | 0,8 | 0,0 | 2,1 |
| pulégone | 39,8 | 9,4 | 15,7 | 61,6 | 3,0 | 6,0 | 0,0 | 26,2 | 2,2 | 1,1 | 0,2 | 3,1 |
| isopipériténone | 0,1 | 0,4 | 0,0 | 2,2 | 0,6 | 0,9 | 0,0 | 3,6 | 13,4 | 4,7 | 9,1 | 20,2 |
| pipériténone | 3,3 | 3,3 | 0,6 | 16,1 | 3,9 | 5,1 | 0,0 | 17,8 | 68,0 | 5,0 | 60,7 | 73,5 |
| oxyde de pipériténone | 0,6 | 1,9 | 0,0 | 10,0 | 63,6 | 11,2 | 45,8 | 82,8 | 1,6 | 0,6 | 0,5 | 1,9 |
| <i>cis-cis</i> -p-menthénolide | 25,6 | 11,1 | 5,9 | 57,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

M: Moyenne ; E T : Ecart Type ; Min : Minimum ; Max : Maximum ; Type I: *M. suaveolens* ssp. *insularis*; Type II and III: *M. suaveolens* ssp. *suaveolens*.

Tableau 17 : Caractéristiques des trois groupes mis en évidence par l'ACP.

Les 22 échantillons qui proviennent de la sous-espèce *suaveolens* sont répartis en deux groupes :

- le groupe II (17 échantillons) rassemble les compositions caractérisées par la présence de l'oxyde de pipériténone (45,8-82,3%) comme constituant majoritaire (**Tableau 17**). Il est associé à la pulégone (0,0-26,2%), la *cis*-isopulégone (0,0-11,3%) et la pipériténone (0,0-3,6%).
- le groupe III (5 échantillons) rassemble les compositions caractérisées par la présence de la pipériténone (37,5-73,5%) et de l'isopipériténone (2,8-20,2%) comme constituants majoritaires.

Les groupes II et III présentent des compositions chimiques qualitativement proches de celles des deux profils chromatographiques (PC1 et PC2) décrits précédemment pour les huiles essentielles de *M. suaveolens* ssp. *suaveolens*. Dans ces deux groupes, tous les échantillons ont été botaniquement identifiés comme ssp. *suaveolens*.

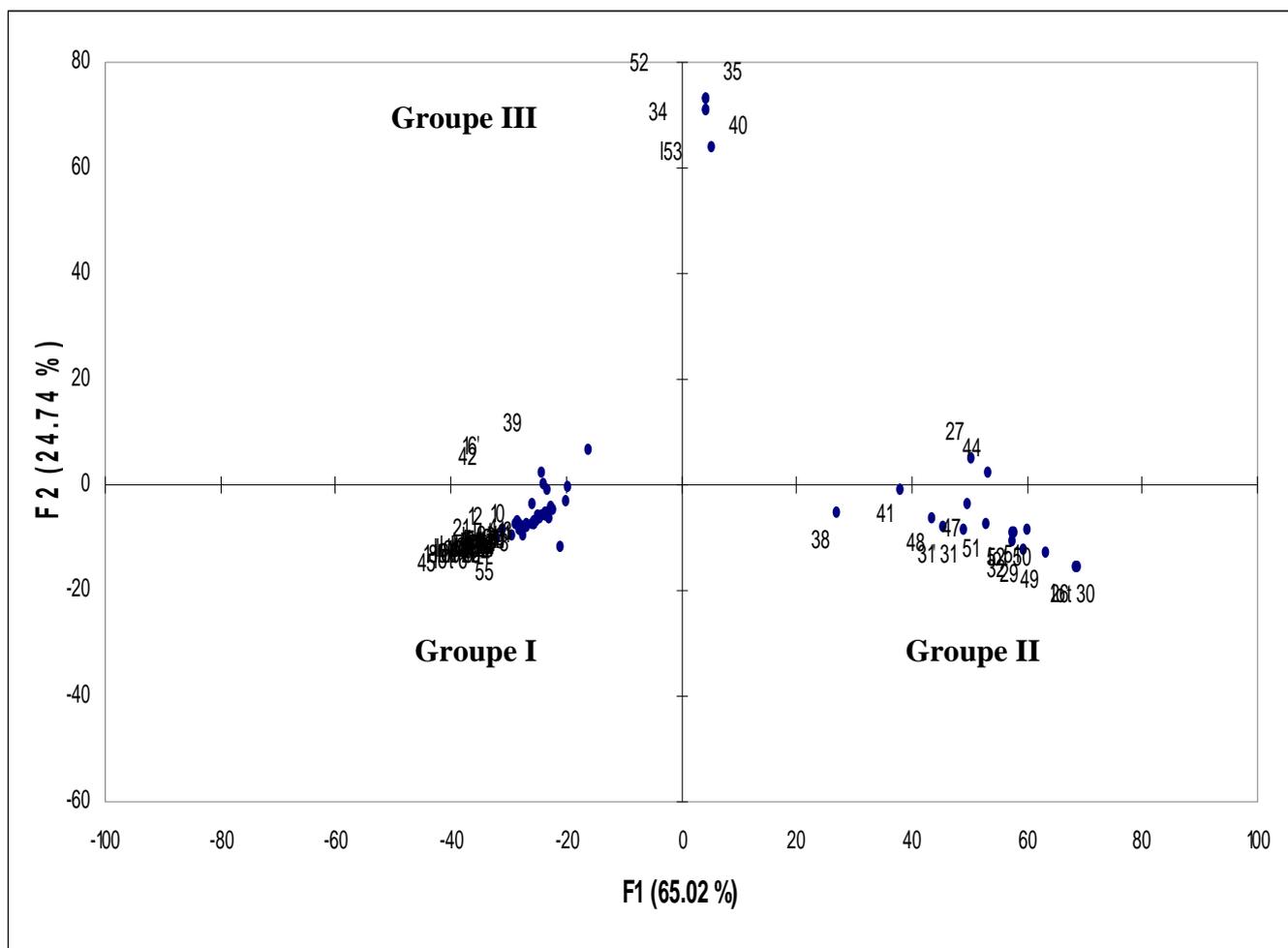


Figure 27 : Analyse en Composantes Principales de la composition chimique des huiles essentielles de *M. suaveolens* Ehrh.

L'identification botanique au sein du genre *Mentha* est considérée comme une tâche difficile. La différenciation des deux sous-espèces de *M. suaveolens* : *suaveolens* et *insularis* peut être réalisé en prenant en compte différents paramètres morphologiques (couleurs et formes des fleurs et des feuilles, absence ou présence de pétiole). L'étude des compositions chimiques des 59 échantillons d'huiles essentielles isolées de plants de *M. suaveolens* poussant à l'état sauvage en Corse, suivie par une analyse statistique des données permet une différenciation claire des deux sous-espèces et ainsi de lever toute ambiguïté pouvant subsister après un examen botanique. Sur la base du critère présence (groupe I) / absence (groupe II et III) de la *cis-cis*-p-menthénolide, il est possible de déduire l'appartenance à la sous espèce *insularis* ou *suaveolens*. L'ensemble des résultats sur les huiles essentielles de *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* et ssp. *insularis* a donné lieu à une publication (*Chemistry and biodiversity*, **2010** : **4**, 1002-1008) et à une communication dans un congrès (International Symposium on Essential Oils ISEO Savigniono/Italie 2009) (**Annexe 12**, p. 203).

V. BILAN DE L'ETUDE SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES DE MENTHES POUSSANT A L'ETAT SPONTANE EN CORSE

Dans la première partie de notre étude sur les menthes poussant à l'état spontané en Corse, nous avons analysé par RMN du ^{13}C et CPG(Ir), l'huile essentielle commerciale de *M. aquatica*. Ainsi, 35 constituants (31 monoterpènes et 4 sesquiterpènes) qui représentent 97,0 % de la composition chimique totale ont pu être identifiés. Les principaux constituants sont le menthofurane majoritaire (près de 51%) et, dans une moindre mesure, le 1,8-cinéole (5,9 %) et le limonène (5,3 %). En ce qui concerne les constituants minoritaires, il s'agit de la première mise en évidence de lactones para-menthaniques dans une huile essentielle de *M. aquatica*. Ces composés, à l'exception de l'hydroxy mintlactone, ont déjà été décrits dans l'huile essentielle de *M. piperita* L. (Frérot *et al.*, 2002 ; Naf et Velluz, 1998). Pour autant, malgré des analyses réalisées directement après la distillation, il n'est pas possible d'exclure qu'ils résultent d'une auto-oxydation de l'huile essentielle. En effet, l'AFNOR souligne le fait que le phénomène d'auto-oxydation constitue un critère de reconnaissance du menthofurane. La composition chimique de l'huile essentielle de *M. aquatica* de Corse se rapproche de celles décrites en Italie (Maffei, 1988) et en Croatie (Jerkovic et Mastelic, 2001) avec de fortes teneurs en menthofurane (50,7% vs. 42,8-59,7%) et, dans une moindre mesure, en 1,8-cinéole (5,9% vs. 7,3-18,4%). Cependant, ces similitudes sur le bassin méditerranéen ne sont pas totales puisque nous notons une teneur appréciable pour le terpinèn-4-ol en Italie (7,5 % et 13,4%) et l'absence du limonène en Croatie.

Dans une seconde partie de notre étude nous nous sommes intéressés à l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de *M. pulegium*. La partie oxygénée de cette huile essentielle est majoritairement composée de cétones dont la pulégone est le composé majoritaire (50,5-90,8%) suivi à de moindres teneurs de la menthone (1,0-16,9%) et l'isomenthone (0,6-20,7%). De plus, il apparaît que la composition chimique des huiles essentielles obtenues soit par hydrodistillation classique (processus de laboratoire) soit par entraînement à la vapeur (processus industriel) sont proches. En effet, aucune variation qualitative n'a été observée et seules des variations quantitatives sont à noter et concernent par exemple, la pulégone dont la teneur peut varier de 50,5 à 90,0%.

La composition des huiles essentielles de *M. pulegium* est donc caractérisée par la pulégone comme constituant majoritaire, comme de nombreuses huiles décrites dans la littérature (Lawrence, 2007) au Maroc, Grèce, Inde et Uruguay (Bouchra *et al.*, 2003/ Lorenzo *et al.*, 2002 ; El-ghorab, 2006 ; Kokkini *et al.*, 2002). Ainsi les échantillons d'huiles essentielles de Corse ne se démarquent pas de ceux décrits dans la littérature. Seule l'association dans un échantillon (n°8) de la pulégone (50,5%) avec à la fois l'isomenthone (20,7%) et la menthone (12,3%) est originale. Toutefois la présence d'un seul échantillon, original par sa composition chimique, ne peut en aucun cas constituer un type chimique différent de ceux décrits.

Dans une troisième partie nous nous sommes intéressés aux huiles essentielles de l'espèce *Mentha suaveolens* Ehrh. représentée en Corse par deux sous-espèces : *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* et *M. suaveolens* ssp. *insularis*. L'identification des composés des huiles essentielles de *Mentha suaveolens* ssp. *suaveolens* (L.) Hudson a été réalisée par CPG(Ir), CPG-SM et RMN du ¹³C et nous avons mis en évidence deux compositions chimiques. Les deux huiles essentielles sélectionnées sur le profil chromatographique (PC1 et PC2) sont caractérisées par une teneur importante en monoterpènes oxygénés (91,5% PC 1 ; 85,7% PC 2) dont une grande majorité présente un squelette p-menthanique. Ainsi, la pipériténone (73,5%) est le composé majoritaire suivi par l'isopipériténone (9,4%) dans l'huile essentielle PC1 alors que l'oxyde de pipériténone (72,0%) caractérise celle du second profil PC2. Malgré le nombre important de types chimiques cités dans la littérature concernant les huiles essentielles de *Mentha suaveolens* ssp. *suaveolens* (L.) Hudson la présence majoritaire de la pipériténone associée avec l'isopipériténone n'a jamais été décrite, ce qui confère une certaine originalité à cet échantillon de Corse. De plus, l'isopipériténone est un composé peu commun des huiles essentielles de menthe, la présence de ce constituant (13,4%) n'est décrite que pour un échantillon provenant du Japon (Handa *et al.*, 1964). Par ailleurs, la présence de l'acétate de néoiso-isopulégyle composé jamais décrit comme constituant d'une huile essentielle même à des proportions très faibles, rajoute de l'originalité à cette huile essentielle. Le profil PC2 possède une composition chimique classique puisque de telles compositions dominées par la présence de l'oxyde de pipériténone ont été décrites au Maroc et au Japon (Ouzmil *et al.*, 2002 ; Handa *et al.*, 1964 ; Umemoto *et al.*, 1994) alors que le PC1 est décrit pour la première fois pour les huiles essentielles de *Mentha suaveolens* ssp. *suaveolens* (L.) Hudson

L'analyse par CPG(Ir) et RMN du ^{13}C des parties aériennes de *M. suaveolens* ssp. *insularis* a conduit à l'identification de 51 composés (36 monoterpènes, 10 sesquiterpènes, 2 aliphatiques, 3 phénylpropanoïdes) qui représentent 96,1% de la composition chimique totale. L'huile essentielle est caractérisée par une teneur importante en monoterpènes oxygénés (85,2%) dont une grande majorité présente un squelette p-menthanique. Les constituants majoritaires sont la pulégone (44,4%) et la *cis-cis*-p-menthénolide (27,4%), suivis à des teneurs bien moins importantes, du limonène (4,3%) et du néoiso-isopulégol (2,4%). Les autres composés sont présents à des teneurs inférieures à 2,0%. Seul un échantillon d'huile essentielle de l'hybride *M. rotundifolia* (*M. suaveolens* x *M. longifolia*) provenant d'Algérie possède une composition dominée par la pipériténone (Brada *et al.*, 2007). Il est à noter que *M. longifolia* autrefois cultivée dans les jardins en Corse, aurait aujourd'hui totalement disparue. La présence de la pulégone ne constitue pas en soi un critère discriminant de *M. suaveolens* ssp. *insularis*. En effet, cette cétone, qui est notamment le constituant principal de *Mentha pulegium* L. (Bruneton, 1993), est aussi reportée dans de fortes proportions pour deux échantillons d'huile essentielle du Maroc de *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* (Ouzmil *et al.*, 2002) et de l'hybride *M. rotundifolia* (*M. suaveolens* x *M. longifolia*) (El Arch *et al.*, 2003). En revanche, la présence de la *cis-cis*-p-menthénolide constitue une grande originalité dans la composition de l'huile essentielle de *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* puisque ce constituant n'a jamais été ni isolé, ni identifié à partir d'une source naturelle.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'étude de l'extrait d'hydrolat de *M. suaveolens* ssp. *insularis* par combinaison de trois techniques analytiques (CPG(Ir), CPG-SM et RMN du ^{13}C). Vingt-huit composés oxygénés représentant 98,3 % de la composition totale de cet extrait ont pu être identifiés. Les composés possédant le squelette menthanique substitué en C3 sont les plus importants, à la fois en nombre (19) et en teneur (93,6%). Les composés majoritaires sont la *cis-cis*-p-menthénolide (67,3%) et la pulégone (14,8%) suivi à des teneurs bien moins importantes par la 8-hydroxy-menthone (3,0%), la pipériténone (2,2%), la 8-hydroxy-isomenthone (1,8%) et le bornéol (1,7%). L'originalité de cet extrait réside dans la présence majoritaire de la *cis-cis*-p-menthénolide. Les lactones p-menthaniques sont habituellement décrites dans la littérature comme des constituants minoritaires. Ici le fort taux de la *cis-cis*-p-menthénolide, que ce soit dans l'huile essentielle ou dans l'extrait d'hydrolat, caractérise la sous-espèce *insularis*. Par ailleurs, la RMN du ^{13}C nous a permis de mettre en évidence la présence de la 8-hydroxy-menthone, la *cis-cis*-dihydro-p-menthénolide A et B ainsi que d'élucider la structure de son stéréoisomère la 8-hydroxy-isomenthone. Les deux stéréoisomères de la 8-hydroxy-menthone n'ont été identifiés qu'à l'état de traces dans l'huile

essentielle de *Schizonepeta tenuifolia* Briq. (Fujita et Morishita, 1987), quant à la 8-hydroxy-menthone une teneur plus importante est signalée (1,3%) dans l'huile essentielle de *Hesperozygis ringens* (Benth.) (Von Poser *et al.*, 1996). De plus, pour une caractérisation plus complète des huiles essentielles, l'analyse de l'extrait d'hydrolat permet la mise en évidence de composés oxygénés, quantitativement très faibles dans l'huile essentielle. En effet certains composés ont tout d'abord été identifiés dans l'extrait d'hydrolat (8-hydroxy-menthone /8-hydroxy-isomenthone /8-hydroxy-p-menth-4-èn-3-one) et puis trouvés dans l'huile essentielle ou dans les fractions de chromatographie de l'huile essentielle.

L'identification botanique au sein du genre *Mentha* constitue une tâche considérée comme difficile par les spécialistes. Ainsi le principal critère de différenciation des deux sous-espèces *Mentha suaveolens* ssp. *suaveolens* et ssp. *insularis* réside dans la présence (ssp. *insularis*) ou l'absence (ssp. *suaveolens*) d'un petit pétiole. La composition chimique d'échantillons d'huiles essentielles isolées à partir de plants de *M. suaveolens* poussant à l'état sauvage en Corse permet une différenciation claire des deux sous-espèces et ainsi de lever toute ambiguïté pouvant subsister après un examen botanique. Ainsi la sous-espèce *suaveolens* produit des huiles essentielles soit dominées par la pipériténone (un nouveau type chimique pour cette sous-espèce) soit dominées par l'oxyde de piperiténone, alors que tous les échantillons de la sous-espèce *insularis* sont caractérisés par la pulégone et la *cis-cis-p*-menthénolide, une lactone *p*-menthanique. La pulégone, la piperiténone ainsi que son oxyde sont des constituants très communs chez les menthes et sont présents dans les trois groupes cependant à différentes teneurs. Ainsi, la pulégone est majoritaire dans le groupe I (II : 0-26,2%, III : 0,2-2,5%), l'oxyde de piperiténone dans le groupe II (I : 0-10,0%, III : 1,8-1,9%) et la pipériténone dans le groupe III (I : 0,6-16,1%, II : 0-17,8%). La *cis-cis-p*-menthénolide, lactone *p*-menthanique présente exclusivement chez *M. suaveolens* ssp. *insularis*, est clairement le marqueur du groupe I et ainsi de la sous-espèce *insularis*. Ainsi sur le seul critère présence (groupe I) / absence (groupe II et III) il est possible de déduire l'appartenance à la sous espèce *insularis* ou *suaveolens*.

CHAPITRE III

CARACTERISATION CHIMIQUE DU GENRE *FORTUNELLA*

I. INTRODUCTION

Les agrumes sont originaires du Sud-Est asiatique où ils sont connus depuis 4200 ans et cultivés depuis 3000 ans. La zone d'origine se situerait plus précisément sous une ligne allant du Nord-Est de l'Inde au nord de la Birmanie et au sud de l'île de Haiman (Tanaka, 1954). Les agrumes auraient alors été diffusés vers l'est de l'Inde, l'archipel Malais et la Chine du sud et plus tardivement vers l'Europe. Dans la mythologie grecque, des références aux agrumes sont présentes. Ainsi un des douze travaux d'Hercule consistait à cueillir les fruits d'or d'un pommier gardé par un dragon dans le jardin des Hespérides : ces fameuses pommes d'or seraient en fait des oranges (hespéridium est le nom botanique du fruit des agrumes).

Dans le domaine de l'agro-alimentaire, les agrumes de la famille des Rutacées représentent un secteur important. Ils offrent ainsi une grande étendue d'utilisation allant, bien entendue, de la consommation à l'état frais à la transformation en jus, confits ou liqueurs mais aussi à l'extraction de leurs essences. Aujourd'hui, la culture des agrumes s'étend sur plus de 3 millions d'hectares depuis les zones tempérées et chaudes jusqu'aux zones tropicales. En 2000, les agrumes occupaient la première place des productions fruitières dans le monde avec plus de 97 millions de tonnes produites (FAO, 2002).

Dans le domaine des Plantes à Parfums Aromatiques et Médicinales (PPAM), les huiles essentielles d'agrumes, destinées à des secteurs d'activité aussi divers que l'agroalimentaire, la cosmétologie, l'industrie pharmaceutique ou encore l'aromathérapie, occupent une place importante dans la production mondiale. Les trois quarts de la production d'huiles essentielles (HE) d'agrumes proviennent de l'aire méditerranéenne et des USA tandis que le Brésil et l'Argentine assurent le dernier quart. Il s'agit de produits à haute valeur ajoutée permettent de valoriser une matière abondante et périssable (Dugo et Di Giacomo, 2002).

L'objectif de ce travail s'inscrit dans le cadre d'une étude globale entreprise au laboratoire sur la famille des *Rutaceae*. En effet, depuis une dizaine d'années, l'université de Corse et l'INRA-GEQA de San Ghjuliano mènent des travaux en collaboration sur la caractérisation des agrumes du genre *Citrus* à travers la composition chimique des huiles essentielles de fruits et de feuilles.

Dans une première étape, les espèces du genre *Citrus* les plus répandues et utilisées ont été étudiées. Les agrumes acides (cédrat, lime, citron) donnent des huiles essentielles de fruits

présentant 5 compositions chimiques différentes tandis que huit compositions sont trouvées pour les feuilles. Les compositions riches en i) limonène, γ -terpinène et/ou β -pinène (zestes), ii) limonène, néral, géraniol et/ou β -pinène (feuilles) sont les plus fréquemment rencontrées. Dans le groupe des mandarines-clémentines, où il est possible de dénombrer pas moins de 16 espèces, 16 variétés de clémentines de *C. clementina*, 41 variétés de mandarines de *C. reticulata* Blanco et 42 mandarines provenant de 14 autres espèces ont été étudiées. Trois compositions chimiques (limonène, limonène/ γ -terpinène et acétate de linalyle/limonène) caractérisent les huiles essentielles de fruits tandis que trois principales compositions (sabinène/linalol, γ -terpinène/linalol, N-méthylanthranilate de méthyle) sont distinguées pour les huiles essentielles de feuilles. Cependant les types chimiques à limonène (zestes) et sabinène/linalol (feuilles) sont les plus fréquemment rencontrés. A titre d'exemple, ce dernier caractérise tous les échantillons de feuilles de clémentines. Les huiles essentielles de bigaradier sont marquées par la présence majoritaire du limonène pour le zeste et du couple linalol/acétate de linalyle pour les feuilles. Les huiles essentielles de 11 variétés de pomelos et celles de 25 tangelos (hybride de mandarine et de pomelo) ont été caractérisées. Les huiles essentielles de zestes sont toutes dominées par le limonène tandis qu'une importante variabilité a été observée pour celles de feuilles (compositions chimiques à sabinène, β -pinène ou N-méthylanthranilate de méthyle majoritaires).

Ultérieurement cette étude a été étendue aux hybrides du genre *Citrus* par la caractérisation de leurs huiles essentielles ainsi que celle de leurs parents. Selon l'hybride, le patrimoine « chimique » est transmis de manière différente. Ainsi les huiles essentielles de feuilles et de fruits du genre *Citrus* et par conséquent les hybrides de *Citrus*, possèdent une grande variabilité chimique. Ces compositions sont caractérisées par les constituants monoterpéniques cités plus haut (limonène, γ -terpinène, β -pinène, néral, géraniol, linalol, acétate de linalyle) (Lota *et al.*, 1997, 2000, 2001).

Parallèlement, des travaux ont été réalisés à l'INRA-GEQA de San Gjuliano (Gancel *et al.*, 2004, 2005a, 2005b) concernant la composition chimique d'extraits au solvant (pentane/oxyde de diéthyle 1/1) de feuilles d'agrumes du genre *Citrus*, *Poncirus* et *Fortunella* ainsi que d'hybrides somatiques. Les extraits de *Fortunella margarita*, de *Poncirus trifoliata* et de *Citrus aurantifolia* diffèrent des autres *Citrus* par une prédominance de sesquiterpènes, tout particulièrement des sesquiterpènes oxygénés dans le cas de *Fortunella margarita*. Les hybrides formés à partir d'un parent *Poncirus* ou *Fortunella* conservent une production

remarquable de sesquiterpènes mais à des concentrations inférieures à la moyenne de celles des parents. Par ailleurs un grand nombre de ces sesquiterpènes oxygénés et oléfiniques n'a pu être identifié. Il est à noter que le caractère peu discriminant des spectres de masses des alcools sesquiterpénique, ne permet pas de parvenir à une identification par CPG-SM.

En conclusion, les huiles essentielles de feuilles et de fruits du genre *Citrus* sont dominées par des monoterpènes alors que celles du genre *Poncirus* et *Fortunella* sont plutôt caractérisées par des sesquiterpènes et apparaissent ainsi beaucoup plus complexes à analyser. Notre objectif consiste à poursuivre l'étude initiée sur les huiles essentielles du genre *Citrus* en s'intéressant au genre voisin *Fortunella*.

II. LE GENRE *FORTUNELLA*

Depuis toujours, la classification des *Citrus* demeure un problème complexe. En effet, il existe pour le genre *Citrus* deux grandes classifications : celle de Tanaka (1961) qui comprend 156 espèces et celle de Swingle et Reece (1967) qui n'en distingue que 16. Cette différence notable s'explique par le fait que Tanaka élève au rang d'espèce de nombreux hybrides intra- ou interspécifiques.

Les agrumes ou 'agrumes vrais' appartiennent à la tribu des *Citreae* qui elle-même est incluse dans la sous-famille des *Aurantioideae* et la famille des *Rutaceae*. Swingle et Reece (1967) ont divisé la tribu des *Citreae* en trois sous-tribus : *Triphasilineae*, *Balsamocitrineae* et *Citrineae* (sous-tribu incluant les agrumes vrais). Au sein du groupe des agrumes vrais, on distingue six genres botaniques dont les trois plus connus sont : *Citrus*, *Poncirus* et *Fortunella* (Dugo et Di Giacomo, 2002).

Nous nous sommes ainsi intéressés au genre *Fortunella*, qui se différencie de l'ensemble de la tribu des *Citreae* principalement par la petite taille des fruits et par le faible nombre de locules. Ces fruits sont comestibles et commercialement nommés le kumquat, nom qui vient du chinois « kam kwat » et signifie « petit agrume d'or ». Quatre espèces de *Fortunella* ont été initialement recensées (Dugo et Di Giacomo, 2002) :

- *Fortunella margarita* (Lour.) Swing., Nagami ou kumquat oval.
- *Fortunella japonica* (Thumb.) Swing., Marumi ou kumquat rond.
- *Fortunella polyandra* (Ridl.) Tan., kumquat malaisien.
- *Fortunella hindsii* (Thumb.) Swing., kumquat sauvage de Hong Kong.

En 1967, Hogdson a rajouté deux espèces :

- *Fortunella obovata* Tan., kumquat Chagsou.
- *Fortunella crassifolia* Swing., Meiwa ou grand kumquat rond, hybride *F. japonica* x *F. margarita*.

Les individus du genre *Fortunella* sont des arbustes de croissance lente à feuilles persistantes de 3 à 4 m de hauteur, avec les branches denses, parfois munies de petites épines. Les feuilles sont vert glacé foncé. *Fortunella* est connu principalement pour ses fruits comestibles et sa résistance à des températures approchant -10°C. De petites fleurs blanches parfumées à 5 pétales étoilés de 0,5 à 1 cm de diamètre, semblables à d'autres fleurs de citron, apparaissent de mars à juin. Elles sont suivies de petits fruits ovoïdes jaune-orangé qui mûrissent lentement sur l'arbre. Ces fruits, riches en vitamines A et C, sont consommés frais, mais surtout confit ou en marmelade. L'écorce est douce et le centre juteux et aigre, le fruit cru est habituellement mangé entier, pour savourer le contraste. Parfois seule l'écorce est consommée. Les utilisations culinaires incluent conserve, confiture, gelée et liqueur. Les huiles essentielles des fruits sont utilisées pour l'élaboration de parfums (Dugo et Di Giacomo, 2002).

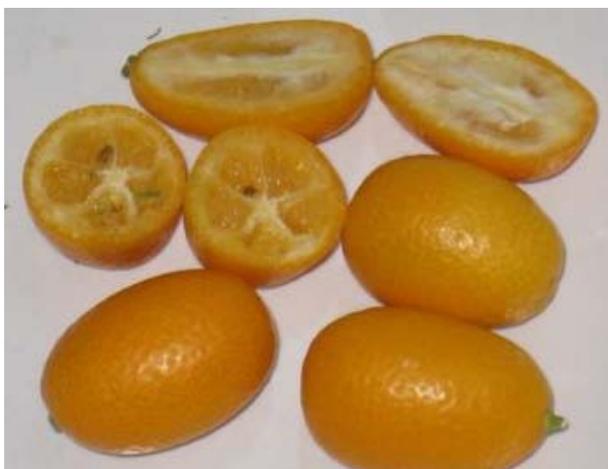


Figure 28 : Fruits et feuilles du genre *Fortunella*.

Les composés volatils du genre *Fortunella* ont fait l'objet de nombreuses publications qui concernent en majorité les fruits et plus particulièrement les zestes. Les huiles essentielles, obtenues par hydrodistillation ou par pression à froid, sont caractérisées par la prépondérance du limonène avec une teneur allant de 92,7 à 96,9% en Italie, Japon, USA, Argentine et Corée (Cotroneo *et al.*, 1985 ; Mitiku *et al.*, 2000 ; Choi et Sawamura, 2000 ; Koyasako et

Bernhard, 1983 ; Capello *et al.*, 1982 ; Choi, 2005). Des huiles essentielles de fruits du Japon et de Colombie sont caractérisées par la présence à des teneurs plus faibles en limonène (58,4 et 73,7% respectivement), associé au myrcène (10,9 et 6,3%) (Hashinaga et Ito, 1985 ; Quijano et Pino, 2009). Seule une huile essentielle d'origine grecque apparaît atypique de par la présence du linalol majoritaire (40,2%) associé au limonène (10,3%) (Kentarou *et al.*, 2007).

A notre connaissance, trois publications font état de la composition chimique d'huiles essentielles de feuilles du genre *Fortunella*. Dès 1969, Scora *et al.*, décrivent une huile essentielle de *Fortunella crassifolia* provenant de Californie (U.S.A), caractérisée par la présence d' α -terpinéol (21,9%) suivi par l'acétate d'octyle (9,6%) et le géraniol (8,9%). Les huiles essentielles de *F. japonica*, *F. margarita* et *F. crassifolia* de Grèce sont dominées par des sesquiterpènes tels que le germacrène D (9,0-16,4%) et le β -élémol (8,7-13,2%) (Kontaratou *et al.*, 2007). Plus récemment, Quijano et Pino (2009) ont décrit une huile essentielle de *F. margarita* de Colombie riche en sesquiterpènes oxygénés tels que le γ -eudesmol (19,0%), le β -élémol (18,8%) et le β -eudesmol (12,4%). Le germacrène D (8,9%), le β -pinène (8,3%) et le linalol (8,2%) sont aussi identifiés à des teneurs appréciables.

Par ailleurs, des extraits au solvant provenant de feuilles du genre *Fortunella* ont été étudiés. Ils contiennent des composés de la famille des flavonoïdes tels les isoflavones (Lapčik *et al.*, 2004), des flavones et des dérivés glucosylés (Ogawa *et al.*, 2001). Ces extraits possèdent de plus une activité antioxydante (Kondo *et al.*, 2005).

Notre intérêt pour le genre *Fortunella* nous a conduit à réaliser une étude détaillée de l'huile essentielle de feuilles et de fruits, de l'hydrolat et de l'extrait microondes de feuilles de *Fortunella japonica* (Thumb.) Swing. Ensuite nous nous intéresserons aux huiles essentielles de feuilles et de fruits et extraits microondes de feuilles des cinq espèces (*F. japonica* (Thumb.) Swing., *F. margarita* (Lour.) Swing., *F. obovata* Tan., *F. hindsii* (Thumb.) Swing., *F. crassifolia* Swing., *F. obovata* Tan.). Enfin, nous détaillerons l'identification de molécules absentes de nos banques de spectre de RMN du ^{13}C réalisées au cours de ces études détaillées. Leur élucidation structurale a parfois nécessité la mise en œuvre des techniques de RMN 1D et 2D.

III. COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE FRUITS DE *FORTUNELLA JAPONICA* (THUMB.) SWING.

Nous nous sommes intéressés à la composition chimique de l'huile essentielle de fruits de *F. japonica* (Thumb.) Swing et nous avons analysé, par CPG(Ir) et par RMN du ^{13}C , un échantillon d'huile essentielle de fruits entiers obtenu par hydrodistillation avec un appareil de type Clévenger. A partir du spectre de l'huile essentielle, seuls 2 constituants, le limonène (96,3%) et le myrcène (1,5%) sont identifiés, la quantification étant réalisée par CPG(Ir).

Afin d'identifier les constituants minoritaires, nous avons réalisé une chromatographie sur colonne pour concentrer les composés oxygénés d'une teneur inférieure à 0,5% de l'HE. Nous avons soumis 560 mg d'huile essentielle de fruits à un fractionnement par chromatographie sur gel de silice de type fine (63-200 μm) : une fraction oléfinique éluée au pentane (495 mg) et une fraction oxygénée éluée à l'oxyde de diéthyle (45 mg) sont obtenues.

L'étude du chromatogramme de la fraction oléfinique permet de suspecter la présence de nombreux monoterpènes oléfiniques d'après leurs indices de rétention. Une analyse de cette fraction en spectrométrie de masse nous permet de confirmer la présence de sept constituants dont 4 à l'état de traces. Il s'agit en particulier de l' α -pinène (0,3%), du β -phellandrène (0,2%) et du germacrène D (0,2%). Tous les constituants identifiés dans cette fraction sont reportés **Tableau 18**.

L'étude de la fraction oxygénée, par les mêmes techniques chromatographiques et spectroscopiques, nous ont permis d'identifier des constituants dont les teneurs étaient trop faibles dans l'huile essentielle. Par interrogation de la banque de RMN du ^{13}C « Terpènes », 10 constituants de la fraction oxygénée ont été identifiés. La fraction oxygénée est dominée par l' α -terpinéol (27,7%), l'acétate de géranyle (11,9%) et le *trans* carvéol (11,0%) (**Tableau 18**). Le β -terpinéol (5,4%) a pu être identifié par comparaison de ces données spectrales présentes dans la littérature avec celles observées dans le spectre de la fraction. Nous reportons ces données dans la **Figure 29**. Tous les carbones de la molécule ont été observés. Les variations de déplacements chimiques avec la littérature sont inférieures à 0,1ppm pour 7 carbones sur 10. Les plus fortes variations observées pour le carbone hybridé Csp^2 résonant à 150,36 ppm ainsi que les carbones en α de la fonction alcool, ne gênent en rien l'identification de la molécule.

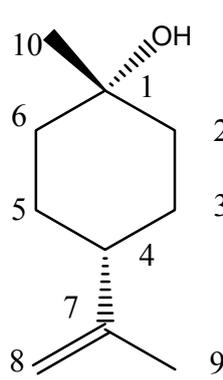
| | δ (ppm) Bohlmann | δ (ppm) 12 | |
|---|--------------------------------|--------------------------|--------|
|  | 7 | 150,1 | 150,36 |
| | 8 | 108,4 | 108,40 |
| | 1 | 68,7 | 68,63 |
| | 4 | 44,9 | 44,98 |
| | 2 | 38,9 | 38,77 |
| | 6 | 38,9 | 38,77 |
| | 10 | 31,6 | 31,54 |
| | 3 | 27,0 | 26,98 |
| | 5 | 27,0 | 26,98 |
| | 9 | 20,9 | 21,02 |

Figure 29 : Structure et déplacements chimiques du β -terpinéol **12** décrits dans la littérature (**Bohlmann, 1977**) et observés dans la fraction «oxygénée».

| N°. | Constituants | Ir _a | Ir _p | HE | Folef | Fox |
|-------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|------|-------|------|
| 1 | α -pinène | 929 | 1022 | 0,3 | 0,2 | - |
| 2 | myrcène | 979 | 1160 | 1,5 | 1,4 | - |
| 3 | α -terpinène | 1005 | 1168 | tr | tr | - |
| 4 | limonène | 1027 | 1215 | 96,3 | 97,1 | - |
| 5 | β -phellandrène | 1021 | 1221 | 0,2 | 0,2 | - |
| 6 | γ -terpinène | 1048 | 1249 | tr | tr | - |
| 7 | oxyde de <i>cis</i> linalol THF | 1056 | 1443 | 0,1 | - | 3,0 |
| 8 | oxyde de <i>trans</i> linalol THF | 1070 | 1471 | 0,1 | - | 1,8 |
| 9 | p-cyménène | 1072 | 1441 | tr | 0,1 | - |
| 10 | terpinolène | 1078 | 1275 | tr | tr | - |
| 11 | linalol | 1082 | 1547 | tr | - | 1,4 |
| 12 | β -terpinéol | 1125 | 1631 | 0,1 | - | 5,4 |
| 13 | p-mentha-1,5-diène-8-ol | 1142 | 1711 | tr | - | 1,2 |
| 14 | α -terpinéol | 1170 | 1698 | 0,5 | - | 27,7 |
| 15 | <i>trans</i> carvéol | 1195 | 1836 | 0,1 | - | 11,0 |
| 16 | <i>cis</i> carvéol | 1208 | 1867 | tr | - | 5,2 |
| 17 | δ -élémente | 1335 | 1475 | 0,1 | 0,1 | - |
| 18 | acétate d' α -terpinyle | 1338 | 1682 | 0,1 | - | 1,5 |
| 19 | acétate de géranyle | 1358 | 1758 | 0,2 | - | 11,9 |
| 20 | germacrène D | 1474 | 1708 | 0,2 | 0,7 | - |
| 21 | bicyclo germacrène | 1490 | 1735 | tr | tr | - |
| 22 | δ -cadinène | 1513 | 1759 | tr | tr | - |
| 23 | γ -eudesmol | 1610 | 2188 | tr | - | 1,1 |
| 24 | α -eudesmol | 1635 | 2223 | tr | - | 0,1 |
| 25 | β -eudesmol | 1637 | 2244 | tr | - | 1,0 |
| Total | | | | 99,8 | 99,8 | 72,3 |

L'ordre d'éluion est donné sur colonne apolaire. Ir^a et Ir^p: indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et polaire (BP20). %^a: pourcentages mesurés sur colonne apolaire.

Tableau 18 : Composés identifiés dans l'huile essentielle de fruits de *F. japonica* (Thumb.) Swing.

La composition chimique de l'huile essentielle de fruits de *Fortunella japonica* (Thumb.) Swing. est donc caractérisée par la présence majoritaire du limonène (96,3%). Seul le myrcène est présent à des teneurs appréciables (1,5%). Les autres constituants sont présents dans l'huile essentielle à des pourcentages inférieurs à 0,6%.

La composition chimique de l'huile essentielle de *F. japonica* décrite ici est qualitativement et quantitativement très proche de celles décrites au Japon (96,7/96,9%) (Mitiku *et al.*, 2000 ; Choi et Sawamura, 2000), en Corée (93,3%) (Choi, 2005) et en Italie (95,6%) (Cotroneo *et al.*, 1985) par la forte teneur en limonène. Par ailleurs, la présence à l'état de traces de sesquiterpènes oxygénés (α , β et γ -eudesmols) ainsi que celle du p-mentha-1,5-dièn-8-ol, identifié pour la première fois dans une huile essentielle de zeste et/ou de fruits du genre *Fortunella*, doit être soulignée.

IV. COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE (HE) DE FEUILLES DE *FORTUNELLA JAPONICA* (THUMB.) SWING.

IV.1 Analyse par CPG(Ir) et RMN du ^{13}C de l'échantillon

Nous avons analysé un échantillon d'huile essentielle obtenue par hydrodistillation au laboratoire, à l'aide d'un appareil de type Clévenger, de feuilles de *F. japonica* prélevées à la station INRA-GEQA (San Ghjuliano, France). Plusieurs distillations du même matériel végétal ont été nécessaires afin d'obtenir une masse d'huile essentielle suffisante pour une étude de la composition chimique aussi complète que possible. Les rendements en huile essentielle, calculés en fonction de la masse de végétal frais, varient entre 0,24 et 0,36%.

A partir du spectre unique de l'huile essentielle, nous avons identifié 13 constituants qui représentent 66,3% de l'huile essentielle totale. A l'exception du limonène, les composés identifiés sont des sesquiterpènes oxygénés (34,2%) et oléfiniques (25,0%). Cette huile essentielle est caractérisée par la présence comme constituants majoritaires du germacrène D **30** (14,9%) et du β -élémol **43** (9,1%) suivie à des moindres teneurs par le limonène **7** (7,1%), le *cis*-guai-6- β -ol **48** (6,3%), le δ -élémente **13** (5,2%) et le β -eudesmol **62** (5,5%) (**Tableau 19**).

Les signaux de tous les carbones des 13 composés identifiés sont présents dans le spectre de RMN du ^{13}C . Les variations de déplacements chimiques ($\Delta\delta$) des carbones par rapport aux valeurs de référence sont environ de 0,05 ppm. De plus, pour tous les composés, le nombre de superpositions de pics est limité (inférieur ou égal à 5) malgré la présence de molécules possédant le même squelette. Les superpositions, ainsi que l'absence de certains carbones quaternaires de composés ayant des teneurs voisines de 1% (δ -amorphène et guaiol) ne gênent en rien les identifications, puisque au moins 7 signaux des carbones appartiennent en propre à chaque molécule. Une fois identifiés par la RMN du ^{13}C , les constituants sont repérés sur le chromatogramme par leurs indices de rétention, sur colonne polaire et apolaire, ce qui permet de les quantifier (**Tableau 19**). Il est à noter que pour certains constituants (cas du germacrène D et du β -eudesmol) les pourcentages sur colonne apolaire et polaire sont différents à cause de coélutions sur une colonne mais probablement aussi sur les deux colonnes.

| N° [♦] | Constituants | Ir apol | Ir pol | % ^a | RMN | SUP |
|-----------------|------------------------------|---------|--------|----------------|--------|-----|
| 7 | limonène | 1021 | 1201 | 7,1 | 10 /10 | 3 |
| 17 | δ-élémente | 1339 | 1467 | 5,2 | 15 /15 | 1 |
| 22 | β-élémente | 1384 | 1588 | 3,3 | 15 /15 | 4 |
| 34 | germacrène D | 1475 | 1712 | 14,9 | 15 /15 | 1 |
| 44 | δ-amorphe | 1500 | 1635 | 1,6 | 12 /15 | 5 |
| 47 | β-élémol | 1532 | 2094 | 9,1 | 15 /15 | 2 |
| 52 | <i>cis</i> -guai-6-èn-10β-ol | 1575 | 1993 | 6,3 | 15 /15 | 3 |
| 54 | guaiol | 1580 | 2043 | 1,2 | 14 /15 | 2 |
| 60 | γ-eudesmol | 1614 | 2178 | 1,4 | 15 /15 | 4 |
| 62 | éremophilèn-11-ol Δ9-10 | 1623 | 2198 | 4,2 | 15 /15 | 4 |
| 66 | β-eudesmol | 1641 | 2244 | 5,5 | 15 /15 | 3 |
| 69 | valérianol | 1643 | 2214 | 2,1 | 15 /15 | 2 |
| 70 | α-eudesmol | 1646 | 2238 | 4,4 | 15 /15 | 4 |
| total | | | | 66,3 | | |

Ordre d'élution et pourcentages des composés donnés sur colonne apolaire ; ^aIr Apol, Ir Pol : indices de rétention colonne apolaire (BP-1) et polaire (BP-20); RMN : nombre de carbones identifiés dans le spectre de RMN du ¹³C par rapport au nombre de carbones attendus ; SUP : nombre de superpositions. ♦: numérotation associée à chaque constituant faisant référence au **Tableau 22**.

Tableau 19 : Identification par RMN du ¹³C des principaux constituants d'un échantillon d'huile essentielle de *Fortunella japonica* (Thumb.) Swing.

L'analyse de l'huile essentielle par CPG-SM nous a permis d'identifier d'autres composés monoterpéniques et un sesquiterpène présents à des teneurs faibles ou à l'état de traces dans l'huile essentielle. Il s'agit de l'α-pinène **1**, du sabinène **2**, du β-pinène **3**, de l'α-phellandrène **5**, du β-phellandrène **8**, du (Z)-β-ocimène **9**, du terpinolène **11**, de l'α-humulène **30** et du linalol **12**. En revanche, même si la présence de sesquiterpènes oléfiniques a pu être confirmée, les diverses interrogations des banques de spectrométrie de masse concernant les sesquiterpènes oxygénés ne permettent pas toujours de corréler l'identification réalisée par RMN du ¹³C. Les notes de concordance très moyennes (coélution) et les spectres de masse peu discriminants en impact électronique (isomères) sont vraisemblablement les causes de ces difficultés d'identification. En fait, il est très rare que l'interrogation des banques de spectres de masse ne propose aucune réponse. Cependant, les diverses réponses proposées doivent donc être prises avec précaution.

Après cette analyse préliminaire, seuls les deux tiers de la composition chimique sont connus et de nombreux composés, tous minoritaires (<2,4%), demeurent non-identifiés. Les séries de valeurs de déplacements chimiques relevées sur le spectre de RMN du ¹³C (pour

les constituants d'une teneur > 0,5%) ainsi que les indices de rétention sur colonne apolaire et polaire, nous laissent supposer que les constituants encore non identifiés sont des sesquiterpènes oléfiniques mais aussi oxygénés. Aussi dans un but d'identifier ces constituants (absents ou présents dans nos banques de spectres) et donc de caractériser plus finement cet échantillon d'huile essentielle, nous avons procédé à un fractionnement sur colonne de silice.

IV.2 Fractionnement et étude détaillée de l'huile essentielle

Nous avons soumis 1,845g d'huile essentielle à un fractionnement par chromatographie sur gel de silice de granulométrie 63-200 μ m. Les différentes étapes de ce fractionnement sont décrites dans la **Figure 30**. Onze fractions, notées F1 à F11, sont éluées respectivement avec le pentane (F1-F6), un gradient pentane oxyde de diéthyle 95/5 (F7), 80/20 (F8-F10) et à l'oxyde de diéthyle (F11).

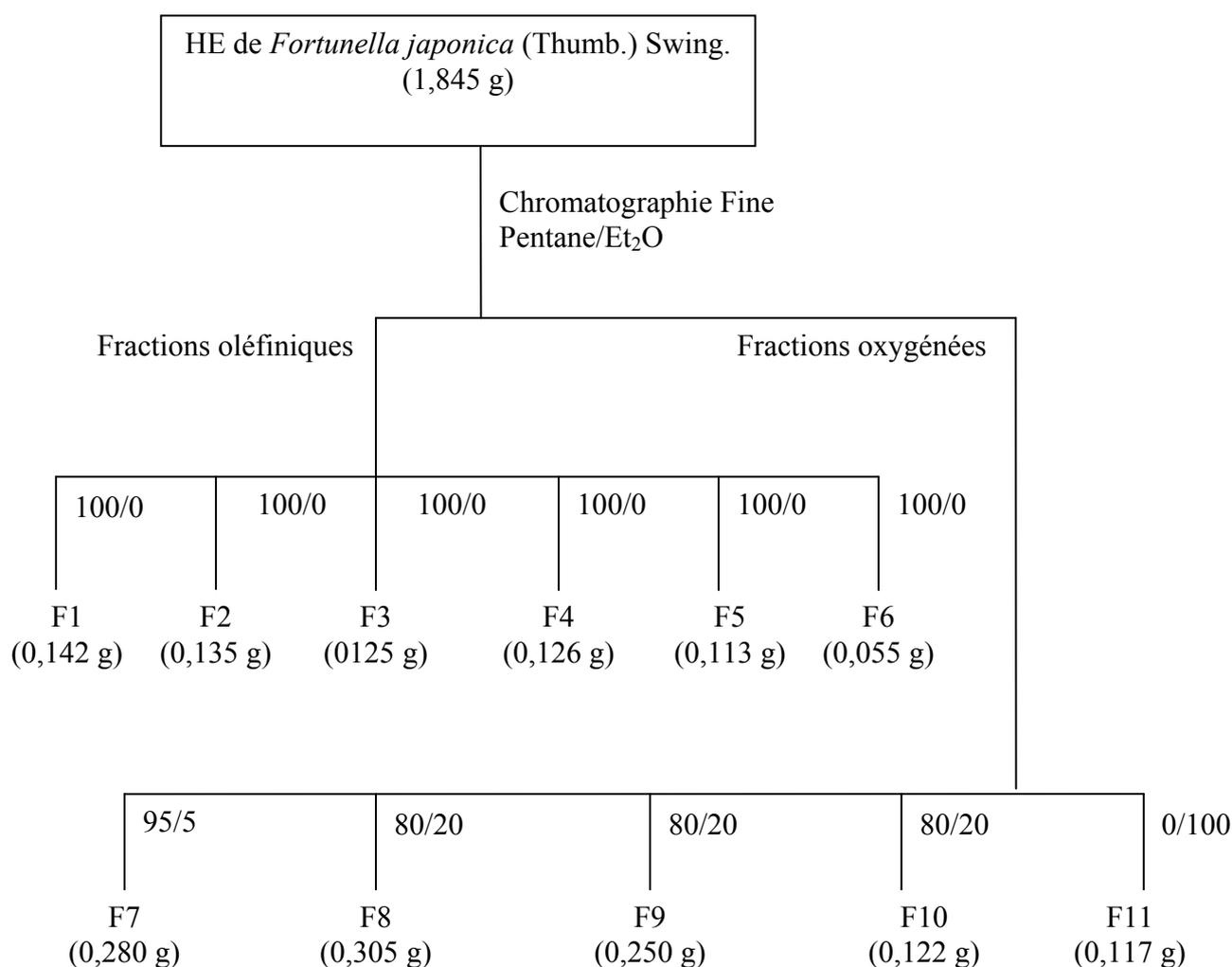


Figure 30 : Schéma de fractionnement de l'huile essentielle de *F. japonica*.

Chacune des fractions a été analysée par la combinaison de la CPG(Ir) et de la RMN du ^{13}C (**Tableau 20 et 21**). Sur la base des chromatogrammes, nous observons que ce fractionnement ne nous a pas permis de concentrer fortement les constituants minoritaires non-identifiés de cette huile essentielle. En effet, il s'agit plutôt d'un enrichissement de ces composés non identifiés qui demeurent en mélange avec des constituants déjà identifiés quantitativement plus importants.

IV.2.1 Etude des fractions hydrocarbonées F1-F6

Dans la seule fraction F1, nous identifions par consultation de la banque « Terpènes » 23 composés supplémentaires, majoritairement des sesquiterpènes insaturés à l'exception du 3-carène **6** et du (E)- β -ocimène **10** (**Tableau 20**). Nous citons ici les constituants qui sont présents à des teneurs au moins égales à 0,3% dans l'huile essentielle : β -ylangène **23** (0,3%), (E)- β -caryophyllène **24** (1,6%), β -copaène **25** (0,5%), thujopsène **26** (0,4%), α -guaïène **27** (0,5%), β -gurjunène **28** (0,4%), α -amorphène **33** (0,5%), γ -humulène **35** (0,5%), β -sélinène **37** (0,8%), α -muurolène **42** (0,3%), γ cadinène **43** (0,9%) et δ -cadinène **46** (1,0%).

Dans les fractions F2 à F6, nous identifions 7 composés supplémentaires toujours par consultation de la banque « Terpènes » : l' α -bulnésène **45** (fraction F2), l'E-(β)-farnésène **29**, le γ -amorphène **39**, l' α -sélinène **41** (fraction F3), le bicyclo-germacrène **40** (fraction F5) le *cis*-eudesma-6,11-diène **38** et le sélina-4(15),7(11)-diène **48** (fraction F6). Il est à noter que le germacrène B **50** (28,2% fraction F6) n'était pas présent dans notre banque de spectres « Terpènes » et « Littérature ». Nous détaillons son identification dans la partie VIII « Identification de constituants absents de nos banques et analyse structurale de composés non identifiés ».

Malgré la présence de nombreux composés ayant des squelettes similaires (eudesmane, élémmane, muurolane, amorphane, sélinane, etc...), nous avons pu identifier 42 constituants hydrocarbonés qui représentent près de 46% de la composition chimique de l'huile essentielle totale. Etant donné le fort taux d'identification dans la majorité des fractions étudiées et les faibles teneurs des composés non-identifiés (<0,3%), il ne nous a pas semblé judicieux de poursuivre un fractionnement.

| N° [♦] | Constituants | Ir _a | Ir _p | HE | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 |
|-----------------|--------------------------|-----------------|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1 | α-pinène | 931 | 1022 | tr | 0,2 | - | - | - | - | - |
| 2 | sabinène | 965 | 1124 | tr | 0,1 | - | - | - | - | - |
| 3 | β-pinène | 971 | 1114 | tr | 0,1 | - | - | - | - | - |
| 4 | myrcène | 980 | 1159 | 0,4 | 0,8 | 1,3 | 0,8 | 0,2 | - | - |
| 5 | α-phellandrène | 994 | 1164 | tr | 0,1 | - | - | - | - | - |
| 6 | 3-carène | 1003 | 1148 | 0,1 | 0,7 | tr | - | - | - | - |
| 7 | limonène | 1021* | 1201 | 7,1 | 15,2 | 19,7 | 8,6 | 1,5 | tr | - |
| 8 | β-phellandrène | 1021* | 1210 | tr | 0,2 | 0,1 | - | - | - | - |
| 9 | (Z)-β-ocimène | 1023 | 1232 | tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | tr | - | - |
| 10 | (E)-β-ocimène | 1036 | 1249 | 0,6 | 1,1 | 2,4 | 2,8 | 1,2 | tr | - |
| 13 | terpinolène | 1076 | 1280 | tr | 0,1 | 0,2 | 0,1 | - | - | - |
| 17 | δ-élémente | 1339 | 1467 | 5,2 | 24,5 | 10,5 | 7,5 | 6,9 | tr | - |
| 18 | α-cubébène | 1345 | 1454 | 0,1 | 0,5 | 0,1 | - | - | - | - |
| 19 | α-ylangène | 1368 | 1480 | 0,1 | 1,4 | tr | - | - | - | - |
| 20 | α-copaène | 1373 | 1488 | 0,1 | 1,0 | tr | - | - | - | - |
| 21 | β-bourbonène | 1381 | 1515 | 0,2 | 2,3 | 0,3 | - | - | - | - |
| 22 | β-élémente | 1384 | 1588 | 3,3 | 2,7 | 5,3 | 8,8 | 8,3 | 7,6 | - |
| 23 | β-ylangène | 1413 | 1568 | 0,3 | 1,2 | 0,3 | 0,3 | - | - | - |
| 24 | (E)-β-caryophyllène | 1423 | 1593 | 1,6 | 2,2 | 4,0 | 1,8 | 2,9 | tr | - |
| 25 | β-copaène | 1425 | 1586 | 0,3 | 0,8 | tr | - | - | - | - |
| 26 | thujopsène | 1435* | 1618 | 0,4 | 2,6 | 2,0 | 0,7 | 0,2 | 0,2 | - |
| 27 | α-guaiène | 1435* | 1602 | 0,5 | 1,1 | 2,2 | 0,9 | 0,1 | tr | - |
| 28 | β-gurjunène | 1441 | 1593 | 0,4 | 1,0 | 2,2 | 0,8 | 0,2 | tr | - |
| 29 | E-(β)-farnésène | 1448 | 1635 | 0,7 | - | 0,1 | 0,5 | 1,7 | 6,0 | 2,6 |
| 30 | α-humulène | 1454 | 1666 | tr | - | 0,8 | tr | tr | - | - |
| 31 | γ-muuroolène | 1467 | 1685 | tr | 1,0 | 1,2 | 0,2 | - | - | - |
| 32 | β-chamigrène | 1475* | 1703 | 0,1 | 0,8 | tr | - | - | - | - |
| 33 | α-amorphène | 1475* | 1686 | 0,5 | 2,2 | 4,2 | 1,0 | 0,5 | 0,2 | - |
| 34 | germacrène D | 1475* | 1712 | 14,9 | 8,8 | 22,6 | 51,6 | 64,0 | 21,7 | 3,7 |
| 35 | γ-humulène | 1475* | 1721 | 0,5 | 1,3 | 2,7 | 0,8 | 0,4 | - | - |
| 36 | (E)-β-bergamotène | 1475* | 1718 | 0,2 | 1,1 | tr | - | - | - | - |
| 37 | β-sélinène | 1475* | 1714 | 0,8 | 3,9 | 4,0 | 4,2 | 2,1 | 0,6 | tr |
| 38 | cis-eudesma-6,11-diène | 1480 | 1718 | tr | - | - | - | - | tr | 2,7 |
| 39 | γ-amorphène | 1493 | 1671 | tr | - | tr | 0,5 | 0,4 | tr | - |
| 40 | germacrène bicyclo | 1496* | 1728 | 0,8 | 0,5 | 0,4 | 0,2 | 0,4 | 2,9 | - |
| 41 | α-sélinène | 1496* | 1520 | 0,2 | 0,5 | 0,7 | 1,0 | 0,6 | 0,5 | 0,5 |
| 42 | α-muuroolène | 1496* | 1721 | 0,3 | 1,3 | 1,1 | - | - | - | - |
| 43 | γ-cadinène | 1496* | 1752 | 0,9 | 2,4 | 1,8 | 1,1 | 0,8 | 0,2 | - |
| 44 | δ-amorphène | 1500 | 1635 | 1,6 | 1,0 | 3,6 | 1,0 | 0,2 | - | - |
| 45 | α-bulnésène | 1502 | 1711 | 0,2 | 0,2 | 0,7 | 0,6 | - | - | - |
| 46 | δ-cadinène | 1510 | 1751 | 1,0 | 2,4 | 3,5 | 2,0 | 1,5 | 0,3 | 0,1 |
| 48 | sélina-4(15),7(11)-diène | 1534 | 1772 | 0,1 | - | - | - | - | - | 1,6 |
| 50 | germacrène B | 1552 | 1833 | 2,4 | - | - | - | 0,4 | 15,5 | 28,2 |

L'ordre d'élution est donné sur colonne apolaire. Ir^a et Ir^p : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et polaire (BP20). %^a : pourcentages mesurés sur colonne apolaire, excepté les pourcentages suivis d'un astérisque (colonne polaire). ♦ : numérotation associée à chaque constituant faisant référence au **Tableau 22**.

Tableau 20 : Composés identifiés dans les fractions hydrocarbonées F1-F6 de l'huile essentielle de *F. japonica*.

IV.2.2 Etude des fractions oxygénées F7-F11

La composition chimique de chacune des fractions oxygénées est donnée dans le **Tableau 21**. Tous les sesquiterpènes de ces fractions oxygénées sont des alcools tertiaires possédant une polarité très proche. Il n'a donc pas été possible d'isoler les produits non-identifiés dans l'huile essentielle. Seule une variation quantitative est observée pour les fractions F8 à F11.

L'analyse de la fraction F7 nous permet d'identifier le (E)-nérolidol **49**, alcool linéaire sesquiterpénique, malgré le fort pourcentage du *cis*-guai-6-èn-10 β -ol **52** (66,3%). L'étude de la fraction F8 nous permet de confirmer la présence des composés identifiés dans l'huile essentielle mais surtout d'observer la présence de neuf autres alcools tertiaires sesquiterpéniques. Le squelette eudesmane est représenté par 4 de ces alcools qui sont isomères deux à deux de par la position de leur double liaison (7-épi- α **71** / 7-épi- γ -eudesmol **57** ; eudesm-6-èn-4 α -ol **56** / eudesm-7(11)-èn-4 α -ol **72**). En revanche, les 5 autres présentent des squelettes très divers : le spathuléol **51**, l'épicubéol **55**, l'alismol **61**, l' α -cadinol **67** et le sélin-11-èn-4 α -ol **68**.

L'étude des fractions F9 à F11, nous permet d'identifier le guaiol **54** et le τ -muurolol **63** (fraction F9), le τ -cadinol **64**, le (E)-phytol **74** (fraction F10). Toutes les molécules précédemment citées ont été identifiées par consultation de la banque « Terpènes ». En revanche, le *trans*-guai-6-èn-10 β -ol **59** (fraction F8), l'amorph-4-èn-10 α -ol **65** (F8) et l'amorph-4-èn-10 β -ol **53** (F10) n'étaient pas présents dans cette banque de spectres. Nous détaillerons leurs identifications par rapport aux données de la littérature dans la partie VIII.

Il est à noter que le β -élémol **66** et l' α -cadinol **67** coéluent sur colonnes apolaire et polaire. L'intensité des raies de résonance de RMN du ^{13}C d'une molécule est proportionnelle à son abondance dans le mélange. Nous avons donc relevé l'intensité d'une raie de résonance non-superposée d'un carbone hybridé sp^3 de l' α -cadinol et du β -élémol. Le pourcentage de chacun des deux constituants est donc estimé en tenant compte du ratio entre les intensités ainsi que du pourcentage relatif relevé sur colonne polaire.

Dans la fraction F10, une série de 15 raies de résonance reste non-attribuée. A l'aide d'une étude complète RMN 1D et 2D et spectrométrie de masse, il nous a été possible d'identifier ce constituant (2,2% de l'huile essentielle et 9,6% dans la fraction F10), comme étant le

germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol **58** absent des bibliothèques de spectres. Nous détaillons son analyse structurale dans la partie VIII.

| N° \blacklozenge | Constituants | Ir _a | Ir _p | HE | F7 | F8 | F9 | F10 | F11 |
|--------------------|--|-----------------|-----------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Eluant | | | | 95/5 | 80/20 | 80/20 | 80/20 | 0/100 |
| | Masses (mg) | | | 1840,0 | 280,3 | 304,7 | 250,0 | 121,7 | 116,9 |
| 14 | linalol | 1080 | 1551 | tr | 0,2 | 0,2 | - | - | - |
| 47 | β -élémol | 1532 | 2094 | 9,1 | - | 16,2 | 25,8 | 26,3 | 25,3 |
| 49 | (E)-nérolidol | 1541 | 2049 | 1,1 | 6,8 | 3,5 | - | - | - |
| 51 | spathuléol | 1561 | 2114 | tr | tr | 1,0 | tr | - | - |
| 52 | <i>cis</i> -guai-6-èn-10 β -ol | 1575 | 1993 | 6,3 | 66,3 | 6,0 | tr | - | - |
| 53 | amorph-4-èn-10 β -ol | 1577 | 2083 | tr | - | - | tr | 2,2 | 0,6 |
| 54 | guaïol | 1580 | 2083 | 1,2 | - | 0,5 | 1,2 | 0,4 | tr |
| 55 | epi-cubéol | 1582 | 2062 | tr | - | 1,8 | tr | - | - |
| 56 | eudésm-6-èn-4 α -ol | 1604 | 2092 | 2,2 | - | 2,7 | 5,0 | 2,1 | - |
| 57 | 7-épi- γ -eudesmol | 1609 | 2036 | 0,4 | - | 1,8 | 0,3 | 0,2 | 0,2 |
| 58 | germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol | 1611 | 2188 | 2,4 | 0,7 | 2,1 | 4,5 | 9,6 | 8,4 |
| 59 | <i>trans</i> -guai-6-èn-10 β -ol | 1612 | 2158 | 1,4 | - | 1,1 | 3,3 | 5,2 | 6,7 |
| 60 | γ -eudesmol | 1614 | 2178 | 1,4 | - | 5,2 | 3,2 | 2,2 | 0,8 |
| 61 | alismol | 1617 | 2270 | 1,2 | - | 2,7 | 4,2 | 2,7 | 1,3 |
| 62 | éremophilén-11-ol Δ 9-10 | 1623 | 2198 | 4,2 | - | 14,4 | 5,8 | 4,2 | 1,1 |
| 63 | τ -muurolol | 1627 | 2200 | 0,1 | - | 0,2 | 0,5 | - | - |
| 64 | τ -cadinol | 1630 | 2173 | 0,1 | - | - | tr | 0,6 | 0,1 |
| 65 | amorph-4-èn-10 α -ol | 1641* | 2210 | 2,2 | - | 0,7 | 1,2 | 2,1 | 19,2 |
| 66 | β -eudesmol | 1641* | 2244 | 5,5 | - | 8,6 | 17,7 | 19,7 | 12 |
| 67 | α -cadinol | 1641* | 2244 | 0,7 | - | 0,9 | 0,9 | 1,2 | 5,4 |
| 68 | selin-11-èn-4 α -ol | 1643* | 2238 | tr | - | 0,5 | tr | - | - |
| 69 | valérianol | 1643* | 2214 | 2,1 | - | 1,9 | 4,6 | 3,7 | 2,9 |
| 70 | α -eudesmol | 1646 | 2238 | 4,4 | - | 6,6 | 13,3 | 13,4 | 7,7 |
| 71 | 7-épi- α -eudesmol | 1649 | 2228 | 0,5 | - | 1,5 | 1,1 | 0,6 | tr |
| 72 | eudesm-7(11)-èn-4 α -ol | 1682 | 2310 | 0,4 | - | 1,5 | 0,7 | 0,2 | - |
| 74 | (E)-phytol | 2104 | 2620 | 0,3 | - | tr | tr | 0,6 | tr |
| Total | | | | 47,2 | 74 | 81,6 | 93,3 | 97,2 | 91,7 |

L'ordre d'éluion est donné sur colonne apolaire. Ir^a et Ir^p : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et polaire (BP2). %^a : pourcentages mesurés sur colonne apolaire, exceptés les pourcentages suivis d'un astérisque (colonne polaire). \blacklozenge : numérotation associée à chaque constituant faisant référence au **Tableau 22**.

Tableau 21 : Composés identifiés dans les fractions oxygénées F7-F11 de l'huile essentielle de *F. japonica*.

IV.3 Bilan de l'étude de l'huile essentielle de *F. japonica*

Au terme de notre étude sur la composition chimique de l'huile essentielle de *Fortunella japonica* (Thumb.) Swing. réalisée par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ^{13}C , nous avons mis en évidence 69 composés qui représentent 93,1% de l'huile essentielle (**Tableau 22**). Parmi ces constituants, 57 ont été identifiés directement par interrogation de la banque « Terpènes », 4 à partir de la banque « Littérature » et 7 uniquement par analyse CPG-SM et CPG(Ir). Un alcool tertiaire sesquiterpénique possédant le squelette germacrane, le germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol, n'était présent dans aucune des banques de spectrométrie de masse et de RMN du ^{13}C .

L'huile essentielle de *Fortunella japonica* (Thumb.) Swing. est caractérisée par la présence majoritaire du germacrène D **34** (14,9%), du β -élémol **47** (9,1%) et du limonène **7** (7,1%). De nombreux composés présentent une teneur supérieure à 1%. Il s'agit de :

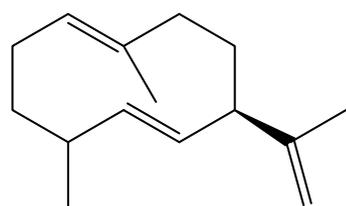
- 5 sesquiterpènes oléfiniques : le δ -élémente **17** (5,2%), le β -élémente **22** (3,3%), le germacrène B **50** (2,4%), le (E)- β -caryophyllène **24** (1,6%), le δ -amorphène **44** (1,6%), le δ -cadinène **46** (1,0%).

- 14 alcools tertiaires sesquiterpéniques : (E)-nérolidol **49** (1,1%), *cis* **52** (6,3%) et *trans*-guai-6-èn-10 β -ol **59** (1,4%), guaiol **54** (1,2%), l'alismol **61** (1,2%), eudesm-6-èn-4 α -ol **56** (2,2%), l' α **70** (4,4%), β **66** (5,5%) et γ -eudesmol **60** (1,4%), éremophilen-11-ol Δ 9-10 **62** (4,2%), amorph-4-èn-10 α -ol **65** (2,2%), valérianol **69** (2,1%) et le germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol **58** (2,4%).

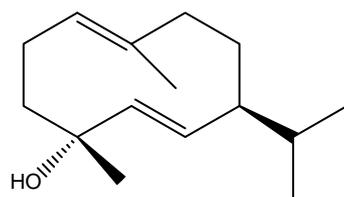
Il est à noter d'une part, la forte teneur en sesquiterpènes possédant des squelettes très variés (**Figure 31**). L'ensemble de ces constituants représentent près de 85% de la composition chimique de l'huile essentielle. De plus, les alcools tertiaires sesquiterpéniques représentent quasiment la moitié (47%) de la composition chimique.

La composition chimique de cette huile essentielle de *Fortunella japonica* (Thumb.) Swing. se rapproche de celles décrites en Grèce et Colombie (Kentarou *et al.*, 2007 ; Quijano et Pino, 2009) par l'abondance en germacrène D et en β -élémol et aussi par la présence des γ - et β -eudesmols. Cependant la forte teneur en sesquiterpènes ainsi que la présence de nombreux constituants peu communs dont le germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol, constitue une certaine originalité de cette huile essentielle.

Squelette germacrane

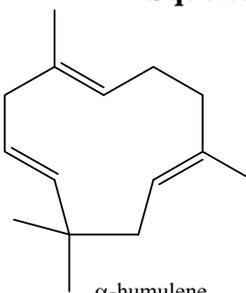


germacrène D

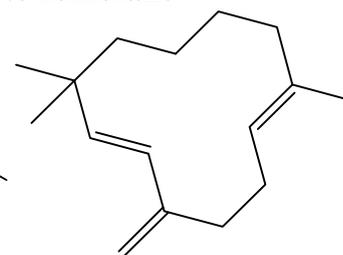


germacra-1(10),5-diène-4αol

Squelette humulane

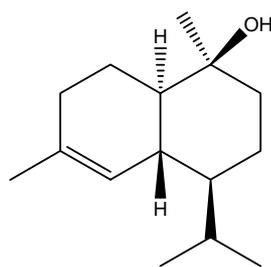


α-humulene

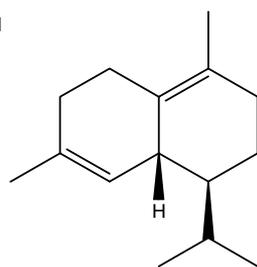


γ-humulène

Squelette cadinane

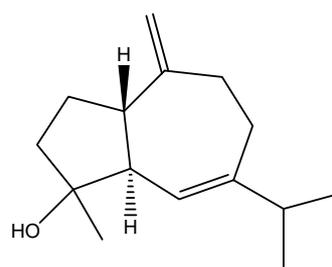


τ-cadinol

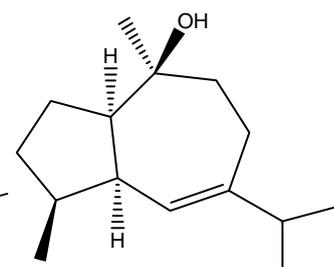


δ-cadinène

Squelette guaiane

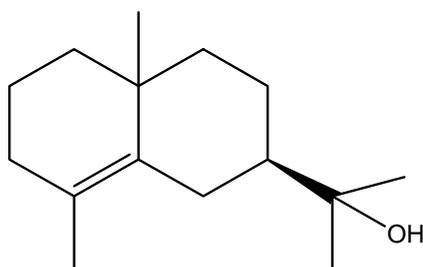


alismol

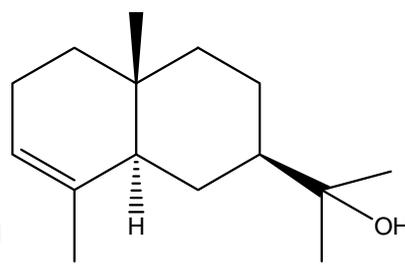


guai-6-en-10-αol

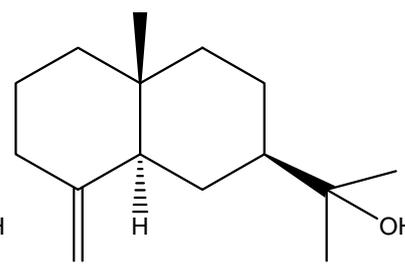
Squelette eudesmane



γ-eudesmol

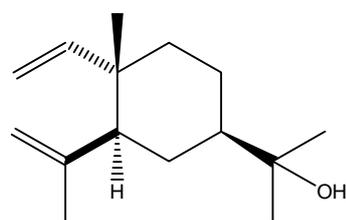


α-eudesmol

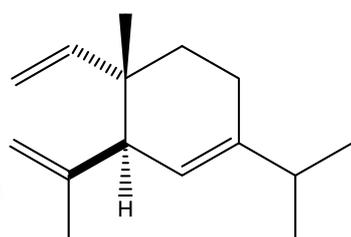


β-eudesmol

Squelette élémane

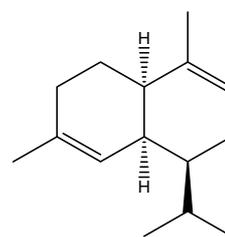


β-élémol

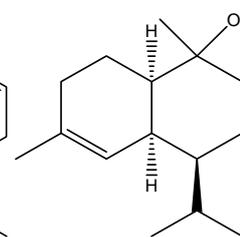


δ-élémenè

Squelette amorphe



α-amorphène



amorph-4-èn-10-ol

Figure 31 : Divers squelettes monocycliques et bicycliques de sesquiterpènes retrouvés dans les huiles essentielles de *Fortunella japonica*.

V. COMPOSITION CHIMIQUE DE L'EXTRAIT D'HYDROLAT DE *FORTUNELLA JAPONICA* (THUMB.) SWING.

Lors de l'hydrodistillation, il y a formation d'azéotropes entre l'eau et les métabolites secondaires mais aussi un entrainement mécanique par les molécules d'eau des molécules terpéniques. Après la condensation, l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse aussi appelée hydrolat. Cette phase aqueuse, en perpétuelle circulation lors de l'hydrodistillation (cohobation), s'enrichit constamment en produits hydrosolubles. Nous avons donc recueilli l'hydrolat provenant des mêmes hydrodistillations de feuilles de *F. japonica* ayant permis l'étude précédente. Son extraction avec de l'oxyde de diéthyle (cf. partie expérimentale) a conduit à un « extrait d'hydrolat » noté EH.

Nous avons déterminé la composition chimique de l'extrait d'hydrolat (EH) par CPG(Ir) et par RMN du ^{13}C . A partir du spectre unique de RMN du ^{13}C de l'EH, nous avons identifié par consultation des bibliothèques de spectres, 14 constituants qui représentent 90,5% de l'EH, la quantification étant réalisée par CPG(Ir) (**Tableau 22**). En se référant à l'analyse de l'huile essentielle, l'identification de constituants, présents à des teneurs inférieures au seuil de détection de la RMN du ^{13}C (<0,3%), a été réalisée sur la base leurs indices de rétention sur colonne polaire et apolaire ce qui porte à 94,8% le pourcentage d'identification. Cet EH est caractérisé par la présence majoritaire du cryptomériol **73** (23,3%), du β -eudesmol **66** (20,6%), du β -élémol **73** (11,1%) et de l' α -eudesmol **70** (10,7%).

Nous observons de fortes variations quantitatives mais aussi qualitatives par rapport à l'huile essentielle. L'EH est caractérisé par la prédominance de la fraction oxygénée puisqu'elle représente 93,9% dont 92,2% sont représentés par des alcools sesquiterpéniques tertiaires. En revanche, les constituants oléfiniques qui étaient présents à des teneurs appréciables dans l'huile essentielle (germacrène D, limonène, β et δ -élémane) sont soit totalement absents soit présents à des teneurs très faibles (0,1% pour le germacrène D). De plus deux oxydes (oxyde de *cis* **11** et *trans* linalol THF **12**) et deux alcools (α -terpinéol **15** et *trans* carvéol **16**) monoterpéniques, qui n'étaient pas présents dans l'huile essentielle, sont identifiés à de très faibles teneurs ($\leq 0,4\%$).

Les fortes variations quantitatives observées entre l'EH et l'HE sont liées à une différence de solubilité. Cependant, même au sein de la famille des alcools tertiaires sesquiterpéniques,

des différences sont observées. Ainsi le τ -muurolol **63** et le cryptomériol **73**, qui étaient respectivement soit présent à 0,1% soit absent se concentrent dans l'hydrolat (6,7%/23,3%), alors que le *trans*-guai-6-èn-10 β -ol **59** est identifié à des teneurs plus faible dans l'EH (6,3% vs. 2,4%). Cependant le cryptomériol **73** un diol possédant un squelette de type eudesmane totalement absent de l'huile essentielle pourrait être un sous produit de l'hydratation des trois eudesmons (α , β et γ). En effet, le pH acide (5,5) relevé dans l'hydrolat pourrait favoriser ce type de phénomène. Contrairement à ce que nous espérions, le germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol **58** est présent à des teneurs plus faibles dans cet EH par rapport à l'HE (0,2 et 2,4%)..

Comme nous l'avons observé pour les HE et EH de menthes, l'EH présente un profil assez éloigné de l'HE par i) la faible teneur des oléfines et ii) l'augmentation du pourcentage des composés oxygénés.

VI. COMPOSITION CHIMIQUE DE L'EXTRAIT MICRO-ONDES (EM) DE *FORTUNELLA JAPONICA* (THUMB.) SWING.

Si l'extraction par micro-ondes avec un appareil de type Clévenger est une technique récente qui s'apparente à une hydrodistillation, le produit obtenu ne peut pas, compte tenu du mode d'extraction, être nommée « huile essentielle ». Comme de nombreux auteurs nous utiliserons le terme d'extrait obtenu par hydrodistillation assistée par micro-ondes que nous noterons (EM). L'extrait a été obtenu à partir des feuilles prélevées à la station expérimentale de Recherches Agronomiques INRA-GEQA, San Ghjuliano, France et à l'aide d'un appareil MILESTONE DRYDIST.

Afin de réaliser une étude de la composition chimique aussi complète que possible, plusieurs distillations ont été nécessaires pour obtenir une masse d'extrait micro-ondes suffisante. Le rendement en EM, calculé en fonction de la masse de végétal frais, varie entre 0,06 et 0,12%.

VI.1 Analyse de l'extrait micro-ondes (EM) par CPG(Ir) et RMN du ^{13}C

A partir du spectre RMN du ^{13}C de l'extrait, nous avons identifié 25 constituants qui représentent 90,8% de l'EM (**Tableau 23**). La quantification a ensuite été réalisée par CPG, les différents composés étant repérés sur le chromatogramme en fonction de leurs indices de rétention sur colonnes polaire et apolaire. A l'exception du (E)-phytol (3,8%), les composés identifiés sont des sesquiterpènes avec 18 composés oxygénés (65,3%) et 6 composés oléfiniques (21,7%). Les constituants non identifiés sont présents à des teneurs inférieures à 0,6%. La présence de sesquiterpènes oxygénés est plus marquée dans le profil chromatographique de cet EM que dans le profil de l'huile essentielle.

Cet EM est caractérisée par la présence du β -élémol **48** (12,4%) suivi par le germacrène D **34** (9,9%), le *cis*-guai-6-èn-10 β -ol **53** (9,0%), le β -eudesmol **67** (8,2%) et le germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol **59** (7,1%) (**Tableau 23**). En effet, la présence des 15 raies de résonance ainsi que les indices de rétention sur colonne polaire et apolaire caractéristiques du germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol (7,1%), permettent de l'identifier en mélange dans cet EM sans ambiguïté. Afin d'isoler ce produit, de réaliser son étude complète par RMN et par la même occasion d'identifier les autres constituants minoritaires de l'extrait, nous avons procédé à une chromatographie sur colonne de silice en utilisant un gradient pentane/oxyde de diéthyle.

| N° [♦] | Constituants | Ir ^a | Ir ^p | % ^a | RMN | SUP |
|-----------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|----------------|---------|-----|
| 10 | δ-élémente | 1339 | 1467 | 2,1 | 15 / 15 | 1 |
| 22 | β-élémente | 1384 | 1588 | 3,3 | 15 / 15 | 4 |
| 31 | γ-muurole | 1467 | 1685 | 0,7 | 12 / 15 | 1 |
| 33 | α-amorphe | 1475* | 1686 | 1,0 | 13 / 15 | 3 |
| 34 | germacrene D | 1475* | 1712 | 9,9 | 15 / 15 | 1 |
| 47 | β-éle | 1532 | 2094 | 12,4 | 15 / 15 | 2 |
| 50 | (E)-nérolidol | 1541 | 2049 | 2,1 | 15 / 15 | 1 |
| 51 | germacrene B | 1552 | 1833 | 4,7 | 15 / 15 | 3 |
| 53 | cis-guai-6-èn-10β-ol | 1575 | 1993 | 9,0 | 15 / 15 | 3 |
| 54 | amorph-4-èn-10β-ol | 1577 | 2083 | 1,6 | 15 / 15 | 2 |
| 55 | guaiol | 1580 | 2043 | 1,5 | 14 / 15 | 2 |
| 57 | eudesm-6-èn-4α-ol | 1604 | 2092 | 0,8 | 13 / 15 | 4 |
| 59 | germacra-1(10),5-dièn-4α-ol | 1611 | 2188 | 7,1 | 15 / 15 | 2 |
| 60 | trans-guai-6-èn-10β-ol | 1612 | 2158 | 1,8 | 15 / 15 | 3 |
| 61 | γ-eudesmol | 1614 | 2178 | 0,8 | 12 / 15 | 4 |
| 62 | alimol | 1617 | 2270 | 3,5 | 15 / 15 | 2 |
| 63 | éremophile-11-ol Δ9-10 | 1623 | 2198 | 4,4 | 15 / 15 | 4 |
| 64 | τ-muurolo | 1627 | 2200 | 1,5 | 15 / 15 | 2 |
| 65 | τ-cadinol | 1630 | 2173 | 0,8 | 13 / 15 | 3 |
| 67 | β-eudesmol | 1641* | 2244 | 8,2 | 15 / 15 | 4 |
| 68 | α-cadinol | 1641* | 2244 | 1,1 | 15 / 15 | 2 |
| 70 | valerianol | 1643 | 2214 | 1,8 | 15 / 15 | 1 |
| 71 | α-eudesmol | 1646 | 2238 | 6,4 | 15 / 15 | 3 |
| 73 | eudesm-7(11)-èn-4α-ol | 1682 | 2310 | 0,5 | 12 / 15 | 2 |
| 76 | (E)-phytol | 2104 | 2620 | 3,8 | 20 / 20 | 4 |
| total | | | | 90,8 | | |

RMN : nombre de carbones observés dans le spectre de RMN de ¹³C par rapport au nombre de pics attendus. SUP : nombre de superpositions.. Ir^a et Ir^p : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et polaire (BP20). %^a : pourcentages mesurés sur colonne apolaire, exceptés les pourcentages suivis d'un astérisque (colonne polaire). ♦ : numérotation associée à chaque constituant faisant référence au **Tableau 25**.

Tableau 23 : Composés identifiés à partir du spectre RMN du ¹³C de l'extrait micro-ondes de feuilles de *Fortunella japonica* (Thumb.) Swing.

VI.2 Fractionnement et étude détaillée de l'extrait micro-ondes

Nous avons soumis 2,055g d'EM à un fractionnement par chromatographie sur gel de silice de granulométrie 63-200µm. Les différentes étapes de ce fractionnement sont décrites dans la **Figure 32**.

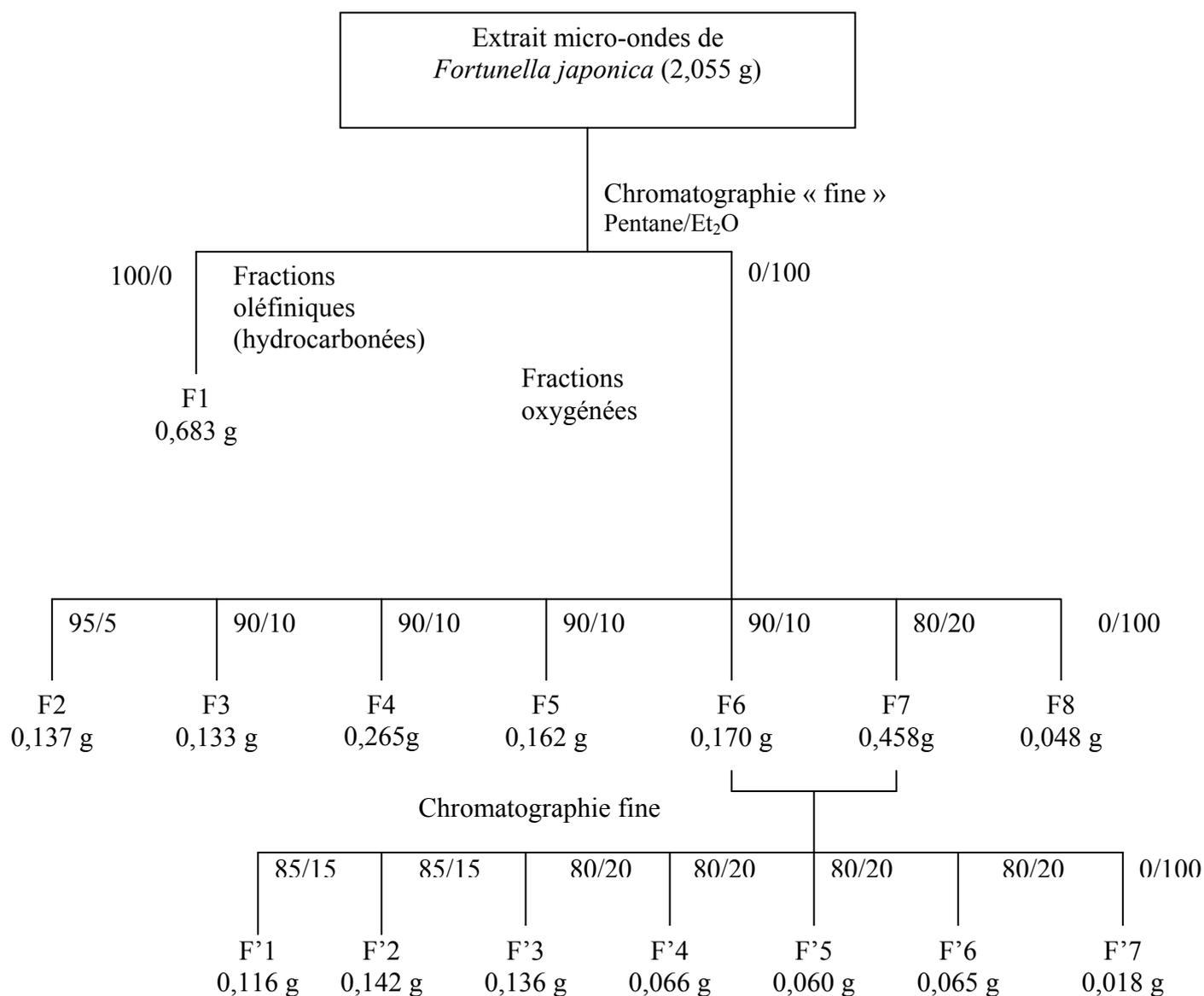


Figure 32 : Schéma de fractionnement de l'extrait micro-ondes de *F. japonica* (Thumb.) Swing.

Huit fractions, notées F1 à F8 sont éluées respectivement avec le pentane (F1), un mélange pentane/ oxyde de diéthyle 95/5 (F2), 80/20 (F3-F7) et à l'oxyde de diéthyle (F8). Les fractions F6 et F7 présentent des fortes teneurs en germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol et la masse est assez importante pour envisager un fractionnement supplémentaire. Ainsi 7 fractions, notées F'1-F'7 sont éluées sur colonne ouverte de silice (0,40-0,63 μ m) avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle 85/15 (F'1-F'2), 80/20 (F'3-F'7) et à l'oxyde de diéthyle (F'8). Chacune des fractions est analysée par la combinaison CPG(Ir) et RMN du ^{13}C (**Tableau 25**). Il faut noter que lors du fractionnement, nous avons rencontré les mêmes difficultés que dans le cas de l'huile essentielle. Les sesquiterpènes oxygénés présents possèdent des polarités quasi similaires ne permettant pas leur séparation.

VI.2.1 Etude de la fraction hydrocarbonée F1

L'étude de la fraction hydrocarbonée, nous permet en plus des 6 constituants oléfiniques précédemment observés, d'identifier 16 nouveaux composés. Il s'agit d'un monoterpène (limonène) et de 15 sesquiterpènes. Tous ces composés sont directement identifiés par interrogation de la banque « Terpènes » et ont été également identifiés dans l'huile essentielle (**Tableau 25**).

VI.2.2 Etude des fractions oxygénées F2-F8

Dans les 7 fractions de chromatographie, 6 alcools sesquiterpéniques supplémentaires ont été mis en évidence (**Tableau 24**). Il s'agit du 7-épi- γ -eudesmol **58**, de l'amorph-4- α -10-ol **66** (F5), du 7-épi- α -eudesmol **72**, du eudesm-7(11)-en-4 α -ol **73** (fraction F4) et du (Z)-phytol **75** (F7). Le germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol **59** est identifié dans les fractions F3 à F7. La teneur la plus élevée est observée dans la fraction F6 (18,9%). Une série supplémentaire de chromatographies sur colonne avec de la silice fine imprégnée d'AgNO₃, nous permet d'obtenir une fraction où le composé majoritaire est le germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol **59** (40%). Malgré la présence à des teneurs similaires du β -élémol **48** (37%), nous avons réalisé une analyse structurale complète sur cette fraction. L'étude par RMN du ¹³C des fractions de chromatographie ne nous permet pas d'identifier de constituants supplémentaires. Nous aborderons dans une partie suivante l'analyse des constituants soit absents de notre banque de molécules « Terpènes » soit nécessitant une analyse structurale.

| N° [♦] | Constituants Eluant | I _r ^a | I _r ^p | HE | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 | F7 | F8 |
|-----------------|--------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | | | | 95/5 | 90/10 | 90/10 | 90/10 | 90/10 | 80/20 | 0/100 |
| 47 | β-éléamol | 1532 | 2094 | 12,4 | 2,0 | 2,5 | 15,0 | 19,1 | 23,1 | 25,5 | 12,9 |
| 50 | (E)-nérolidol | 1541 | 2049 | 2,1 | 4,4 | 5,7 | 0,7 | - | - | - | - |
| 53 | <i>cis</i> -guai-6-èn-10β-ol | 1578 | 1993 | 9,0 | 75,0 | 48,1 | 7,7 | 0,8 | tr | - | - |
| 54 | amorph-4-èn-10β-ol | 1575 | 2083 | 1,6 | - | - | - | 5,1 | 4,1 | 1,7 | 1,2 |
| 55 | guaïol | 1580 | 2043 | 1,5 | 2,6 | 4,0 | 0,1 | - | - | - | - |
| 56 | épi-cubénol | 1582 | 2062 | tr | | tr | 0,1 | - | - | - | - |
| 57 | eudesm-6-èn-4α-ol | 1604 | 2092 | 0,8 | 1,2 | 1,8 | 2,7 | 1,1 | 0,9 | 0,2 | tr |
| 58 | 7-épi-γ-eudesmol | 1609 | 2036 | 0,2 | - | - | - | - | 0,6 | 0,8 | - |
| 59 | germacra-1(10),5-dièn-4α-ol | 1611 | 2188 | 7,1 | 0,1 | 2,4 | 12,7 | 13,5 | 18,9 | 15,7 | 0,4 |
| 60 | <i>trans</i> -guai-6-èn-10β-ol | 1612 | 2158 | 1,8 | - | - | tr | 1,8 | 2,5 | 4,7 | 6,5 |
| 61 | γ-eudesmol | 1614 | 2178 | 0,8 | - | 2,0 | 2,2 | 2,5 | 1,1 | 0,1 | - |
| 62 | alïsmol | 1617 | 2270 | 3,5 | - | 2,0 | 2,1 | 2,8 | 3,1 | 2,8 | 0,8 |
| 63 | éremophilèn-11-ol Δ ⁹ -10 | 1623 | 2198 | 4,4 | - | 6,7 | 13,9 | 8,9 | 5,6 | 4,3 | 0,2 |
| 64 | τ-muurolol | 1627 | 2200 | 1,5 | - | 3,4 | 0,7 | 0,3 | tr | - | - |
| 65 | τ-cadinol | 1630 | 2173 | 0,8 | 1,4 | 1,5 | 2,3 | 1,2 | 0,6 | 0,3 | tr |
| 66 | amorph-4-èn-10α-ol | 1641* | 2210 | 0,1 | - | 0,5 | 0,5 | 0,8 | 1,0 | 2,5 | 31,6 |
| 67 | β-eudesmol | 1641* | 2244 | 8,2 | - | 3,1 | 10,6 | 17,2 | 18,0 | 18,6 | 13,9 |
| 68 | α-cadinol | 1641* | 2244 | 1,1 | - | - | 1,5 | 2,5 | 2,6 | 2,7 | 2,0 |
| 70 | valérianol | 1643 | 2214 | 1,8 | 1,6 | 3,2 | 4,1 | 3,1 | 1,5 | 0,3 | 0,2 |
| 71 | α-eudesmol | 1646 | 2238 | 6,4 | - | 3,1 | 9,0 | 10,2 | 12,4 | 13,4 | 5,9 |
| 72 | 7-épi-α-eudesmol | 1649 | 2228 | 0,2 | - | - | 1,6 | 0,9 | 0,4 | - | - |
| 73 | eudesm-7(11)-èn-4α-ol | 1682 | 2310 | 0,5 | - | - | 1,3 | 0,8 | 0,3 | 0,1 | - |
| 75 | (Z)-phytol | 2074 | 2545 | 0,2 | - | - | - | - | tr | 2,1 | 13,9 |
| 76 | (E)-phytol | 2104 | 2620 | 3,8 | - | tr | 0,4 | 5,1 | 2,6 | 2,4 | 0,7 |
| Total | | | | 69,8 | 88,3 | 90,0 | 89,2 | 97,7 | 99,3 | 98,1 | 90,2 |

L'ordre d'élution est donné sur colonne apolaire. I_r^a et I_r^p: indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et polaire (BP20). %^a: pourcentages mesurés sur colonne apolaire, excepté les pourcentages suivis d'un astérisque (colonne polaire).[♦]: numérotation associée à chaque constituant faisant référence au **Tableau 25**.

Tableau 24: Composés identifiés dans les fractions oxygénées de l'extrait micro-ondes de *F. japonica* (Thumb.) Swing.

VI.3 Bilan de l'étude concernant l'extrait micro-ondes.

Au terme de notre étude sur la composition chimique de l'extrait micro-ondes de feuilles de *Fortunella japonica* réalisée par CPG(Ir), CPG-SM et RMN du ¹³C, nous avons mis en évidence 59 composés qui représentent 95,2% de l'extrait (**Tableau 25**). Parmi ces constituants, 44 ont été identifiés directement par interrogation de la banque « Terpènes ».

L'extrait de *Fortunella japonica* (Thumb.) Swing. est caractérisé par la présence du β -élémol **48** (12,4%), du germacrène D **34** (9,9%), du *cis*-guai-6-èn-10 β -ol **53** (9,0%), du β -eudesmol **67** (8,2%) et du germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol **59** (7,1%). De nombreux composés présentent une teneur supérieure à 2%. Il s'agit de 3 sesquiterpènes oléfiniques, le germacrène B **51** (4,7%), le β -élémente **22** (3,3%), le δ -élémente **17** (2,1%) ainsi que de 5 alcools tertiaires dont 4 sesquiterpéniques, l' α -eudesmol **61** (6,4%), éremophilen-11-ol Δ 9-10 **63** (4,4%), l'(E)-phytol **76** (3,8%), l'alismol **62** (3,5%) et le (E)-nérolidol **50** (2,1%).

Le pourcentage relatif des sesquiterpènes oxygénés et par conséquent les alcools tertiaires sesquiterpéniques qui était déjà importante dans l'HE, est encore plus élevé dans l'EM (84,6% vs. 91,1%). De plus le rapport, des sesquiterpènes oxygénés/oléfiniques est accentué dans l'EM, passant de 1,44 à 2,60. Ce phénomène de diminution des teneurs en oléfines ainsi que d'augmentation du pourcentage des composés oxygénés induit par une extraction assistée sans solvant par microondes est décrit dans la littérature. Nous citerons comme exemple la composition chimique de l'huile essentielle de cumin obtenue par hydrodistillation classique et par extraction sans solvant assistée par micro-ondes. Ainsi dans l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation, le cuminaldéhyde (22,8%), l' α -terpinén-7-al (14,4%), le *p*-cymène (18,4%), le γ -terpinène (22,3%) et le β -pinène (16,2%) ont des teneurs quasi équivalentes. Dans l'EM, le cuminaldéhyde (37,1%), et l' α -terpinén-7-al (29,1%) sont nettement prépondérants par rapport au *p*-cymène (12,1%), γ -terpinène (12,9%) et au β -pinène (5,9%). De la même manière, les composés oxygénés sont majoritaires dans l'extrait micro-onde d'ajowan (thymol 60%, *p*-cymène 21,2% et γ terpinène 16,4%) alors que ces trois constituants présentent des teneurs équivalentes (environ 30%) dans l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation (Thèse Lucchesi). Ainsi nos résultats sont bien en accord avec les données décrites dans la littérature.

| N° | Constituents | Ir _a | Ir _p | HE | EM | Constituents | Ir _a | Ir _p | HE | EM |
|-------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|------|-----|---|-----------------|-----------------|------|------|
| 1 | α -pinène | 931 | 1022 | tr | tr | 39 γ -amorphène | 1493 | 1671 | tr | - |
| 2 | sabinène | 965 | 1124 | tr | tr | 40 germacrène bicyclo | 1496 | 1728 | 0,8 | tr |
| 3 | β -pinène | 971 | 1114 | tr | tr | 41 α -sélinène | 1496 | 1520 | 0,2 | tr |
| 4 | myrcène | 980 | 1159 | 0,4 | tr | 42 α -muurolène | 1496 | 1721 | 0,3 | tr |
| 5 | α -phellandrène | 994 | 1164 | tr | - | 43 γ -cadinène | 1496 | 1752 | 0,9 | 0,2 |
| 6 | 3-carène | 1003 | 1148 | 0,1 | - | 44 δ -amorphène | 1500 | 1635 | 1,6 | 0,2 |
| 7 | limonène | 1021* | 1201 | 7,1 | 0,1 | 45 α -bulnésène | 1502 | 1711 | 0,2 | 0,3 |
| 8 | β -phellandrène | 1021* | 1210 | tr | - | 46 δ -cadinène | 1510 | 1751 | 1 | 0,5 |
| 9 | (Z)- β -ocimène | 1023 | 1232 | tr | - | 47 β -élémol | 1532 | 2094 | 9,1 | 12,4 |
| 10 | (E)- β -ocimène | 1036 | 1249 | 0,6 | - | 48 sélina-4(15),7(11)-diène | 1534 | 1772 | 0,1 | 0,4 |
| 11 | oxyde de <i>cis</i> linalol THF | 1056 | 1443 | - | - | 49 α -cadinène | 1535 | 1785 | tr | - |
| 12 | oxyde de <i>trans</i> linalol THF | 1070 | 1471 | - | - | 50 (E)-nérolidol | 1541 | 2049 | 1,1 | 2,1 |
| 13 | terpinolène | 1076 | 1280 | tr | - | 51 germacrène B | 1552 | 1833 | 2,4 | 4,7 |
| 14 | linalol | 1080 | 1551 | tr | - | 52 spathuléol | 1561 | 2114 | tr | - |
| 15 | α -terpinéol | 1170 | 1698 | - | - | 53 <i>cis</i> -guai-6-èn-10 β -ol | 1575 | 1993 | 6,3 | 9 |
| 16 | <i>trans</i> carvéol | 1195 | 1836 | - | - | 54 amorph-4-èn-10 β -ol | 1577 | 2083 | tr | 1,6 |
| 17 | δ -élémente | 1339 | 1467 | 5,2 | 2,1 | 55 guaiol | 1580 | 2083 | 1,2 | 1,5 |
| 18 | α -cubébène | 1345 | 1454 | 0,1 | tr | 56 epi-cubéol | 1582 | 2062 | tr | - |
| 19 | ylangène | 1368 | 1480 | 0,1 | tr | 57 eudesm-6-èn-4 α -ol | 1604 | 2092 | 2,2 | 0,8 |
| 20 | α -copaène | 1373 | 1488 | 0,1 | tr | 58 7-epi- γ -eudesmol | 1609 | 2036 | 0,4 | 0,2 |
| 21 | β -bourbonène | 1381 | 1515 | 0,2 | 0,3 | 59 germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol | 1611 | 2188 | 2,4 | 7,1 |
| 22 | β -élémente | 1384 | 1588 | 3,3 | 3,3 | 60 <i>trans</i> -guai-6-èn-10 β -ol | 1612 | 2158 | 1,4 | 1,8 |
| 23 | β -ylangène | 1413 | 1568 | 0,3 | tr | 61 γ -eudesmol | 1614 | 2178 | 1,4 | 0,8 |
| 24 | (E)- β -caryophyllène | 1423 | 1593 | 1,6 | tr | 62 alismol | 1617 | 2270 | 1,2 | 3,5 |
| 25 | β -copaène | 1425 | 1586 | 0,3 | tr | 63 érérophilen-11-ol Δ 9-10 | 1623 | 2198 | 4,2 | 4,4 |
| 26 | thujopsène | 1435* | 1618 | 0,4 | tr | 64 τ -muurolol | 1627 | 2200 | 0,1 | 1,5 |
| 27 | α -guaiène | 1435* | 1602 | 0,5 | 0,1 | 65 τ -cadinol | 1630 | 2173 | 0,1 | 0,8 |
| 28 | β -gurjunène | 1441 | 1593 | 0,4 | 0,4 | 66 amorph-4-èn-10 α -ol | 1641* | 2210 | 2,2 | 0,1 |
| 29 | E-(β)-farnésène | 1448 | 1635 | 0,7 | tr | 67 β -eudesmol | 1641* | 2244 | 5,5 | 8,2 |
| 30 | α -humulène | 1454 | 1666 | tr | tr | 68 α -cadinol | 1641* | 2244 | 0,7 | 1,1 |
| 31 | γ -muurolène | 1467 | 1685 | tr | 0,7 | 69 valérianol | 1643 | 2214 | 2,1 | 1,8 |
| 32 | β -chamigrène | 1475* | 1703 | 0,1 | 0,2 | 70 selin-11-èn-4 α -ol | 1644 | 2238 | tr | - |
| 33 | α -amorphène | 1475* | 1686 | 0,5 | 1 | 71 α -eudesmol | 1646 | 2238 | 4,4 | 6,4 |
| 34 | germacrène D | 1475* | 1712 | 14,9 | 9,9 | 72 7-epi- α -eudesmol | 1649 | 2228 | 0,5 | 0,2 |
| 35 | γ -humulène | 1475* | 1721 | 0,5 | 0,3 | 73 eudésm-7(11)-èn-4 α -ol | 1682 | 2310 | 0,4 | 0,5 |
| 36 | (E)- β -bergamotène | 1475* | 1718 | 0,2 | 0,4 | 74 cryptomériol | 1791 | 2598 | - | - |
| 37 | β -sélinène | 1475* | 1714 | 0,8 | 0,3 | 75 (Z)-phytol | 2074 | 2545 | - | 0,2 |
| 38 | <i>cis</i> -eudesma-6,11-diène | 1480 | 1718 | tr | - | 76 (E)-phytol | 2104 | 2620 | 0,3 | 3,8 |
| Total | | | | | | | | | 93,1 | 95,2 |

L'ordre d'élution est donné sur colonne apolaire. Ir^a et Ir^p : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et polaire (BP20). %^a : pourcentages mesurés sur colonne apolaire, excepté les pourcentages suivis d'un astérisque (colonne polaire).

Tableau 25 : Composés identifiés dans l'huile essentielle (HE), l'extrait d'hydrolat (EH) et l'extrait micro-ondes (EM) de feuilles de *F. japonica* (Thumb.) Swing.

VII. ETUDE DE LA VARIABILITE CHIMIQUE DANS LE GENRE *FORTUNELLA*

A la suite de cette étude réalisée sur les huiles essentielles et extraits de l'espèce *Fortunella japonica* (Thumb.) Swing., nous avons élargi notre échantillonnage aux cinq espèces du genre *Fortunella* disponibles à la l'INRA-GEQA de San Ghjuliano sur les six recensées (*F. margarita* (Lour.) Swing., *F. hindsii* (Thumb.) Swing., *F. crassifolia* Swing., *F. obovata* Tan.). Nous avons utilisé le même matériel végétal (feuilles et fruits entiers) et les mêmes méthodes d'extraction (hydrodistillation au laboratoire avec un appareil de type Clévenger et extraction par micro-ondes). Nous avons analysé, par CPG(Ir) et RMN du ^{13}C tous les échantillons, les composés présents à une teneur supérieure à 0,6% étant identifiés par RMN du ^{13}C . Les autres constituants ont été identifiés par comparaison des indices de rétention avec ceux des mêmes composés observés lors des analyses détaillées décrites précédemment. En raison du faible nombre d'espèces dans ce genre, une étude statistique par analyse en composantes principales ou par partition, comme celle réalisée dans le chapitre II sur les huiles essentielles de *Mentha suaveolens* Ehrh., n'aurait aucune signification. Nous avons donc procédé à des comparaisons entre les compositions chimiques des huiles essentielles de fruits ou de feuilles des cinq espèces.

VII.1 Les huiles essentielles de fruits des cinq espèces de *Fortunella*

Les compositions chimiques des 5 huiles essentielles de fruits du genre *Fortunella* (*F. margarita*, *F. japonica*, *F. hindsii*, *F. obovata*, *F. crassifolia*) obtenues par hydrodistillation des fruits entiers sont données dans le **Tableau 26**.

Nous avons identifié 26 composés qui représentent de 98,9 à 99,5% de la composition totale des huiles essentielles. Les huiles essentielles présentent des compositions chimiques très proches et sont principalement constituées de monoterpènes hydrocarbonés, le limonène (84,2-96,3%) et le myrcène (1,3-12,9%) étant les principaux constituants. L' α -pinène (0,2-0,3%), le *trans*-carvéol (0,1-0,6%), l'acétate de géranyle (0,2%) et le germacrène D (0,2-2,4%) sont présents dans tous les échantillons. Les composés oxygénés (1,1-1,4%) sont minoritaires dans ces huiles essentielles puisque seuls le *trans*-carvéol (0,1-0,6%) et l' α -terpinéol (tr-0,5%) sont présents à des teneurs appréciables. L'huile essentielle de *F. crassifolia* se distingue des autres huiles essentielles par une teneur élevée en myrcène

(12,9%) alors que pour les autres espèces, le pourcentage de ce composé ne dépasse pas 1,5%. Les huiles essentielles de fruits de *F. margarita* et *F. hindsii* se distinguent aussi par des teneurs les plus élevées en germacrène D, respectivement 2,4 et 2,1% vs. 0,2-0,3% pour les trois autres espèces (**Tableau 26**).

Les compositions chimiques des huiles essentielles de fruits des cinq espèces sont proches de celles décrites dans la littérature. En effet, la grande majorité des huiles essentielles de fruits du genre *Fortunella* présentent des teneurs en limonène supérieures à 90% (Mitiku *et al.*, 2000 ; Choi et Sawamura, 2000 ; Koyasako et Bernhard, 1983 ; Capello *et al.*, 1982 ; Choi, 2005). Les teneurs en myrcène relevées dans les huiles essentielles de *F. obovata*, *F. japonica*, *F. margarita* et *F. hindsii* (1,3-1,5%) sont proches de celles relevées dans les huiles essentielles de *F. japonica* de Corée, d'Italie (espèce non-précisée), de *F. margarita* d'Argentine (Choi, 2005 ; Cotroneo *et al.*, 1985 ; Capello *et al.*, 1982). En revanche, la teneur relevée pour le myrcène dans l'huile essentielle de *F. crassifolia* est proche des valeurs obtenues dans un extrait à l'oxyde de diéthyle de fruits de *F. crassifolia* (10,9-14,2%), et dans une moindre mesure, dans les huiles essentielles de *F. japonica* (6,3%) de Colombie (Quijano et Pino, 2009).

En 2003, Merle *et al.* ont démontré que, même en présence d'une teneur en limonène supérieure à 90%, les pourcentages des composés minoritaires des huiles essentielles de zestes de mandarines permettaient de réaliser une étude statistique fiable et ainsi d'aider à la classification des agrumes. En multipliant le nombre d'échantillons de différentes origines géographiques, il serait intéressant de vérifier si, par exemple, le p-mentha-1,5-diène-8-ol, identifié pour la première fois dans une huile essentielle de fruit du genre *Fortunella*, pourrait constituer un critère pour la classification.

Les compositions chimiques d'huiles essentielles de zestes ou de fruits, obtenues par hydrodistillation ou expression à froid, qui présentent une teneur en limonène supérieure à 80-90%, sont très fréquentes dans le genre *Citrus* (oranges, mandarines, limes,...). Dans les huiles essentielles de kumquat, les sesquiterpènes oxygénés et oléfiniques sont présents en quantités supérieures par rapport aux huiles essentielles du genre *Citrus* comme l'orange et le citron et pourraient être à l'origine de l'amertume qui caractérise le kumquat selon Quijano et Pino (2009).

| N° | Constituants | Ir ^a | Ir ^p | <i>F.</i> <i>japonica</i> | <i>F.</i> <i>obovata</i> | <i>F.</i> <i>margarita</i> | <i>F.</i> <i>crassifolia</i> | <i>F.</i> <i>hindsii</i> |
|----------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| Rendements (%) | | | | 0,066 | 0,074 | 0,048 | 0,086 | 0,059 |
| 1 | α-thujène | 922 | 1023 | tr | - | - | - | tr |
| 2 | α-pinène | 929 | 1022 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| 3 | myrcène | 979 | 1160 | 1,5 | 1,4 | 1,4 | 12,9 | 1,3 |
| 4 | α-terpinène | 1005 | 1168 | tr | - | - | tr | tr |
| 5 | limonène | 1021* | 1215 | 96,3 | 95,6 | 93,1 | 84,2 | 93,5 |
| 6 | β-phellandréne | 1021* | 1225 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,1 |
| 7 | γ-terpinène | 1048 | 1249 | tr | - | - | tr | - |
| 8 | <i>cis</i> oxyde de linalol THF | 1056 | 1443 | 0,1 | 0,1 | tr | 0,1 | tr |
| 9 | <i>trans</i> oxyde de linalol THF | 1070 | 1471 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | tr | 0,2 |
| 10 | p-cyménène | 1072 | 1441 | tr | - | - | - | tr |
| 11 | terpinolène | 1078 | 1275 | tr | tr | - | 0,1 | - |
| 12 | linalol | 1082 | 1547 | tr | 0,1 | - | 0,1 | - |
| 13 | <i>cis</i> -β-terpinéol | 1125 | 1631 | 0,1 | tr | tr | 0,2 | tr |
| 14 | p-mentha-1,5-diène-8-ol | 1142 | 1711 | tr | tr | tr | tr | tr |
| 15 | α-terpinéol | 1170 | 1698 | 0,5 | 0,3 | 0,1 | tr | 0,1 |
| 16 | <i>trans</i> carvéol | 1195 | 1836 | 0,1 | 0,4 | 0,2 | 0,6 | 0,2 |
| 17 | <i>cis</i> carvéol | 1208 | 1867 | tr | tr | tr | 0,1 | 0,1 |
| 18 | δ-élémane | 1335 | 1475 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | tr | 0,2 |
| 19 | acétate d'α-terpinyle | 1338 | 1682 | 0,1 | tr | - | 0,1 | 0,1 |
| 20 | acétate de géranyle | 1358 | 1758 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| 21 | germacrène D | 1474 | 1716 | 0,2 | 0,3 | 2,4 | 0,3 | 2,1 |
| 22 | bicyclo germacrène | 1490 | 1735 | tr | - | 0,2 | - | 0,2 |
| 23 | δ-cadinène | 1513 | 1765 | tr | tr | 0,2 | 0,1 | 0,2 |
| 24 | γ-eudesmol | 1610 | 2188 | tr | - | 0,3 | tr | 0,1 |
| 25 | α-eudesmol | 1635 | 2223 | tr | tr | tr | tr | tr |
| 26 | β-eudesmol | 1637 | 2244 | tr | tr | tr | tr | 0,2 |
| | | | | 99,8 | 98,9 | 99,0 | 99,5 | 99,0 |

L'ordre d'éluion est donné sur colonne apolaire. Ir^a et Ir^p : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et polaire (BP20). %^a : pourcentages mesurés sur colonne apolaire.

Tableau 26 : Composés identifiés dans les huiles essentielles de fruits de 5 espèces du genre *Fortunella*.

VII.2 Les huiles essentielles de feuilles des cinq espèces de *Fortunella*

Nous avons identifié entre 50 et 73 composés qui représentent entre 93,1 et 97,8% de la composition globale des huiles essentielles de *F. margarita*, *F. japonica*, *F. hindsii*, *F. obovata* et *F. crassifolia* (Annexe 13, p. 209). Le profil chromatographique de chacune de ces huiles essentielles permet d'affirmer, que si des différences quantitatives existent, les huiles essentielles sont qualitativement proches. Les constituants majoritaires communs de ces

huiles sont le germacrène D (14,9-28,7%) et le β -élémol (8,4-26,8%). Les rendements sont, eux aussi, proches à l'exception de celui de *F. crassifolia* 0,17% vs. 0,28-0,39%.

Afin de faciliter la comparaison entre les différentes espèces, nous avons pris uniquement en considération les composés qui, au moins une fois, présentaient un pourcentage de 1% (Tableau 27).

| N° [♦] | Constituants | Ir _a | Ir _p | <i>F.</i> <i>japonica</i> | <i>F.</i> <i>obovata</i> | <i>F.</i> <i>crassifolia</i> | <i>F.</i> <i>margarita</i> | <i>F.</i> <i>hindsii</i> |
|-----------------|--|-----------------|-----------------|------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| | Rendements (%) | | | 0,28 | 0,35 | 0,17 | 0,36 | 0,39 |
| 7 | limonène | 1021* | 1201 | 7,1 | 7,3 | 2,8 | 2,8 | 3,1 |
| 17 | δ -élémente | 1339 | 1467 | 5,2 | 7,1 | 0,1 | 0,1 | 12,5 |
| 22 | β -élémente | 1384 | 1588 | 3,3 | 4,4 | 0,6 | 0,6 | 3,6 |
| 24 | (E)- β -caryophyllène | 1423 | 1593 | 1,6 | 0,7 | 5,5 | 6,0 | 2,3 |
| 33 | α -amorphène | 1475* | 1686 | 0,5 | 0,3 | 0,2 | - | 1,0 |
| 34 | germacrène D | 1475* | 1712 | 14,9 | 15,5 | 14,9 | 14,9 | 28,7 |
| 40 | bicyclo germacrène | 1496* | 1728 | 0,8 | 0,2 | 4,8 | 4,8 | 3,9 |
| 47 | β -élémol | 1532 | 2094 | 9,1 | 8,4 | 26,8 | 25,8 | 10,8 |
| 50 | (E)-nérolidol | 1541 | 2049 | 1,1 | 1,6 | 3,4 | 3,3 | 1,0 |
| 51 | germacrène B | 1552 | 1833 | 2,4 | - | 0,8 | 1,4 | 1,1 |
| 53 | <i>cis</i> -guai-6-èn-10 β -ol | 1575 | 1993 | 6,3 | 6,4 | 0,6 | 0,4 | 0,7 |
| 54 | amorph-4-èn-10 β -ol | 1577 | 2083 | tr | 2,6 | 0,1 | 0,1 | - |
| 55 | guaïol | 1580 | 2083 | 1,2 | 0,6 | 0,3 | 0,2 | 0,1 |
| 59 | germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol | 1611 | 2188 | 2,4 | 2,4 | 3,6 | 2,4 | 4,4 |
| 60 | <i>trans</i> -guai-6-èn-10 β -ol | 1612 | 2158 | 1,4 | 1,2 | 2,4 | 2,5 | 1,5 |
| 61 | γ -eudesmol | 1614 | 2178 | 1,4 | 1,3 | 2,5 | 0,2 | 1,4 |
| 62 | alismol | 1617 | 2270 | 1,2 | 1,0 | 0,2 | 5,3 | 0,8 |
| 63 | érémophilén-11-ol Δ 9-10 | 1623 | 2198 | 4,2 | 3,8 | 8,0 | tr | 4,1 |
| 66 | amorph-4-èn-10 α -ol | 1630 | 2173 | 2,2 | 2,4 | tr | 1,4 | 1,0 |
| 67 | β -eudesmol | 1641 | 2244 | 5,5 | 6,1 | 3,9 | 3,9 | 1,0 |
| 70 | valérianiol | 1643 | 2238 | 2,1 | 2,3 | 2,8 | 2,8 | 1,8 |
| 71 | α -eudesmol | 1646 | 2214 | 4,4 | 4,4 | 3,1 | 3,1 | 1,5 |
| | Total | | | 93,1 | 96,2 | 97,4 | 97,8 | 96,0 |
| | monoterpènes | | | 8,2 | 9,0 | 8,0 | 8,2 | 4,1 |
| | sesquiterpènes | | | 84,6 | 87,4 | 89,3 | 89,6 | 91,5 |
| | sesquiterpènes oxygénés | | | 46,9 | 49,2 | 58,9 | 58,0 | 31,7 |
| | sesquiterpènes oléfiniques | | | 37,7 | 38,2 | 30,4 | 31,6 | 59,8 |

L'ordre d'éluion est donné sur colonne apolaire. Ir^a et Ir^p : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et polaire (BP20). %^a : pourcentages mesurés sur colonne apolaire. ♦ : numérotation associée à chaque constituant faisant référence au Tableau 25.

Tableau 27 : Composés présents au moins une fois à des teneurs égales à 1% identifiés dans les huiles essentielles de feuilles de 5 espèces du genre *Fortunella*.

Malgré l'homogénéité de la composition chimique, nous observons des différences entre les espèces et nous pouvons proposer trois profils :

- l'huile essentielle de *Fortunella hindsii* présente un pourcentage élevé pour les sesquiterpènes oléfiniques (59,8% vs. 30,4-38,2% pour les quatre autres espèces) due aux fortes teneurs en germacrène D (28,7% vs. 14,9-15,5%) et en δ -élémente (12,5% vs. 0,1-7,1%).

- les huiles essentielles de *F. margarita* et *F. crassifolia* présentent les plus fortes teneurs en β -élémol (26,8/25,8%) associés avec de faibles pourcentages en δ -élémente (0,1/0,1%) et β -élémente (0,6/0,6%). Il est possible de les différencier par les pourcentages en alismol (5,3% vs. 0,2% et en éremophilen-11-ol Δ 9-10 (traces vs. 8,0%).

- les huiles essentielles de *F. japonica* et *F. obovata* présentent de nombreuses caractéristiques communes avec des teneurs proches en sesquiterpènes oxygénés (46,9/49,2%) et oléfiniques (37,7/38,2%). Il est à noter des teneurs remarquables du limonène (7,1/7,3% vs. 2,8-3,1%) et du *cis*-guai-6-ène-10 β -ol (6,3/6,4% vs. 0,4-0,7%) et dans une moindre mesure du β -eudesmol (5,5/6,1% vs. 1,0-3,9%) et de l' α -eudesmol (4,4/4,4% vs. 1,5-3,1%). Pour les pourcentages du δ -élémente (5,2/7,1%) et du β -élémente (3,3/4,4%), la situation apparaît intermédiaire entre les huiles essentielles des trois autres espèces (*F. hindsii*, *F. margarita* et *F. crassifolia*). La différenciation entre *F. japonica* et *F. obovata* s'avère délicate et ne peut se faire que sur la base des teneurs des composés minoritaires, comme par exemple le germacrène B absent chez *F. obovata* (**Annexe 13**, p. 210).

Par conséquent, la grande variabilité chimique inter et intraspécifique décrite dans le genre *Citrus* (mandarines, citrons) ne semble pas exister dans le genre *Fortunella* et il s'avère délicat de différencier les cinq espèces sur la base de la composition chimique de l'huile essentielle de feuilles.

Comme nous l'avons déjà observé pour l'espèce *F. japonica*, les huiles essentielles de feuilles du genre *Fortunella* sont très originales par la quasi absence de monoterpènes et la présence avec des teneurs importantes de sesquiterpènes, en particulier oxygénés qui représentent pour quatre espèces sur cinq la moitié de la composition totale (46,9-58,9%). Ces sesquiterpènes sont présents mais avec de plus faibles proportions dans l'huile essentielle du genre *Poncirus* et quasiment absents ou présents à l'état de traces (si on excepte les sinensals) dans les huiles essentielles du genre *Citrus*. Ainsi, les données sur la composition chimique des huiles essentielles de feuilles peuvent permettre d'affiner les classifications actuelles afin de réaliser une exploitation de la diversité des agrumes beaucoup plus approfondie.

VII.3 Les extraits micro-ondes de feuilles des cinq espèces de *Fortunella*

La composition chimique de chacun des extraits micro-ondes (EM) de feuilles des cinq espèces (*F. margarita*, *F. japonica*, *F. hindsii*, *F. obovata* et *F. crassifolia*) est décrite dans l'Annexe 14, p. 211. Dans le Tableau 28, figurent les composés qui présentent, au moins une fois, des teneurs supérieures à 1%.

Nous avons identifié de 28 à 49 composés qui représentent de 94,1 à 96,0% de la composition globale. Les 5 extraits (EM) présentent des compositions chimiques proches des huiles essentielles correspondantes. En effet, ces EM sont également caractérisés par la prédominance de la fraction sesquiterpénique, les sesquiterpènes oxygénés (55,7-75,2%) étant plus importants que les sesquiterpènes oléfiniques (17,7-38,0%), sauf dans le cas de *F. crassifolia*. Le germacrène D (4,1-26,1%) et le β -élémol (7,8-19,5%) sont identifiés dans tous les échantillons. Il est cependant possible de différencier les EM sur la base d'autres sesquiterpènes.

- L'EM de *F. obovata* est caractérisé par les plus fortes teneurs en alcools tertiaires sesquiterpéniques, α -eudesmol (13,1%), β -eudesmol (12,5%), éremophilen-11-ol Δ 9-10 (6,8%) et valérianol (5,4%). De plus, le germacrène D (4,1%) ainsi que le β -eudesmol (7,8%) sont présents avec de teneurs faibles.
- L'EM de *F. margarita* présente une composition chimique caractérisée par la présence à des concentrations importantes de deux stéréoisomères : le *cis*-guai-6- β -ol (8,4%) et le *trans*-guai-6- β -ol (5,0%).
- L'EM de *F. japonica* se distingue par des teneurs les plus importantes en *cis*-guai-6- β -ol (9,0%) et en alismol (3,5%).
- L'EM de *F. hindsii* se différencie des autres EM par une composition chimique possédant des teneurs remarquables en germacra-1(10),5-diène-4 α -ol (9,9%), en δ -élémane (7,8%) et en amorph-4- α -ol (3,3%).
- Enfin l'EM de *F. crassifolia* se singularise par la plus forte proportion en sesquiterpènes hydrocarbonés (50,8%) représentés majoritairement par le germacrène D (26,1%), le (E)- β -caryophyllène (9,9%) et le bicyclogermacrène (8,4%). Paradoxalement, nous constatons que l'huile essentielle de *F. crassifolia* possède la plus forte teneur en sesquiterpènes oxygénés (58,9%) et que les profils de

de *F. crassifolia* et *F. margarita* qui étaient proches pour les huiles essentielles sont beaucoup plus éloignés pour les EM.

| N° [♦] | Constituants | Ir _a | Ir _p | <i>F.</i> <i>japonica</i> | <i>F.</i> <i>obovata</i> | <i>F.</i> <i>crassifolia</i> | <i>F.</i> <i>margarita</i> | <i>F.</i> <i>hindsii</i> |
|-----------------|--------------------------------|-----------------|-----------------|------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| | Rendements (%) | | | 0,07 | 0,10 | 0,10 | 0,09 | 0,10 |
| 7 | Limonène | 1021* | 1201 | 0,1 | 0,3 | 1,1 | 0,1 | tr |
| 17 | δ-élémente | 1339 | 1467 | 2,1 | 1,5 | 0,3 | 2,4 | 7,8 |
| 22 | β-élémente | 1384 | 1588 | 3,3 | 2,0 | 1,0 | 3,6 | 1,9 |
| 24 | (E)-β-caryophyllène | 1423 | 1593 | tr | 1,2 | 9,9 | 0,6 | 2,1 |
| 33 | α-amorphène | 1475* | 1686 | 1,0 | 0,1 | 1,1 | - | 1,1 |
| 34 | germacrène D | 1475* | 1712 | 9,9 | 4,1 | 26,1 | 11,6 | 20,0 |
| 40 | bicyclo germacrène | 1496* | 1728 | tr | 0,3 | 8,4 | 2,1 | 2,5 |
| 47 | β-élémol | 1532 | 2094 | 12,4 | 7,8 | 18,6 | 15,5 | 19,5 |
| 50 | (E)-nérolidol | 1541 | 2049 | 2,1 | 2,1 | 2,9 | 0,9 | 0,7 |
| 51 | germacrène B | 1552 | 1833 | 4,7 | 1,8 | - | 1,8 | - |
| 53 | <i>cis</i> -guai-6-èn-10β-ol | 1575 | 1993 | 9,0 | 5,1 | 0,6 | 8,4 | - |
| 54 | amorph-4-èn-10β-ol | 1577 | 2083 | 1,6 | 0,9 | 1,1 | 0,6 | - |
| 55 | Guaiol | 1580 | 2083 | 1,5 | 2,3 | 0,3 | 0,7 | - |
| 59 | Germacra-1(10),5-dièn-4α-ol | 1611 | 2188 | 7,1 | 6,8 | 1,1 | 6,9 | 9,9 |
| 60 | <i>trans</i> -guai-6-èn-10β-ol | 1612 | 2158 | 1,8 | 2,0 | 1,6 | 5,0 | 1,9 |
| 61 | γ-eudesmol | 1614 | 2178 | 0,8 | 1,9 | 1,5 | 2,6 | 1,5 |
| 62 | alismol | 1617 | 2270 | 3,5 | 0,1 | 0,2 | 2,1 | 1,0 |
| 63 | érémophilén-11-ol Δ9-10 | 1623 | 2198 | 4,4 | 6,8 | 5,4 | 4,8 | 5,9 |
| 66 | amorph-4-èn-10α-ol | 1630 | 2173 | 0,1 | 1,8 | 1,2 | 0,5 | 3,3 |
| 67 | β-eudesmol | 1641* | 2244 | 8,2 | 12,5 | 3,2 | 10,5 | 6,2 |
| 70 | valérianol | 1643 | 2238 | 1,8 | 5,4 | 2,4 | 1,4 | 2,0 |
| 71 | α-eudesmol | 1646 | 2214 | 6,4 | 13,1 | 2,3 | 6,1 | 2,0 |
| | Total | | | 95,2 | 94,3 | 96,0 | 95,9 | 94,1 |
| | monoterpènes | | | 0,1 | 0,3 | 1,9 | 0,1 | 0,0 |
| | sesquiterpènes | | | 91,1 | 92,9 | 94,0 | 94,6 | 93,7 |
| | sesquiterpènes oxygénés | | | 65,8 | 75,2 | 43,2 | 70,3 | 55,7 |
| | sesquiterpènes oléfiniques | | | 25,3 | 17,7 | 50,8 | 24,3 | 38,0 |

L'ordre d'éluion est donné sur colonne apolaire. Ir^a et Ir^p: indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et polaire (BP20). %^a: pourcentages mesurés sur colonne apolaire. ♦: numérotation associé à chaque constituant faisant référence au **Tableau 22**.

Tableau 28: Composés identifiés dans les extraits micro-ondes de feuilles des 5 espèces du genre *Fortunella* et présents, au moins une fois, à des teneurs supérieures à 1%.

La comparaison entre les modes d'extraction (hydrodistillation et micro-ondes) s'avère aussi délicate car les rendements obtenus par l'extraction assistée par micro-ondes (0,07-0,09%) sont très inférieurs à ceux de l'hydrodistillation classique (0,17-0,39%). Des variations importantes sont observées entre les cinq espèces. Malgré plusieurs essais et l'étude de divers paramètres pouvant avoir une influence sur le rendement (temps de chauffage, puissance de chauffage, taux d'humidité), nous n'avons jamais pu obtenir, par extraction micro-ondes, les rendements obtenus par hydrodistillation classique, mesurés à partir du végétal frais. Ces résultats confirment que l'extraction par micro-ondes n'est pas destinée à

concurrencer les huiles essentielles mais qu'il s'agit plutôt d'une technique complémentaire permettant d'obtenir de manière rapide et économique et en accord avec les lois de l'industrie agro-alimentaire, un extrait dont la composition demeure assez proche de celle obtenue par hydrodistillation. Pour notre échantillonnage, nous avons effectivement des profils chromatographiques comparables par les deux méthodes. Cependant, il peut exister pour certains composés des différences quantitatives importantes.

Pour les 5 espèces du genre *Fortunella*, nous pouvons observer une augmentation du pourcentage des sesquiterpènes qui étaient déjà majoritaires dans l'huile essentielle par rapport aux monoterpènes. De plus, les sesquiterpènes oxygénés majoritaires dans les huiles essentielles sont présents à des teneurs plus importantes dans les extraits micro-ondes à l'exception de *F. crassifolia* qui présente un comportement atypique. L'augmentation de la teneur des composés oxygénés est souvent reliée à la présence de groupements hydroxyles qui rendent les molécules plus sensibles à l'activation par micro-ondes.

VII.4 Conclusion

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles de feuilles et de fruits et extraits micro-ondes de feuilles des cinq espèces du genre *Fortunella* confirme bien la spécificité des huiles essentielles de feuilles qui sont caractérisées par de nombreux sesquiterpènes oxygénés. Ce type de composition chimique n'a jamais été décrit dans le genre *Citrus* qui comprend de très nombreuses familles (cédrat, lime, mandarine, clémentine, orange, citron, pomelo, pamplemousse,...).

Dans le genre *Fortunella*, la variabilité chimique est quasiment absente pour les huiles essentielles de fruits mais ce résultat n'est pas surprenant car cette situation est assez fréquente pour de nombreuses familles du genre *Citrus*. Seule l'huile essentielle de fruits de *F. crassifolia* se distingue par sa teneur en myrcène. De plus, il existe pour les huiles essentielles de feuilles une variabilité chimique faible plus quantitative que qualitative. Il est cependant possible de distinguer trois sous groupes en se basant sur les pourcentages de quelques constituants : δ -élémane, β -élémane, β -élémol, germacrène D, *cis*-guai-6- α -10 β -ol, éremophilen-11-ol Δ 9-10 et alismol. Le premier sous groupe réunit les espèces *japonica* et *obovata*, le second *crassifolia* et *margarita* et le dernier *Hindsii*.

L'utilisation des micro-ondes permet d'obtenir rapidement un extrait qui présente un profil chromatographique assez voisin de l'huile essentielle mais les différences quantitatives existent. L'extraction assistée par micro-ondes semble plus adaptée à un suivi ou à un contrôle de la qualité d'un échantillon et ne constitue pas une technique comparable à l'hydrodistillation mais plutôt une technique complémentaire. De plus, les comparaisons effectuées avec l'hydrodistillation, même si elles sont délicates, montrent que le procédé d'extraction par micro-ondes apparaît plus complexe et ne peut se résumer à une simple activation de molécules qui présentent un moment dipolaire. Si la présence des moments dipolaires générés par les groupements hydroxyles rend les molécules plus sensibles, cette sensibilité à l'activation par micro-ondes apparaît très variable en fonction des molécules.

VIII. IDENTIFICATION DE CONSTITUANTS ABSENTS DE NOS BANQUES ET ANALYSE STRUCTURALE DE COMPOSES NON IDENTIFIES.

L'identification de composés du métabolome et en particulier les sesquiterpènes constitue une tâche délicate. Comme nous l'avons montré dans le premier chapitre, de nombreux auteurs de revues et articles ont souligné les avantages et les inconvénients des différentes techniques spectroscopiques et la nécessité d'employer plusieurs techniques d'identification. La RMN du proton mais aussi celle du ^{13}C , qui fournissent des informations sur la structure d'un composé sans en modifier l'intégrité et sans procéder à des changements d'état physiques susceptibles de conduire à des modifications structurales, constituent une des techniques les moins soumises aux biais (Veerporte *et al.*, 2007). Bien que la RMN présente une sensibilité bien inférieure à celle de la spectrométrie de masse (SM), les informations structurales obtenues, la reproductibilité et les aspects quantitatifs sont nettement supérieurs à ceux de la SM.

Ces dernières années, avec l'utilisation de spectromètres de routine de type 400 MHz, les conditions opératoires d'enregistrement des spectres se sont standardisées permettant un échange et une comparaison de données de plus en plus aisée. La constitution de banques de données spectrales issues de la littérature permet à la fois d'identifier de manière fiable et rapide des molécules connues mais absentes dans les banques de données du laboratoire mais aussi de mettre en évidence des molécules dont les données spectrales sont absentes ou incomplètes.

Dans ce paragraphe, nous illustrons à l'aide de plusieurs exemples l'identification de molécules, absentes de notre bibliothèque « Terpènes », mais dont les données spectrales figurent dans les bibliothèques constituées à partir de données de la littérature. Pour chaque molécule, nous présentons la structure et la comparaison des raies de résonance observées dans les fractions (où le composé est le plus important) avec celles décrites dans la littérature ainsi que l'attribution des déplacements chimiques de chaque carbone. De manière générale, nous avons utilisé les spectres de RMN ^1H , ^{13}C et DEPT et, pour certains cas ambigus, la séquence d'écho de spin. Ensuite, nous détaillons l'identification du germacra-1(10),5-diène-4 α -ol pour lequel nous avons réalisé une étude structurale plus complète car les données de la littérature sont incomplètes voire ambiguës.

VIII.1 Identification de constituants à partir de données de la littérature

VIII.1.1 Germacrène B

L'étude détaillée des spectres de RMN du ^{13}C des fractions oléfiniques F5 et F6 de l'huile essentielle de *F. japonica* permet de faire ressortir une série de 15 raies de résonance, ne correspondant à aucun composé présent dans les banques « Terpènes » et « Littérature ». Certaines valeurs de déplacements chimiques des carbones repérées ainsi que leurs multiplicités nous orientent vers un sesquiterpène monocyclique possédant 3 doubles liaisons carbone-carbone. Le spectre de masse et les indices de rétention pourraient correspondre à ceux du germacrène B, dont les valeurs de déplacements chimiques de la littérature ne sont disponibles que dans le benzène deutéré. Nous avons donc enregistré les spectres de RMN du ^{13}C des fractions F5 et F6 dans le benzène deutéré et observé que les données spectrales obtenues coïncident avec celles de la littérature. Les écarts avec les données de la littérature sont faibles pour la majorité des carbones non fonctionnalisés. Ceci nous a permis d'identifier sans ambiguïté le germacrène B dans les fractions oléfiniques mais aussi dans l'EH, l'HE et l'EM et par déduction d'obtenir les valeurs de déplacement chimique du ^{13}C du germacrène B dans le CDCl_3 . Nous remarquons un déplacement chimique supplémentaire à 129,51 ppm (Csp^2) qui était sans doute masqué dans le spectre enregistré dans le benzène deutéré (C_6D_6).

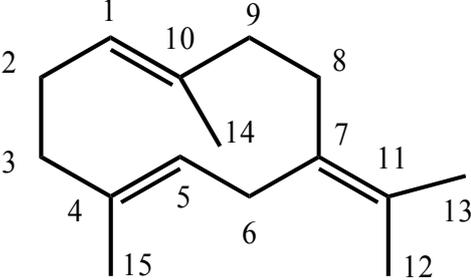
| | C ₆ D ₆ | | CDCl ₃ |
|---|-------------------------------------|---------|-------------------|
| | δ (ppm) Breedem <i>et al.</i> | δ (ppm) | δ (ppm) |
|  | 5 | 131,55 | 131,94 |
| | 10 | 128,50* | 128,33 |
| | 4 | 128,42* | 128,33 |
| | 7 | 128,12 | 128,67 |
| | 11 | 127,88 | 127,88 |
| | 1 | 126,82 | 126,93 |
| | 9 | 39,25 | 39,49 |
| | 6 | 34,44 | 34,46 |
| | 8 | 32,87 | 32,97 |
| | 2 | 26,14 | 26,11 |
| | 3 | 22,70 | 22,77 |
| | 15 | 20,80 | 20,82 |
| | 13 | 20,47 | 20,44 |
| | 14 | 16,35 | 16,34 |
| | 12 | 14,26 | 14,22 |

Figure 33 : Structure et déplacements chimiques du germacrène B décrits dans la littérature (Breedem *et al.*, 1996) et dans la fraction F6. (C₆D₆ et CDCl₃).

VIII.1.2 Amorph-4-èn-10α et amorph-4-èn-10β-ol

Les valeurs des déplacements chimiques des deux épimères amorphen-4-èn-10α-ol et β-ol sont relevées respectivement dans les fractions F8 (31,6%) et F5 (5,1%) de l'extrait micro-ondes. Elles sont très proches de celles décrites par Weyerstahl *et al.*, en 1999. Cependant, en toute rigueur, il n'est pas possible d'évaluer les variations de déplacements chimiques pour chaque carbone des molécules ($\Delta\delta$) étant donné la présence d'un seul chiffre significatif dans les données de la littérature (**Figure 34**).

Il est à noter que ces deux stéréoisomères sont des constituants peu communs des huiles essentielles puisque leur présence à l'état de traces a été notée seulement dans les huiles essentielles de *Cangerana* (Meliaceae) du Brésil et du *Vetiver* Haïtien (Poaceae) (Weyerstahl *et al.*, 1999).

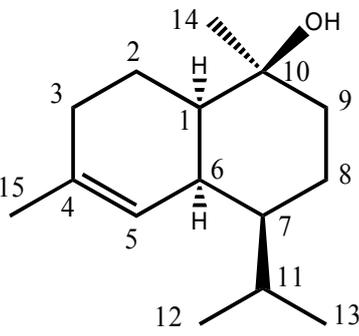
| amorph-4-èn-10 α -ol | δ (ppm) Weyerstahl <i>et al.</i> | δ (ppm) | amorph-4-èn-10 β -ol | δ (ppm) Weyerstahl <i>et al.</i> | δ (ppm) |
|---|---|-------------------|----------------------------|---|-------------------|
|  | 4 | 135,6 | 135,60 | | |
| | 5 | 120,6 | 120,66 | | |
| | 10 | 73,4 | 73,44 | | |
| | 7 | 48,4 | 48,51 | | |
| | 1 | 44,8 | 44,91 | | |
| | 9 | 44,1 | 44,16 | | |
| | 6 | 36,5 | 36,61 | | |
| | 11 | 28,5 | 28,54 | | |
| | 3 | 28,4 | 28,47 | | |
| | 8 | 25,2 | 25,27 | | |
| | 15 | 24,2 | 24,24 | | |
| | 14 | 23,7 | 23,76 | | |
| | 2 | 22,2 | 22,24 | | |
| | 13 | 21,8 | 21,80 | | |
| | 12 | 20,8 | 20,82 | | |
| | | | | 139,9 | 140,00 |
| | | | | 120,6 | 120,56 |
| | | | | 72,8 | 72,84 |
| | | | | 48,2 | 48,31 |
| | | | | 41,9 | 41,87 |
| | | | | 41,4 | 41,31 |
| | | | | 35,9 | 35,89 |
| | | | | 28,7 | 28,67 |
| | | | | 28,6 | 28,54 |
| | | | | 27,5 | 27,43 |
| | | | | 23,9 | 23,98 |
| | | | | 23,7 | 23,63 |
| | | | | 22,1 | 22,06 |
| | | | | 21,6 | 21,62 |
| | | | | 20,5 | 20,43 |

Figure 34 : Structures et déplacements chimiques de l'amorph-4-èn-10 α -ol et de l'amorph-4-èn-10 β -ol décrits dans la littérature (Weyerstahl *et al.*, 1999) et dans le spectre RMN du ^{13}C des fractions.

VIII.1.3 *trans*-guai-6-èn-10 β -ol

Après fractionnement de l'huile essentielle, ce composé a été concentré dans la dernière fraction F11 (6,7%). Le *trans*-guai-6-èn-10 β -ol a aussi été concentré dans des proportions similaires lors du fractionnement de l'extrait obtenu par micro-ondes (F'8, 6,5%).

L'analyse par RMN du ^{13}C de deux fractions (l'une de l'HE et l'autre de l'EM) permet de repérer la même série de 15 raies de résonance, qui par interrogation de la banque « Littérature », sont attribués au *trans*-guai-6-èn-10 β -ol. Les valeurs des déplacements chimiques du *trans*-guai-6-èn-10 β -ol relevées dans les spectres de RMN du ^{13}C des fractions F11 et F'8 sont conformes à celles publiées par Lago *et al.*, en 2000 (**Figure 35**). Pour les mêmes raisons que dans le cas des alcools à squelette amorphe, la détermination de la variation des déplacements chimiques entre les valeurs de la littérature et celles obtenues dans nos spectres n'est pas rigoureusement possible. Nous observons que seul le carbone C10 présente une variation de déplacement chimique par rapport à la littérature importante. Cependant ce carbone porte le groupement hydroxyle et une différence de concentration est probablement à l'origine de cet écart.

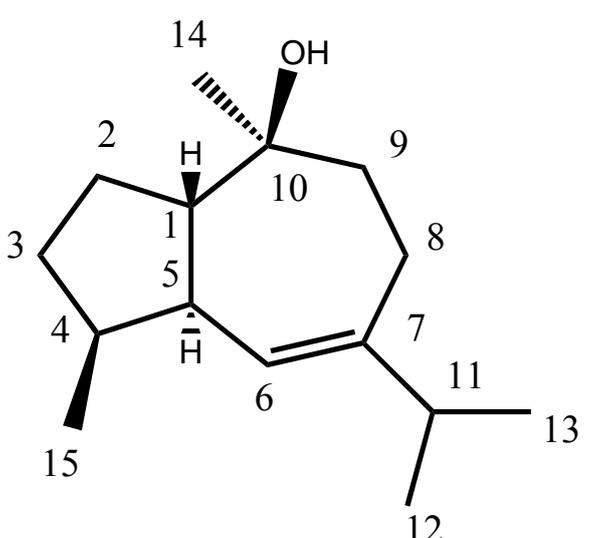
| | δ (ppm) | | |
|---|--------------------|-----------|--------|
| | Lago <i>et al.</i> | 56 | |
|  | 7 | 148,2 | 148,24 |
| | 6 | 124,0 | 124,03 |
| | 10 | 76,0 | 75,61 |
| | 1 | 51,2 | 51,25 |
| | 5 | 43,8 | 43,80 |
| | 9 | 42,6 | 42,61 |
| | 11 | 37,6 | 37,60 |
| | 4 | 37,2 | 37,18 |
| | 3 | 33,1 | 33,16 |
| | 8 | 25,1 | 25,13 |
| | 2 | 23,9 | 23,98 |
| | 14 | 21,4 | 21,51 |
| | 13 | 21,3 | 21,27 |
| | 12 | 21,2 | 21,24 |
| | 15 | 15,2 | 15,26 |

Figure 35 : structure et déplacements chimiques du *trans*-guai-6-èn-10β-ol **56** décrits dans la littérature (Lago *et al.*, 2000) et observés dans la fraction (F'8, 6,5%) de l'extrait micro-onde.

Si l'isomère *cis*-du guai-6-èn-10β-ol a été identifié directement dans l'huile essentielle à l'aide de la banque « Terpènes », l'isomère *trans* n'a pu être identifié du fait de sa faible teneur. Nous avons constaté que les spectres de masse des deux stéréoisomères *cis* et *trans*-guai-6-èn-10β-ol présentent de fortes similitudes. L'identification d'un ou des deux isomères ne peut être faite que sur la base des valeurs des indices de rétention qui sont assez différenciées (1641/2210 *vs.* 1577/2083) (spectre de masse en mode IE des deux stéréoisomères en **Annexe 15**, p. 213).

La présence de ce composé dans les huiles essentielles semble exceptionnelle puis qu'il n'a été signalé, à notre connaissance, que dans les espèces *Guarea guidonia* et *Macrophylla (Meliaceae)* (Lago *et al.*, 2000) du Brésil et du vétiver Haïtien (Weyerstahl *et al.*, 1999).

VIII.2 Analyse structurale du germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol

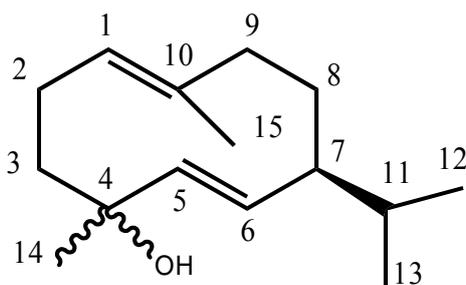
Dans les spectres de RMN du ^{13}C de l'huile essentielle et de l'extrait micro-ondes de *Fortunella japonica*, nous avons repéré une série de quinze raies de résonance d'un composé qui n'est présent ni dans la banque « Terpènes », ni dans la banque « Littérature ». La teneur de ce composé s'avère trois fois plus élevée dans l'extrait micro-ondes (7,1%) que dans l'huile essentielle (2,4%). L'interrogation de la banque « Littérature » avec une variation de déplacement chimique égale à 0,10 ppm et un pourcentage de carbones identifiés de 70% propose un composé : le germacra-1(10),5-dièn-4 β -ol (**Figure 36**). Ce constituant a été identifié dans une fraction de chromatographie (26,5%) de l'huile essentielle de *Juniperus thurifera* de Corse (Ottavioli, 2009) à l'aide de la banque « Terpènes.

Le germacra-1(10),5-dièn-4 β -ol a été isolé à partir de nombreuses sources telles que :

- des huiles essentielles du genre *Pseudobrickellia* (Bohlmann *et al.*, 1984), d'aiguilles de *Pinus sylvastris* (Nordin *et al.*, 1999), de feuilles de *Corymbia maculata* (Cornwell *et al.*, 2001), de *Doronicum corsicum* L. (Paolini *et al.*, 2007).
- des extraits au solvant du genre *Senecio* (Bohlmann *et al.*, 1976), de coraux, *Nephtea* sp. (Kitagawa *et al.*, 1987), *Octocorallia* (Izac *et al.*, 1982), d'éponges marines *Luffariella* sp. (Park *et al.*, 1995), de *Juniperus communis* ssp. *hemisphaerica* (San Feliciano *et al.*, 1995).
- des oléo-résines de *Picea ajanensis* (Radulgin *et al.*, 1980).
- des sécrétions de *Neodiprion setifer* (peste des pins) (Nordin *et al.*, 1999) ;

La synthèse énantiosélective de ce composé a été réalisée par Smitt et Högberg par qui permet de disposer de ses données spectrales (^1H , ^{13}C , UV et IR) à l'exception du spectre de masse. Plusieurs auteurs proposent les données spectrales de RMN du ^1H et du ^{13}C pour le germacra-1(10),5-dièn-4 β -ol, isolé à partir de différentes sources naturelles, qui coïncident avec celles de Smitt et Högberg (1999) (**Tableaux 29 et 30**).

La comparaison de la série de déplacements chimiques de RMN du ^{13}C trouvée dans la fraction F6 avec celle décrite par Smitt et Högberg, ainsi que celle présente dans la banque « Terpènes » du laboratoire permet d'affirmer que le composé présent dans l'huile essentielle du genre *Fortunella* n'est pas le germacra-1(10),5-dièn-4 β -ol. En effet, d'importantes variations de déplacements chimiques ($\Delta\delta > 1$ ppm) sont constatées pour quatre carbones (**Tableau 31**).



| δ (ppm), isomère β (Smitt et Högberg, 1999) | δ (ppm), isomère β , « Terpènes » | δ (ppm) fraction F6 | $\Delta\delta$ |
|---|---|-------------------------------|----------------|
| 140,09 | 140,07 | 140,02 | -0,05 |
| 132,58 | 132,56 | 132,17 | -0,39 |
| 128,88 | 128,85 | 130,30 | 1,45 |
| 125,73 | 125,71 | 129,17 | 3,46 |
| 73,12 | 73,10 | 73,05 | -0,05 |
| 52,83 | 52,81 | 52,83 | 0,02 |
| 41,28 | 41,26 | 41,33 | 0,07 |
| 39,62 | 39,62 | 40,83 | 1,21 |
| 32,99 | 32,99 | 32,96 | -0,03 |
| 30,69 | 30,72 | 28,49 | -2,23 |
| 25,95 | 25,96 | 26,71 | 0,75 |
| 23,67 | 23,68 | 23,57 | -0,11 |
| 20,60 | 20,62 | 20,66 | 0,04 |
| 18,96 | 18,97 | 19,03 | 0,06 |
| 16,70 | 16,72 | 16,65 | -0,07 |

$\Delta\delta$: variation de déplacements chimiques entre le germacra-1(10),5-dièn-4 β -ol enregistré au laboratoire et le composé présent dans la fraction F6

Tableau 31 : valeurs des déplacements chimiques de RMN du ^{13}C du germacra-1(10),5-dièn-4 β -ol (Smitt et Högberg, 1999 et enregistrées au laboratoire) et du composé non-identifié.

Parallèlement, une analyse par couplage CPG-SM de l'huile essentielle et de l'extrait micro-ondes, nous a permis d'obtenir le spectre de masse de ce constituant. L'interrogation des banques de spectre de masse commerciale (NIST) et laboratoire de Chimie des produits naturels (Arômes) propose avec un bon degré de corrélation, le germacra-1(10),5-dièn-4 β -ol. En effet, le spectre de masse du composé non identifié et celui du germacra-1(10),5-dièn-4 β -ol possèdent de fortes similitudes puisque seule l'intensité du fragment m/z 81 semble varier légèrement (**Figure 36**). La consultation d'autres sources bibliographiques (publications et

base de données du « International Centre for Science and High Technology ») aboutit à la même conclusion.

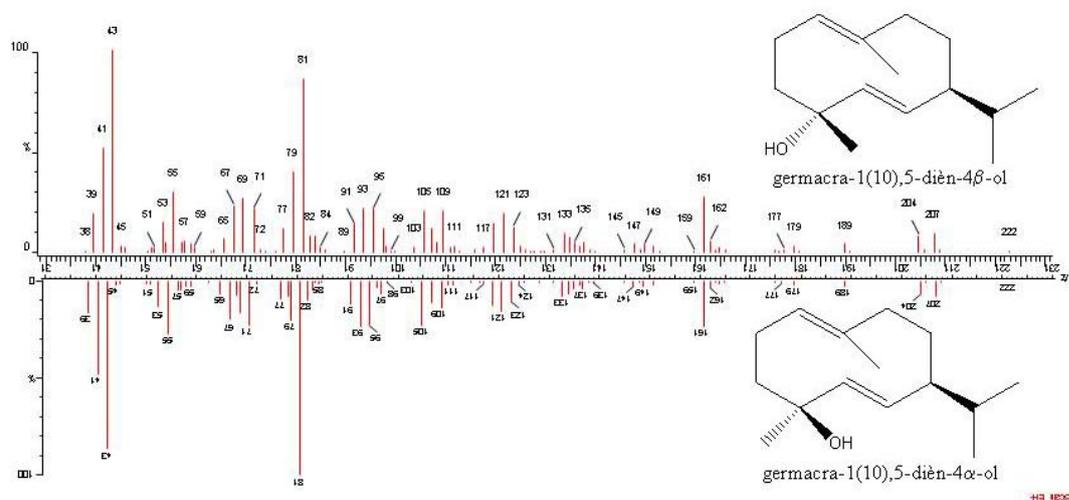


Figure 36 : spectres de masse des isomères α et β en mode IE.

Après consultation des données de la littérature concernant le germacra-1(10),5-dien-4 β -ol, ainsi que ses stéréoisomères, il apparaît que le composé le plus souvent identifié est l'isomère β . Cependant divers synonymes, qui ne précisent pas la stéréochimie, sont fréquemment utilisés dans de nombreux articles parfois très récents : germacrénol, germacrène-1(10),5-dien-4-ol, germacradien-4-ol, germacrène D-4-ol, 1-hydroxy-1,7-diméthyl-4-isopropyl-2,7-cyclodécadiène dans : *Thymus praecox* ssp. *articus* d'Angleterre (Schmidt *et al.*, 2004), *Glechoma hederacea* de Lituanie, *Ajuga bombycina* de Turquie (Başer *et al.*, 2001), *Teucrium capitatum* du Portugal (Antunes *et al.*, 2007), *Verbesina diversifolia* du Brésil (Albuquerque *et al.*, 2006), *Lantana armata* de Colombie (Stahenko *et al.*, 2003) et *Angelica pubescens* de Chine (Song *et al.*, 2003).

| | (β) Smitt et Hogberg, 1999 | (β) Bohlmann <i>et al.</i> , 1984 | (α) | (β) Cornwell <i>et al.</i> , 2001 | (β) San Feliciano <i>et al.</i> , 1995 | (β) Park <i>et al.</i> , 1995 | (β) Kitagawa <i>et al.</i> , 1987 | (β*) Izac <i>et al.</i> , 1982 |
|-----------|-------------------------------------|--------------------------------------|----------------|--------------------------------------|--|-------------------------------------|---|-----------------------------------|
| H1 | 4,94 d br | 4,95 d br | 4,95 d br | 4,9 | 4,95 d br | 4,95 d br | 4,95 br d | 4,94 d br |
| H2-α | 2,50 m | 1,95 d br | 1,96 d br | 1,9 | - | 2,50 dddd | - | 1,91 m |
| H2-β | 1,92 m | 2,50 dddd | 2,51 dddd | 2,48 | 2,5 dddd | 1,95 d br | - | 2,49 m |
| H3-α | 1,61 m | 1,54 m | 1,52 m | 1,6 | - | 1,64 m | - | 1,59 m |
| H3-β | 1,47 s | 1,64 m | 1,65 m | - | - | 1,54 m | - | - |
| H5 | 5,24 d | 5,25 d | 5,17 d | 5,21 | 5,25 d | 5,25 d | 5,25 d | 5,24 d |
| H6 | 5,17 dd | 5,17 dd | 5,25 dd | 5,14 | 5,17 dd | 5,18 dd | 5,18 dd | 5,19 dd |
| H7 | 1,98-2,04 m | 2,02 m | 2,02 m | 1,95 | - | 2,01 m | - | 2,0 m |
| H8 | 1,35-1,4 m | 1,39 m | 1,41 m | 1,38 | - | 1,39 m | - | 1,39 m |
| H9 | 2,24 m | 2,25 m | 2,26 m | 2,21 | - | 2,25 m | - | 2,25 m |
| H11 | 1,41-1,45 m | 1,39 m | 1,41 m | 1,38 | - | 1,39 m | - | 1,39 m |
| H12 | 0,82 d | 0,82 d | 0,84 d | 0,81 | 0,79 d | 0,83 d | 0,83 d | 0,83 d |
| H13 | 0,78 d | 0,78 d | 0,80 d | 0,79 | 0,83 d | 0,79 d | 0,79 d | 0,79 d |
| H14 | 1,54 s | 1,54 s br | 1,55 s br | 1,5 | 1,54 s | 1,54 s br | 1,54 s | 1,54 s |
| H15 | 1,19 s | 1,19 s | 1,21 s | 1,15 | 1,19 s | 1,19 s | 1,19 s | 1,20 s |

* identifié par les auteurs comme étant l'isomère α de manière erronée

Tableau 29 : Valeurs de déplacements chimiques de RMN du proton décrites dans la littérature pour les stéréoisomères (α) et (β) du germacra-1(10),5-dièn-4-ol.

| (β) Smitt et Hogberg, 1999 | (β) San Feliciano <i>et al.</i> , 1995 | (β) Cornwell <i>et al.</i> , 2001 | (β) Park <i>et al.</i> , 1995 | (β*) Izac <i>et al.</i> , 1982 | (β*) C ₆ D ₆ Schmaus <i>et al.</i> , 1989 |
|----------------------------------|--|--------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--|
| 128,88 | 129,1 | 128,8 | 128,84 | 129,0 | 129,32 |
| 23,67 | 23,8 | 23,6 | 23,64 | 23,7 | 24,13 |
| 39,62 | 41,4 | 39,6 | 39,59 | 41,3 | 39,95 |
| 73,12 | 73,2 | 73,0 | 73,08 | 73,1 | 72,65 |
| 140,09 | 140,2 | 140,0 | 140,06 | 140,1 | 140,49 |
| 125,73 | 126,1 | 125,7 | 125,69 | 125,8 | 126,02 |
| 52,83 | 53 | 52,8 | 52,79 | 52,9 | 53,05 |
| 25,95 | 39,8 | 25,9 | 25,92 | 39,7 | 26,42 |
| 41,28 | 26,1 | 41,2 | 41,23 | 26,0 | 41,65 |
| 132,58 | 132,6 | 132,5 | 132,55 | 132,5 | 132,32 |
| 32,99 | 33,1 | 33,0 | 32,96 | 30,0 | 33,33 |
| 20,6 | 20,6 | 20,6 | 20,57 | 20,6 | 20,86 |
| 18,96 | 19,1 | 18,9 | 18,93 | 19,0 | 19,26 |
| 16,70 | 16,7 | 16,7 | 16,67 | 16,1 | 16,76 |
| 30,69 | 30,7 | 30,7 | 30,67 | 30,8 | 31,22 |

* identifié par les auteurs comme étant l'isomère α de manière erronée

Tableau 30 Valeurs de déplacements chimiques de RMN du ¹³C décrites dans la littérature pour le germacra-1(10),5-dièn-4β-ol.

D'autres articles font état de la présence d'un stéréoisomère, le germacra-1(10),5-diène-4 α -ol ; dans lequel le groupement hydroxy porté par le C4 serait pseudo-axial alors qu'il est équatorial pour l'isomère β . Il est notamment signalé dans l'extrait au dichlorométhane de fruits de *Reneilmia cincinnata* (Tchuendem *et al.*, 1999) et dans les huiles essentielles de *Hedychium gardnerianum* (Weyerstahl *et al.*, 1998), de *Teucrium ramosissimum* (Hachicha *et al.*, 2007) et de *Seseli andronakii* (Tosun *et al.*, 2006).

Dès 1982, Izac *et al.*, décrivent l'identification de l'isomère α isolé d'un extrait de coraux d'*Octocorallia*. Cependant les données spectrales de RMN (^1H et ^{13}C) décrites sont identiques à celles fournies par Smitt et Högberg pour l'isomère β . Ces données spectrales reprises par Schmaus *et al.*, (1988) dans l'huile essentielle de *Peucedanum palustre* et par Tchuendem *et al.*, (1999) dans l'huile essentielle de *Reneilmia cincinnata* sont celles de l'isomère β et non pas celle de l' α (**Tableaux 29 et 30**).

L'identification du germacra-1(10),5-diène-4 α -ol a aussi été proposée dans l'huile essentielle de *Teucrium ramosissimum* sur la base de son spectre de masse. Cependant les indices de rétention sur colonne polaire et apolaire correspondent à ceux du stéréoisomère β . Cette erreur résulte probablement de la grande similitude entre les spectres de masse des deux isomères. En effet, il faut attendre les travaux de l'équipe du professeur Başer, pour obtenir les spectres de masse des deux stéréoisomères et surtout l'indice de rétention de l'isomère α sur colonne polaire qui est éloigné de celui de son stéréoisomère ($\Delta(I_r) = 133$). En utilisant ces données, Tosun *et al.*, (2006) identifient le stéréoisomère α dans l'huile essentielle de *Seseli petraeum*.

Nous notons aussi que Bohlmann *et al.*, (1984) fournit les séries de déplacements chimiques de RMN du ^1H des deux isomères α et β (**Tableau 29**). Mais, il est impossible de les différencier sur la base des valeurs des δ , qui sont quasiment identiques. Cependant cette différenciation peut se faire sur la base de la multiplicité des signaux des protons portés par les carbones éthyléniques C5 et C6. En effet, H6 (5,25 ppm, isomère α) se présente sous la forme d'un doublet de doublet alors que H5 (5,25 ppm, isomère β) est simplement un doublet. La même observation peut être faite pour les protons H6 du composé β et H5 de l' α (5,17 ppm). En conclusion, l'identification de des deux composés, sur la base de la RMN du proton, apparaît pour le moins délicate.

L'examen de l'ensemble des données bibliographiques permet de conclure que si l'isomère β peut être parfaitement identifié sur la base de ses données spectrales (SM, RMN du ^1H et du ^{13}C),

ainsi que de ses indices de rétention, il n'en n'est pas de même pour l'isomère α dont les données de RMN du proton sont anciennes (Bohlmann *et al.*, 1984) voire erronées (Izac *et al.*, 1982) alors que celles du ^{13}C ne sont pas décrites.

C'est pour cette raison que nous avons choisi de concentrer et/ou isoler le composé qui pourrait être le germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol. Après une série de fractionnement par divers types de chromatographie (Flash-fine-sephadex-fine/ AgNO_3), une fraction enrichie en composé inconnu (40,6%) a été soumise à une série de séquences de RMN 1D (^1H , ^{13}C , DEPT, écho de spin) et 2D, COSY (corrélation ^1H - ^1H) et HSQC (corrélations ^1H - ^{13}C , ^1J), HMBC (corrélations ^1H - ^{13}C ; ^2J , ^3J et ^4J) et NOESY (corrélation ^1H - ^1H ; proximité spatiale) afin de déterminer la structure de ce composé et de réaliser l'attribution de l'ensemble des déplacements chimiques (**Tableau 33**).

Malgré de nombreuses tentatives et sans doute à cause de la présence de composés possédant une polarité voisine (β -élémol) de celle de l'isomère α , il n'a pas été possible de concentrer de manière plus importante ce composé. Cependant, la mise en œuvre des séquences de RMN n'a pas été gênée par cette teneur moyenne car le composé est le produit majoritaire de la fraction. Le second composé par ordre d'importance est le β -élémol, qui a été isolé (98,9%) dans une autre fraction de chromatographie. Une série de séquences de RMN 1D et 2D a permis de repérer l'ensemble des signaux du β -élémol (**Annexe 16**, p. 213) et par conséquent de simplifier les spectres du mélange et ainsi de n'observer que les raies de résonance et les corrélations caractérisant le germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol.

Le spectre de RMN du ^{13}C associé aux séquences DEPT et d'écho de spin nous permettent de confirmer une formule brute identique au composé β , $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$ et d'en déduire la présence de trois centres d'insaturations dont deux correspondent à des doubles liaisons intracycliques et le troisième à un cycle. Le carbone quaternaire qui résonne à 73,05 ppm confirme la présence d'une fonction alcool.

L'interprétation du spectre de RMN du proton demeure délicate à cause de la présence d'autres sesquiterpènes oxygénés minoritaires dans cette fraction. Cependant, la multiplicité et surtout la constante de couplage de 17,1 Hz (^3J axial-axial) des protons oléfiniques (H5-H6), nous permet d'affirmer que la double liaison entre C5-C6 est de stéréochimie *trans* : H5 5,25 ppm (d ; 17,1 Hz), H6 5,08 ppm (dd ; 17,1 ; 10,0 Hz). La constante de couplage de 10,0 Hz est en accord avec la position quasi-axiale de H7 et par conséquent avec celle quasi-équatoriale de l'isopropyle.

A partir du spectre DEPT 135 donnant la multiplicité de chaque carbone, et par comparaison des données ^{13}C entre les deux stéréoisomères, nous proposons une attribution des déplacements chimiques de chaque carbone de l'isomère α (**Tableau 33**). L'étude conformationnelle théorique réalisée par Nordin *et al.*, (1999), montre que la conformation la plus stable est chaise-chaise avec les deux doubles liaisons parallèles à l'aide d'un calcul du « mécanisme moléculaire » (conformation nécessitant le minimum d'énergie). Le groupement isopropyle occupe la position pseudo-équatoriale.

En utilisant d'abord la séquence HSQC puis la séquence HMBC (**Annexe 17**, p. 2007), nous observons les corrélations proton-carbone suivantes :

- le proton qui résonne à 1,35 ppm corrèle avec les carbones C2 (28,49 ppm), C3 (40,83 ppm), C4 (73,05 ppm), C5 (140,02 ppm) et C6 (130,30 ppm)
- le proton résonnant à 2,24 ppm corrèle avec les carbones C1 (129,17 ppm), C7 (52,83 ppm), C8 (26,71 ppm), C10 (132,17 ppm) et C14 (16,65 ppm), ce qui nous permet de confirmer que nous sommes bien en présence, d'une part, d'un sesquiterpène monocyclique à squelette germacrane, d'autre part de positionner les deux doubles liaisons et les deux méthyles sur ce cycle.
- le proton résonnant à 0,82 ppm porté par C13 corrèle avec les carbones C7 (52,83 ppm), C11 (32,96 ppm) et C13 (20,66 ppm), permet de confirmer la présence du groupement isopropyle ainsi que de le positionner sur le cycle.

L'ensemble des ces corrélations décrites dans la **Tableau 33**, nous permet donc de confirmer que ce composé est un stéréoisomère du germacra-1(10),5-diène-4 α -ol.

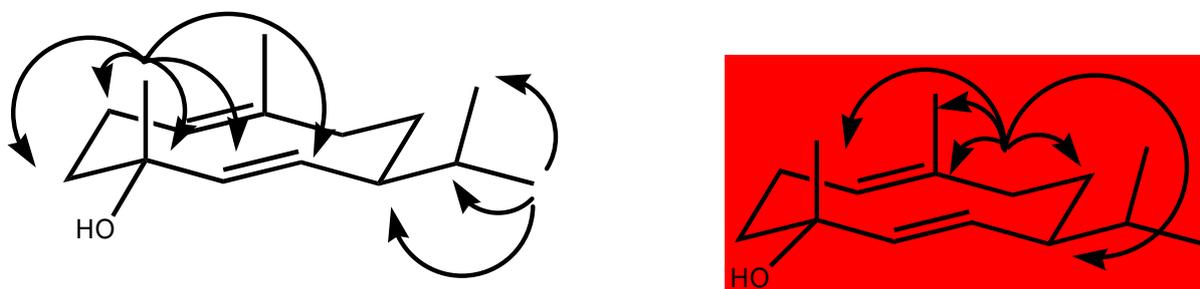


Figure 37 : Corrélations HMBC du germacra-1(10),5-diène-4 α -ol.

Les séries de déplacements chimiques de RMN du ^{13}C des deux isomères sont très voisines avec des écarts de l'ordre de 1 ppm, à l'exception de trois carbones (C2, C6 et C15) (**Tableau 32**).

| | δ (ppm), isomère β (Smitt et Högberg, 1999) | δ (ppm), isomère β , "Terpènes" | δ (ppm), isomère α fraction F6 | $(\Delta\delta)$ ppm |
|-----|---|---|---|----------------------|
| C1 | 128,88 | 128,85 | 129,17 | 0,32 |
| C2 | 23,67 | 23,68 | 28,49 | 4,83 |
| C3 | 39,62 | 39,62 | 40,83 | 1,21 |
| C4 | 73,12 | 73,10 | 73,05 | -0,05 |
| C5 | 140,09 | 140,07 | 140,02 | -0,05 |
| C6 | 125,73 | 125,71 | 130,30 | 4,57 |
| C7 | 52,83 | 52,81 | 52,83 | 0,02 |
| C8 | 25,95 | 25,96 | 26,71 | 0,75 |
| C9 | 41,28 | 41,26 | 41,33 | 0,07 |
| C10 | 132,58 | 132,56 | 132,17 | -0,43 |
| C11 | 32,99 | 32,99 | 32,96 | -0,03 |
| C12 | 20,60 | 20,62 | 20,66 | 0,06 |
| C13 | 18,96 | 18,97 | 19,03 | 0,06 |
| C14 | 16,70 | 16,72 | 16,65 | -0,07 |
| C15 | 30,69 | 30,72 | 23,57 | -7,10 |

($\Delta\delta$) : variation de déplacements chimiques (en ppm) entre l'isomère α (en mélange, fraction F6) et l'isomère β (banque laboratoire).

Tableau 32 : Comparaison des valeurs de déplacement chimique des isomères (α) et (β) du germacra-1(10),5-dièn-4-ol.

Les variations observées sur les carbones C2, C6 et C15 proviennent du changement de configuration du C4 qui porte le méthyle C15. En effet, le carbone C15 subit un blindage important (-7,1 ppm) qui résulte d'un effet γ stérique généré par son passage en position quasi-axiale. Les carbones C2 et C6 subissent des déblindages de l'ordre de +5 ppm, dus à l'effet moins blindant du méthyle C15 par rapport celui de l'oxygène de l'alcool dans l'isomère β . Les autres variations observées, de l'ordre d'un ppm, sont probablement liées à une modification spatiale du cycle décannique (**Figure 38**).

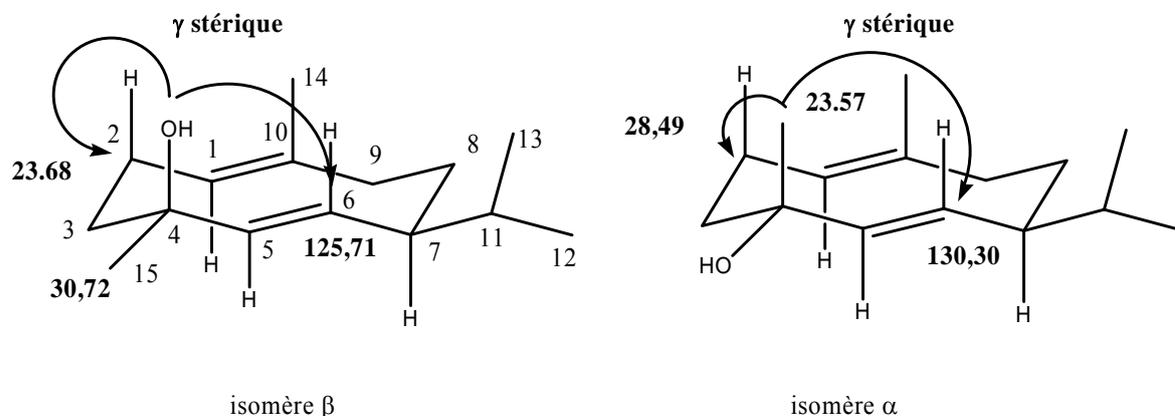


Figure 38 : variation des valeurs de déplacements chimiques induite par l'effet γ stérique du stéréoisomère (α) et (β).

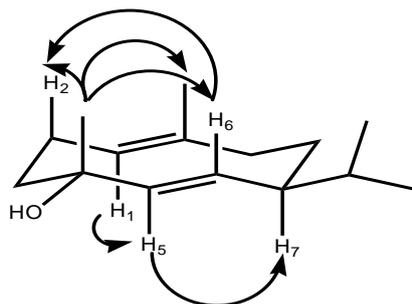


Figure 39 : Corrélations NOESY du germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol.

Afin de garantir de la position spatiale du groupement méthyle C15, mis en évidence par l'effet γ stérique, nous avons réalisé une séquence NOESY (**Annexe 18**). Les corrélations observées entre les protons H15 portés par le groupement méthyle C15, d'une part avec le proton éthylénique H6 et d'autre part avec le proton H2a quasi axial porté par le C2 permettent de confirmer la position du groupement méthyle (**Figure 39**). Par ailleurs, les corrélations observées entre le proton éthylénique H5 et les protons H1 et H7 permettent de confirmer d'une part, que la seconde double liaison entre C1 et C10 présente une configuration *trans* et d'autre part, que le groupement isopropyle est en position équatoriale.

| | δ (ppm) ¹³ C | Spin écho | H | δ (ppm) ¹ H | Multiplicité (J, Hz) | HMBC | NOESY |
|-----|-----------------------------------|-----------------|---|----------------------------------|----------------------|---------------------------|------------------|
| C1 | 129,17 | CH | - | 4,91 | dd(6,3 ; 1,4) | | H5, H9 |
| C2 | 28,49 | CH ₂ | a | 1,60 | | | |
| | | | b | 1,44 | | | |
| C3 | 40,83 | CH ₂ | a | 1,67 | | | |
| | | | b | 1,63 | | | |
| C4 | 73,05 | C | - | | | | |
| C5 | 140,02 | CH | - | 5,25 | d(17,1) | C3, C4, C5, C6, C7, C8 | H1, H7, H3a |
| C6 | 130,30 | CH | - | 5,08 | dd(17,1 ; 10,0) | C4, C5, C7, C8 | H15, H2b, H14 |
| C7 | 52,83 | CH | - | 1,98 | | | H9 |
| C8 | 26,71 | CH ₂ | a | | | | |
| | | | b | | | | |
| C9 | 41,33 | CH ₂ | - | 2,24 | | C1, C7, C8, C10, C14 | |
| C10 | 132,17 | C | - | | | | |
| C11 | 32,96 | CH | - | 1,42 | | | |
| C12 | 19,03 | CH ₃ | - | 0,79 | d(4,7) | C7, C11, C13 | |
| C13 | 20,66 | CH ₃ | - | 0,82 | d(4,7) | C7, C11, C12 | |
| C14 | 16,65 | CH ₃ | - | 1,50 | d(1,0) | | |
| C15 | 23,57 | CH ₃ | - | 1,35 | | C2, C3, C4, C5, C6 | |

Tableau 33 : Structure, conformation et données spectrales du germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol.

Nous sommes donc bien en présence du germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol. Les valeurs des déplacements chimiques du ^{13}C décrites ici ne correspondent à aucune des séries de 15 valeurs décrites dans la littérature.

Cependant les données de RMN du ^1H ne corrélaient pas parfaitement avec celles décrites de Bohlmann *et al.*, 1984. En effet, si les multiplicités et les constantes de couplages sont proches, il existe une différence pour les valeurs de déplacement chimiques pour les deux protons oléfiniques. Elle est assez faible pour le H5 (5,25 vs. 5,17 ppm) mais plus marquée pour H6 (5,08 vs. 5,25 ppm). En conclusion, un isolement de cette molécule serait nécessaire pour confirmer l'existence de ces légères différences.

En conclusion, la méthode développée au laboratoire et basée sur la RMN du ^{13}C a permis l'identification de molécules et en particulier des isomères : *trans* guai-6-en-10- β ol et amorphén-4-en-10 α et β -ol, germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol dont certains étaient absents de notre banque « Terpènes ». L'utilisation des données de la littérature constitue une méthode fiable et rapide pour réaliser ces identifications. Cependant l'étude bibliographique doit être très rigoureuse. L'exemple des deux épimères du germacra-1(10),5-dièn-4-ol, démontre que les données de la littérature, qu'il s'agisse de données spectrales de RMN (^1H ou ^{13}C) et de masse doivent être utilisées avec beaucoup de précaution.

La généralisation de spectromètres RMN de routine de type 400 MHz associée à l'utilisation de conditions d'enregistrement des spectres standardisées conduisent à une plus grande fiabilité et favorisent un échange et une comparaison de données de plus en plus aisée. Pour la SM, les différentes techniques et puissances d'ionisation, l'appareillage utilisé et bien sûr les conditions expérimentales constituent autant de variables rendant la comparaison des données de littérature plus difficile. Même lorsque ces variables sont fixées et avec l'utilisation de banques propres au laboratoire, l'identification de stéréoisomères et a fortiori d'épimères s'avère délicate (**Figure 36**).

La spectrométrie RMN du ^{13}C fournit un spectre spécifique et très reproductible, où la seule variable d'ajustement est le solvant utilisé. Avec la RMN du ^1H , elle constitue une technique de choix pour les études phytochimiques. De nombreux auteurs préconisent l'utilisation systématique de la RMN pour l'étude du métabolome (Verpoorte *et al.*, 2007 ; Keun, 2006).

CONCLUSION

Ce mémoire a pour objectif de contribuer à une meilleure gestion et protection de l'environnement par la valorisation des ressources végétales (huiles essentielles et extraits végétaux) et s'inscrit dans une démarche de développement durable. Plusieurs étapes, souvent dépendantes entre-elles, sont nécessaires pour caractériser complètement ces huiles essentielles et ces extraits végétaux : la détermination de la composition chimique, la mise en évidence d'une éventuelle spécificité, le contrôle de la qualité, la valorisation de co-produits d'extraction, la recherche de modes d'extraction plus respectueux de l'environnement (chimie verte). Les huiles essentielles et les extraits se présentent sous la forme de mélanges complexes. Cette complexité résulte de la diversité structurale et fonctionnelle des constituants qui paradoxalement sont construits à partir de la même entité (synthon isoprénique).

Afin de réaliser l'étape cruciale de détermination de la composition chimique de ces mélanges complexes naturels, deux stratégies sont traditionnellement utilisées. La première s'appuie sur l'association « individualisation-identification » et utilise le couplage « en ligne » d'une technique chromatographique (CPG, CLHP, etc), permettant l'individualisation des constituants, et d'une technique spectroscopique d'identification (SM, IRFT, etc.). Une autre démarche utilise l'association « purification-identification » et s'apparente à celle employée lors de l'analyse structurale d'une nouvelle molécule. La purification est réalisée à l'aide de différentes techniques chromatographiques alors que l'identification est assurée par la comparaison de leurs caractéristiques spectrales avec celles de produits de référence. Les informations sont souvent obtenues par la spectrométrie de masse (SM) mais surtout par la RMN du ^1H et de plus en plus, par la RMN du ^{13}C .

L'équipe « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse a mis au point et développé une méthode analytique, complémentaire de la SM, axée sur l'utilisation de la RMN du ^{13}C pour l'identification des constituants des mélanges naturels, et plus particulièrement les huiles essentielles, sans individualisation préalable des constituants. Un logiciel d'aide à l'analyse, conçu à l'université de Corse, permet de comparer les déplacements chimiques des carbones du spectre du mélange avec ceux de composés de référence contenus dans les bibliothèques de spectres. Plus d'une centaine de publications réalisées ces dix dernières années attestent du potentiel de cette méthode.

Dans le premier chapitre, les différentes démarches analytiques appliquées à l'étude de la composition chimique des huiles essentielles ont été explicitées. Nous avons tout d'abord

positionné la méthode d'analyse par RMN du ^{13}C par rapport aux techniques conventionnelles et nous avons montré à travers de nombreux exemples que la RMN du ^{13}C constitue une méthode robuste tout à fait adaptée à l'analyse des métabolites secondaires, à conditions toutefois de fixer et de contrôler soigneusement les conditions expérimentales. Nous avons souligné à l'aide de références bibliographiques récentes que la RMN du ^{13}C possède un potentiel pour les études sur la métabolomique. Celle-ci regroupe une série de méthodes analytiques pour l'étude de tous les types d'organismes vivants et doit compléter les données obtenues par la génomique, la protéomique ou la transcriptomique.

Dans ce contexte, et afin de participer à la diversification de la gamme des huiles essentielles produites et au développement de la filière PPAM en région Corse, nous avons étudié la composition chimique d'huiles essentielles du genre *Mentha* (*M. aquatica*, *M. pulegium*, *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* et *M. suaveolens* ssp. *insularis*) poussant à l'état sauvage en Corse et du genre *Fortunella* (*F. margarita*, *F. hindsii*, *F. crassifolia*, *F. obovata* et *F. japonica*) cultivés à la station l'INRA-GEQA de San Ghjulianu. Pour la plupart des échantillons d'huiles essentielles, nous avons réalisé une étude détaillée de la composition chimique par combinaison de techniques chromatographiques (CC, CCM et CPG), des indices de rétention et de techniques spectroscopiques (SM, RMN du ^{13}C).

Dans le deuxième chapitre nous avons d'abord étudié, les huiles essentielles de *M. aquatica* et *M. pulegium*. Celles-ci présentent des compositions chimiques très conventionnelles dominées soit par la pulégone (*M. pulegium*) soit par le menthofurane (*M. aquatica*). Seule la présence de monoterpènes irréguliers tels que le lyratol et de lactones p-menthaniques (mintlactone/ isomintlactone / hydroxymintlactone / menthofurolactone / épimenthofurolactone) doit être soulignée puisque ces composés sont identifiés pour la première fois dans une huile essentielle de *M. aquatica*. Les HE de *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* et *M. suaveolens* ssp. *insularis* possèdent des compositions chimiques plus originales. Les huiles essentielles de la sous-espèce *suaveolens* présentent deux profils chromatographiques différents (PC1 et PC2). Ainsi, la pipériténone (73,5%) est le composé majoritaire de la première huile essentielle (PC1) alors que l'oxyde de pipériténone (72,0%) caractérise celle du second profil chromatographique (PC2). La composition chimique correspondant au profil PC1 est décrite pour la première fois pour les huiles essentielles de *Mentha suaveolens* ssp. *suaveolens*. La seconde sous espèce *M. suaveolens* ssp. *insularis* est endémique à la Corse et la Sardaigne. Son huile essentielle est caractérisée par l'association de la pulégone et la *cis-cis*-p-menthénolide. La présence de cette lactone p-menthanique

possédant un motif α -méthylène- γ -butyrolactone jamais isolée, ni identifiée à partir d'une source naturelle confère à cette HE une grande originalité. De plus, la présence d'autres lactones minoritaires la 8-l'hydroxy-menthone, la 8-hydroxy-isomenthone et la 8-hydroxy-p-menth-4-èn-3-one, contribuent aussi à la spécificité de cette huile essentielle.

En botanique, la différenciation des deux sous-espèces *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* et ssp. *insularis* repose uniquement sur le critère d'absence/présence d'un léger pétiole. L'étude de la composition chimique de 59 échantillons d'huiles essentielles extraites de plants de *M. suaveolens* Ehrh. poussant à l'état sauvage en Corse, suivie par une analyse statistique des données permet une différenciation claire des deux sous-espèces. La sous-espèce *suaveolens* produit des huiles essentielles dominées par la pipériténone ou par l'oxyde de piperiténone, alors que tous les échantillons de la sous-espèce *insularis* sont caractérisés par l'association pulégone/*cis-cis*-p-menthénolide. Ainsi la composition chimique de l'huile essentielle et en particulier le critère présence (ssp. *insularis*) / absence (ssp. *suaveolens*) de la lactone menthanique, permet de déduire l'appartenance d'un échantillon à la sous espèce.

Nous nous sommes également intéressés aux hydrolats qui font l'objet depuis quelques années, d'un intérêt croissant. La caractérisation de cette phase aqueuse (co-produit de l'huile essentielle) chargée en composés hydrosolubles, s'inscrit aussi dans une démarche de production plus écologique en valorisant une matière jusqu'alors considérée comme un effluent. La composition chimique de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* est caractérisée par la même association de constituants majoritaire, la pulégone (44,8/14,8%) et la *cis-cis*-p-menthénolide (27,3/67,3%). Leurs pourcentages respectifs illustrent parfaitement la différence de solubilité de chacun des constituants dans l'eau et l'hydrolat s'avère très riche en *cis-cis*-p-menthénolide. L'analyse de l'extrait d'hydrolat permet aussi la mise en évidence de composés oxygénés, quantitativement très faibles dans l'huile essentielle et donc une caractérisation plus complète de celle-ci. D'un point de vue industriel, ce co-produit de l'huile essentielle contenant plusieurs constituants oxygénés dans une phase aqueuse présente un intérêt commercial.

Le troisième chapitre est consacré aux HE et extraits du genre *Fortunella*, plus communément nommé kumquat. La composition chimique des huiles essentielles de feuilles de *Fortunella japonica* est caractérisée par la quasi-absence de monoterpènes combinée à l'importance des sesquiterpènes oxygénés (46,9-58,9%) et plus particulièrement d'alcools tertiaires sesquiterpéniques. L'analyse de cette huile essentielle par les méthodes

conventionnelles s'avère très délicate (nombreuses superpositions sur les colonnes apolaire et polaire, spectres de masse peu différenciés pour de nombreux composés). Le germacrène D (14,9-28,7%) et le β -élémol (7,5-26,8%) sont les composés majoritaires. A l'aide de la RMN du ^{13}C , nous avons identifié des sesquiterpènes qui présentent une grande variété de squelettes (eudesmane, élémone, germacrane, amorphane, muurolane, guaiane...). Certains d'entre eux sont des isomères de position (7-épi- α -eudesmol/7-épi- γ -eudesmol, γ -eudesmol/ β -eudesmol/ α -eudesmol,) et des stéréoisomères (amorph-4-èn-10 β -ol/amorph-4-èn-10 α -ol, *trans*-guai-6-èn-10 β -ol/*cis*-guai-6-èn-10 β -ol). Malgré un nombre important de superpositions sur colonne polaire et apolaire, il nous a été possible de mettre en évidence 69 composés qui représentent près de 93,1% de l'huile essentielle de *F. Japonica*. La richesse en sesquiterpènes ainsi que la présence de constituants peu communs comme le germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol, l'amorph-4-èn-10 β -ol, l'amorph-4-èn-10 α -ol et le *trans*-guai-6-èn-10 β -ol confère une grande originalité à cette huile essentielle. Contrairement à ce que nous avons observé lors d'études antérieures sur les huiles essentielles de diverses espèces de *Citrus* (mandarine, lime, citrons), la variabilité chimique au sein du genre *Fortunella* apparaît assez faible, que ce soit pour les huiles essentielles de zestes ou de feuilles même si des différences existent entre les 5 espèces étudiées. Par contre, les huiles essentielles de feuilles du genre *Fortunella* apparaissent totalement différentes des huiles du genre *Citrus*. Malgré l'appartenance à la tribu des *Citreae*, les voies de biosynthèse et par conséquent l'expression génomique du genre *Fortunella* sont plus orientées vers la formation des sesquiterpènes que celles du genre *Citrus* riches en monoterpènes (β -pinène, linalol, sabinène, γ -terpinène).

En revanche, les huiles essentielles de fruits du genre *Fortunella* présentent des similitudes avec celles du genre *Citrus* avec un très forte teneur en limonène (> 90%). Bien que minoritaires, les sesquiterpènes oxygénés et oléfiniques, sont présents en quantités supérieures par rapport aux huiles essentielles du genre *Citrus* comme l'orange et le citron et pourraient être à l'origine de l'amertume qui caractérise le kumquat.

Comme nous l'avons observé pour les menthes dans le chapitre II, l'extrait d'hydrolat du genre *Fortunella* présente un profil assez éloigné de l'huile essentielle par i) la faible teneur des oléfines et ii) l'augmentation du pourcentage des composés oxygénés. Ainsi cet extrait d'hydrolat est caractérisé par la présence majoritaire du cryptomériol, du β -eudesmol, du β -élémol et de l' α -eudesmol.

Nous nous sommes aussi intéressés à l'extraction assistée par micro-ondes qui constitue un exemple de chimie verte. Cette technique, de nos jours exclusivement utilisée en laboratoire permet d'obtenir de manière simple et rapide un extrait présentant une composition chimique voisine de celle obtenue par l'hydrodistillation conventionnelle. La comparaison entre les modes d'extraction (hydrodistillation et micro-ondes) est souvent délicate car les rendements obtenus par hydrodistillation assistée par micro-ondes (0,07-0,09%) sont très inférieurs à ceux de l'hydrodistillation classique (0,17-0,39%). Nous observons une augmentation du pourcentage des sesquiterpènes qui étaient déjà majoritaires dans l'huile essentielle par rapport aux monoterpènes. De plus, la teneur en sesquiterpènes oxygénés déjà majoritaire dans les huiles essentielles a augmenté dans les extraits micro-ondes à l'exception de *F. crassifolia* qui présente un comportement atypique. Ces résultats sont conformes à ceux décrits dans la littérature car les molécules oxygénées sont plus sensibles à l'activation par micro-ondes.

D'un point de vue méthodologique, notre travail s'inscrit dans une démarche globale apparue depuis une dizaine d'années sous le terme de métabolomique. L'objectif est la recherche de méthodes analytiques pour l'identification et la quantification des métabolites dans un système biologique. Les méthodes analytiques choisies doivent répondre à plusieurs critères et en particulier fournir des données fiables, reproductibles et facilement intégrables dans les bibliothèques. En raison de la complexité des matrices végétales mais surtout à cause de l'absence de méthodes standardisées, le double objectif identification/quantification est difficile à atteindre. A l'aide de divers exemples sur les huiles essentielles de menthe et de kumquat, nous avons montré que l'utilisation conjointe de la CPG(Ir) et de la méthode d'identification des terpènes basée sur la RMN du ^{13}C répond aux différents critères. La création et l'amélioration continue d'une banque de données spectrales constitue un point fort de cette méthode. Aussi, nous avons apporté notre contribution à l'enrichissement de la banque de spectres de RMN du ^{13}C par l'identification de constituants absents de notre banque. La RMN du ^{13}C a donc permis de caractériser des molécules peu communes comme les lactones p-menthaniques dans les huiles essentielles de menthes et des alcools sesquiterpéniques épimères dans l' huiles essentielles du genre *Fortunella*. Cette méthode analytique a permis de plus de réaliser l'étude structurale d'une molécule jamais identifiée à l'état naturel, la *cis-cis*-p-menthénolide, mais aussi de lever l'ambiguïté présente dans la littérature concernant l'identification du germacra-1(10),5-diène-4 α -ol. Les identifications des alcools sesquiterpéniques dans les huiles essentielles du genre *Fortunella*, qui sont particulièrement complexes, permettent de confirmer que l'utilisation de la RMN du ^{13}C et

par conséquent la méthode d'identification des mélanges complexes développée au laboratoire répond aux critères d'une méthode robuste et exempte de biais.

Ainsi lors de ces travaux, nous avons défini des signes de qualité et de reconnaissance qui peuvent constituer un atout pour une éventuelle commercialisation. Chez les menthes étudiées, il apparaît que les lactones identifiées chez *M. aquatica* et surtout chez *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* pourraient constituer une plus-value. En effet, les lactones contribuent dans l'industrie agroalimentaire à l'arôme de produits alimentaires très divers naturels ou transformés. Elles sont en général à l'origine de notes aromatiques fruitées, lactées. Les lactones menthaniques ont fait l'objet de nombreuses études et brevets, surtout concernant leurs propriétés organoleptiques. Il est à noter que deux stéréoisomères de la menthofurolactone possèdent tout particulièrement de grandes qualités organoleptiques, rendant son utilisation intéressante dans la parfumerie ainsi que dans l'industrie des arômes. Elles possèdent une odeur « phénolique - coumarinée » qui la rendent utiles pour un emploi alternatif à celui de la coumarine, ainsi « qu'une note odorante de type menthe et une teinte vanillée » Seule une lactone *p*-menthanique possédant le motif α -méthylène- γ -butyrolactone : la paeonilactone B a été isolée d'un extrait de racines de *Paeonia albiflora* Pallas var. *trichocarpa* Bunge (Hayashi *et al.*, 1985). Cet extrait utilisé dans la médecine traditionnelle Chinoise est à l'étude pour lutter contre la maladie d'Alzheimer. Ces lactones *p*-menthaniques sont présentes à de très faibles teneurs dans les produits naturels. Ainsi en vue des diverses utilisations dans l'industrie, la *cis-cis-p*-menthénolide présente en grande quantité dans les huiles essentielles et hydrolats de *M. suaveolens* ssp. *insularis* ainsi que les autres lactones *p*-menthaniques pourraient constituer une source potentielle pour ce type de molécule.

Les huiles essentielles du genre *Fortunella* sont caractérisées par la richesse en sesquiterpènes. Ces produits peu volatils sont utilisés comme fixateurs dans l'industrie de la parfumerie et de la cosmétique. Ainsi l'huile essentielle d'amyris et celles de bois de santal sont très utilisées pour leurs propriétés fixatrices et contribuent entre autres à renforcer les notes de tête. Le santal étant aujourd'hui très protégé à cause d'une sur-exploitation, les huiles essentielles de feuilles du genre *Fortunella* pourraient donc être utilisées pour des usages similaires. En perspective, l'activité biologique de cette huile essentielle mériterait d'être étudiée pour des développements en sylviculture. En effet, le stéréoisomère β du germacra-1(10),5-diène-4-ol est le composé majoritairement responsable de l'efficacité du système de défense par sécrétion des larves du pin. Il serait alors intéressant d'isoler et de tester l'activité biologique du stéréoisomère α .

PARTIE EXPERIMENTALE

I. MATERIEL VEGETAL ET PRODUCTION D'HUILES ESSENTIELLES

I.1 Matériel végétal

I.1.1 Genre *Mentha*

Les parties aériennes des différents plants de *Mentha suaveolens* ssp. ont été récoltées en Corse de Juin à Septembre 2007, 2008 et 2009 sur une cinquantaine de sites (carte fournie en annexe dans la publication) : Afa, Ajaccio, Alata, Asco, Bastelica, Bicchisano, Bocognano, Calcatoggio, Campana, Cargiaca, Cervione, Corte, Casanova de Venaco, Funtanone, Morosaglia, Mucchiata, Nocano, Nonza, Orezza, Ortale, Piana, Poggiolo, Porto, Porto Pollo, Propriano, Sagone, Saint-Pierre de Venaco, San Nicolau, Sarrola Carcopino, Soccia, Sollacaro, Tavera, Torra, Valle di Mezzana, Vico, Venaco et Vero. L'identification botanique de l'ensemble des échantillons végétaux de menthes : *Mentha aquatica*, *Mentha pulegium*, *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* et *Mentha suaveolens* ssp. *suaveolens* a été réalisée par Mme. Hugot Laetitia du Conservatoire botanique de Corse.

I.1.2 Genre *Fortunella*

Le matériel végétal provient de la station INRA-GEQA de San Ghjulianu, située aux latitudes 42°27'N et longitude 9°32'E. Le verger est soumis à un climat méditerranéen, le sol est acide (pH 5,0-5,6) et constitué d'alluvions. Six arbres du verger ont été sélectionnés pour: *Fortunella margarita* (Lour.) Swing. et *Fortunella japonica* (Thumb.) Swing. et 3 arbres pour *F. hindsii* (Thumb.) Swing., *F. crassifolia* Swing., et *F. obovata* Tan. Les échantillons de fruits ont été prélevés sur les mêmes arbres. Afin que les facteurs environnementaux n'influencent pas la composition chimique des huiles essentielles, tous les arbres sont en bon état sanitaire et sont soumis aux mêmes conditions culturales (eau, fertilisants, traitements phytosanitaires) et pédoclimatiques. L'échantillonnage a été réalisé en collaboration avec Mr François Luro, chargé de recherches à l'INRA-GEQA.

I.2 Hydrodistillation

Les huiles essentielles de menthes (*Mentha aquatica*, *M. pulegium*, *M. suaveolens* ssp. *insularis* et ssp. *suaveolens*,) et de kumquat (*Fortunella margarita*, *F. japonica*, *F. hindsii*, *F. crassifolia* et *F. obovata*) ont été obtenues au laboratoire par hydrodistillation avec un appareil de type Clévenger (réacteurs de 2 L) jusqu'à extraction totale de l'huile essentielle (quatre heures en moyenne) à partir d'une masse de végétal comprise entre 300 et 518 g. Le

rendement calculé par rapport à la masse en végétal frais a été utilisé afin de s'affranchir du facteur perte en eau très variable selon la période de récolte et le temps de séchage. Les huiles essentielles sont conservées dans des piluliers à 7° C à l'abri de la lumière.

I.3 Production industrielle d'huiles essentielles

Les huiles essentielles de *Mentha suaveolens* ssp. *insularis*, *M. aquatica* et *M. pulegium* utilisées proviennent de la distillerie Mandriolu de M. Pierre-Antoine Alessandri. Les parties aériennes des plantes récoltées à la faucille à dents sont placées dans une cuve en inox près un préfanage de 24 heures. L'extraction est effectuée par entraînement à la vapeur sèche, à une pression basse, de 0,1 bar L'eau utilisée est exempte de tout traitement. Les huiles essentielles ainsi produites sont conservées dans des piluliers à 4° C à l'abri de la lumière.

I.4 Hydrodistillation Assistée par Micro-ondes

Les hydrodistillations assistées par micro-ondes ont été réalisées avec un four micro-ondes de laboratoire Milestone DRYDIST, recouvert de PTFE, dont les dimensions sont les suivantes 35 cm x 35 cm x 35 cm. La fréquence micro-ondes est de 2450 MHz avec une puissance maximale de 1200 W. Le contrôle de la température et la programmation sont réalisés à l'aide du logiciel de contrôle : «easy-control ». Les conditions expérimentales sont les suivantes : environ 300 g de feuilles du genre *Fortunella* sont placées dans le réacteur de 2 L. La durée d'extraction est de 2x 45 minutes avec le programme suivant : 20 s à 400 W et une température de 200°C puis 2 min à 600W et une température de 120 °C et enfin 30 min à 550 W et une température de 120°C.

I.5 Extraction d'hydrolat

Les hydrolats de menthes et de kumquats sont récupérés par fractions de 20 mL au cours de l'hydrodistillation (300 mL environ) puis extraits par de l'oxyde de diéthyle (3 x 30 mL). Après séchage sur MgSO₄ puis évaporation du solvant, on obtient l'extrait d'hydrolat (EH).

II. TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES ET SPECTROSCOPIQUES

II.1 Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

Les analyses chromatographiques en phase gazeuse ont été réalisées à l'aide d'un appareil Perkin-Elmer autosystem GC, équipé d'un injecteur diviseur, de deux colonnes (50 x 0,22 mm d.i. ; épaisseur du film : 0,25 μm), apolaire (BP-1, polyméthylsiloxane) et polaire (BP-20, polyéthylène glycol) et de deux détecteurs à ionisation de flamme. Les conditions opératoires sont les suivantes : gaz vecteur, hélium ; pression en tête de colonne : 20 psi ; température de l'injecteur et des détecteurs : 250°C ; programmation de température : de 60 à 220°C (80 min) à 2°C/min, avec un palier de 20 min à 220°C ; injection : mode diviseur avec un rapport 1/60. La quantité d'échantillon injectée est de 0,5 μl issue d'une solution contenant 50 μL de mélange (huile essentielle ou extrait d'hydrolat ou extrait micro-ondes ou fraction de chromatographie) dans 350 μL de CCl_4 .

II.2 Spectrométrie de Masse (SM)

Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer autosystem XL, doté d'un injecteur automatique et d'une colonne apolaire (Rtx-1) (60 m x 0,22 mm d.i. ; épaisseur du film : 0,25 μm), couplé à un détecteur de masse Perkin Elmer TurboMass. Le gaz vecteur est l'hélium (1ml/mn) et il exerce une pression en tête de colonne de 25 psi. La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur 280°C. La programmation de la température consiste en une élévation de 60 à 230 °C, à 2 °C/mn, puis en un palier de 45 mn à 230°C. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/50. La quantité d'échantillon injectée est de 0,2 μl . La détection se fait par un analyseur à filtre quadripolaire. Les molécules sont généralement bombardées par un faisceau électronique de 70 eV. Les spectres de masse obtenus par impact électronique ont été acquis sur la gamme de masse 35-350 Da.

II.3 Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres de RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker 400 AVANCE, 9,4 Tesla, opérant à 400,132 MHz pour le proton et à 100,623 MHz pour le carbone-13. Les spectres ont été enregistrés avec une sonde de 5 mm. Le solvant est le CDCl_3 additionné de tétraméthylsilane (TMS). Les déplacements chimiques sont donnés en ppm (δ) par rapport au TMS pris comme référence interne.

Les spectres de RMN du proton ont été enregistrés avec les paramètres suivants : angle d'impulsion 30°; temps d'acquisition = 2,56 s correspondant à une acquisition de 32 K avec une largeur spectrale (SW) de 7000 Hz (17,5 ppm). Aucun traitement mathématique du signal de précession libre (FID) n'est appliqué avant la transformée de Fourier.

Les spectres du ^{13}C ont été enregistrés avec les paramètres suivants : angle d'impulsion 45°; temps d'acquisition = 2,73 s correspondant à une acquisition de 128 K avec une largeur spectrale (SW) de 25000 Hz (environ 250 ppm) ; résolution digitale de 0,183 Hz/pt. Pour l'enregistrement des spectres des huiles essentielles (ou extrait d'hydrolat ou extrait micro-ondes ou fraction de chromatographie), une masse de 40 à 70 mg d'huile essentielle est dissoute dans 0,5ml de CDCl_3 . Les données du signal (FID) sont multipliées avant la transformée de Fourier par une fonction exponentielle (LB = 1,0 Hz).

Les paramètres suivants ont été utilisés pour les expériences d'écho de spin (programme JMODXH) (sonde de 5 mm) : durée de l'impulsion = 5,6 μs (angle d'impulsion 90°) ; temps de répétition entre deux expériences = 5,3 s ; temps $[1/J(\text{C,H})]$ calculé pour une constante de couplage $J(\text{C,H}) = 125\text{Hz}$: 8,0 ms.

Pour enregistrer les spectres de RMN 2D mettant en jeu les corrélations hétéronucléaires (HSQC, HMBC) ou homonucléaires (COSY, NOESY), nous avons utilisé les séquences impulsionsnelles définies par les programmes Bruker. A titre d'exemple, les paramètres suivants ont été utilisés pour la corrélation proton-proton (COSY) La matrice d'acquisition des données a pour dimensions 1 K x 256 points mémoire. Les données sont ensuite complétées par une mise à zéro sur le domaine F1 (^1H) et traitées par une fonction gaussienne avant la transformée de Fourier.

II.3 Spectrométrie de Masse (SM)

Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer autosystem XL, doté d'un injecteur automatique et d'une colonne apolaire (Rtx-1) (60 m x 0,22 mm d.i. ; épaisseur du film : 0,25 μm), couplé à un détecteur de masse Perkin Elmer TurboMass. Le gaz vecteur est l'hélium (1ml/mn) et il exerce une pression en tête de colonne de 25 psi. La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur 280°C. La programmation de la température consiste en une élévation de 60 à 230 °C, à 2 °C/mn, puis en un palier de 45mn à

230 °C. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/50. La quantité d'échantillon injectée est de 0,2 µl. La détection se fait par un analyseur à filtre quadripolaire. Les molécules sont généralement bombardées par un faisceau électronique de 70 eV. Les spectres de masse obtenus par impact électronique ont été acquis sur la gamme de masse 35-350 Da.

III. TECHNIQUES DE SEPARATION

III.1 Chromatographie sur colonne de silice

III.1.1 Genre *mentha*

***Mentha aquatica*.** La chromatographie sur colonne de silice (CC) de type «flash» a été réalisée avec de la silice ICN (200-500 µm, 60 Å, 32g) sur 2,à g d'huile essentielle. Deux fractions sont éluées, la première fraction nommée « hydrocarbonée » F1 (1,40 g) au pentane ($V_e = 250$ mL) et la seconde fraction F2 (0,55 g) nommée « oxygénée » à l'oxyde de diéthyle ($V_e = 400$ mL). Une partie de la fraction F2 (0,45 g) a été de nouveau soumise à un fractionnement sur colonne ouverte de silice de faible granulométrie (ICN 35-70 µm, 100 g).Trois fractions sont éluées (F2-1 à F2-3) avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle (98/2, $V_e = 300$ mL ; 95/5, $V_e=350$ mL ; 0/100 $V_e=400$ mL v/v).

***Mentha suaveolens ssp. insularis*.** La chromatographie sur colonne de silice (CC) de type «flash» a été réalisée avec de la silice (ICN 200-500 µm, 60 Å, 90 g) sur 5,0 g d'huile essentielle. Treize fractions sont éluées (deux hydrocarbonées et onze oxygénées) : F1 0,264 g, $V_e=200$ mL ; F2 0,111 g, $V_e=200$ mL ; F3 0,931 g, $V_e=320$ mL ; F4 1,093 g, $V_e=120$ mL ; F5 0,156 g, $V_e=120$ mL ; F6 0,085 g, $V_e=120$ mL ; F7 0,095 g, $V_e=120$ mL ; F8 1,502g, $V_e=250$ mL ; F9 0,216 g $V_e=130$ mL; F10 0,040 g, $V_e=120$ mL ; F11 0,285 g, $V_e=120$ mL ; F12 0,040 g, $V_e=200$ mL ; F13 0,013 g, $V_e=200$ mL) avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle (100/0 à 0/100 ; v/v). Une partie de la fraction F8 (1,40 g) a été de nouveau soumise à un fractionnement sur colonne ouverte de silice de faible granulométrie (ICN 35-70 µm, 100g). Quatre fractions sont éluées (F8-1 à F8-4) avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle (de 90/10 à 60/40 ; v/v), (F8.1 – F8.4 = 0,021 g, $V_e=200$ mL ; 0,933 g $V_e=150$ mL ; 0,093 g, $V_e=200$ mL ; 0,238 g, $V_e=300$ mL).

Mentha suaveolens ssp. suaveolens. La chromatographie sur colonne de silice (CC) de type «flash» a été réalisée avec de la silice (ICN 200-500 µm, 60 Å, 55g) sur 3,0 g d'huile essentielle. Dix fractions sont éluées (deux hydrocarbonées et huit oxygénées) : F1 0,071g, Ve=400 mL ; F2 0,039 g Ve=300 mL ; F3 0,071 g, Ve=400 mL ; F4 0,421 g, Ve=400mL ; F5 0,295 g, Ve=100 mL ; F6 0,837 g, Ve=100 mL; F7 0,475 g, Ve=100 mL ; F8 0,327 g, Ve=100 mL ; F9 0,196 g, Ve=200 mL ; F10 0,024 g, Ve=400 mL) avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle (100/0 à 0/100 ; v/v).

III.1.2 Genre *Fortunella*

Huile essentielle de feuilles. La chromatographie sur colonne de silice (CC) de type «flash» a été réalisée avec de la silice (ICN 200-500 µm, 60 Å, 80g) sur 1,84 g d'huile essentielle. Onze fractions sont éluées (six hydrocarbonées et cinq oxygénées) : F1 0,143 g, Ve=200 mL ; F2 0,135 g, Ve=100 mL ; F3 0,125 g, Ve=100 mL ; F4 0,126 g, Ve=100 mL ; F5 0,113 g, Ve=100 mL ; F6 0,055 g, Ve=100 mL ; F7 0,280 g, Ve=100 mL ; F8 0,305 g, Ve=250 mL ; F9=0,250 g, Ve=100 mL ; F10 0,122 g, Ve=100 mL ; F11 0,117 g, Ve=200 mL.

Extrait micro-ondes de feuilles. La chromatographie sur colonne de silice (CC) de type «flash» a été réalisée avec de la silice (ICN 200-500 µm, 60 Å, 50g) sur 2,0 g d'extrait. Huit fractions sont éluées (une hydrocarbonées et sept oxygénées) : F1 0,629 g, Ve=700 mL ; F2 0,136 g, Ve=200 mL ; F3 0,133 g, Ve=500 mL ; F4 0,266 g, Ve=200 mL ; F5 0,162 g, Ve=300 mL ; F6 0,170 g, Ve=400 mL ; F7 0,458 g, Ve=500 mL ; F8 0,048 g, Ve=400 mL. Les fractions F6 et F7 combinées (0,6 g après analyse) ont été de nouveau soumise à un fractionnement sur colonne ouverte de silice de faible granulométrie (ICN 35-70 µm, 100g). Sept fractions sont éluées (F8-1 à F8-4) avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle (90/10 à 60/40 ; v/v), (F'1 – F'7 = F'1 0,116 g, Ve=125 mL; F'2 0,142 g, Ve=50 mL ; F'3 0,136 g, Ve=50 mL; F'4 0,066 g, Ve=50 mL, F'5 0,060 g, Ve=50 mL ; F'6 0,065 g, Ve=50 mL ; F'7 0,018 g, Ve=150 mL).

Huile essentielle de fruits La chromatographie sur colonne de silice (CC) de type «flash» a été réalisée avec de la silice (ICN 200-500 µm, 60 Å, 18g) sur 0,55 g d'extrait. Deux fractions sont éluées : une hydrocarbonée (0,495 g Ve=400 mL) et une oxygénée (0,387 g Ve=200 mL).

III.2 Chromatographie d'exclusion stérique

La fraction F8-3 (0,08 g) de *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* ainsi que la fraction F'3 (*Fortunella japonica*, 0,130 g) ont été soumises à une chromatographie d'exclusion stérique afin d'isoler les deux molécules respectivement absente de nos banques (NI). Le gel de séphadex LH-20 est préparé en mettant en contact 5,4 g de séphadex dans 8,6 mL de dichlorométhane pendant 48 heures (F 8) et 8,8g dans 14mL (F'3). Durant la chromatographie, l'élution est réalisé en mode isocratique en utilisant le dichlorométhane (100 mL) comme éluant. Sept fractions sont éluées pour *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* F1 20,5 mg, $V_e=16$ mL ; F2 13,2 mg, $V_e=20$ mL ; F3 5,8 mg, $V_e=4$ mL ; F4 12,6 mg, $V_e=28$ mL ; F5 12,0 mg, $V_e=40$ mL ; F6 14,9 mg, $V_e=40$ mL ; F7 4,6 mg, $V_e=20$ mL ; 6 fractions sont élués pour l'extrait de *Fortunella japonica* F1 22,3 mg, $V_e=25$ mL ; F2 19,5 mg, $V_e=25$ mL ; F3 15,1 mg, $V_e=25$ mL ; F4 15,7 mg, $V_e=50$ mL ; F5 29,9 mg, $V_e=25$ mL ; F6 21,4 mg, $V_e=50$ mL. Afin de suivre le fractionnement sur colonne ouverte de la fraction F8 de *M. suaveolens* ssp.*insularis*, nous avons utilisé des plaques commerciales de CCM Merck (plaque d'aluminium de 20 x 20 cm recouvertes de gel de silice 60 F254 d'épaisseur 0,2 mm)

IV ANALYSES STATISTIQUES

Les Analyses en Composantes Principales (ACP) ont été réalisées à l'aide du logiciel du logiciel XLSTAT-PRO (Thierry Fahmy, France). La classification des échantillons a été effectuée par l'utilisation de l'algorithme de partition des centres de groupes (Program K-means, Legendre P, Université de Montréal, Département des sciences biologiques, 1999).

BIBLIOGRAPHIE

Adams RP. **1989**. Identification of essential oils by Ion Trap Mass Spectroscopy, Academic Press. Inc.: San Diego.

Adams RP. **2001**. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured: Carol Stream, IL.

Adio AM, Paul C, Kloth P, König WA. **2004**. Sesquiterpenes of the liverwort *Scapania undulate*. *Phytochem.* **65** : 199-206.

Adio AM, König WA. **2005**. Sesquiterpene constituents from the essential oil of the liverwort *Plagiochila asplenoides*. *Phytochem.* **66** : 599-609.

Aghel N, Yamini Y, Hadjiakhoondi A, Pourmortazavi SM. **2004**. Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Talanta*, **62** : 407-411.

Agnihotri VK, Agarwal SG, Dhar PL, Thappa RK, Kapahi BK, Saxena RK, Qazi GN. **2005**. Essential oil composition of *Mentha pulegium* growing wild in the north-western Himalayas India. *Flavour Fragr. J.* **20** : 607-610.

Ahmad VU, Jassbi AR. **1999**. Analysis of the essential oil of *Echinophora sibthorpiana* guss. By means of GC, GC/MS and ¹³C-NMR techniques. *J. Essent. Oil Res.* **11** : 107-108.

Albert K, Dachtler M, Glaser E, Händel H, Lacker T, Schlotterberck G, Strohschein S, Tseng LH, Braumanu U. **1999**. On-line coupling of separation techniques to NMR, *HRC. J. High Resol. Chromatogr.* **22** : 135-143.

Albuquerque MRJR, Canuto KM, Pessoa ODL, Nunes EP, Nascimento RF, Silveira ER. **2006**. Essential oil composition of *Verbesina diversifolia* DC. *Flavour Fragr. J.* **21** : 634-636.

Aleman LB. **1989**. Exceptional Resolution and New Signals Detected in the ¹³C NMR Spectra of Alkanes, *Magn. Res. Chem.* **27** : 1065-1073.

Andrade Fabio DP, Santos Lourdes C, Datchler Markus, Albert K, Vilegas W. **2002**. Use of on-line liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectroscopy for the rapid investigation of flavonoids from *Sorocea bomplandii*. *J. Chromatogr. A*, **953** : 287-291.

Antunes T, Sevinat-Pinto I, Barroso JG, Cavaleiro C, Salgueiro LR. **2004**. Micromorphology of trichomes and composition of essential oil of *Teucrium capitatum*. *Flavour Fragr. J.* **19** : 336-340.

Arpino P, Prévôt A, Serpinet J, Tranchant J, Vergnol A, Wittier P. **1995**. - Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Masson, Paris.

Avato P, Sgarra G, Casadoro G. **1995**. Chemical composition of the essential oils of *Mentha* species cultivated in Italy. *Sci. Pharm.* **63** : 223-230.

Bal BS, Pinnick HW. **1981**. Total syntheses of p-menthenolides. *Heterocycles*, **16** : 2091-2101.

Baldovini N, Ristorcelli D, Tomi F, Casanova J. **2000**. Intraspecific variability of the essential oil *Calamintha nepeta* from Corsica (France). *Flavour Fragr. J.* **15** : 50-54.

Baldovini N, Tomi F, Casanova J. **2001**. Identification and Quantitative Determination NMR of Furanodiene, a Heat-sensitive Compound, in Essential Oils by ¹³C-NMR. *Phytochem. Anal.* **12** : 58-63.

Baldovini N, Tomi F, Casanova J. **2003**. Enantiomeric differentiation of bornyl acetate by carbon-13 NMR using a chiral lanthanide shift reagent. *Phytochem. Anal.* **14** : 241-244.

Başer KHC, Demirci B, Duman H. **2001a**. Composition of the essential oils of two endemic species from Turkey : *Achillea lycaonica* and *A. ketenoghui*. *Chem. Nat. Comp.* **37** : 245-252.

Başer KHC, Kurkcuoglu M, Erdemgil FZ. **2001b**. The essential oil of *Ajuga reptans* from Turkey. *Chem. Nat. Comp.* **37** : 242-244.

Başer KHC, Kürkcüoglu M, Tarimicilar G, Kaynak G. **1999**. Essential oils of *Mentha* species from northern Turkey. *J. Essent. Oil Res.* **11** : 579-588.

Bertoli A, Flamini G, Cioni PL, Tomei PE, Spinelli G. **1997**. Variability of essential oil composition of *Mentha aquatica* ssp. *Aquatica* collected in two different habitats of north Tuscany, Italy. *J. Essent. Oil Res.* **9** : 455-457.

Bianchini A, Tomi F, Richomme P, Bernardini A-F, Casanova J. **2004**. Eudesm-5-en-11-ol from *Helichrysum italicum* essential oil. *Magn. Reson. Chem.* **42** : 983-984.

Bicchi C, Liberto E, Matteodo M, Sgorbini B, Mondello L, d'Acompara Zellner B, Costa R, Rubiolo P. **2008**. Quantitative analysis of essential oils: a complex task. *Flavour Fragr. J.* **23** : 382-391.

Bielicka-Daszkiwicz K, D'bicka M, Voelkel A. **2004**. Comparison of three derivatization ways in the separation of phenol and hydroquinone from water samples. *J Chromatogr A*, **1052** : 233-236.

Bighelli A, Casanova J. **2010**. Analytical methods for Cymbopogon oils. Essential Oil-Bearing Grasses. The genus Cymbopogon. Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles. CRC Press, Taylor & Francis Group, pp 195-215.

Bilia AR, Flamini G, Taglioli V, Morelli I, Vincieri FF. **2002**. GC-MS analysis of essential oil of some commercial Fennel teas. *Food Chem.* **76** : 307-310.

Blanc M-C. **2003**. La RMN du carbone-13, outil d'analyse : différenciation énantiomérique des terpènes, caractérisation des huiles essentielles de *Dittrichia graveolens* et *Dittrichia viscosa* subsp. *viscosa*. Thèse de Doctorat de l'Université de Corse.

Bohlmann F, Zdero C, King RM, Robinson H. **1984**. A hydroxygermacrene and other constituents from *Pseudobrickellia brasiliensis*. *Phytochem.* **23** : 1798-99.

Bohlmann F, Zeisberg R, Klein E. **1975**. ¹³C-NMR-Spektren von Monoterpen. *Organic Magnetic Resonance*, **7**: 426-432.

Bonnet M, Denoyer C, Renou JP. **1990**. High Resolution ¹³C NMR Spectroscopy of Rendered Animal Fats : Degree of Saturation of Fatty Acid Chains and Position on Glycerol. *Int. Food Sci. Tech.* **25** : 399-408.

Boti JB, Koukoua G, N'Guessan TY, Muselli A, Bernardini A-F, Casanova J. **2005**. Composition of leaf, stem bark and root bark oils from *Isolona cooperi* investigated by GC/RI, GC/MS and ¹³C-NMR spectroscopy. *Phytochem. Anal.* **16** : 357-363.

Bouchra C, Achouri M, Idrissi Hassani LM, Hmamouchi M. **2003**. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. *Phytochem.* **89** : 165-69.

Brada M, Bezzina M, Marlier M, Carlier A. **2007**. Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du nord de l'Algérie. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **11** : 3-7.

Bradesi P, Bighelli A, Tomi F, Casanova J. **1996**. L'analyse des mélanges complexes par RMN du carbone-13. *Canadian J. Appl. Spectrosc.* Partie 1, **41**: 15-24; Partie 2, **41** : 41-50.

Bradesi P, Tomi F, Casanova J. **1995**. Carbon-13 NMR study of farnesol, farnesyl acetate and farnesal stereoisomers: chemical shift assignment using lanthanide induced shifts. *Canadian J. Appl. Spectrosc.* **40** : 76-81.

Bradesi P, Tomi F, Terriaga I, Casanova J. **1994**. Identification of Dihydrocarvéol Stereoisomers and their Acetates using Carbon-13 NMR Spectroscopy. *Spectrosc. Lett.* **27** : 921-933.

Breeden DC, Young TE, Coates RM, Juvik JA. **1996**. Identification and bioassay of kairomones for *Helicoverpa zea*. *J. Chem. Ecol.* **22** : 513-539.

Brochini CB, Núñez CV, Moreira IC, Roque NF, Chaves MH, Martins D. **1999**. Identificação de componenetes de óleos voláteis : análise espectroscópica de misturas de sesquiterpenos. *Química Nova*, **22** : 37-40.

Bruins AP. **1979**. Negative ion chemical ionisation mass spectrometry in the determination of components in essential oils. *Anal Chem.* **51** : 967-972.

Bruneton J. **1993**. Pharmacognosie, phytochimie, Plantes médicinales (2^e édition). *Tec et Doc.*, Lavoisier, Paris. 915 p.

Cambon A. **1989**. La spectrométrie de masse multidimensionnelle et ses applications à l'analyse des mélanges complexes. *Science, Technique, Technologie*, **11** : 4-10.

Capello C, Calvarano I, Tonarelli de Rossin G, Retamar JA. **1982**. Ricerche sulla composizione dei kumquat argentine del genere *Fortunella margarita* – Nota I. L'olio essenziale. *Essenze Derivati Agrumari*, **52** : 67-72.

Cavaleiro C. **2001**. Oleos essenciais de *Juniperus* de Portugal. Thèse de Doctorat, Université de Coimbra, Portugal.

Cavalli JF, Tomi F, Bernardini A-F, Casanova J. **2004**. Combined analysis of *Chenopodium ambrosioides* essential oil by GC, GC-MS and ¹³C-NMR spectroscopy. Quantitative determination of Ascaridole, a heat-sensitive compound. *Phytochem. Anal.* **15** : 275-279.

Cavalli JF, Tomi F, Bernardini A-F, Casanova J. **2004**. Dihydroagarofurans: the fourth isomer isolated from *Cedrelopsis grevei* bark oil. *Magn. Reson. Chem.* **42** : 709-711.

Chericoni S, Flamini G, Campeol E, Cioni PL, Morelli I. **2004**. GC-MS analyses of the essential oil from the aerial parts of *Artemisia verlotiorum*: variability during the year. *Biochem Syst Ecol.* **32** : 423-429.

Choi HS. **2005**. Characteristic odor components of Kumquat (*Fortunella japonica* Swingle) peel oil. *J. Agric. Food Chem.* **53** : 1642-1647.

Choi HS, Sawamura M. **2000**. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Food flavors and chemistry*, **48** : 4156-4161.

Chon C, Poulard A, Rabiller C. **1996**. Analyse quantitative des principaux constituants du vin par RMN de carbone-13: optimisation de la méthode. *Journal international des Sciences de la Vigne et du Vin*, **30** : 73-83.

Claridge TDW. **1999**. High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry. Tetrahedron Organic Chemistry Series. volume 19, Elsevier, Oxford.

Coleman WM, Gordon BM. **1989**. Lawrence B.M., Examinations of the matrix isolation fourier transform infrared spectra of organic compounds: part XII. *Appl. Spectrosc.* **43** : 298-304.

Cook CM, Maloupa E, Kokkini S, Lanaras T. **2000**. Differences between the inflorescence, leaf and stem essential oils of wild *Mentha pulegium* L plants from Zakynthos Greece. *J. Essent. Oil Res.* **12** : 598-600.

Cornwell CP, Reddy N, Leach DN, Wyllie SG. **2001**. Germacradienols in the essential oils of the Myrtaceae. *Flavour Fragr. J.* **16** : 263-73.

Corticchiato M, Casanova J. **1992**. Analyse des mélanges complexes par RMN du Carbone-13 : application aux huiles essentielles. *Analisis*, **20** : 51-58.

Corticchiato M, Tomi F, Bernardini A-F, Casanova J. **1998**. Composition and intraspecific variability of essential oil from *Thymus herba-barona* Lois. *Biochem. Syst. Ecol.* **26** : 915-932.

Cotroneo A, Trozzi A, Di Giacomo A. **1985**. Sull'olio essenziale di Kumquat. *Essenz. Deriv. Agrum.* **55** : 20-26.

Cremin P, Donnelly DMX, Wolfender JL, Hostettmann K. **1995**. Liquid Chromatographic-Thermospray Mass Spectrometric Analysis of Sesquiterpenes of *Armillaria* (Eumycota : Basidiomycotina) species. *J Chromatogr A*, **710** : 273-285.

Crisp TG, Meyer GA. **1995**. Syntheses of optically active α -methylene γ -butyrolactones and (+)-Mintlactone. *Tetrahed.* **51** : 5831-5846.

Dallüge J, Beens J, Brinkman UAT. **2003**. Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool. *J Chromatogr A*, **1000** : 69-108.

De la Torre CP, Torres OA. **1977**. Aceite esencial de *Mentha rotundifolia*. *Arch. Bioquim. Quim. Farm.* **20** : 85-88.

Decouzon M, Geribaldi S, Rouillard M, Stural JM. **1990**. A New Look at the Spectroscopic properties of Dihydrocarveol Stereoisomers. *Flavour Fragr. J.* **5** : 147-152.

Delort E, Jacquier A. **2009**. Novel terpenyl esters from Australian finger lime (*Citrus australasica*) peel extract. *Flavour Fragr. J.* **24** : 3, 123-132.

Derome AE. **1987**. Modern NMR Techniques for Chemistry Research, Volume 6 Pergamon Press, Oxford.

Dugo G, Di Giacomo A. **2002**. Citrus : the genus Citrus., Medicinal and aromatic plants-Industrial profiles. CRC Press Taylor and Francis group, 642 p.

Dugo P, Mondello L, Dugo L, Stancanelli R, Dugo G. **2000**. LC-MS for the identification of oxygen heterocyclic compounds in citrus essential oils. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24** : 147-154.

Dung NX, Cu LD, Khien PV, Muselli A, Casanova J, Bartel A, Leclercq PA. **1998**. Volatile Constituents of the stem and leaf oils of *Eupatorium coelestidum* L. from Vietnam. *J. Essent. Oil Res.* **10** : 478-482.

El Arch M, Satrani B, Farah A, Bennani L, Boriky D, Fechtal M, Blaghen M, Talbi M. **2003**. Composition chimique et activités antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* du Maroc. *Acta Bot. Gallica*, **150** : 267-274.

El-Ghorab AH. **2006**. The chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil from Egypt and its antioxidant activity. *J. Essential oil Bearing Plants*, **9** : 183-195.

Esmaeli A, Rustaiyan A, Masoudi S, Nadji K. **2006**. Composition of the essential oils of *Mentha aquatica* L. and *Nepeta meyeri* Benth. From Iran. *J. Essent. Oil Res.* **18** : 263-265.

Ferhat MA, Meklati BY, Smadja J, Chemat F. **2006**. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. *J Chromatogr A*, **1112** : 121-126.

Ferreira MJP, Costantin MB, Sartorelli P, Rodrigues GV, Limberger R, Henriques AT, Kato MJ, Emerenciano VP. **2001**. Computer-Aided Method for Identification of Components in Essential Oils by ¹³C NMR Spectroscopy. *Anal. Chim. Acta*, **447** : 125-134.

Figueroa M, Rivero-Cruz I, Rivero-Cruz B, Bye R, Navarette A, Mata R. **2007**. Constituents, biological activities and quality control parameters of the crude extract and essential oil from *Arracacia toluensis* var. *multifida*. *J. Ethnopharmacol.* **113** : 125-131.

Formáček V, Kubeczka KH. **1982a**. Essential oils analysis by capillary gas chromatography and carbon-13 NMR spectroscopy. John Wiley & Sons, Chichester.

Formáček V, Kubeczka KH. **1982b**. ¹³C NMR analysis of essential oils, in aromatic plants: Basic and applied aspects. Margaris N, Koedam A, Vokou D, Ed. Martinus Nijhoff. Publishers, La Haye, 177-181.

Formáček V, Kubeczka KH. **1982c**. Quantitative analyse ätherischer öle Mittels ¹³C-NMR spektroskopie in aetherische öle. Kubeczka KH, Ed. Thieme, Stuttgart, 42-53.

Frérot E, Bagnoud A. **2003**. Method for preparing a γ -unsaturated β -lactone and use thereof as an aromatic and flavouring ingredient. European Patent EP1202982, Firmenich SA.

Frérot E, Bagnoud A, Vuilleumier C. **2002**. Menthofurolactone : a new p-menthane lactone in *Mentha piperita* L.: analysis, synthesis and olfactory properties. *Flavour Fragr. J.* **17** : 218-226.

Fujita Y, Fujita SI. **1967**. Essential oil of *Mentha pulegium* and *M. grattefossei* view from the standpoint of comparative biochemistry. *Nippon Kagaku Zasshi*, **88** : 767-768.

Fujita S, Morishita T. **1987**. Miscellaneous contributions to the essential oils of plants from various territories. XLVIII. A biochemical study of the essential oils of *Schizonepeta tenuifolia* Briq. *Yakugaku Zasshi*, **12** : 959-963.

Galambosi B, Aflatuni A, Sorvari K. **1998**. Effect of cultivation techniques on mint oils in northern Finland. *Perfum. Flavor.* **23** : 27-31.

Gamisans J, Jeanmonod D. **1993**. Catalogue des plantes vasculaires de la Corse (seconde édition). Edition des conservatoires et jardin botaniques de la ville de Genève, Chambésy, 258p.

Gancel AL. **2004**. Etude de l'hérédité des composés d'arôme chez des hybrides somatiques d'agrumes. Thèse de doctorat de l'Université de Corse.

Gancel AL, Ollitrault P, Froelicher Y, Tomi F, Jacquemond C, Luro F, Brillouet JM. **2005**. Citrus somatic allotetraploid hybrids exhibit a differential reduction of leaf sesquiterpenoid biosynthesis compared with their parents. *Flavour Fragr. J.* **20**: 626-632.

Gancel AL, Ollitrault P, Froelicher Y, Tomi F, Jacquemond C, Luro F, Brillouet JM. **2005**. Leaf volatile compounds of six citrus somatic allotetraploid hybrids originating from various combinations of lime, lemon, citron, sweet orange, and grapefruit. *J. Agric. Food Chem.* **53** : 2224-2230.

Ganzler K, Salgo A, Valko K. **1986**. A novel sample preparation method for chromatography, *J. Chromatogr. A*, **371** : 299-306.

Gaudin JM. **2000**. Synthesis and organoleptic properties of p-menthane lactones. *Tetrahedron*, **56** : 4769-4776.

Grenier-Loustalot MF, Grenier P, Bounoure J, Grall M, Panaras R. **1990**. Couplage direct chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) et résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ¹H). Appareillage, méthodologie, exemple d'application. *Analisis*, **18** : 200-207.

Grundschober F. **1991**. The identification of individual components in flavorings and ed foods. *Z. Lebensm Unters Forsch.* **192** : 530-534.

Guillon J, Rioult J-P, Robba M. **2000**. New synthesis of isopiperitenol, previously isolated from species of *Cymbopogon*. *Flavour Fragr. J.* **15** : 223-224.

Gunstone FD. **1991**. ^{13}C NMR Studies of Mono-, Di- and Tri-Acylglycerols Leading to Qualitative and Semi-Quantitative Informations About Mixtures of These Glycerol Esters. *Chem. Phys. Lipids*, **58** : 219-224.

Gunstone FD, Pollard MR, Scrimgeour CM. **1977**. Vedanayagam H.S., Fatty Acids. Part 50. ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Studies of Olefinic Fatty Acids and Esters. *Chem. Phys. Lipids*, **18** : 115-129.

Günther H. **1994**. La spectroscopie de RMN. Principes de base, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone-13 en chimie. Masson, Paris.

Handa KL, Smith DM, Nigam IC, Levi L. **1964**. Essential oils and their constituents XXXIII. Chemotaxonomy of the genus *Mentha*. *J. Pharm. Sci.* **53** : 1407-1409.

Hachicha S., Skanji T., Barrek S., Ghrabi Z.G., Zarrouk H. **2007**. Composition of the essential oil of *Teucrium ramosissimum* Desf. (Lamiaceae) from Tunisia. *Flavour Fragr. J.* **22** : 101-104.

Hashinaga F, Ito S. **1985**. Effect of Ethephon on the Maturity of Meiwa Kumquat *Fortunella-Crassifolia*. Fruit. Bulletin of the Faculty of Agriculture Kagoshima University, 43-48.

Hayashi T, Shinbo T, Shimizu M, Arisawa M, Morita N, Kimura M, Matsuda S, Kikuchi T. **1985**. Paeonilactone-A, -B, and -C, new monoterpenoids from paeony root. *Tetrahedr. Lett.* **26** : 3699-3702.

Hedges LM, Wilkins CL. **1991**. Components analysis of eucalyptus oil by Gas Chromatography-Fourier Transform-Infrared Spectrometry-Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. Sci.* **29** : 345-350.

Hesse M, Meier H, Zeeh B. **1997**. Méthodes spectroscopiques pour la chimie organique, Masson : Paris.

Hoi TM, Moi LD, Muselli A, Bighelli A, Casanova J. **1997**. Analyse de l'huile essentielle de *Cupressus funebris* du Viêt-Nam par RMN du carbone-13. 15èmes Journées Internationales des Huiles Essentielles, Digne-les-bains, 5-7/09/1996, *Actes, Rivista Italiana EPPOS*, n° spécial, 633-637.

Iob A, Buenafe R, Abbas NM. **1998**. Determination of oxygenates in gasoline by FTIR. *Fuel*, **77** : 1861-1864.

Izac RR, Bandurraga MM, Wasylyk JM, Dunn FW, Fenical W. **1982**. Germacrene derivatives from diverse marine soft-corals (octocorallia). *Tetrahedron*, **38** : 301-4.

Jennings W, Shibamoto T. **1980**. Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography, Jovanovich H.B. Ed., Academic Press, New York.

Jerkovic I, Mastelic J. **2001**. Composition of free and glycosidically bound volatiles of *Mentha aquatica* L. *Croat. Chem. acta*, **74** : 431-439.

Joulain D. **1994**. Methods for analyzing essential oils. Modern analysis methodologies: use and abuse. *Perfumer & Flavorist*, **19** : 5-17.

Joulain D, König WA. **1998**. *The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons*: E.B.-Verlag, Hamburg.

Joulain D, Laurent R. **1989**. Two closely related sesquiterpenols: 1-endobourbonanol and 1,6-germacradien-5-ol. *J. Essent. Oil Res.* **1** : 299-301.

Kentarou V, Graikou K, Chinou I. **2007**. Chemical analyses of the essential oils of three *Fortunella* cultivars and a Greek traditional Kumquat liqueur. Abstracts of the 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, September 2-6, 2007, Graz, Austria. *Planta med.* **73** : p.797-1024.

Keun HC. **2006**. Metabonomic modelling of drug toxicity. *Pharmacol. & Therap.* **109** : 92-106.

Kitagawa I, Cui Z, Son BW, Kobayashi M, Kyogoku Y. **1987**. Marine Natural Products. XVII. Nephtoxydiol, a new cytotoxic hydroperoxy-germacrane sesquiterpene, and related sesquiterpenoids from an Okinawan soft coral of *Nephtea* sp. (Nephteidae). *Chem. Pharm. Bull.* **35** : 124-35.

Kokkini S, Handilou E, Karouscou R. **2004**. Clinal variation of *Mentha pulegium* essential oils along the climatic gradient of Greece. *J. Essent. Oil Res.* **16** : 588-93.

Kokkini S, Handilou E, Karousou R, Lanaras T. **2002**. Variations of pulegone content in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) plants growing wild in Greece. *J. Essent. Oil Res.* **14** : 224-227.

Kondo S, Katayama R, Uchino K. **2005**. Antioxidant activity in meiwa kumquat as affected by environmental and growing factors. *Environmental and Experimental Botany*, **54** : 60-68.

Kosir IJ, Kidric J. **2001**. Identification of amino acids in wines by one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **49** : 50-56.

Kováts E. **1965**. Gas chromatographic characterisation of organic substances in the retention index system. *Advances in Chromatography*, **1** : 229-247.

Koyasako A, Bernhard RA. **1983**. Volatile constituents of the essential oil of Kumquat., *J. Food Sci.* **48** : 1807-1812.

Kubeczka KH, Formáček V. **1984**. Application of direct carbone-13 NMR spectroscopy in the analysis of volatiles, Schreier P. Ed., Walter de Gruyter & Co., Berlin, 219-230.

La Torre GL, Saitta M, Vilasi F, Pellicanò T, Dugo G. **2006**. Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection, *Food Chem.* **94** : 640-650.

Lago JHG, Brochini C, Roque NF. **2000**. Terpenes from leaves of *Guarea macrophylla* (Meliaceae). *Phytochem.* **55** : 727-731.

Lange G, Schultze W. **1988**. Differentiation of isopulegol isomers by chemical ionization mass spectrometry, in *Bioflavour'87*, P. Schreier Ed., W. de Gruyter & Co.: Berlin, New-York, 115-122.

Lapčik O, Klejdus B, Davidová M, Kokoška L, Kubáň V, Moravcová J. **2004**. Isoflavonoids in the Rutaceae family : 1. *Fortunella obovata*, *Murraya paniculata* and four *Citrus* species. *Phytochem. Anal.* **15** : 293-299.

Lawrence MB, **1978**. A study of monoterpene interrelationships in the genus *Mentha* with special reference to the origin of pulegone and menthofuran. Ph.D. Thesis, state University , Groningen, Netherlands.

Lawrence MB. **2007**. Mint: The genus *Mentha*. Medicinal and aromatic plants-Industrial profiles. CRC Press Taylor and Francis group, 556 p.

Lesueur D, Bighelli A, Casanova J, Tran Minh Hoi and Tran Huy Thai. **2009**. Composition of the essential oil of *Piper bavinum* C. DC. from Vietnam. *J Essent. Oil Res.* **21** : 16-18.

Lesueur D, Ninh Khac Ban, Bighelli A, Muselli A, Casanova J. **2006**. Analysis of the root oil of *Fokienia hodginsii* (Dunn) Henry and Thomas (Cupressaceae) by GC, GC/MS and ¹³C-NMR. *Flavour Fragr. J.* **21** : 171-174.

Liang YZ, Xieb P, Chan K. **2004**. Quality control of herbal medicines. *J Chromatogr B*, **812** : 53-70.

Liu K, Rossi PG, Ferrari B, Berti L, Casanova J, Tomi F. **2007**. Composition, irregular terpenoids, chemical variability and antibacterial activity of the essential oil from *Santolina corsica* Jordan et Fourr. *Phytochem.* **68** : 1698-1705.

Lorenzo D, Paz D, Dellacassa E, Davies P, Vila R, Cañigueral S. **2002**. Essential Oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **45** : 2, 519-524.

Lota ML, de Rocca Serra D, Tomi F, Casanova J. **2000**. Chemical variability of peel and leaf essential oils of mandarins from *Citrus reticulata* Blanco. *Biochem. Syst. Ecol.* **28** : 61-78.

Lota ML, de Rocca Serra D, Jacquemond C, Tomi F, Casanova J. **2001a**. Chemical variability of peel and leaf essential oils of sour orange. *Flavour Fragr. J.* **16** : 89-96.

Lota ML, de Rocca Serra D, Tomi F, Casanova J. **2001b**. Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins. *Biochem. Syst. Ecol.* **29** : 77-104.

Lota ML, de Rocca Serra D, Tomi F, Jacquemond C, Casanova J. **2002**. Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. *J. Agric. Food Chem.* **50** : 796-805.

Lucchesi ME, Samdja J, Bradshaw S, Louw W, Chemat F. **2007**. Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L.: a multivariate study of a new chemotype for the extraction of essential oil. *J. Food Eng.* **79** : 1079-1086.

Maffei M. **1988**. Environmental factors affecting the oil composition of some *Mentha* species grown in North West Italy. *Flavour Fragr. J.* **3** : 79-84.

Maia JGS, Andradeb EH, das Graças M, Zoghbib B. **2004**. Aroma volatiles from two fruit varieties of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). *Food Chem.* **85** : 195-197.

Markowitz A, Rapp A. **1990**. ¹³C-NMR spectroscopy in the analysis of wine, fruit juices and honey. *Bruker Report*, **1** : 38-39.

Marriott P, Shellie R, Fergeus J, Ong R, Morrison P. **2000**. High resolution essential oil analysis by using comprehensive gas chromatographic methodology. *Flavour Fragr. J.* **15** : 225-239.

Martin AJP, Synge RLM. **1941**. A new form of chromatogram employing two liquid phases. 1. A theory of chromatography. 2. Application of the microdetermination of the higher monoaminoacids in proteins. *Biochem. J.* **35** : 1358-1368.

Masada Y. **1976**. Analysis of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry, John Wiley & sons, New York.

Mata AT, Proença C, Ferreira AR, Serralheiro MLM, Nogueira JMF, Araújo MEM. **2007**. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chem.* **103** : 778-786.

Mazzoni V, Tomi F, Casanova J. **1999**. A daucane type sesquiterpene from *Daucus carota* seed oil. *Flavour Fragr. J.* **14** : 268-272.

Mc Lafferty FW, Stauffer DB. **1994**. Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th ed., Mass spectrometry library search system BenchTop/PBM, version 3.10d. Palisade Co.: Newfield.

Mecherara-Idjeri S, Hassani A, Castola V, Casanova J. **2008a**. Composition and chemical variability of the essential oil from *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Algeria Part I: Leaf oil. *J. Essent. Oil Res.* **20** : 32-38.

Mecherara-Idjeri S, Hassani A, Castola V, Casanova J. **2008b**. Composition and chemical variability of the essential oil from *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Algeria Part II: fruit oil. *J. Essent. Oil Res.* **20** : 104-107.

Merle H, Morón M, Blázquez MA, Boira H. **2004**. Taxonomical contribution of essential oils in madarins cultivars. *Biochem. Sys. Eco.* **32** : 491-497.

Mitiku SB, Ukeda H, Sawamura M. **2000**. Enantiomeric distribution of α -pinene, β -pinene, sabinène and limonene in various citrus essential oils. *food flavors and chemistry: advances of the new millennium*, 216-231.

Mkaddem M, Bousaid M, Ben Fadhel N. **2007**. Variability of volatiles in Tunisian *Mentha pulegium* L (Lamiaceae). *J. Essent. Oil Res.* **19** : 211-215.

Mondello L, Casilli A, Tranchida PQ, Dugo P, Dugo G. **2005**. Comprehensive two-dimensional GC for the analysis of citrus essential oils. *Flavour Fragr. J.* **20** : 136-140.

Mondello L, Dugo P, Bartle KD. **1995**. Automated HPLC-HRGC: A Powerful Method for Essential Oil Analysis. Part V. Identification of Terpenes Hydrocarbons of Bergamot, Lemon, Mandarin, Sweet Orange, Bitter Orange, Grapefruit, Clementine and Mexican Lime Oils by Coupled HPLC-HRGC-MS (ITD). *Flavour Fragr. J.* **10** : 33-42.

Mondello L, Lewis AC, Bartle KD, Marriott PJ. **2002**. Multidimensional Chromatography. John Wiley & Sons Ltd. Baffins Lanes, Chichester, West Sussex PO19 1UD, England. Chapter 3 and 4, pp47-108.

Mroczek T, Ndjoko K, Glowniak K, Hostettmann K. **2004**. On-line structure characterization of pyrrolizidine alkaloids in *Onosma stellulatum* and *Emilia coccinea* by liquid chromatography–ion-trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1056** : 91-97.

Mundina M, Vila R, Tomi F, Gupta MP, Adzet T, Casanova J, Cañigueral S. **1998**. Leaf essential oils of three Panamanian Piper species. *Phytochem.* **47** : 1277-1282.

Murray MJ, Hefendehl FW. **1973**. Changes in monoterpene composition of *Mentha aquatica* produced by gene substitution from a high limonene strain of *M. Citrata*. *Phytochem.* **12** : 1875-1880.

N'Guyen Thi Tam, Duong Thi Thuam, Bighelli A, Castola V, Muselli A, Richomme P, Casanova J. **2004**. *Baeckea frutescens* leaf oil from Vietnam: composition and chemical variability. *Flavour Fragr. J.* **19** : 217-220.

Naf R, Velluz R. **1998**. Phenols and lactones in Italo-Mitcham peppermint oil *Mentha piperita* L. *Flavour Fragr. J.* **13** : 203-208.

Nicholson JK, Lindon JC. **2008**. Metabolomics. *Nature*, **455** : 1054-1056.

Nguyen Thi Phuong Thao, Nguyen Thi Thuy, Tran Minh Hoi, Tran Huy Thai, Muselli A, Bighelli A, Castola V, Casanova J. **2004**. *Artemisia vulgaris* L. from Vietnam: Chemical variability and composition of the oil along the vegetative life of the plant. *J. Essent. Oil Res.* **16** : 358-361.

Nordin O, Hedenstsöm E, Högberg H-E. **1999**. Stereochemistry of 1,6-Germacradien-5-ol, a constituent of the needles of Scots pine (*Pinus sylvestris*) and of the defence secretion from Larvae of the pine sawfly *Neodiprion sertifer*. *Acta Chem. Scand.* **53** : 124-32.

Novak P, Tepeš P, Fistrić I, Bratoš I, Gabelica V. **2006**. The application of LC-NMR and LC-MS for separation and rapid structure elucidation of an unknown impurity in 5-aminosalicylic acid. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40** : 1268-1272.

Núñez CV, Roque NF. **1999**. Sesquiterpenes from the stem bark of *Guarea guidonia* (L.) sleumer (Meliaceae). *J. Essent. Oil Res.* **11** : 439-440.

Ogawa K, Kawasaki A, Omura M, Yoshida T, Ikoma Y, Yano M. **2001**. 3',5'-di-C- β -glucopyranosylphloretin, a flavonoid characteristic of the genus *Fortunella*. *Phytochem.* **57** : 737-742.

Ottavioli J. **2009**. Contribution de la RMN ^{13}C à l'analyse d'huiles essentielles et d'oleoresines : Caractérisation de genevriers et du pin maritime de Corse. Phd thesis, Université de Corse.

Ouzmil H, Ghouami S, Rhajaoui M, Ilidrissi A, Fkih-Tetouani S, Faid M, Benjouad A. **2002**. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. *Phytother. Res.* **16** : 727-731.

Palama TL, Fock I, Choi YH, Verpoorte R, Kodja H. Biological variation of *Vanilla planifolia* leaf metabolome. *Phytochem.* Sous presse.

Paolini J, Costa J, Bernardini A-F. **2005.** Analysis of the essential oil from aerial parts of *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* (L.) by gas chromatography with electron impact and chemical ionisation mass spectrometry. *J. chromatogr. A*, **1076** : 170-178.

Paolini J, Falchi A, Quilichini Y, Desjobert J-M, De Cian M-C, Varesi L, Costa J. **2009.** Morphological, chemical and genetic differentiation of two subspecies of *Cistus creticus* L. (*C. creticus* subsp. *eriocephalus* and *C. creticus* subsp. *corsicus*). *Phytochem.* **70** : 1146-1160.

Paolini J, Muselli A, Bernardini A-F, Bighelli A, Casanova J, Costa J. **2007.** Thymol derivatives from essential oil of *Doronicum corsicum* L. *Flavour Fragr. J.* **22** : 479-487.

Paré JRJ, Sigouin M, Lapointe J. **1990.** Extraction de produits naturels assistée par micro-ondes. *Brevet européen*, EP 398798.

Park SK, Kim SS, Park JD, Hong JS, Kim IK. **1995.** A study on the chemical constituents from Marine sponge *Luffariella* sp. *J. Korean Chem. Soc.* **39** : 559-63.

Perez Raya MD, Utrilla MP, Navarro MC, Jiménez J. **1990.** CNS activity of *Mentha rotundifolia* and *Mentha longifolia* essential oil in Mice and Rats. *Phytother. Res.* **4** : 232-234.

Phillips JB, Beens J. **1999.** Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a hyphenated method with strong coupling between the two dimensions. *J. Chromatogr A*, **856** : 331-347.

Pino JA, Rosada A, Fuentes V. **1999.** Chemical composition of the leaf of *Mentha rotundifolia* (L.) Hudson from Cuba. *J. Essent. Oil. Res.* **11** : 241-242.

Pusecker K, Albert K, Bayer E. **1999.** Investigation of hop and beer bitter acids by coupling of highperformance liquid chromatography to nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Chromatogr. A*, **836** : 245–252.

Quijano CE, Pino JA. **2009.** Volatile Compounds of Kumquat (*Fortunella margarita* (Lour.) Swingle) Leaf Oil. *J. Essent. Oil Res.* **21** : 194-196.

Radulgin VA, Salenko VL, Gamov NS, Titova TF, Khan VA, Pentegova VA. **1974.** 5S,8S-germacra-1E,6E-dien-5-ol from the oleoresin of *Picea ajanensis* and its biomimetic cyclisation. *Chem. Nat. Compd.* **10** : 696.

Reverchon E, De Marco I. **2006.** Supercritical fluid extraction and fractionation of natural Matter. *J. of Supercritical Fluids*, **38** : 146-166.

Rojas-Escudero E, Alarcón-Jiménez AL, Elizalde-Galván P, Rojo-Callejas F. **2004.** Optimization of carbohydrate silylation for gas chromatography. *J Chromatogr A*, **1027** : 117-120.

Rouessac F, Rouessac A. **2004.** *Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes.* 6ème édition, sciences sup : Dunod, Liège.

- Sacchi R, Addeo F, Giudicianni I, Paolillo L. **1992**. Analysis of the Positional Distribution of Fatty Acids in Olive Oil Triacylglycerols by High Resolution ¹³C-NMR of the Carbonyl Region. *Ital. J. Food Sci.* **2** : 117-123.
- Salgueiro L, Vila R, Tomas X, Tomi F, Cañigüeral S, Casanova J, Proença da Cunha A, Adzet T. **1995**. Chemical polymorphism of the essential oil of *Thymus carnosus* from Portugal. *Phytochem.* **38** : 391-396.
- Salgueiro LR, Vila R, Tomi F, Figueiredo AC, Barroso JG, Cañigüeral S, Casanova J, Proença da Cunha A, Adzet T. **1997a**. Variability of the essential oil of *Thymus caespititius* from Portugal. *Phytochem.* **45** : 307-311.
- Salgueiro LR, Vila R, Tomi F, Tomas X, Cañigüeral S, Casanova J, Proença da Cunha A, Adzet T. **1997b**. Composition and intraspecific variability of the essential oil of *Thymus camphorates*. *Phytochem.* **45** : 1177-1183.
- San Feliciano A, Medarde M, Gordaliza M., Lucas MJ. **1995**. Structure elucidation of germacrène alcohols from *Juniperus communis* subsp. *Hemisphaerica*. *J. Nat. Prod.* **58** : 1059-64.
- Sandra P, Bicchi C. **1987**. Capillary gas chromatography in essential oil analysis, Huethig, Heidelberg.
- Sasaki TA, Wilkins CL. **1999**. Gas chromatography with fourier transform infrared and mass spectral detection. *J. Chromatogr. A*, **842** : 341-349.
- Schmaus G, Schultze W, Kubezca K-H. **1989**. Volatile constituents of *Peucedanum palustre*. *Planta Med.* **55** : 482-87.
- Schmidt A, Bischof-Deichnik C, Stahl-Biskup E. **2004**. Essential oil polymorphism of *Thymus praecox* subsp. *articus* on the British Isles. *Biochem. Sys. Eco.* **32** : 409-421.
- Sellier N, Cazaussus A, Budzinski H, Lebon M. **1991**. Structure determination of sesquiterpenes in chinese vetiver oil by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr A*, **557** : 451-458.
- Senatore F, Arnold NA, Piozzi F. **2004**. Chemical composition of the essential oil of *Salvia multicaulis* Vahl. var. *simplicifolia* Boiss. growing wild in Lebanon *J Chromatogr A*. **1052** : 237-240.
- Schenk GO, Schulte-Elte KH, Foote CS, Wuesthoff MT, Wexler S, Burstain IG, Denny R. **1967**. Photosensitized oxygenation of alkyl-substituted furans. *Tetrahedron*, **23** : 2583.
- Shripsema J. **2010**. Application of NMR in plant Metabolomics: techniques, problems and prospects. *Phytochem. Anal.* **21** : 14-21.
- Schultze W, Lange G, Schmaus G. **1992**. Isobutane and ammoniac chemical ionization mass spectrometry of sesquiterpene hydrocarbons. *Flav. Fragr. J.* **7** : 55-64.
- Scora RW, Duesch G, Englan AB. **1969**. Essential leaf oils in representatives of the aurantioideae (Rutaceae). *Amer. J. Bot.* **56** : 1094-1102.

Smitt O, Högberg H-E. **2002**. First total synthesis of (-)-1(10),5-germacradien-4-ol. *Synlett*. **8** : 1273-76.

Song G, Deng C, Wu D, Hu Y. **2004**. Headspace solid-phase Microextraction-Gas Chromatographic-Mass Spectrometric analysis of essential oils of two traditional chinese medicines, *Angelica pubescens* and *Angelica sinensis*. *Chromatographia*, **59** : 343-349.

Songa SM, Marriott P, Kotsosb A, Drummerb OH, Wynnec P. **2004**. Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry (GC/GC-TOFMS) for drug screening and confirmation. *Forensic. Sci. Int.* **143**: 87-101.

Stahenko EE, Jaramillo BE, Maratínez JR. **2003**. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia verbenaceae. *Química*, **105** : 579-598.

Sticher O, Flück H. **1968**. Die Zusammensetzung von genuinen, extrahierten und destillierten ätherischen Ölen einiger *Mentha*-Arten. *Pharm. Acta Helv.* **43** : 411-446.

Stoyanova A, Georgie V, Kula J, Majda T. **2005**. Chemical composition of the essential oil of *Mentha pulegium* L. from Bulgaria. *J. Essent. Oil Res.* **17** : 475-477.

Tchuendem MHK, Mbah JA, Tsopmo A, Ayafor JF, Sterner O, Okunji CC, Iwu MM, Schuster BM. **1999**. Anti-plasmodial sesquiterpenoids from the African *Reneilmia Cinnamata*. *Phytochem.* **52** : 1095-1099.

Teisseire PJ. **1991**. Chimie des substances odorantes. Tec & Doc., Lavoisier, Paris.

Terskikh VV, Feurtado JA, Borchardt S, Giblin M, Abrams SR, Kermode AR. **2005**. In vivo ¹³C NMR metabolite profiling : potential for understanding and assessing conifer seed quality. *J. Exp. Bot.* **56** : 2253-2265.

Thomaidis NS, Georgiou CA. **1999**. Edible oil analysis by flow injection. *Lab. Autom. Inf. Manag.* **34** : 101-114.

Tomi F, Bradesi P, Bighelli A, Casanova J. **1995**. Computer-aided identification of individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson. Anal.* **1** : 25-34.

Tomi F, Casanova J. **2000**. Contribution de la RMN du carbone-13 à l'analyse des huiles essentielles. *Annales Fals. & Expertise Chim.* **93** : 313-330.

Tomi F, Casanova J. **2006**. ¹³C-NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from Labiatae, A review. *Acta Horticulturae*, **723** : 185-192.

Tosun A, Kürkçüoğlu M, Dogan E, Duman H, Başer KHC. **2006**. Essential oil composition of *Seseli andronakii* Woron. Growing in Turkey. *Flavour Fragr. J.* **21** : 257-259.

Tranchida PQ, Dugo P, Dugo G, Mondello L. **2004**. Comprehensive two-dimensional chromatography in food analysis. *J. Chromatogr. A*, **1054** : 3-16.

Umemoto K, Arai T, Nii H, Furukawa K. **1994**. Chemical constituents of wild mints. Part XX. Essential oil of self-pollinated plants of *Mentha aquatica* with sesquiterpene alcohols as major components. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, **68** : 1567.

Van Den Dool H, Kratz PD. **1963**. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.* **11** : 463-471.

Velasco-Negueruela A, Perez-Alonso MJ, Esteban JL, Garcia Vallejo MC, Zygaldó JA, Guzman CA, Ariza-Espinar L. **1996**. Essential oils of *Calamintha nepeta* (L.) Savi and *Mentha aff. suaveolens* Ehrh. grown in Cordoba, Argentina. *J. Essent. Oil Res.* **8** : 81-84.

Vellutini M, Baldovini N, de Rocca Serra D, Tomi F, Casanova J. **2005**. β -Cyclolavandulyl and β -isocyclolavandulyl esters from *Peucedanum paniculatum* L., an endemic species to Corsica. *Phytochem.* **66** : 1956-1962.

Vellutini M, Tomi F, Richomme P, Casanova J. **2007**. Kallisteine A and B, two new coumarins from the roots of *Peucedanum paniculatum* L., an endemic species to Corsica. *Magn. Reson. Chem.* **45** : 355-358.

Vendeuvre C, Bertoincini F, Duval L, Duplan JL, Thiébaud D, Hennion MC. **2004**. Comparison of conventional gas chromatography and comprehensive two-dimensional gas chromatography for the detailed analysis of petrochemical samples. *J Chromatogr A*, **1056** : 155-162.

Vernin G, Boniface C, Metzger J, Guiglione C, Hammoud A, Suon K-N, Fraise D, Parkanyl C. **1988**. GC-MS-Specma bank analysis of *J. communis* needles and berries. *Phytochem.* **27** : 1061-1064.

Verpoorte R, Choi YH, Kim HK. **2007**. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. *Phytochem. Rev.* **6** : 3-14.

Verpoorte R, Choi YH, Kim HK. **2010**. Metabolomics: will it stay? *Phytochem. Anal.* **21** : 2-3.

Victoria M, Elipe S. **2003**. Advantages and disadvantages of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a hyphenated technique. *Analytica Chimica Acta*, **497** : 1-25.

Von Poser GL, Menut C, Toffli ME, Verin P, Sobral M, Bessiere JM, Lamaty G, Henriques AT. **1996**. Essential oil composition and allelopathic effects of the Brazilian Lamiaceae *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling and *Hesperozygis rhododon* Epling. *J. Agric Food Chem.* **44** : 1829-1832.

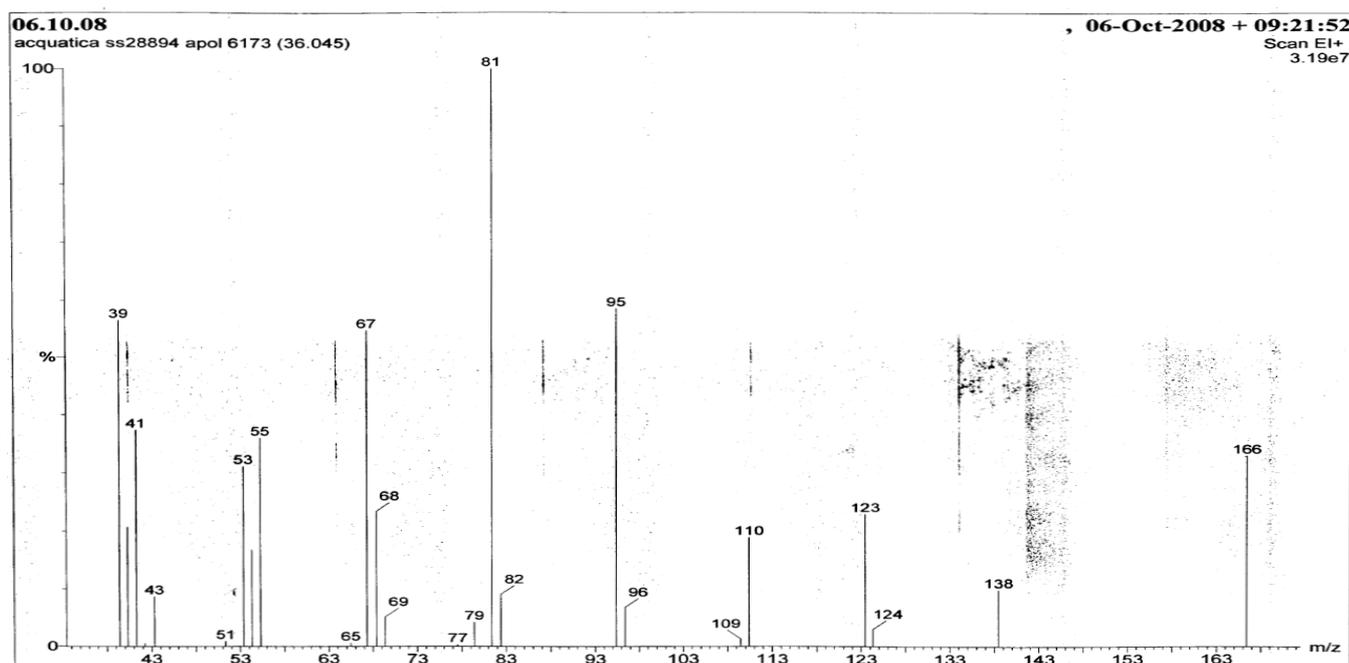
Waridel P, Wolfender J-L, Lachavanne J-B, Hostettmann K. **2004**. Identification of the polar constituents of Potamogeton species by HPLC-UV with post-column derivatization, HPLC-MSⁿ and HPLC-NMR, and isolation of a new ent-labdane glycoside. *Phytochem.* **65** : 2401-2410.

Weyerstahl P, Marschall H, Son P.T., Giang M. **1999**. Constituents of the flower essential oil of *Aglaia odorata* Lour. from Vietnam. *Flavour Fragr. J.* **14** : 219-224.

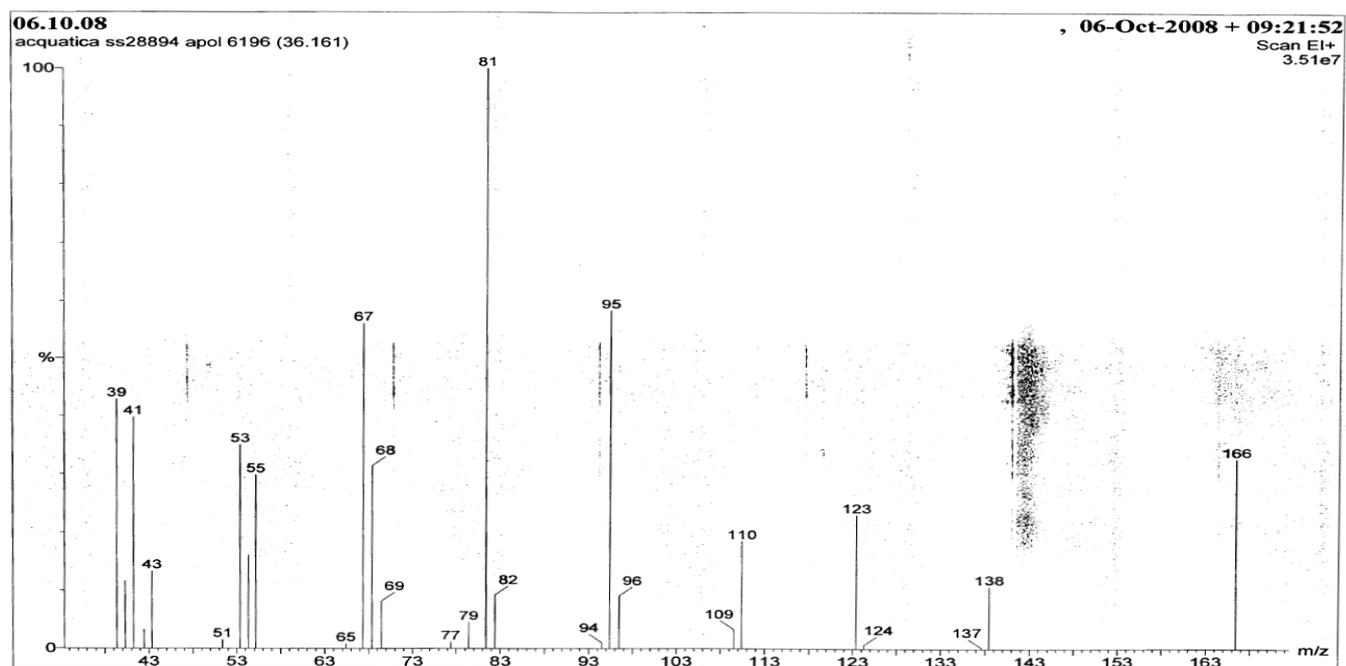
- Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D. **2000a**. 1,7-Cyclogermacra-1(10),4-dien-15-al, a Sesquiterpene with a Novel Skeleton, and Other Sesquiterpenes from Haitian Vetiver Oil. *Flavour Fragr. J.* **15** : 61-83.
- Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D. **2000b**. Analysis of the Polar Fraction of Haitian Vetiver Oil. *Flavour Fragr. J.* **15** : 153-173.
- Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D, Surburg H. **2000c**. Constituents of Haitian Vetiver Oil. *Flav. Fragr. J.* **15** : 395-412.
- Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D. **1996**. New Sesquiterpene Ethers from Vetiver Oil. *Liebigs Ann.* **7** : 1195-1199.
- Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D. **1997**. New cis-Eudesm-6-ene Derivatives from Vetiver Oil. *Liebigs Ann.* **7** : 1783-1787.
- Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D, Surburg H. **2000d**. Constituents of Haitian Vetiver Oil. *Flavour Fragr. J.* **15** : 395-412.
- Weyerstahl P, Marschall H, Thefeld K, Subba GC. **1998**. Constituents of the essential oil from the rhizomes of *Hedychium gardnerianum* Roscoe. *Flavour Fragr. J.* **13** : 377-88.
- Weyerstahl P, Schlicht V. **1997**. Synthesis of rac-Bisabola-3(15),10-dien-7-ol. *Liebigs Ann.* **8** : 1789-1790.
- Williamson M, Neuhaus D. **1989**. The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis, VCH, New York.
- Wolfender JL, Ndjoko K, Hostettmann K. **1998**. LC/NMR in natural products chemistry. *Current Organic Chemistry.* **2** : 575-596.
- Wollenberg KF. **1990**. Quantitative High Resolution ¹³C Nuclear Magnetic Resonance of the Olefinic and Carbonyl Carbons of Edible Vegetable Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **67** : 487-494.
- Yost RA, Enke CG. **1979**. Triple Quadrupole Mass Spectrometry for Direct Mixture Analysis and Structure Elucidation. *Anal. Chem.* **51** : 1251-1264.
- Zupanc M, Prošek M, Dušan M. **1992**. Combined CI and EI Mass Spectra in the Analysis of Essential Oils. *J. High Resol. Chromatogr.* **15** : 510-513.
- Zwaving JH, Smith D. **1971**. Composition of the essential oil of Austrian *Mentha pulegium*. *Phytochem.* **10** : 1951-1953.

ANNEXES

Annexe 1 : Spectre de masse en mode IE de la menthofurolactone.



Annexe 2 : Spectre de masse en mode IE de l'épi-menthofurolactone.



Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* (Req.) Greuter

Sylvain Sutour, Pascale Bradesi, Dominique de Rocca-Serra, Joseph Casanova and Félix Tomi*

Université de Corse–CNRS, UMR 6134 SPE, Equipe Chimie et Biomasse, Route des Sanguinaires, 20000 Ajaccio, France

Received 31 October 2007; Revised 20 December 2007; Accepted 10 January 2008

ABSTRACT: A detailed analysis of *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* (Req.) Greuter essential oil (EO) and hydrolate extract (HE) was carried out by combination of GC–RI, GC–MS and ¹³C-NMR spectroscopy. After fractionation by column chromatography, 51 components of the EO and 27 components of the HE, accounting for 96.1% and 98.3%, respectively, were identified. The main components were pulegone (44.4% and 14.8%) and *cis-cis-p*-menthenolide (27.3% and 67.3%). This α -methylene- γ -butyrolactone, reported for the first time as a natural product, was isolated and its structure elucidated by 1D and 2D NMR spectroscopy. Both EO and HE exhibited a fair antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. Copyright © 2008 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS: *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* (Req.) Greuter; essential oil; hydrolate; *cis-cis-p*-menthenolide; antibacterial activity; 2D NMR

Introduction

The genus *Mentha* L., family Labiatae, includes 18 species and 11 hybrids, among which several species are cultivated for essential oil production. Indeed, mint oils are among the most important essential oils produced in the world and their values are exceeding 400 million of \$US/year. For instance, *M. canadensis* L. produces cornmint oil (>15 000 tonnes/year), the most important source of (–) menthol; *M. piperita* L. produces peppermint oil (>3500 tonnes/year), constituted of menthol, menthone and menthyl acetate as main components; *M. spicata* ssp. *spicata*, *M. viridis* (native spearmint) and *M. gracilis* (scotch spearmint) produce mostly carvone-rich oils, although different compositions have been reported; *M. citrata* is a source of linalool and linalyl acetate; *M. pulegium* produces the so called ‘pennyroyal oil’, which is a pulegone-rich oil; finally, the composition of *M. aquatica* oils is dominated by menthofuran.¹

M. suaveolens ssp. *suaveolens* (L.) Hudson [syn = *Mentha rotundifolia* (L.) Hudson] commonly known as ‘pineapple mint’, grows in wet places in western Europe (from Denmark) to eastern Europe and in northern Africa¹ as well as in the temperate countries of the Southern hemisphere.² It is always used as condiment and it has been applied in the traditional medicine for a wide range of actions: tonic, stimulative, stomachic, carminative, analgesic, choleric, antispasmodic, antiinflammatory, sedative, hypotensive and

insecticidal.^{3,4} For instance, high values of AChE (acetylcholine esterase) inhibitory activity were found using decoctions of *M. suaveolens*.⁵

The composition of the essential oil (EO) of *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* (L.) Hudson has been largely investigated and exhibited a tremendous chemical variability, the main components being pulegone, carvone, piperitone oxide, dihydrocarvone, 1,2-epoxymenthyl acetate or *cis*-piperitol.¹ The pulegone-rich oil of *M. suaveolens* from Morocco exhibited a fair antimicrobial activity.⁶ The piperitol-rich oil of Spanish *M. rotundifolia* was found to have a CNS effect similar to those produced by somnifacients.^{3,7}

Mentha suaveolens ssp. *insularis* (Req.) Greuter is an endemic species to the islands of the occidental Mediterranean Sea. In Corsica, it is known as ‘mintrastella’ and grows wild in wet places. Leaves of *M. suaveolens* ssp. *insularis* are longer and greener than those of *M. suaveolens* ssp. *suaveolens*. They are not sessile but have a short petiole (<0.5 cm), which clearly differentiates the two subspecies. The flowers are whitish in a cylindrical spike, whereas those of *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* are more rose-like.^{8–10} No studies have been reported in the literature on the essential oil of *M. suaveolens* ssp. *insularis*.

The aim of the present study was to investigate the chemical composition of the EO from *M. suaveolens* ssp. *insularis* (Req.) Greuter from Corsica. Beside botanical parameters, knowledge of the volatile secondary metabolites produced by the plant could be helpful in differentiating the two subspecies. The composition of the hydrolate extract (HE), which contains a part of the hydrosoluble

* Correspondence to: F. Tomi, Université de Corse–CNRS, UMR 6134 SPE, Equipe Chimie et Biomasse, Route des Sanguinaires, 20000 Ajaccio, France. E-mail: felix.tomi@univ-corse.fr
Contract/grant sponsor: Collectivité Territoriale de Corse, France

volatiles, was investigated in parallel. The EO and HE were tested for their antibacterial activity against a panel of Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Experimental

Plant Material and Essential Oil Extraction

The EO and the hydrolate from the same batch of *M. suaveolens* ssp. *insularis* were supplied by the society 'U Mandriolu' Sarrola Carcopino' (Corsica, France). Aerial parts (15 kg) were collected during the vegetative phase (May 2005) in the surrounds of Sarrola Carcopino, near Ajaccio (Corsica). They were dried for 1 day at room temperature, away from direct sunlight, and submitted to dry-vapour distillation in a pilot plant. The EO (20 ml) and the hydrolate (10 l) from the same distillation were stored in the dark at 4 °C. A portion of the hydrolate (3.5 l) was extracted with diethyl oxide (3 × 700 ml) and the organic layer was dried over Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure, yielding the hydrolate extract (HE). In parallel, three individual samples of *M. suaveolens* ssp. *insularis* were collected during June 2007 near Ajaccio. They were submitted to water distillation for 3 h using a Clevenger-type apparatus (yields: 0.12–0.15% w/w). The mint was identified as *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* by Mrs Laetitia Hugot, and a specimen was deposited in the herbarium of the Office de l'Environnement de la Corse.

Chromatographic Fractionation of the EO and HE

An oil sample (5 g) was chromatographed on a silica gel column (200–500 µm, 90 g) and 13 fractions (F1–F13 = 0.264, 0.111, 0.931, 1.093, 0.156, 0.085, 0.095, 1.502, 0.216, 0.040, 0.285, 0.040 and 0.013 g, respectively) were eluted with a gradient of solvents of increasing polarity (pentane:diethyl oxide 100:0–0:100). The fraction F8 was chromatographed once again on a silica gel column (35–70 µm, 25 g) and four fractions (F8.1–F8.4 = 0.021; 0.933; 0.093; 0.238 g) were eluted with a gradient of solvents of increasing polarity. The fraction F8.3 was chromatographed on a Sephadex gel column (LH-20; 5.4 g) and seven fractions (F8.3.1–F8.3.7 = 20, 13, 6, 13, 12, 15, 5 mg) were eluted with dichloromethane.

A sample of the HE (3.5 g) was chromatographed on a silica gel column (200–500 µm, 60 g) and five fractions (F'1–F'5 = 0.041, 0.466, 2.902, 0.043, 0.054 g) were eluted with a gradient of solvents of increasing polarity (pentane: diethyl oxide 100:0–0:100). The fraction F'3 was partitioned and one part (1.56 g) was chromatographed on a silica gel column (35–70 µm, 22 g) and eight fractions (F'3.1–F'3.8 = 0.270, 0.066, 0.131, 0.113, 0.668, 0.062, 0.139, 0.051 g) were eluted with a gradient of solvents of increasing polarity. The fraction F'3.8 was then chromatographed on a silica gel column (35–70 µm, 2.0 g) and seven fractions (F'3.8.1–F'3.8.7 = 9, 6, 6, 10, 8, 6, 4 mg) were obtained.

GC Analysis

GC analysis was carried out using a Perkin-Elmer Autosystem apparatus equipped with two flame ionization detectors (FIDs)

and fused capillary columns (50 m × 0.22 mm i.d., film thickness 0.25 µm), BP-1 (polydimethylsiloxane) and BP-20 (polyethyleneglycol). The oven temperature was programmed from 60 °C to 220 °C at 2 °C/min and then held isothermal (20 min); injector temperature, 250 °C (injection mode, split 1/60); detector temperature, 250 °C; carrier gas, helium (0.8 ml/min). The relative proportions of the essential oil constituents were expressed as percentages obtained by peak area normalization, without using correcting factors. Retention indices (RI) were determined relative to the retention times of a series of *n*-alkanes with linear interpolation (Target Compounds software from Perkin-Elmer).

GC–MS Analysis

The EO and HE were analysed with a Perkin-Elmer TurboMass detector (quadrupole), directly coupled to a Perkin-Elmer Autosystem XL, equipped with a fused-silica capillary column (60 m × 0.22 mm i.d., film thickness 0.25 µm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane). Carrier gas, helium at 1 ml/min; split, 1/80; injection volume, 0.2 µl; injector temperature, 250 °C; oven temperature programmed from 60 °C to 230 °C at 2 °C/min and then held isothermal (45 min); ion source temperature, 150 °C; energy ionization, 70 eV; electron ionization mass spectra were acquired over the mass range 35–350 Da.

¹³C-NMR Analysis

All NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 Fourier Transform spectrometer, equipped with a 5 mm probe, in deuterated chloroform, with all shifts referred to internal tetramethylsilane (TMS). ¹³C-NMR spectra of mixtures (EO, HE or fractions of chromatography) were recorded with the following parameters: pulse width, 4 µs (flip angle 45°); acquisition time, 2.7 s for 128 K data table with a spectral width of 25 000 Hz (250 p.p.m.); CPD mode decoupling; digital resolution, 0.183 Hz/pt. The number of accumulated scans was 3000 for most mixtures (when available, around 40 mg sample in 0.5 ml CDCl₃). ¹H-, ¹³C- and 2D-NMR spectra of pure compounds were recorded using Bruker microprograms.

Identification of Components

Identification of the individual components was based on: (a) comparison of their GC retention indices (RI) on apolar and polar columns with those of authentic compounds or literature data; (b) computer matching with a laboratory-made and commercial mass spectral libraries^{11–13} and comparison of spectra with literature data;^{14–16} (c) comparison of the signals in the ¹³C-NMR spectra of the mixtures with those of reference spectra compiled in the laboratory spectral library, with the help of laboratory-made software.¹⁷

Otherwise, 8-hydroxy-*p*-menth-4-en-3-one 35 (7.9% of the fraction F10) was suggested by MS and confirmed by comparison of its ¹³C-NMR data with those reported in the literature.¹⁸ ¹³C-NMR, δ p.p.m. = 202.30 (C3), 143.78 (C4), 143.57 (C5), 71.83 (C8), 47.48 (C2), 34.15 (C6), 30.13 (C1), 29.07 (C9), 28.87 (C10), 20.97 (C7).

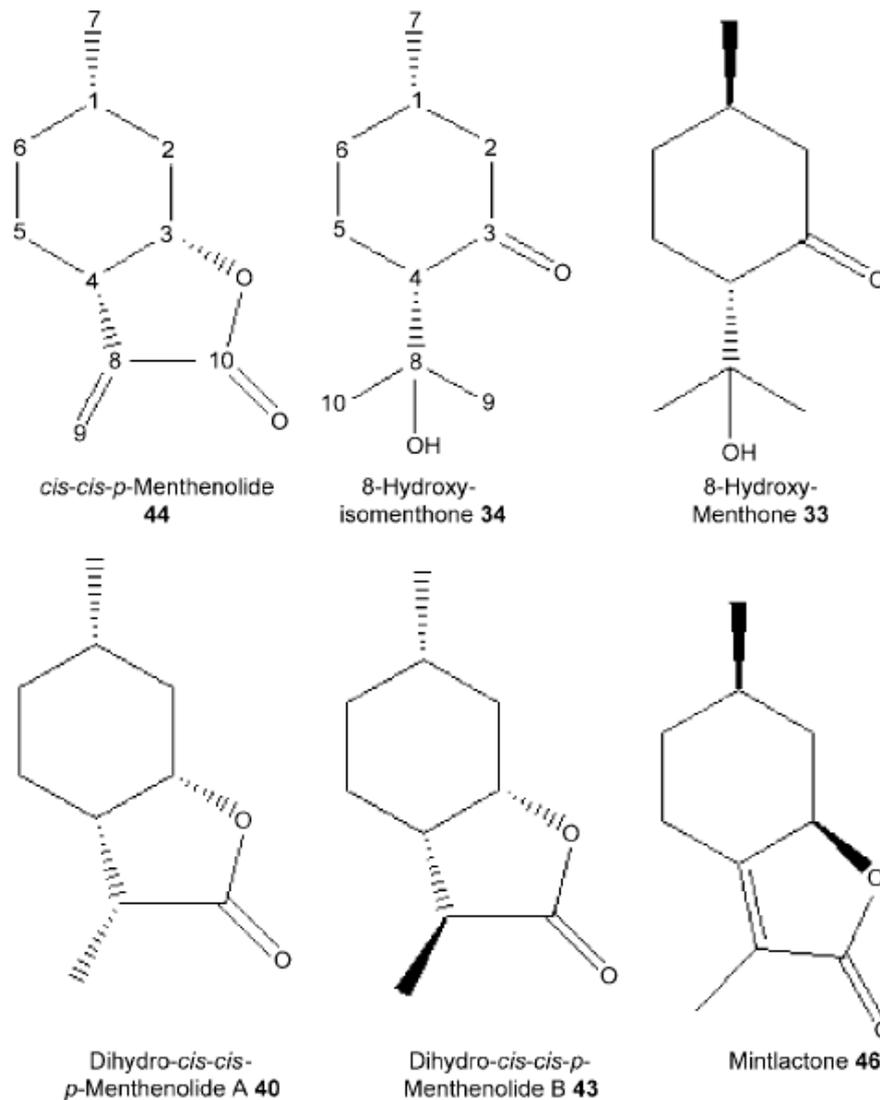


Figure 1. Structures of compounds 33, 34, 40, 43, 44 and 46

Three compounds (Figure 1) whose mass spectra were not present in commercial and laboratory-made libraries were identified by computer matching of the ^{13}C -NMR chemical shift values in the spectrum of each fraction of chromatography with those of pure compound spectra reported in the literature and compiled in a laboratory-constructed library of ^{13}C -NMR data:

8-Hydroxy-menthone 33¹⁹ (34% of the fraction F'3.8.7). ^{13}C -NMR, δ , p.p.m. = 215.24 (C3), 71.31 (C8), 58.72 (C4), 51.48 (C2), 35.55 (C1), 33.88 (C6), 28.70 (C5), 28.43 (C9), 25.71 (C10), 22.25 (C7).

Dihydro-cis-cis-p-menthenolides A 40 and *B 43*²⁰ (1.1% of the fraction F'3.1 and 2.0% of the fraction F'3.6): 40: ^{13}C -NMR, δ , p.p.m. = 179.72 (C10), 77.48 (C3), 41.67 (C4), 37.76 (C2), 35.26 (C8), 29.42 (C1), 28.65 (C6), 23.99 (C5), 22.06 (C7), 13.23 (C9); 43: ^{13}C -NMR, δ , p.p.m. = 179.86 (C10), 77.91 (C3), 41.30 (C8), 38.77 (C4), 32.93 (C2), 28.78 (C6), 25.13 (C1), 19.76 (C7), 17.27 (C5), 9.76 (C9).

Finally, two components, 8-hydroxy-isomenthone 34 and *cis-cis-p*-menthenolide 44, could not be identified by computer matching against commercial or laboratory-made MS and ^{13}C -NMR spectral data libraries. The two compounds were isolated by repeated chromatography and submitted to MS and NMR analysis; the spectral data (MS, ^1H -, ^{13}C and 2D-NMR) and the detailed analysis are reported in Results and Discussion.

Antibacterial Tests

The essential oil was tested against 11 bacterial strains: five Gram-negative, *Enterobacter cloacae* (60.85T), *Escherichia coli* (54.8T), *Salmonella enterica* (55.132), *Serratia marcescens* (58.14), *Pseudomonas aeruginosa* (A22); and six Gram-positive, *Bacillus cereus* (78.3), *Bacillus subtilis* (52.65), *Staphylococcus aureus* (53.156), *Staphylococcus epidermidis* (53.126), *Streptococcus*

bovis (102302) and *Enterococcus faecalis* (76.117). The bacteria were supplied by Institute Pasteur (Paris).

Antibacterial activity of the essential oils was assayed using the agar disc diffusion method.²¹ A suspension of the tested microorganism (0.1 ml 10⁸ cells/ml) was spread onto the surface of Mueller-Hinton agar plates. Filter paper discs (6 mm in diameter) were soaked with 15 µl filter-sterilized fractions, using a 0.45 µm membrane filter and 5 µl dimethyl sulphoxide (DMSO) and placed on the surfaces of the inoculated plates. Ciprofloxacin (bioMérieux, 5 µg) was used as the positive control and DMSO as the negative control. After incubation at 37 °C for 24 h, the diameters of the inhibition zones were measured (mm). Each test was carried out in triplicate.

Results and Discussion

Chemical Composition of the EO and HE of *M. suaveolens* ssp. *insularis*

Aerial parts of *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* produced, by dry vapour distillation, an almost colourless essential oil (yield 0.13% v/w on a dry weight basis) for plants harvested before flowering. The bulk sample was submitted to repeated column chromatography. The EO was analysed by GC-RI, GC-MS and ¹³C-NMR and all the fractions of chromatography were analysed by GC-RI and ¹³C-NMR. In total, 51 components, accounting for 96.1% of the EO, were identified (Table 1). Most compounds were identified by comparison of their spectral data (MS and/or NMR) with those of authentic compounds compiled in our laboratory-made MS and ¹³C-NMR spectral data libraries. However, the second most abundant component of the EO (**44**, 27.3%, RI = 1409/2218) remained unidentified. Consequently, the compound was isolated by repeated chromatography on silica gel (purity >96%) and submitted to a full set of NMR experiments. Total assignment of proton and carbon chemical shifts is reported in Table 2. The molecular formula, C₁₀H₁₄O₂, of compound **44** was deduced from the molecular ion (*m/z* = 166, EI-MS) and distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT) experiments (2 C, 3 CH, 4 CH₂, 1 CH₃). The chemical shifts of protons and carbons indicated the occurrence of a carbonyl group, an exocyclic methylene and a carbon bearing an oxygen atom. Obviously, the skeleton of that molecule contained two rings and the spectral data suggested a methylene lactone. The structure, reported in Figure 1, was established by analysis of the proton-carbon correlations observed in the HSQC and HMBC spectra. The relative stereochemistry of the ring junction and the substituents of **44** was deduced on the basis of the multiplicity and coupling constant values of the cyclohexanic protons, particularly H2a and H3. Indeed, the signal of H2a (δ = 0.87 p.p.m., td; 13.1, 10.6 Hz) exhibited two large coupling constants, according to an anticoplanar stereochemistry, which confirmed the *cis* stereochemistry

of the methyl group vs. the cyclopentane ring. Similarly, the signal of proton H3 (δ = 4.69 p.p.m., ddd; 10.6; 7.3; 6.3 Hz) exhibited only a doublet with a large coupling constant, which confirmed the *cis* junction of the two rings. Consequently, compound **44** is *cis-cis*-hexahydro-6-methyl-3-methylene-2(3*H*)benzofuranone, for which we suggest the name *cis-cis-p*-menthenolide. Search in the computerized literature confirmed the structure and the stereochemistry of that compound, already described during the synthesis of mintlactone and isomintlactone from neo-isopulegol.²² Conversely, compound **44** was not previously identified as a natural product. It is noticeable that the chemical compositions of the three individual laboratory-distilled samples were close to that of the EO distilled in the pilot plant. These samples were characterized by the association of pulegone **32** (37.9–48.3%) and *cis-cis-p*-menthenolide **44** (23.0–25.5%).

The volatiles of the hydrolate belonging to the same batch of plants were also investigated. They were extracted with diethyl oxide (yield = 0.18% w/v) and analysed by a combination of GC-RI, GC-MS and ¹³C-NMR. In total, 27 components, accounting for 98.3% of the extract, were identified (Table 1). The main component of the HE was by far *cis-cis-p*-menthenolide **44** (67.3%), while pulegone **32** accounted for 14.8% of the extract. In order to identify minor components, the extract was fractionated on silica gel and the chromatography fractions analysed by GC-RI and ¹³C-NMR. A few compounds (**33**, **40** and **41**, Figure 1) were identified by comparison with literature data.^{19,20} Compound **33** was identified as 8-hydroxy-menthone; it exhibited the same mass spectrum as **34**, suggesting the occurrence of two isomers. After repeated chromatography on silica gel, compounds **33** and **34** were obtained as a mixture (1:9). The purity of **34** was sufficient to allow complete 1D and 2D NMR analyses and compound **34** was identified as 8-hydroxy-isomenthone (Table 3). These two compounds are present at trace levels in the essential oil from *Schizonepeta tenuifolia* Briq.²³ and 8-hydroxy-menthone at a bigger level (1.3%) in the oil from *Hesperozygis ringens* (Benth.).¹⁸

The composition of both the EO and the HE of *M. suaveolens* ssp. *insularis* was dominated by *p*-menthane oxygenated monoterpenes (80.1 and 93.4%, respectively). Pulegone and *cis-cis-p*-menthenolide were the major components in both mixtures and their respective percentages probably illustrated the difference of solubility of each compound in water. Monoterpene and sesquiterpene hydrocarbons were minor components (limonene 4.3% excepted), accounting for 8.5 and 1.4%, respectively, of the EO. Moreover, they were totally absent in the HE. The occurrence should be mentioned in the HE of the two isomers of 8-hydroxy-menthone at appreciable amounts (3.0% and 1.8%, respectively) and the *cis-cis*-dihydro-*p*-menthenolides A and B, present at lower levels (0.1% each).

Obviously, the investigated EO of *M. suaveolens* ssp. *insularis* exhibits some similarities with the EO of

Table 1. Composition of the essential oil (EO) and the hydrolate extract (HE) of *M. suaveolens* ssp. *insularis*

| No. | Constituents | RI ^{lit} | RI _a | RI _p | EO (%) | HE (%) | Identification |
|-----|--|-------------------|-----------------|-----------------|--------|--------|-----------------------------|
| 1 | (<i>Z</i>)-Hex-3-en-1-ol | 855 ^a | 851 | 1382 | 0.4 | – | RI, MS |
| 2 | α -Thujene | 925 ^b | 929 | 1023 | tr | – | RI, MS |
| 3 | α -Pinene | 932 ^b | 930 | 1026 | 0.7 | – | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 4 | Camphene | 948 ^b | 943 | 1071 | 0.4 | – | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 5 | Oct-1-en-3-ol | 961 ^c | 959 | 1447 | 0.5 | 0.7 | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 6 | Sabinene | 965 ^b | 965 | 1124 | 0.5 | – | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 7 | β -Pinene | 970 ^d | 971 | 1114 | 1.0 | – | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 8 | Myrcene | 983 ^b | 981 | 1164 | 0.7 | – | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 9 | <i>p</i> -Cymene | 1015 ^b | 1012 | 1273 | tr | – | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 10 | 1,8-Cineole* | 1017 ^b | 1020 | 1211 | 1.3 | 1.3 | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 11 | Limonene* | 1022 ^b | 1020 | 1207 | 4.3 | – | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 12 | (<i>Z</i>)- β -Ocimene | 1026 ^d | 1026 | 1236 | 0.8 | – | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 13 | (<i>E</i>)- β -Ocimene | 1037 ^d | 1036 | 1251 | 0.1 | – | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 14 | <i>trans</i> -Sabinene hydrate | 1059 ^e | 1050 | 1454 | tr | – | RI, MS |
| 15 | <i>p</i> -Menth-3,8-diene | 1070 ^f | 1059 | 1266 | tr | – | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 16 | Terpinolene | 1083 ^b | 1078 | 1284 | tr | – | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 17 | <i>cis</i> -Sabinene hydrate | 1091 ^g | 1082 | 1545 | 0.2 | 0.2 | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 18 | <i>trans-p</i> -Menth-2,8-dien-1-ol | 1109 ^h | 1103 | 1628 | – | 0.1 | RI, MS |
| 19 | <i>cis-p</i> -Menth-2,8-dien-1-ol | 1122 ^a | 1117 | 1669 | – | 0.1 | RI, MS |
| 20 | <i>p</i> -Menth-3-en-8-ol | 1140 ^b | 1131 | 1605 | 0.6 | 0.4 | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 21 | Neo-isopulegol | 1144 ⁱ | 1141 | 1562 | tr | – | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 22 | Menthofurane | 1150 ^b | 1147 | 1485 | 1.0 | – | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 23 | <i>cis</i> -Isopulegone* | 1148 ^j | 1149 | 1572 | 0.3 | 0.9 | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 24 | <i>trans</i> -Isopulegone* | 1149 ^j | 1149 | 1583 | 1.4 | 0.3 | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 25 | Borneol* | 1154 ^b | 1149 | 1701 | 1.9 | 1.7 | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 26 | Terpinen-4-ol | 1170 ^b | 1161 | 1600 | tr | 0.3 | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 27 | Neois-isopulegol | 1166 ^k | 1165 | 1610 | 2.4 | 1.4 | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 28 | Myrtenal | 1173 ^b | 1169 | 1628 | 0.5 | 0.2 | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 29 | α -Terpineol | 1177 ^b | 1172 | 1697 | 0.2 | 0.3 | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 30 | Neois-menthol | 1173 ^l | 1174 | 1626 | tr | – | RI, ¹³ C-NMR |
| 31 | <i>cis-p</i> -Menth-1(7),8-dien-2-ol | 1213 ^a | 1212 | 1871 | tr | – | RI, MS |
| 32 | Pulegone | 1214 ^d | 1218 | 1651 | 44.4 | 14.8 | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 33 | 8-Hydroxy-menthone | 1231 ⁱ | 1222 | 1764 | tr | 3.0 | RI, ¹³ C-NMR |
| 34 | 8-Hydroxy-isomenthone | 1238 ^m | 1239 | 1821 | tr | 1.8 | RI, ¹³ C-NMR |
| 35 | 8-Hydroxy- <i>p</i> -menth-4-en-3-one | 1264 ⁱ | 1256 | 1908 | tr | 0.2 | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 36 | Piperitone | 1315 ^b | 1309 | 1927 | 1.4 | 2.2 | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 37 | Eugenol* | 1327 ⁿ | 1333 | 2171 | 0.2 | 0.2 | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 38 | Piperitone oxide* | 1332 ^c | 1333 | 1963 | 0.9 | 0.1 | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 39 | <i>cis</i> -Jasmone | 1378 ^o | 1367 | 1947 | 0.6 | 0.4 | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 40 | <i>cis-cis</i> -Dihydro- <i>p</i> -menthenolide A* | – | 1376 | 2108 | – | 0.1 | ¹³ C-NMR |
| 41 | β -Bourbonene | 1386 ^o | 1385 | 1518 | tr | – | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 42 | β -elemene | 1389 ^o | 1388 | 1588 | tr | – | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 43 | <i>cis-cis</i> -Dihydro- <i>p</i> -menthenolide B* | – | 1392 | 2154 | – | 0.1 | ¹³ C-NMR |
| 44 | <i>cis-cis-p</i> -Menthenoilide | 1407 ^q | 1409 | 2218 | 27.3 | 67.3 | RI, ¹³ C-NMR |
| 45 | (<i>E</i>)- β -Caryophyllene | 1421 ^o | 1417 | 1594 | 0.2 | 0.2 | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 46 | Mintlactone | 1449 ^p | 1453 | 2320 | 0.2 | tr | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 47 | α -Humulene | 1455 ^o | 1458 | 1668 | 0.1 | – | RI, ¹³ C-NMR |
| 48 | (<i>E</i>)-Methylisoeugenol | 1466 ^o | 1459 | 2184 | 0.2 | – | RI, ¹³ C-NMR |
| 49 | Germacrene D | 1479 ^o | 1478 | 1711 | 0.5 | – | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 50 | Bicyclogermacrene | 1494 ^o | 1494 | 1727 | tr | – | RI, MS |
| 51 | β -Bisabolene | 1503 ^o | 1500 | 1727 | tr | – | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 52 | <i>cis</i> -Calamenene | 1517 ^o | 1510 | 1833 | tr | – | RI, ¹³ C-NMR |
| 53 | δ -Cadinene | 1520 ^o | 1514 | 1757 | tr | – | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 54 | Elemicine | 1521 ^r | 1515 | 2229 | 0.3 | 0.2 | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| 55 | Viridiflorol | 1580 ^d | 1584 | 2085 | 0.6 | – | RI, MS, ¹³ C-NMR |
| | Total | | | | 96.1 | 98.3 | |

Order of elution and percentages are given on apolar column (BP-1), except for compounds with an asterisk (*), percentage on BP-20.

RI^{lit}, retention indices from literature; RI_a, RI_p, retention indices measured on apolar and polar columns, respectively; tr, traces.

^a Ref 29; ^b ref 30; ^c ref 31; ^d ref 32; ^e ref 33; ^f ref 34, retention index on DB-5 column; ^g ref 35; ^h ref 36; ⁱ ref 37; ^j ref 38, compounds identified by ¹³C-NMR in the EO of *Clinopodium ascendens*; ^k ref 39; ^l ref 18; ^m ref 40; ⁿ ref 41; ^o ref 15; ^p ref 42; ^q ref 43; ^r ref 44.

*RIs of pure compounds (see Experimental); *RIs not available.

Table 2. ^1H - and ^{13}C -NMR spectral data, ^1H - ^1H -COSY and -HMBC correlations and MS spectral data for *cis-cis-p*-menthenolide, **44**

| C | δ (^{13}C) (p.p.m.) | DEPT | H | δ (^1H) (p.p.m.) | Multiplicity (J , Hz) | COSY | HMBC |
|-----|--|-----------------|---|---------------------------------------|-----------------------------|----------------|------------------|
| C1 | 28.93 | CH | – | 1.35 | m | 7 | C-7, 5, 6, 2, 4 |
| C2 | 39.03 | CH ₂ | a | 0.87 | td (13.1; 10.6) | 3, 2b | C-1, 3, 4, 7 |
| | | | b | 2.17 | dm (13.1) | 3, 2a | C-1, 3, 4, 7 |
| C3 | 77.56 | CH | – | 4.69 | ddd (10.6; 7.3; 6.3) | 4, 2b, 2a | C-4, 10, 8 |
| C4 | 38.98 | CH | – | 3.14 | qd (6.3; 3.4) | 9a, 9b, 5a, 5b | C-8, 3 |
| C5 | 23.88 | CH ₂ | b | 2.18 | dm (15.0) | 5a | C-1, 3, 4, 6, 8 |
| | | | a | 1.77 | ddd (15.0; 13.2; 6.3; 4.3) | 6a, 6b, 5a, 4 | C-1, 3, 4, 6, 8 |
| C6 | 28.57 | CH ₂ | a | 0.92 | td (13.2; 11.8; 4.3) | 6b, 5a, 5b, 1 | C-1, 5 |
| | | | b | 1.45 | dm (13.2) | 6a, 5a, 5b, 1 | C-1, 5, 7, 4, 2 |
| C7 | 21.96 | CH ₃ | – | 0.90 | d (6.7) | 1 | C-1, 6, 2 |
| C8 | 137.55 | C | – | – | – | – | – |
| C9 | 119.89 | CH ₂ | ' | 5.50 | d (3.4) | 9', 4 | C-4, 3, 5, 8, 10 |
| | | | " | 6.30 | d (3.4) | 9", 4 | C-4, 3, 5, 8, 10 |
| C10 | 170.85 | C | – | – | – | – | – |

EI-MS: 70 eV, m/z (rel. int.): 166(20), 138(50), 137(20), 123(20), 120(28), 110(20), 109(70), 107(17), 96(20), 95(45), 94(67), 91(25), 82(25), 81(70), 79(100), 77(40), 68(30), 67(70), 55(65), 54(60), 53(53), 52(48), 41(86), 39(80).

a, axial; b, equatorial.

Table 3. ^1H - and ^{13}C -NMR spectral data, ^1H - ^1H -COSY and -HMBC correlations and MS spectral data for 8-hydroxy-isomenthone, **34**

| C | δ (^{13}C) (p.p.m.) | DEPT | H | δ (^1H) (p.p.m.) | Multiplicity (J , Hz) | COSY | HMBC |
|-----|---------------------------------------|-----------------|---|------------------------------------|--------------------------|------|--------------------|
| C1 | 31.57 | CH | – | 2.42 | m | | |
| C2 | 49.56 | CH ₂ | a | 2.53 | ddd (13.4; 5.8; 0.5) | 2b | C-1, 3, 6, 7 |
| | | | b | 2.13 | ddd (13.4; 3.0; 2.0) | 2a | C-1, 3, 4, 6, 7, 8 |
| C3 | 216.20 | C | – | – | – | | |
| C4 | 59.03 | CH | – | 2.39 | ddd (12.3; 6.0; 1.2) | 5b | C-3, 5, 8, 9, 10 |
| C5 | 24.34 | CH ₂ | a | 1.80 | td (12.3; 4.0) | | C-1, 4, 6, 8 |
| | | | b | 2.05 | dm | | C-4, 6 |
| C6 | 30.64 | CH ₂ | a | 1.92 | dt (12.9; 4.3) | 6b | C-1, 2, 4, 5, 7 |
| | | | b | 1.68 | dm | 6a | C-1, 2, 4, 5 |
| C7 | 18.68 | CH ₃ | – | 0.96 | d (7.1) | 1 | C-1, 2, 6 |
| C8 | 71.59 | C | – | – | – | | |
| C9 | 25.53 | CH ₃ | – | 1.23 | s | | C-4, 5, 8, 9, 10 |
| C10 | 28.49 | CH ₃ | – | 1.23 | s | | C-4, 5, 8, 9, 10 |

EI-MS: 70 eV, m/z (rel. int.): 112(55), 97(25), 70(35), 69(65), 59(35), 56(20), 55(35), 43(100), 41(50), 39(25).

a, axial; b, equatorial.

M. suaveolens ssp. *suaveolens* (syn = *Mentha rotundifolia* (L) Hudson) from north Africa (Algeria, Morocco).^{7,24,25} Indeed, this EO was dominated by pulegone. Noteworthy was the high level of *cis-cis-p*-menthenolide (27.3%), which is not usually found in *Mentha* essential oils¹ and which could be considered, so far, as a marker of the sub-species.

Antibacterial Activity

The antibacterial activity of the essential oil of *M. suaveolens* ssp. *insularis* was assayed against 11 bacteria, using the agar disc diffusion method (Table 4). The greatest inhibition zone diameters were noted for two Gram-positive

Table 4. Antibacterial activity of EO, HE and three essential oil constituents (mean values of the growth inhibition zones, in mm, including the disk diameter of 6 mm)

| Sample | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
|--------------------------------|------------------------|------------------------------|
| EO | 16 | 18 |
| HE | 18 | 20 |
| <i>cis,cis-p</i> -Menthenolide | 18 | 21 |
| Mintlactone | 11 | 11 |
| Pulegone ⁺ | 15 | 17 |
| Pulegone ⁻ | 15 | 17 |
| Ciprofloxacin | 25 | 25 |

bacteria, *Bacillus cereus* (16 mm) and *Staphylococcus aureus* (18 mm). Little or no activity was observed for the rest of the tested strains. Additionally, the HE was tested against the two sensitive bacterial strains and gave slightly better results (18 and 20 mm). In order to identify the compounds responsible for the antibacterial activity, the main components present, pulegone (44.4% in the EO) and *cis-cis-p*-menthenolide (67.3% in the HE), were tested. Commercial pulegone showed fair activity (15 and 17 mm for *B. cereus* and *S. aureus*, respectively), in agreement with results previously reported.³⁶ Moreover, no difference was observed between the enantiomers. Comparatively, *cis-cis-p*-menthenolide, isolated by repeated chromatography (>96%), exhibited slightly higher inhibition zone diameters (18 and 21 mm, respectively). Additionally, mintlactone, usually found in *Mentha piperita* essential oils,¹ had less activity against the two bacteria (11 and 12 mm, respectively). *Cis-cis-p*-menthenolide and mintlactone (Figure 1), bearing the same *p*-menthanolide framework, possess the α - β unsaturated lactone substructure. They differ only by the position of the double bond (exocyclic or intracyclic), which is probably responsible for the difference in antibacterial activity.

Conclusion

This study showed the original composition of the EO and HE from *Mentha suaveolens* ssp. *insularis*, an endemic species to the islands of the occidental Mediterranean sea. The occurrence, as one of the major components, of *cis-cis-p*-menthenolide has not been reported previously. Moreover, this menthanolide was identified for the first time as a natural product. It should be remembered that *p*-menthane lactones are usually found in small quantities.²⁰ Similarly, 8-hydroxy-menthone and its isomer, as well as the two *cis-cis*-dihydro-*p*-menthenolide isomers, although present as minor components, are unusual compounds found in essential oils.

α -Methylen- γ -butyrolactone sesquiterpenes are widespread and present a wide variety of biological and pharmacological activities, as well as an allergenic potency (e.g. contact dermatitis).^{8,27} Conversely, only one α -methylen- γ -butyrolactone monoterpene has been described previously, the paeonilactone B, isolated from roots of *Paeonia albiflora* Pallas var. *trichocarpa* Bunge²⁸. Allergenic potency was not reported for this compound. According to this observation, no allergic skin reactions occurred by contact with EO and HE from *M. suaveolens* ssp. *insularis*.

The EO, the HE and *cis-cis-p*-menthenolide exhibited a fair antibacterial activity against *B. cereus* and *S. aureus* strains. This is an interesting point, as few examples are reported for monoterpene lactones. The difference of antibacterial activity between *cis-cis-p*-menthenolide and mintlactone suggest a structure-activity relationship and confirms the importance of the exocyclic conjugated double bond.

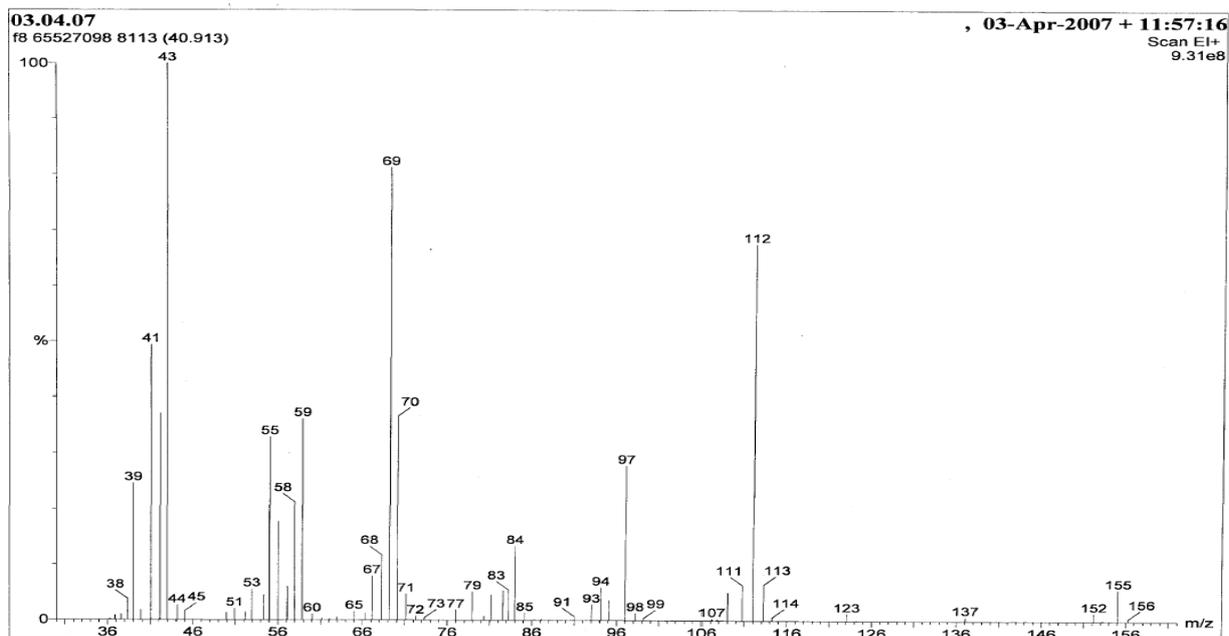
Acknowledgements—We are indebted to Mrs Laetitia Hugot for botanical identification of *Mentha suaveolens* ssp. *insularis*, to Mr P. A. Alessandri from the society 'U Mandriola' for the gift of samples, to Mr J. M. Desjober for recording mass spectra and to the Collectivité Territoriale de Corse for a research grant (to S.S.).

References

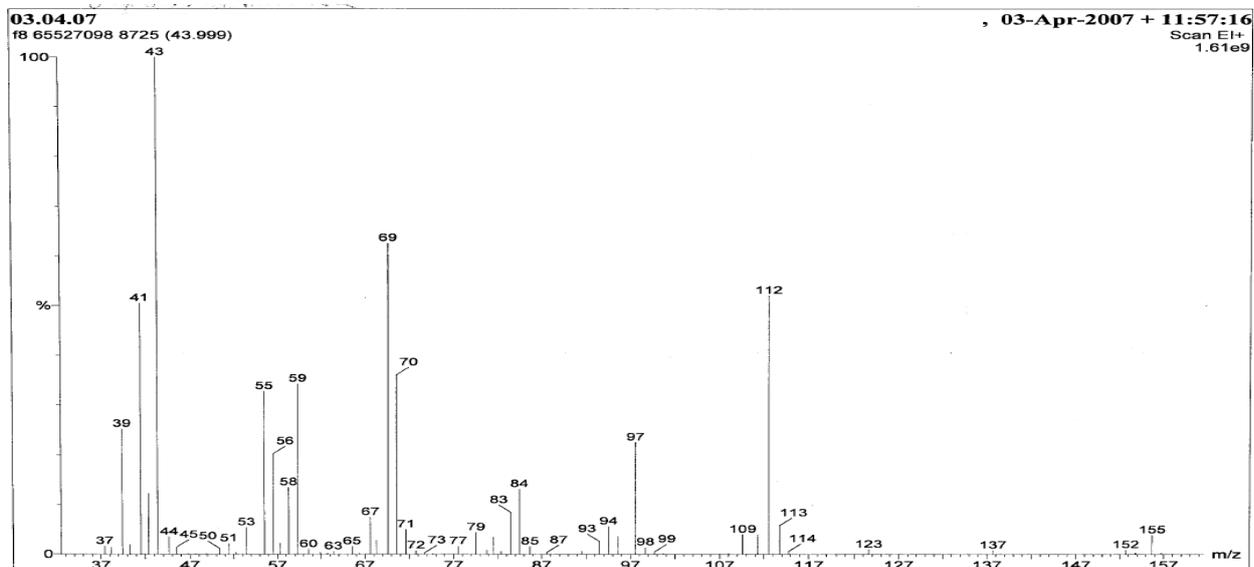
- Lawrence BM. *Mint: The Genus Mentha. Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles*, CRC Press/Taylor & Francis: Boca Raton, FL, 2007.
- Lorenzo D, Paz D, Dellaçassa E *et al.* *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2002; **45**: 519–524.
- Moreno L, Bello R, Primo-Yúfera E *et al.* *Phytother. Res.* 2002; **16**: S10–13.
- Il Idrissi A, Bellakhdar J. *Rev. Maroc. Pharm.* 1989; **5**: 79–88.
- Ferreira A, Proença C, Serralheiro MLM *et al.* *J. Ethnopharmacol.* 2006; **108**: 31–37.
- El Arch M, Satrani B, Farah A *et al.* *Acta Bot. Gallica* 2003; **150**: 267–274.
- Perez Raya MD, Utrilla MP, Navarro MC *et al.* *Phytother. Res.* 1990; **4**: 232–234.
- Bruneton J. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales: Technique et Documentation*, 2nd edn. Lavoisier: Paris, 1993.
- Gamisans J, Jeanmonod D. *Catalogue des Plantes Vasculaires de la Corse*, 2nd edn. Conservatoires et Jardins Botaniques de la Ville de Genève: Chambéry, 1993.
- Gamisans J, Jeanmonod D. *Flora Corsica*. Edisud: Aix-en-Provence, 2007.
- McLafferty FW, Stauffer DB. *Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM*, version 3.10d. *Wiley Registry of Mass Spectral Data*, 6th edn. Palisade: Newfield, 1994.
- König WA, Hochmuth DH, Joulain D. *Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils*. Library of MassFinder 2.1. Institute of Organic Chemistry: Hamburg, 2001.
- NIST/EPA/NIH. *National Institute of Standards and Technology. PC Version 17 of the Mass Spectral Library*. Perkin-Elmer Corporation: Saint Quentin, 1999.
- Adams RP. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy*. Allured: Carol Stream, IL, 2001.
- Joulain D, König WA. *The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons*. E.B.-Verlag: Hamburg, 1998.
- McLafferty FW, Stauffer DB. *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data*, 4th edn. Wiley-Interscience: New York, 1988.
- Tomi F, Bradesi P, Bighelli A *et al.* *J. Magn. Reson. Anal.* 1995; **1**: 253–254.
- von Poser GL, Menut C, Toffoli ME *et al.* *J. Agric. Food Chem.* 1996; **44**: 1829–1832.
- Burkard S, Looser M, Borschberg HJ. *Helv. Chim. Acta* 1988; **71**: 209.
- Gaudin JM. *Tetrahedron* 2000; **56**: 4769–4776.
- Janssen AM, Scheffer JJC, Baerheim Svendsen A. *Planta Med.* 1987; **53**: 395–398.
- Crisp TG, Meyer GA. *Tetrahedron* 1995; **51**: 5831–5846.
- Fujita S, Morishita T. *Yakugaku Zasshi* 1987; **12**: 959–963.
- Brada M, Bezzina M, Marlier M *et al.* *J. Essent. Oil Res.* 2006; **18**: 663–665.
- Ouzmil H, Ghoulami S, Rhajaoui M *et al.* *Phytother. Res.* 2002; **16**: 727–731.
- Flamini G, Cioni PL, Puleio R *et al.* *Phytother. Res.* 1999; **13**: 349–351.
- Picman AK. *Biochem. Syst. Ecol.* 1986; **14**: 255–281.
- Hayashi T, Shinbo T, Shimizu M *et al.* *Tetrahedr. Lett.* 1985; **26**: 3699–3702.
- Jirovetz L, Buchbauer G, Eller G. *J. Essent. Oil Res.* 2007; **19**: 485–489.
- Swigar AA, Silverstein RM. *Monoterpenes Infrared, Mass, ¹H-NMR and ¹³C-NMR Spectra and Kovats Indices*. Aldrich Chemical Company: Milwaukee, 1981.
- Viljoen AM, Petkar S, van Vuuren SF *et al.* *J. Essent. Oil Res.* 2006; **18**: 60–65.

32. Paolini J, Costa J, Bernardini AF. *J. Chromatogr. A* 2005; **1076**: 170–178.
33. Rao RBR. *Indust. Crops Prod.* 1999; **10**: 107–113.
34. Javidnia K, Miri R, Azarpira A et al. *Flavour Fragr. J.* 2003; **18**: 299–300.
35. Vera RR, Chane-Ming J. *Food Chem.* 1999; **66**: 143–145.
36. Salehi P, Sonboli A, Eftekhari F et al. *Biol. Pharm. Bull.* 2005; **28**: 1892–1896.
37. Hongratanaworakit T, Buchbauer G. *Flavour Fragr. J.* 2007; **22**: 443–449.
38. Castilho P, Liu K, Rodrigues AI et al. *Flavour Fragr. J.* 2007; **22**: 139–144.
39. Mimica-Dukic N, Bozin B, Sokovic M et al. *Planta Med.* 2003; **69**: 413–419.
40. Nath SC, Baruah A, Kanjilal PB. *Flavour Fragr. J.* 2006; **21**: 531–533.
41. Adams RP. *Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy*. Allured: Carol Stream, IL, 1995.
42. Frérot E, Bagnoud A, Vuilleumier C. *Flavour Fragr. J.* 2002; **17**: 218–226.
43. Saad HEA, El-Sharkawy SH, Halim AF. *Pharmaceut. Acta Helv.* 1995; **70**: 79–84.
44. Politeo O, Juki M, Milo M. *Croat. Chem. Acta* 2006; **79**: 545–552.

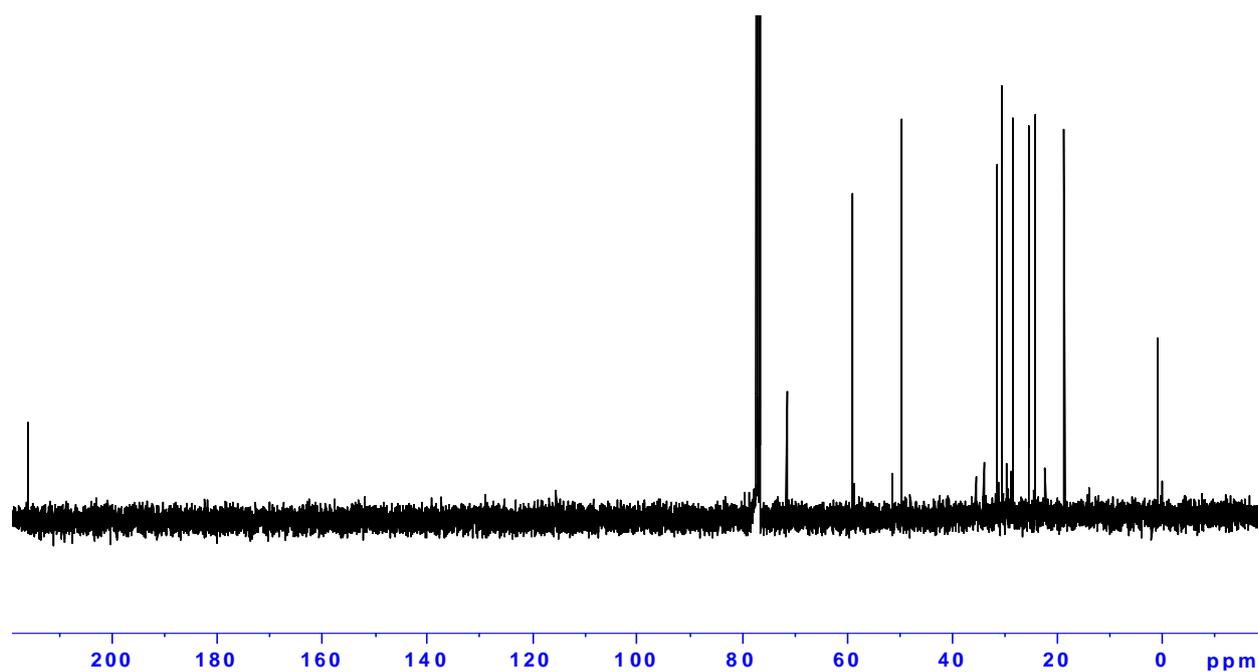
Annexe 4 : Spectre de masse en mode IE de la 8-hydroxy-menthone.



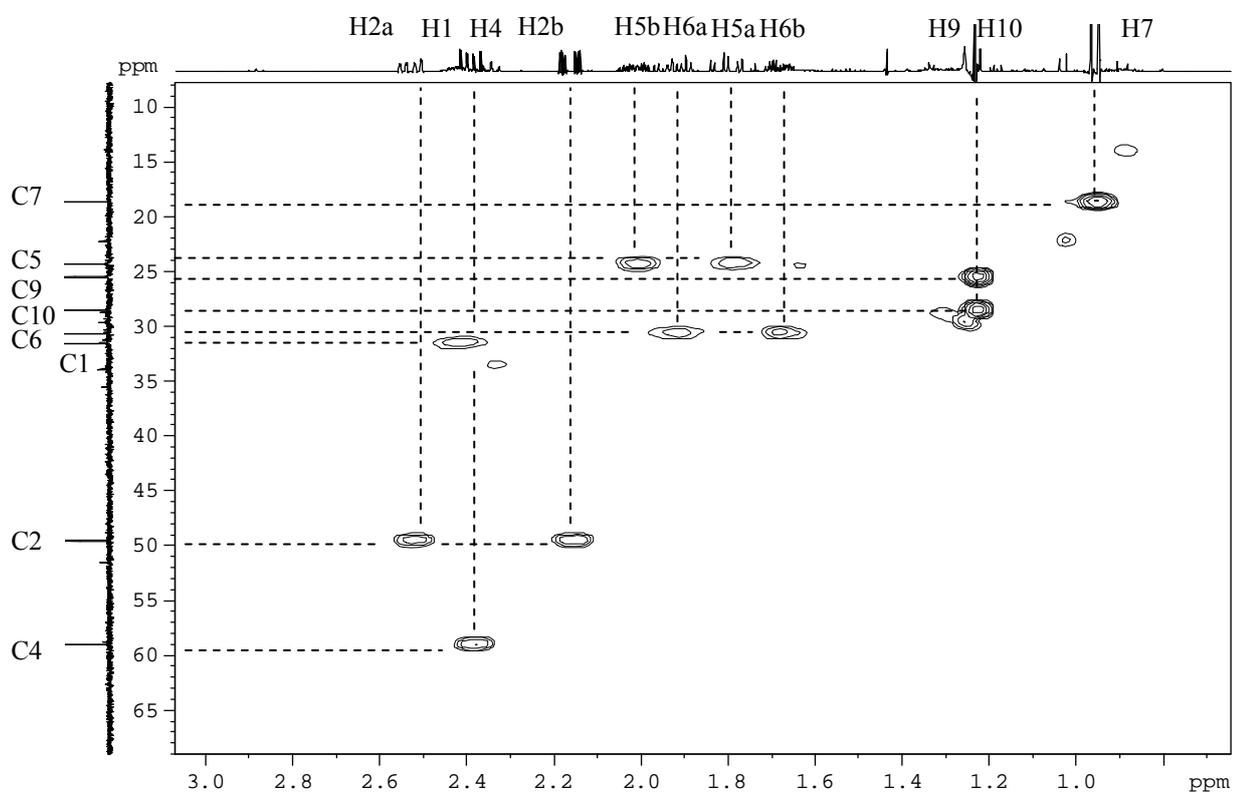
Annexe 5 : Spectre de masse en mode IE de la 8-hydroxy-isomenthone.



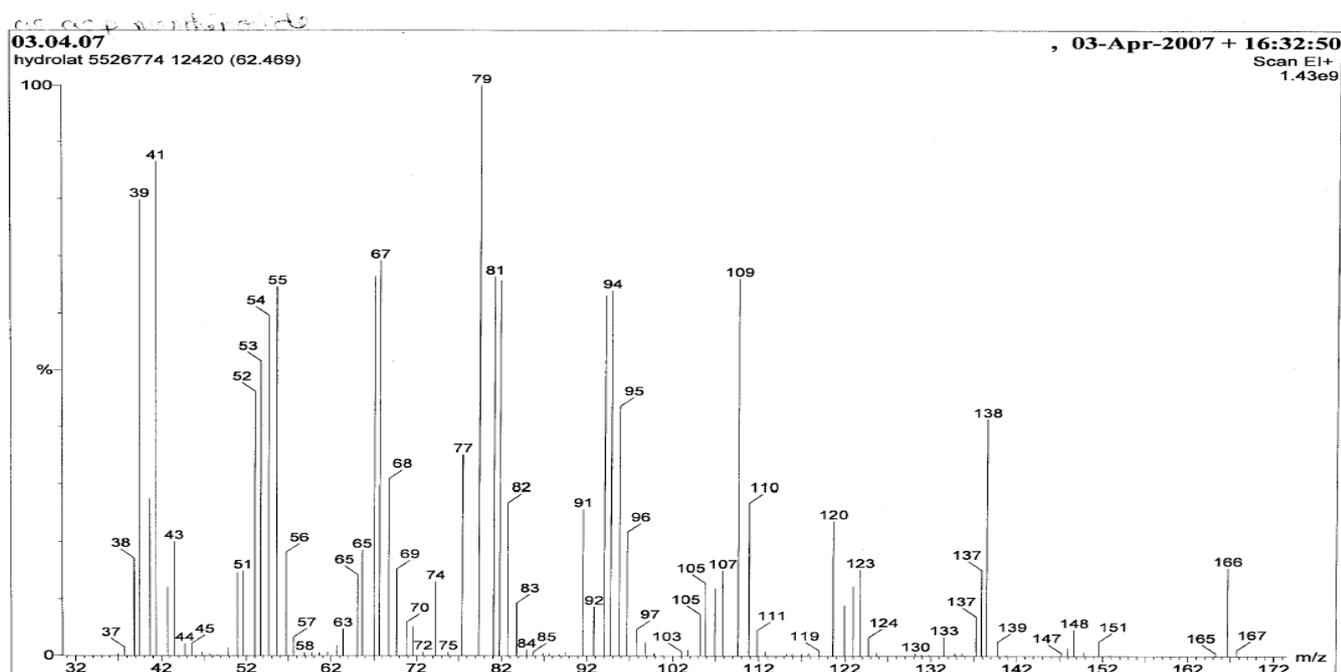
Annexe 6 : Spectre de RMN du ^{13}C de la 8-hydroxy-isomenthone.



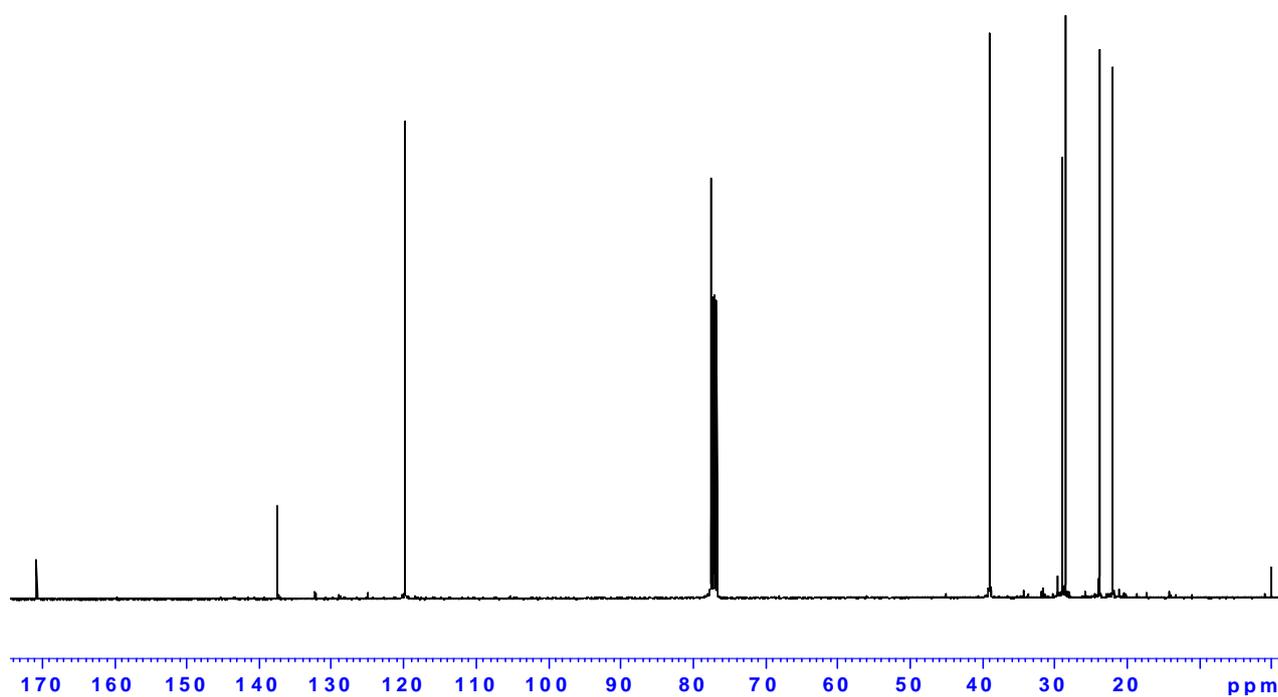
Annexe 6 : Corrélations ^1H - ^{13}C , ^1J de la 8-hydroxy-isomenthone.



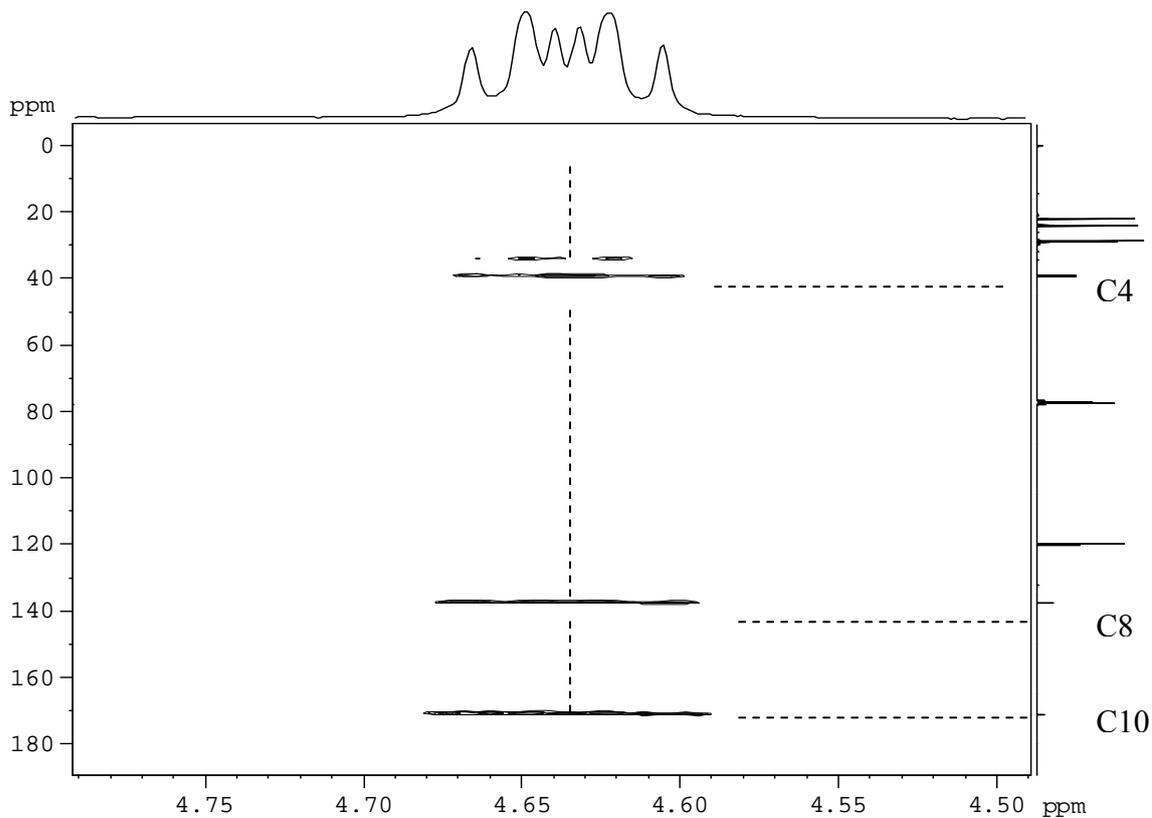
Annexe 7 : Spectre de masse en mode IE de la *cis-cis*-p-menthénolide.



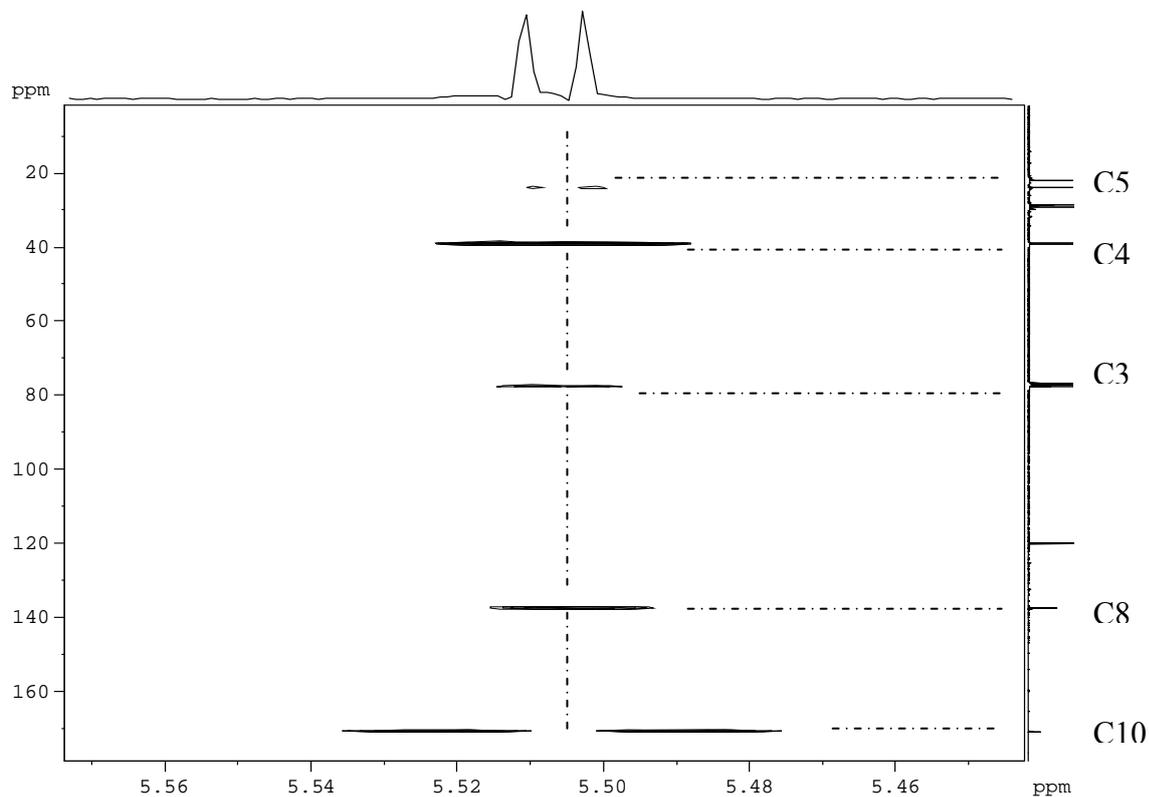
Annexe 8 : Spectre de RMN du ^{13}C de la *cis-cis*-p-menthénolide.



Annexe 9 : Exemple de corrélations HMBC (corrélations $^1\text{H}-^{13}\text{C}$; ^2J , ^3J et ^4J) du proton H3 résonnant à 4,63 ppm de multiplicité de type ddd (13,6 ; 6,7 ; 7,0 Hz).



Annexe 10 : Exemple de corrélations HMBC (corrélations $^1\text{H}-^{13}\text{C}$; ^2J , ^3J et ^4J) du proton H9a résonnant à 5,50 ppm (d ; 3,2 Hz).



Annexe 11 : Composition chimique des 59 échantillons de l'espèce *M. suaveolens* Ehrh.

| Constituants | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 |
|---------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| α -pinène | 0,4 | 0,8 | 1,2 | 1,0 | 1,0 | 0,8 | 0,7 | 1,1 | 1,0 | 0,0 | 0,4 | 0,5 | 1,3 | 1,4 | 1,0 | 1,4 | 1,3 | 1,1 | 0,9 | 0,9 | 0,9 |
| camphène | 0,5 | 0,7 | 0,8 | 0,8 | 0,7 | 0,7 | 0,5 | 0,8 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 0,5 | 0,9 | 0,6 | 0,2 | 0,7 | 0,5 | 0,5 | 0,2 | 0,3 | 0,5 |
| oct-1-èn-3-ol | 0,5 | 1,5 | 0,7 | 0,7 | 0,6 | 0,9 | 0,6 | 1,7 | 2,1 | 1,0 | 1,5 | 0,5 | 2,0 | 0,6 | 2,0 | 1,8 | 1,2 | 1,1 | 1,2 | 0,8 | 1,0 |
| sabinène | 1,0 | 0,7 | 0,8 | 0,4 | 0,4 | 0,8 | 0,9 | 0,9 | 1,0 | 0,0 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 1,0 | 0,7 | 1,9 | 0,9 | 0,7 | 0,4 | 0,6 | 0,6 |
| β -pinène | 0,7 | 1,0 | 1,2 | 1,2 | 1,0 | 0,9 | 0,9 | 1,8 | 1,3 | 0,0 | 0,6 | 0,9 | 1,1 | 3,9 | 1,6 | 1,6 | 1,8 | 1,6 | 1,2 | 1,3 | 1,4 |
| myrcène | 1,3 | 0,8 | 0,5 | 1,3 | 1,1 | 1,0 | 0,9 | 0,5 | 1,2 | 0,1 | 0,9 | 1,2 | 1,1 | 0,7 | 0,8 | 1,7 | 1,7 | 1,4 | 1,1 | 1,2 | 1,3 |
| 1,8-cinéole | 4,3 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,8 | 12,7 | 2,2 | 1,2 | 0,8 | 3,1 | 0,2 | 0,1 | 4,0 | 0,2 | 4,2 | 2,4 | 2,6 | 3,3 | 3,7 |
| limonène | 0,8 | 4,8 | 3,5 | 6,0 | 4,0 | 2,3 | 2,4 | 3,1 | 5,1 | 1,0 | 1,6 | 4,4 | 5,6 | 5,4 | 8,4 | 7,9 | 6,4 | 8,2 | 4,3 | 6,1 | 6,5 |
| (Z)- β -ocimène | 0,1 | 2,3 | 1,7 | 2,3 | 1,3 | 2,6 | 1,5 | 2,4 | 1,7 | 0,8 | 2,2 | 5,0 | 2,8 | 1,9 | 1,7 | 3,3 | 0,2 | 2,0 | 1,0 | 1,9 | 0,3 |
| (E)- β -ocimène | 0,0 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 0,5 | 0,3 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,2 |
| <i>trans</i> -sabinene hydrate | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,4 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>cis</i> -hydrate de sabinène | 0,2 | 0,6 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,5 | 0,2 | 0,3 | 0,5 | 0,0 | 0,0 | 0,2 | 0,2 | 0,4 | 0,5 | 0,1 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,1 |
| menth-3-èn-8-ol para | 0,6 | 0,8 | 0,5 | 1,7 | 1,2 | 1,1 | 0,8 | 0,6 | 1,0 | 1,6 | 0,4 | 0,6 | 0,8 | 0,7 | 0,7 | 1,7 | 0,7 | 0,8 | 0,6 | 0,0 | 0,6 |
| bornéol | 1,9 | 5,5 | 2,5 | 3,0 | 3,5 | 6,2 | 2,6 | 6,9 | 3,2 | 6,0 | 3,3 | 5,4 | 3,9 | 4,1 | 1,1 | 2,7 | 1,9 | 2,0 | 1,0 | 0,8 | 1,9 |
| <i>trans</i> -isopulégone | 0,3 | 0,6 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,5 | 0,3 | 0,0 | 0,4 | 0,3 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,6 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 0,3 |
| <i>cis</i> -isopulégone | 1,4 | 2,2 | 1,2 | 1,0 | 1,7 | 1,5 | 1,8 | 0,0 | 1,4 | 1,2 | 1,2 | 2,0 | 1,5 | 1,0 | 1,0 | 1,1 | 1,7 | 1,7 | 1,2 | 1,7 | 1,1 |
| terpinéol-4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| néoiso-isopulégol | 2,4 | 10,3 | 5,0 | 2,9 | 2,5 | 4,0 | 11,4 | 4,6 | 10,0 | 3,7 | 2,7 | 5,2 | 19,8 | 5,3 | 1,6 | 3,8 | 3,7 | 2,7 | 2,6 | 1,7 | 2,6 |
| myrténal | 0,5 | 0,5 | 0,4 | 0,4 | 0,5 | 0,8 | 0,5 | 0,7 | 0,3 | 0,7 | 0,5 | 0,9 | 0,2 | 0,7 | 0,6 | 0,5 | 0,7 | 0,5 | 0,4 | 0,5 | 0,6 |
| α -terpinéol | 0,2 | 0,5 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,2 | 0,2 | 1,0 | 0,2 | 0,5 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,5 | 0,7 | 0,0 | 0,4 | 0,7 |
| pulégone | 44,4 | 36,6 | 30,2 | 53,7 | 48,3 | 37,9 | 39,3 | 29,3 | 41,2 | 58,7 | 15,7 | 39,1 | 39,8 | 28,4 | 41,5 | 39,2 | 39,9 | 41,9 | 36,8 | 43,4 | 27,8 |
| isopiperitenone | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| pipériténone | 1,4 | 1,5 | 1,6 | 3,9 | 3,5 | 1,5 | 1,6 | 1,6 | 2,0 | 2,2 | 0,8 | 0,6 | 5,0 | 1,2 | 7,5 | 3,1 | 1,3 | 2,5 | 1,7 | 11,9 | 1,4 |
| oxyde de pipériténone | 0,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>cis</i> -jasmone | 0,6 | 0,8 | 0,6 | 0,5 | 0,5 | 1,1 | 0,6 | 0,9 | 0,9 | 1,2 | 0,0 | 1,4 | 0,2 | 1,2 | 0,7 | 0,6 | 1,0 | 0,7 | 0,6 | 0,4 | 0,8 |
| <i>cis-cis</i> -p-menthénolide | 27,3 | 18,7 | 42,3 | 14,5 | 23,0 | 24,8 | 25,5 | 21,8 | 18,9 | 10,5 | 57,9 | 17,3 | 5,9 | 34,6 | 16,9 | 18,1 | 24,4 | 20,8 | 37,0 | 17,1 | 39,7 |
| germacrène D | 0,5 | 1,6 | 1,6 | 0,8 | 0,8 | 2,2 | 1,6 | 2,2 | 1,5 | 3,4 | 1,9 | 3,4 | 1,0 | 2,4 | 1,4 | 1,9 | 0,6 | 1,4 | 1,0 | 1,3 | 0,6 |
| élémicine | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| viridiflorol | 0,6 | 0,7 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,6 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Total | 93,1 | 93,8 | 97,5 | 97,2 | 96,7 | 93,3 | 96,0 | 95,2 | 97,9 | 94,1 | 93,6 | 93,5 | 94,5 | 96,4 | 94,2 | 94,2 | 95,8 | 95,3 | 96,2 | 96,4 | 94,6 |

| Constituants | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 |
|---------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| α -pinène | 0,6 | 1,0 | 1,0 | 0,8 | 0,8 | 1,3 | 1,3 | 1,2 | 0,8 | 0,7 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,6 | 0,0 | 0,0 | 0,9 | 0,5 | 0,5 | 0,9 | 0,4 |
| camphène | 0,3 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,2 | 0,5 | 0,0 | 0,6 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,4 | 0,0 | 0,0 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,3 |
| oct-1-èn-3-ol | 1,1 | 1,6 | 2,1 | 0,6 | 2,3 | 0,9 | 0,8 | 0,6 | 0,6 | 0,7 | 1,8 | 0,7 | 0,5 | 1,3 | 0,0 | 0,0 | 0,7 | 0,7 | 0,3 | 1,1 | 0,2 |
| sabinène | 0,4 | 0,8 | 1,0 | 0,5 | 0,4 | 0,9 | 1,3 | 0,5 | 0,5 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,0 | 0,6 | 1,2 | 0,0 | 0,4 | 0,3 | 0,2 | 0,7 | 0,3 |
| β -pinène | 0,7 | 1,6 | 1,2 | 1,0 | 1,2 | 1,8 | 1,7 | 1,3 | 0,9 | 0,8 | 0,2 | 0,5 | 0,0 | 0,5 | 0,0 | 0,0 | 0,8 | 0,5 | 0,7 | 1,3 | 0,7 |
| myrcène | 0,9 | 1,4 | 1,2 | 1,0 | 1,4 | 1,4 | 0,6 | 1,0 | 0,9 | 0,7 | 0,4 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,7 | 0,5 | 0,7 | 1,0 | 0,7 |
| 1,8-cinéole | 0,1 | 9,4 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 7,1 | 2,3 | 5,7 | 0,3 | 2,2 | 0,4 | 0,6 | 0,2 | 0,8 | 0,2 | 0,9 | 0,0 | 0,1 | 0,2 | 0,5 | 0,9 |
| limonène | 1,7 | 3,2 | 2,8 | 2,6 | 4,1 | 4,9 | 3,7 | 0,5 | 4,0 | 3,2 | 1,2 | 0,8 | 0,1 | 1,6 | 0,6 | 1,4 | 2,7 | 2,0 | 1,7 | 2,1 | 3,8 |
| (Z)- β -ocimène | 0,6 | 2,4 | 0,3 | 1,7 | 1,7 | 1,3 | 0,2 | 1,6 | 0,8 | 1,0 | 1,0 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,2 | 0,0 | 0,9 | 0,7 | 0,0 | 4,8 | 0,0 |
| (E)- β -ocimène | 0,1 | 0,3 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,9 | 0,0 |
| <i>trans</i> -sabinene hydrate | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 3,0 | 0,1 | 2,0 | 8,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,0 |
| <i>cis</i> -hydrate de sabinène | 0,0 | 0,3 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 0,6 | 0,3 | 0,2 | 0,1 | 0,0 | 0,7 | 0,5 | 0,0 | 0,8 | 1,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,7 | 0,3 | 0,1 |
| menth-3-èn-8-ol para | 0,9 | 0,7 | 0,8 | 0,7 | 1,0 | 0,9 | 0,6 | 1,6 | 0,1 | 0,1 | 1,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,6 | 2,1 | 0,0 |
| bornéol | 1,0 | 4,7 | 2,4 | 2,0 | 1,0 | 3,4 | 1,4 | 1,8 | 0,6 | 0,1 | 3,4 | 0,0 | 0,0 | 3,4 | 4,5 | 3,8 | 1,4 | 1,3 | 0,0 | 1,7 | 2,2 |
| <i>trans</i> -isopulégone | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,5 | 0,2 | 0,5 | 0,5 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,5 | 0,1 | 0,4 |
| <i>cis</i> -isopulégone | 0,9 | 1,3 | 1,1 | 1,2 | 2,3 | 1,3 | 1,0 | 0,6 | 0,0 | 0,2 | 2,7 | 5,1 | 0,0 | 11,3 | 0,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,3 | 0,3 | 0,2 |
| terpinéol-4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 1,4 | 0,7 |
| néois-isopulégol | 1,2 | 3,1 | 2,2 | 3,6 | 3,9 | 2,5 | 1,8 | 3,0 | 0,3 | 0,3 | 0,7 | 0,3 | 0,2 | 0,4 | 10,3 | 2,2 | 1,4 | 1,4 | 2,5 | 5,2 | 0,6 |
| myrténal | 0,5 | 0,6 | 0,6 | 0,5 | 1,0 | 0,4 | 0,7 | 0,3 | 0,1 | 0,0 | 0,3 | 1,1 | 0,1 | 0,1 | 0,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,5 | 0,0 |
| α -terpinéol | 0,0 | 0,7 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,0 | 0,5 | 0,0 | 0,2 | 0,0 | 0,5 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,8 | 0,3 | 0,3 |
| pulégone | 46,3 | 38,3 | 37,7 | 44,0 | 34,1 | 33,7 | 30,3 | 46,6 | 0,8 | 4,0 | 40,7 | 1,5 | 1,2 | 1,3 | 2,1 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 50,1 | 38,7 | 26,2 |
| isopiperiténone | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,6 | 0,0 | 0,6 | 1,4 | 9,1 | 9,4 | 0,0 | 1,5 | 0,0 |
| pipériténone | 3,9 | 1,9 | 1,7 | 7,2 | 1,3 | 2,1 | 1,1 | 3,2 | 0,3 | 17,8 | 2,1 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,1 | 2,2 | 71,2 | 73,5 | 4,3 | 1,6 | 8,3 |
| oxyde de pipériténone | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 82,3 | 61,2 | 0,9 | 71,7 | 82,8 | 59,0 | 55,1 | 70,0 | 1,8 | 1,9 | 2,8 | 0,1 | 45,8 |
| <i>cis</i> -jasmone | 0,7 | 0,7 | 0,9 | 0,9 | 1,6 | 0,3 | 1,4 | 0,6 | 1,1 | 0,8 | 1,3 | 0,4 | 1,3 | 1,0 | 1,7 | 5,6 | 0,4 | 0,4 | 1,3 | 0,7 | 0,8 |
| <i>cis-cis-p</i> -menthénolide | 33,1 | 20,4 | 33,6 | 23,3 | 31,7 | 26,9 | 42,4 | 23,2 | 0,0 | 0,0 | 26,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 19,5 | 24,6 | 0,0 |
| germacrène D | 1,0 | 1,9 | 1,5 | 1,5 | 2,0 | 1,0 | 0,8 | 0,6 | 0,3 | 0,8 | 0,8 | 0,9 | 1,3 | 1,9 | 0,2 | 1,2 | 0,3 | 0,3 | 0,5 | 1,5 | 0,3 |
| élémicine | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,0 |
| viridiflorol | 0,0 | 0,2 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,4 | 0,1 | 0,6 | 0,2 | 0,0 | 0,8 | 0,8 | 0,0 | 0,1 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Total | 96,4 | 97,4 | 94,0 | 95,6 | 93,1 | 94,1 | 94,8 | 95,9 | 95,5 | 95,1 | 89,7 | 88,9 | 89,3 | 87,8 | 90,0 | 91,2 | 95,6 | 96,4 | 92,6 | 95,5 | 93,2 |

| Constituants | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 |
|---------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| α -pinène | 0,0 | 0,5 | 0,0 | 0,7 | 0,7 | 0,0 | 1,0 | 1,2 | 1,4 | 0,0 | 0,5 | 0,3 | 0,5 | 0,9 | 0,6 | 1,4 | 0,4 |
| camphène | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,4 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,8 | tr | 0,5 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,0 | 0,2 |
| oct-1-èn-3-ol | 0,7 | 1,2 | 0,5 | 0,6 | 0,5 | 0,4 | 0,6 | 0,7 | 0,5 | 0,0 | 0,7 | 0,5 | 0,7 | 0,7 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| sabinène | 0,0 | 0,2 | 0,0 | 0,9 | 0,3 | 0,0 | 0,6 | 0,8 | 0,7 | 0,0 | 0,5 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,7 | 0,4 |
| β -pinène | 0,0 | 0,7 | 0,0 | 1,1 | 0,9 | 0,1 | 1,1 | 1,2 | 2,1 | 0,0 | 0,7 | 0,5 | 0,5 | 0,8 | 0,7 | 2,1 | 0,6 |
| myrcène | 0,0 | 0,7 | 0,0 | 0,0 | 0,9 | 0,1 | 1,3 | 0,5 | 2,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,5 | 0,7 | 0,8 | 2,6 | 0,5 |
| 1,8-cinéole | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 1,3 | 0,1 | 0,0 | 0,6 | 0,1 | 0,1 | 0,5 | 0,8 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,5 |
| limonène | 0,3 | 3,5 | 0,0 | 1,2 | 1,8 | 0,8 | 9,1 | 3,5 | 16,0 | 0,4 | 4,2 | 2,2 | 2,0 | 2,7 | 3,7 | 16,0 | 3,3 |
| (Z)- β -ocimène | 0,0 | 1,0 | 0,0 | 0,1 | 0,8 | 0,2 | 0,1 | 1,7 | 8,7 | 0,0 | 0,1 | 0,4 | 0,7 | 0,9 | 0,9 | 8,7 | 0,8 |
| (E)- β -ocimène | 0,5 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 2,2 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,2 |
| <i>trans</i> -sabinene hydrate | 0,3 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,4 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 |
| <i>cis</i> -hydrate de sabinène | 0,9 | 0,0 | 0,1 | 1,1 | 0,2 | 0,5 | 0,9 | 0,2 | 0,0 | 0,4 | 0,1 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,3 |
| menth-3-èn-8-ol para | 1,4 | 0,2 | 0,6 | 0,7 | 0,1 | 0,7 | 0,0 | 0,5 | 0,0 | 0,0 | 1,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,5 | 0,0 | 0,2 |
| bornéol | 0,0 | 0,0 | 3,9 | 0,0 | 0,5 | 0,0 | 0,0 | 2,5 | 0,0 | 0,0 | 0,2 | 0,3 | 1,3 | 1,4 | 1,3 | 0,0 | 1,3 |
| <i>trans</i> -isopulégone | 0,8 | 0,0 | 0,1 | 0,5 | 0,1 | 1,0 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,1 |
| <i>cis</i> -isopulégone | 1,3 | 0,0 | 0,4 | 1,0 | 0,5 | 1,6 | 0,2 | 1,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,4 | 0,0 | 0,0 | 0,9 | 0,0 | 1,3 |
| terpinéol-4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 2,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,0 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,4 |
| néoiso-isopulégol | 0,7 | 0,0 | 0,9 | 0,7 | 0,4 | 3,6 | 0,3 | 5,0 | 0,0 | 0,0 | 0,5 | 0,9 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 0,0 | 1,2 |
| myrténal | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 0,2 | 0,4 | 0,0 | 0,0 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,2 |
| α -terpinéol | 0,6 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,5 | 0,0 | 0,1 | 0,3 | 0,0 | 1,0 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,2 |
| pulégone | 41,5 | 0,2 | 4,0 | 26,2 | 0,5 | 61,6 | 1,8 | 30,2 | 0,0 | 0,0 | 1,1 | 0,1 | 2,5 | 2,5 | 57,7 | 0,0 | 3,1 |
| isopiperiténone | 2,2 | 20,2 | 0,3 | 0,0 | 3,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,8 | 0,7 | 9,4 | 9,1 | 0,0 | 0,0 | 0,6 |
| pipériténone | 16,1 | 60,7 | 5,5 | 9,0 | 13,2 | 4,8 | 6,6 | 1,6 | 0,0 | 0,4 | 4,4 | 2,5 | 73,5 | 71,2 | 2,8 | 0,0 | 4,2 |
| oxyde de pipériténone | 5,8 | 1,9 | 46,8 | 0,4 | 63,0 | 1,3 | 59,7 | 0,0 | 51,5 | 75,7 | 72,0 | 68,4 | 1,9 | 1,8 | 10,0 | 51,5 | 64,3 |
| <i>cis</i> -jasmone | 2,1 | 0,8 | 3,9 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,4 | 0,6 | 1,0 | 0,7 | 1,0 | 3,3 | 0,4 | 0,4 | 0,8 | 1,0 | 1,7 |
| <i>cis-cis-p</i> -menthénolide | 11,0 | 0,0 | 0,0 | 41,0 | 0,0 | 18,4 | 0,0 | 44,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 11,9 | 0,0 | 0,0 |
| germacrène D | 0,4 | 1,4 | 5,4 | 0,6 | 0,5 | 0,7 | 0,8 | 1,6 | 1,9 | 0,0 | 1,5 | 1,5 | 0,0 | 0,0 | 0,9 | 1,9 | 1,2 |
| élémicine | 0,1 | 0,0 | 1,6 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,2 |
| viridiflorol | 0,4 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,5 | 0,0 | 0,0 | 0,2 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 |
| Total | 87,3 | 93,8 | 74,1 | 89,0 | 91,3 | 97,3 | 90,8 | 99,6 | 86,5 | 81,0 | 92,4 | 85,4 | 96,1 | 95,3 | 97,0 | 86,5 | 89,0 |

Composition and Chemical Variability of *Mentha suaveolens* ssp. *suaveolens* and *M. suaveolens* ssp. *insularis* from Corsica

by Sylvain Sutour, Pascale Bradesi, Joseph Casanova, and Félix Tomi*

Université de Corse-CNRS, UMR 6134 SPE, Equipe Chimie et Biomasse, Route des Sanguinaires, F-20000 Ajaccio (phone: + 334 95 52 41 22; fax: + 334 95 52 41 42; e-mail: felix.tomi@univ-corse.fr)

A detailed analysis of two essential oils from individual plants of *Mentha suaveolens* ssp. *suaveolens* growing wild in Corsica was carried out by combination of GC(RI), GC/MS, and ¹³C-NMR analyses. One oil sample is characterized by the pre-eminence of piperitenone oxide, and the second is dominated by piperitenone. In contrast, it was reported that the essential oil of *M. suaveolens* ssp. *insularis*, an endemic species to Corsica and Sardinia, contained pulegone and *cis-cis-p*-menthenolide as main components. A principal-component analysis (PCA) carried out on the composition of the essential oil of 59 individual plants of *M. suaveolens* sp. allowed the classification into three well-defined groups. All the oil samples from *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* belonged to the same group, while the oils from *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* were distributed in the two other groups. The composition of the essential oil isolated from aerial parts of *M. suaveolens* ssp. has been shown to be an additional tool to differentiate the botanically close subspecies *suaveolens* and *insularis*.

Introduction. – The genus *Mentha* L. (*Labiatae* family) includes 18 species and eleven hybrids among which several species are cultivated for essential-oil production. Indeed, mint oils are among the most important essential oils produced in the world, and their values are exceeding 400 million USD per year [1]. In Europe, mints are restricted only into five sexual species: *M. aquatica* L., *M. arvensis* L., *M. longifolia* (L.) HUDSON, *M. spicata* L., and *M. suaveolens* EHRH. The *M. suaveolens* species is widespread in Corsica, and it is represented by two subspecies: *suaveolens* and *insularis*.

Mentha suaveolens ssp. *suaveolens* (L.) HUDSON, commonly known as ‘Pineapple Mint’, grows in the wet places. It is always used as condiment, and it has been applied in the traditional medicine for a wide range of actions [2] [3]. *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* (REQ.) GREUTER is an endemic species to the islands of the occidental Mediterranean Sea: Corsica, Sardinia, Balearic Islands. In Corsica, it is known as ‘mintrastella’, and it grows wild in the wet places [4].

The two subspecies are botanically close, but various morphological characters allow the differentiation of the two subspecies. Flowers of *M. suaveolens* ssp. *insularis* are whitish in cylindrical spike, whereas those of the *suaveolens* subspecies are more rose. Leaves of *insularis* subspecies are longer and greener than those of the *suaveolens* subspecies. Leaves of *suaveolens* subspecies are sessile, whilst leaves of *insularis* subspecies have a short petiole (up to 5 mm), which overall differentiate both subspecies [4].

Essential oils (EOs) are typical end-products of plant metabolism, and as such their composition reflects all biogenetic and biochemical processes associated with plant life. Thus, EOs can assume a key role in plant authentication.

The composition of the EO of *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* (L.) HUDSON has been extensively investigated. According to Lawrence [1], in the early literature, *M. suaveolens* was named *M. rotundifolia*. Nowadays, *M. rotundifolia* is considered as a hybrid of *M. longifolia* × *M. suaveolens*. From the review of Lawrence [1], it appears that various chemotypes of *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* were clearly identified, the main component being in almost all cases an oxygenated menthane derivative: pulegone (50.0%), carvone (62.3%–43.0%), *cis*-dihydrocarvone (43.2%), menthol (48.3%), piperitol (57.6%), neoiso-isopulegol (52.3%), piperitenone oxide (87.3% and 56.0%), *trans*-piperitone oxide (50.8%–40.5%) and 1,2-epoxyneomenthyl acetate (66.5%). Other compositions containing two or more major components with similar contents were also reported [1].

The first study related to the composition of the leaf oil of *M. suaveolens* ssp. *insularis* revealed pulegone (35.5%), piperitone (13.7%), and piperitenone (10.0%) as major components [1]. In a previous study, we carried out a detailed analysis of a sample of *M. suaveolens* ssp. *insularis* from Corsica, and we demonstrated that the composition was dominated by pulegone (44.4%) and *cis-cis-p*-menthenolide (= (3*a*S,6*S*,7*a*S)-6-methyl-3-methylidenehexahydro-1-benzofuran-2(3*H*)-one; 27.3%; Fig. 1), a methylidene lactone bearing the menthane skeleton so far not reported as a natural compound. The oil of the *insularis* subspecies exhibited a fair antibacterial activity against two Gram-positive bacteria (*Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*), and it was demonstrated that the two major components have a similar contribution to the biological activity [5].

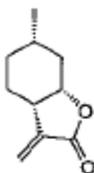


Fig. 1. Structure of *cis-cis-p*-menthenolide

The aim of the present study was *i*) to investigate the chemical composition(s) of EOs from *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* growing wild in Corsica, and to compare it with the compositions reported in the literature and with the composition of the *insularis* subspecies; *ii*) to evaluate the homogeneity or the chemical variability of both subspecies; and *iii*) to evaluate if the composition of the essential oil may assume a role in plant authentication.

Results and Discussion. – Aerial parts of 59 individual plants of *Mentha suaveolens* sp. were collected in various locations in Corsica (see *Exper. Part*). Among these, 37 plants exhibited all or most of the botanical characteristics of *M. suaveolens* ssp. *insularis* (leaf shape and color, sessile or with petiole). Other samples (22) were attributed to the *suaveolens* subspecies. All the samples were submitted to GC (FID) analysis, and they exhibited various chromatographic profiles.

A detailed analysis of two samples belonging to the *suaveolens* subspecies, selected on the basis of their quite different chromatographic profiles, was carried out by combination of GC(RI), GC/MS, and ¹³C-NMR (Table 1). Both compositions differed drastically:

Table 1. Chemical Composition of Two Oil Samples from *Mentha suaveolens* ssp. *suaveolens* (*Suav1* and *Suav2*) and an Oil Sample from *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* (*Insul*)

| Constituents ^{a)} | <i>RI_a</i> ^{b)} | <i>RI_p</i> ^{c)} | <i>Insul</i> ^{d)} | <i>Suav1</i> | <i>Suav2</i> | Identification |
|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|------------------|--------------|-------------------------------------|
| Tricyclene | 920 | 1020 | – | tr ^{e)} | – | <i>RI</i> , MS |
| α -Thujene | 929 | 1023 | tr | tr | – | <i>RI</i> , MS |
| α -Pinene | 930 | 1026 | 0.7 | 0.5 | 0.5 | <i>RI</i> , MS, ¹³ C-NMR |
| Camphene | 943 | 1071 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | <i>RI</i> , MS |
| Oct-1-en-3-ol | 959 | 1447 | 0.5 | 0.7 | 0.7 | <i>RI</i> , MS, ¹³ C-NMR |
| Sabinene | 965 | 1124 | 0.5 | 0.3 | 0.5 | <i>RI</i> , MS, ¹³ C-NMR |
| β -Pinene | 971 | 1114 | 1.0 | 0.5 | 0.7 | <i>RI</i> , MS, ¹³ C-NMR |
| Myrcene | 981 | 1164 | 0.7 | 0.5 | 0.3 | <i>RI</i> , MS, ¹³ C-NMR |
| <i>p</i> -Cymene | 1012 | 1273 | tr | tr | 0.4 | <i>RI</i> , MS, ¹³ C-NMR |
| 1,8-Cineole* | 1020 | 1211 | 1.3 | 0.1 | 0.8 | <i>RI</i> , MS, ¹³ C-NMR |
| Limonene* | 1020 | 1207 | 4.3 | 2.0 | 4.2 | <i>RI</i> , MS, ¹³ C-NMR |
| β -Phellandrene | 1024 | 1012 | – | tr | tr | <i>RI</i> , MS |
| (<i>Z</i>)- β -Ocimene | 1026 | 1236 | 0.8 | 0.7 | 0.1 | <i>RI</i> , MS, ¹³ C-NMR |
| (<i>E</i>)- β -Ocimene | 1036 | 1251 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | <i>RI</i> , MS |
| γ -Terpinene | 1049 | 1247 | – | tr | tr | <i>RI</i> , MS |
| <i>trans</i> -Sabinene hydrate | 1050 | 1454 | tr | – | 0.4 | <i>RI</i> , MS, ¹³ C-NMR |
| Terpinolene | 1078 | 1284 | tr | tr | – | <i>RI</i> , MS |
| <i>cis</i> -Sabinene hydrate | 1083 | 1545 | 0.2 | tr | 0.5 | <i>RI</i> , MS, ¹³ C-NMR |
| <i>trans-p</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol | 1103 | 1628 | – | 0.2 | 0.1 | <i>RI</i> , MS |
| <i>cis-p</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol | 1117 | 1669 | – | 0.1 | 0.1 | <i>RI</i> , MS |
| <i>p</i> -Menth-3-en-8-ol | 1131 | 1605 | 0.6 | – | 1.2 | <i>RI</i> , MS, ¹³ C-NMR |
| Menthone | 1134 | 1466 | – | 0.3 | – | <i>RI</i> , MS |
| Isomenthone | 1144 | 1495 | – | 0.2 | – | <i>RI</i> , MS |
| <i>cis</i> -Isopulegone* | 1149 | 1572 | 0.3 | 0.1 | 0.7 | <i>RI</i> , MS, ¹³ C-NMR |
| <i>trans</i> -Isopulegone* | 1149 | 1583 | 1.4 | tr | tr | <i>RI</i> , MS |
| Borneol* | 1149 | 1701 | 1.9 | 1.3 | 0.2 | <i>RI</i> , MS, ¹³ C-NMR |
| Terpinen-4-ol | 1161 | 1600 | tr | tr | – | <i>RI</i> , MS |
| Neoiso-isopulegol | 1165 | 1610 | 2.4 | 1.4 | 0.5 | <i>RI</i> , MS, ¹³ C-NMR |
| Myrtenal | 1169 | 1628 | 0.5 | – | 0.6 | <i>RI</i> , MS, ¹³ C-NMR |
| α -Terpineol | 1172 | 1697 | 0.2 | tr | 0.3 | <i>RI</i> , MS |
| <i>trans</i> -Carveol | 1197 | 1848 | – | tr | – | <i>RI</i> , MS |
| Pulegone | 1218 | 1651 | 44.4 | 2.5 | 1.1 | <i>RI</i> , MS, ¹³ C-NMR |
| Isopiperitenone | 1245 | 1863 | – | 9.4 | 1.8 | <i>RI</i> , MS, ¹³ C-NMR |
| Bornyl acetate | 1269 | 1580 | – | 0.1 | tr | <i>RI</i> , MS |
| Piperitenone | 1309 | 1927 | 1.4 | 73.5 | 4.4 | <i>RI</i> , MS, ¹³ C-NMR |
| Eugenol* | 1333 | 2171 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | <i>RI</i> , MS |
| Piperitenone oxide* | 1333 | 1963 | 0.9 | 1.9 | 72.0 | <i>RI</i> , MS, ¹³ C-NMR |
| <i>cis</i> -Jasmone | 1367 | 1947 | 0.6 | 0.4 | 1.0 | <i>RI</i> , MS, ¹³ C-NMR |
| β -Bourbonene | 1385 | 1518 | tr | tr | 0.1 | <i>RI</i> , MS |
| <i>cis-cis-p</i> -Menthenolide | 1409 | 2218 | 27.3 | – | – | <i>RI</i> , ¹³ C-NMR |
| Germaacrene D | 1478 | 1711 | 0.5 | 0.3 | 1.5 | <i>RI</i> , MS, ¹³ C-NMR |
| Total | | | ^{d)} | 97.6 | 95.1 | |

^{a)} Order of elution and percentages are given on apolar column (*BP-1*), except for compounds with an asterisk (*), which indicates percentage on *BP-20*. ^{b)} *RI_a*: Retention indices measured on apolar columns. ^{c)} *RI_p*: Retention indices measured on polar columns. ^{d)} A complete analysis of *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* essential oil is reported in [5]. ^{e)} tr=Traces.

• The composition of one sample of *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* was dominated by piperitenone oxide, which was by far the main component (72.0%). Among the other components, only piperitenone (4.4%) and limonene (4.2%) were present at appreciable contents. Germacrene D and β -bourbonene were the two identified sesquiterpenes in that oil sample.

• The composition of the second sample contained piperitenone as major component (73.5%). The two samples differed also by the occurrence of minor components, isopiperitenone (9.4%) being the second major component, accompanied by pulegone (2.5%), limonene (2.0%), and piperitenone oxide (1.9%).

Analysis of the 59 oil samples was carried out by comparison of their retention indices on two columns of different polarity with those of the two previously investigated samples of *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* and of the sample of *M. suaveolens* ssp. *insularis*, whose detailed analysis was reported in [5] and is collected in Table 1. Moreover, half of the samples (29 out of 59) were analyzed by ¹³C-NMR spectroscopy, which ensured the identification of the components present at a concentration as low as 0.4–0.5%.

The 59 compositions were submitted to statistical analysis. Combination of *k*-mean's clustering and principal-component analysis (PCA), in which the plan defined by the first two axes described 90% of the total variance of the population (the first two axes accounted for 65 and 25%, resp.), indicated the existence of three clusters (Table 2 and Fig. 2).

Table 2. Chemical Variability of *M. suaveolens* sp. Essential Oil. Main components of 59 samples: mean value (Mean), standard deviation (SD), minimum content (Min) and maximum content (Max). Type I: *M. suaveolens* ssp. *insularis*; Type II and III: *M. suaveolens* ssp. *suaveolens*.

| Constituents | Type I (37 samples) | | | | Type II (17 samples) | | | | Type III (5 samples) | | | |
|--------------------------------|---------------------|------|------|------|----------------------|------|------|------|----------------------|-----|------|------|
| | Mean | SD | Min | Max | Mean | SD | Min | Max | Mean | SD | Min | Max |
| 1,8-Cineole | 1.9 | 2.8 | 0.0 | 12.7 | 0.5 | 0.7 | 0.0 | 2.2 | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 0.3 |
| Limonene | 3.8 | 2.2 | 0.3 | 8.4 | 4.0 | 5.0 | 0.0 | 16.0 | 2.7 | 0.6 | 2.0 | 3.5 |
| Borneol | 2.6 | 1.8 | 0.0 | 6.9 | 1.2 | 1.6 | 0.0 | 4.5 | 1.2 | 0.8 | 0.0 | 2.1 |
| <i>trans</i> -Isopulegone | 0.4 | 0.2 | 0.0 | 1.0 | 0.1 | 0.3 | 0.0 | 1.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| <i>cis</i> -Isopulegone | 1.3 | 0.5 | 0.0 | 2.7 | 1.9 | 2.8 | 0.0 | 11.3 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Neois-isopulegol | 4.0 | 3.6 | 0.7 | 19.8 | 1.1 | 2.4 | 0.0 | 10.3 | 1.4 | 0.8 | 0.0 | 2.1 |
| Pulegone | 39.8 | 9.4 | 15.7 | 61.6 | 3.0 | 6.0 | 0.0 | 26.2 | 2.2 | 1.1 | 0.2 | 3.1 |
| Isopiperitenone | 0.1 | 0.4 | 0.0 | 2.2 | 0.6 | 0.9 | 0.0 | 3.6 | 13.4 | 4.7 | 9.1 | 20.2 |
| Piperitenone | 3.3 | 3.3 | 0.6 | 16.1 | 3.9 | 5.1 | 0.0 | 17.8 | 68.0 | 5.0 | 60.7 | 73.5 |
| Piperitenone oxide | 0.6 | 1.9 | 0.0 | 10.0 | 63.6 | 11.2 | 45.8 | 82.8 | 1.6 | 0.6 | 0.5 | 1.9 |
| <i>cis-cis-p</i> -Menthenolide | 25.6 | 11.1 | 5.9 | 57.9 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |

The chemical composition of the most important group (group I, 37 samples) is dominated by the association of pulegone (15.7–61.6%) and *cis-cis-p*-menthenolide (5.9–57.9%). Neois-isopulegol (0.7–19.8%), piperitenone (0.6–16.1%), 1,8-cineole (0–12.7%), and piperitenone oxide (0–10.0%) occurred at appreciable amounts. This group contained all the oil samples isolated from plants belonging to the *insularis* subspecies.

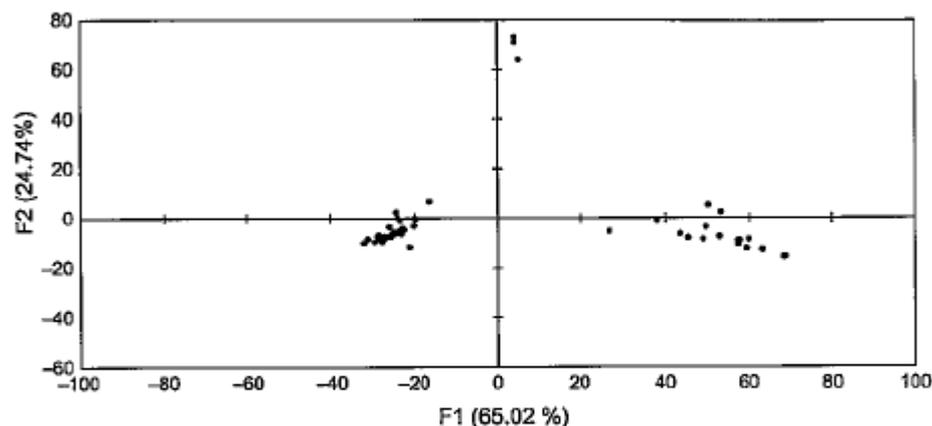


Fig. 2. PCA Scatterplot of 59 samples of *Mentha suaveolens* EHRH. oil from Corsica

The other 22 samples belonging to the *suaveolens* subspecies were divided into two different groups:

- One group (group II, 17 samples) has a chemical composition dominated by piperitenone oxide accounting for 45.8–82.8% of the oil. This compound is associated with pulegone (0.0–26.2%), *cis*-isopulegone (0.0–11.3%), and piperitenone (0.0–3.6%).
- The other group (group III, five samples) has a chemical composition dominated by piperitenone (60.7–73.5%), associated with isopiperitenone (9.1–20.2%) and pulegone (0.2–3.1%).

Concerning the composition of the EOs from the *suaveolens* subspecies, piperitenone oxide was already found as major component of oil samples from Morocco (56.0%) and Japan (87.3%) [6] [7]. It was by far the major component of the hybrid *M. longifolia* × *M. suaveolens* from Uruguay (80.8%) [2]. Conversely, a chemical composition dominated by piperitenone (54.9%) was only reported for *M. longifolia* × *M. suaveolens* growing wild in Algeria [8].

Pulegone, piperitenone, and piperitenone oxide are common constituents found in EOs from the genus *Mentha*. They were found, at variable contents, in most of the investigated samples, belonging to one of the other subspecies. Conversely, *cis-cis-p*-menthenolide, a *p*-menthane lactone found only in the EOs from *M. suaveolens* ssp. *insularis*, is clearly a marker of that subspecies.

Conclusions. – Botanical identification in the genus *Mentha* is considered to be a difficult task. The differentiation of the two subspecies *suaveolens* and *insularis* of *M. suaveolens* could be accomplished by taking into account various morphological parameters (color of flowers and leaves, presence or absence of a short petiole). Analysis of 59 oil samples isolated from plants of *M. suaveolens* growing wild in Corsica, followed by statistical analysis of the data, allowed a clear differentiation of both subspecies with respect to the composition of their EOs: the subspecies *suaveolens* yielded EOs dominated either by piperitenone (a new chemotype for this subspecies) or piperitenone oxide, while all the samples of the *insularis* subspecies contained

relative proportions of the essential oil (EO) constituents were expressed as percentage obtained by peak-area normalization, without using correcting factors. Retention indices (*RIs*) were determined relative to the retention times of a series of *n*-alkanes with linear interpolation ('Target Compounds' software from Perkin-Elmer).

GC/MS Analysis. EOs were analyzed with a Perkin-Elmer TurboMass detector (quadrupole), directly coupled to a Perkin-Elmer Autosystem XL, equipped with a fused-silica cap. column (60 m × 0.22 mm i.d., film thickness 0.25 μm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane); carrier gas, He at 1 ml/min; split, 1/80; injection volume, 0.2 μl; injector temp., 250°; oven temp. programmed from 60° to 230° at 2°/min and then held isothermal (45 min); ion source temp., 150°; energy ionization, 70 eV; electron-ionization (EI) mass spectra were acquired over the mass range 35–350 Da.

¹³C-NMR Analysis. All NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 Fourier-transform spectrometer, equipped with a 5-mm probe, in CDCl₃, with all shifts referred to internal TMS. ¹³C-NMR Spectra of EO were recorded with the following parameters: pulse width, 4 μs (flip angle 45°); acquisition time, 2.7 s for 128 K data table with a spectral width of 25000 Hz (250 ppm); CPD mode decoupling; digital resolution, 0.183 Hz/pt. The number of accumulated scans was 3000 for each oil sample (ca. 40 mg of the sample in 0.5 ml of CDCl₃).

Component Identification. Identification of the individual components was based: *i*) on comparison of their GC retention indices (*RI*) on apolar and polar columns, with those of authentic compounds or literature data; *ii*) on computer matching with a laboratory-made and commercial MS libraries [9–11], and comparison of spectra with literature data [12–14]; and *iii*) on comparison of the signals in the ¹³C-NMR spectra of the mixtures with those of reference spectra compiled in the laboratory spectral library, with the help of a laboratory-made software [15][16].

REFERENCES

- [1] B. M. Lawrence, 'Mint: The Genus *Mentha*, Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles', CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, 2007.
- [2] D. Lorenzo, D. Paz, E. Dellacassa, P. Davies, R. Vila, S. Cañigueral, *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2002**, *45*, 519.
- [3] L. Moreno, R. Bello, E. Primo-Yúfera, J. Esplugues, *Phytother. Res.* **2002**, *16* (Suppl. 1), 10.
- [4] J. Gamisans, D. Jeanmonod, 'Catalogue des plantes vasculaires de la Corse', seconde édition, Edition des conservatoires et jardin botaniques de la ville de Genève, Chambésy, 1993.
- [5] S. Sutour, P. Bradesi, D. de Rocca-Serra, J. Casanova, F. Tomi, *Flavour Fragrance J.* **2008**, *23*, 107.
- [6] H. Ouzmil, S. Ghoulami, M. Rhajaoui, A. Ilidrissi, S. Fkih-Tetouani, M. Faïd, A. Benjouad, *Phytother. Res.* **2002**, *16*, 727.
- [7] K. L. Handa, D. M. Smith, I. C. Nigam, L. Levi, *J. Pharm. Sci.* **1964**, *53*, 1407.
- [8] M. Brada, M. Bezzina, M. Marlier, A. Carlier, G. Lognay, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2007**, *11*, 3.
- [9] F. W. McLafferty, D. B. Stauffer, 'Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th edn., Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM', version 3.10d, Palisade, Newfield, 1994.
- [10] A. König, D. H. Hochmuth, D. Joulain, 'Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils', Library of MassFinder 2.1, Institute of Organic Chemistry, Hamburg, 2001.
- [11] NIST/EPA/NIH, National Institute of Standards and Technology, PC Version 17 of the Mass Spectral Library, Perkin-Elmer Corporation, Saint Quentin, 1999.
- [12] R. P. Adams, 'Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy', Allured Publishing Co., Carol Stream, 2001.
- [13] D. Joulain, W. A. König, 'The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons', E. B.-Verlag, Hamburg, 1998.
- [14] W. McLafferty, D. B. Stauffer, 'The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data', 4th edn., Wiley-Interscience, New York, 1988.
- [15] F. Tomi, P. Bradesi, A. Bighelli, J. Casanova, *J. Magn. Reson. Anal.* **1995**, *1*, 25.
- [16] F. Tomi, J. Casanova, *Acta Hort.* **2006**, *723*, 185.

Received November 2, 2009

Annexe 13: Composition chimique détaillée des huiles essentielles des cinq espèces du genre *Fortunella*.

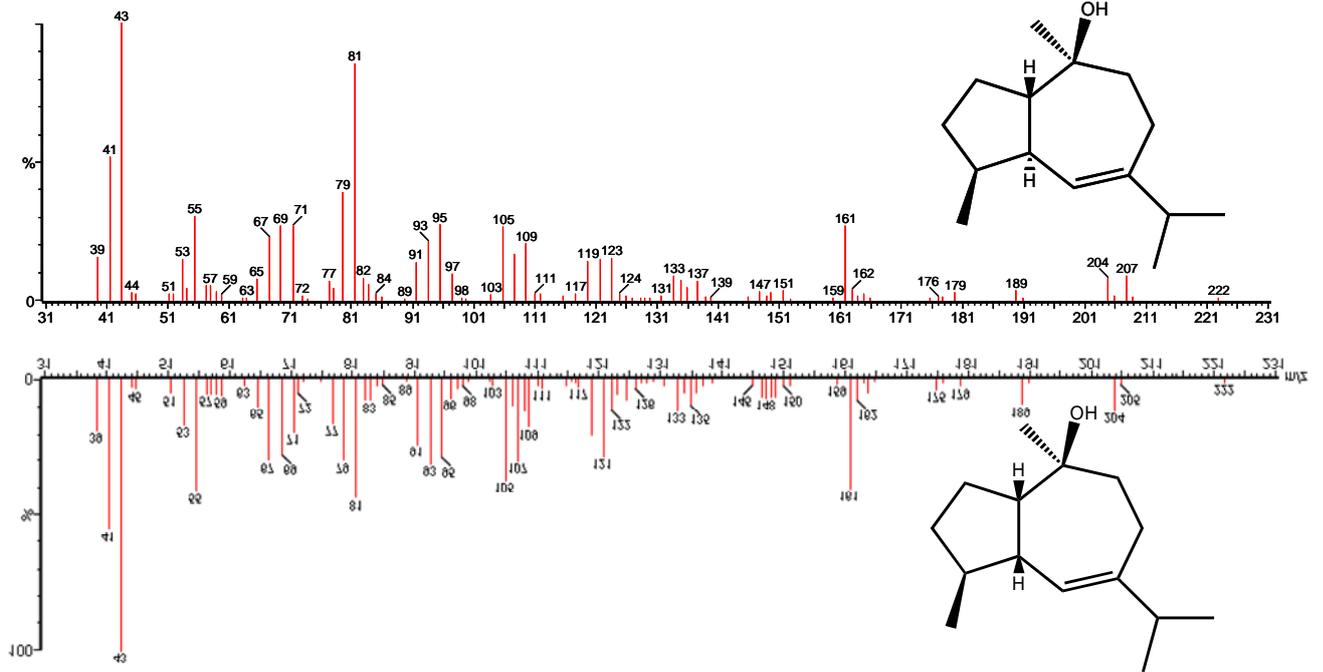
| Constituants | Ir ^a | Ir ^p | <i>F.</i> <i>japonica</i> | <i>F.</i> <i>obovata</i> | <i>F. crassifolia</i> | <i>F. margarita</i> | <i>F. hindsii</i> |
|---|-----------------|-----------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------|---------------------|-------------------|
| 1 α -pinène | 931 | 1022 | tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | - |
| 2 sabinène | 965 | 1124 | tr | tr | 0,1 | tr | - |
| 3 β -pinène | 971 | 1114 | tr | tr | 0,1 | 0,1 | - |
| 4 myrcène | 980 | 1159 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,6 |
| 5 α -phellandrène | 994 | 1164 | tr | 0,5 | 0,3 | 0,5 | - |
| 6 3-carène | 1003 | 1148 | 0,1 | 1,8 | tr | 1,8 | tr |
| 7 limonène | 1021* | 1201 | 7,1 | 2,8 | 7,3 | 2,8 | 3,1 |
| 8 β -phellandrène | 1021* | 1210 | tr | 0,4 | tr | 0,4 | tr |
| 9 (Z)- β -ocimène | 1023 | 1232 | tr | 0,1 | - | 0,1 | - |
| 10 (E)- β -ocimène | 1036 | 1249 | 0,6 | 1,8 | 0,5 | 1,8 | 0,4 |
| 11 terpinolène | 1076 | 1280 | tr | - | 0,1 | - | - |
| 12 linalol | 1080 | 1551 | tr | 0,1 | 0,1 | 0,2 | - |
| 13 δ -élémente | 1339 | 1467 | 5,2 | 0,1 | 7,1 | 0,1 | 12,5 |
| 14 α -cubébène | 1345 | 1454 | 0,1 | - | - | 0,1 | - |
| 15 α -ylangène | 1368 | 1480 | 0,1 | - | tr | tr | 0,1 |
| 16 α -copaène | 1373 | 1488 | 0,1 | - | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| 17 β -bourbonène | 1381 | 1515 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | tr | 0,2 |
| 18 β -élémente | 1384 | 1588 | 3,3 | 0,6 | 4,4 | 0,6 | 3,6 |
| 19 β -ylangène | 1413 | 1568 | 0,3 | 0,1 | 0,4 | tr | - |
| 20 (E)- β -caryophyllène | 1423 | 1593 | 1,6 | 5,5 | 0,7 | 6,0 | 2,3 |
| 21 β -copaène | 1425 | 1586 | 0,3 | 0,2 | - | 0,2 | - |
| 22 thujopsène | 1435* | 1618 | 0,4 | - | 0,5 | - | tr |
| 23 α -guaïène | 1435* | 1602 | 0,5 | 0,2 | - | 0,2 | - |
| 24 β -gurjunène | 1441 | 1593 | 0,4 | tr | 0,7 | tr | - |
| 25 (E)- β -farnésène | 1448 | 1635 | 0,7 | - | 0,9 | - | 0,2 |
| 26 α -humulène | 1454 | 1666 | tr | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,9 |
| 27 γ -muurolène | 1467 | 1685 | tr | tr | tr | tr | - |
| 28 β -chamigrène | 1475* | 1703 | 0,1 | - | tr | - | - |
| 29 α -amorphène | 1475* | 1686 | 0,5 | 0,2 | 0,3 | - | 1,0 |
| 30 germacrène D | 1475* | 1712 | 14,9 | 14,9 | 15,5 | 14,9 | 28,7 |
| 31 γ -humulène | 1475* | 1721 | 0,5 | tr | 0,9 | - | - |
| 32 (E)- β -bergamotène | 1475* | 1714 | 0,2 | - | tr | - | 0,3 |
| 33 β -séliène | 1475* | 1718 | 0,8 | 0,2 | 0,8 | 0,2 | 0,4 |
| 34 <i>cis</i> -eudesma-6,11-diène | 1480 | 1718 | tr | - | 0,8 | - | - |
| 35 γ -amorphène | 1493* | 1671 | tr | tr | 0,4 | tr | - |
| 36 β -vétispirène | 1493* | 1746 | - | - | 1,1 | - | - |
| 37 germacrène bicyclo | 1496* | 1728 | 0,8 | 4,8 | 0,2 | 4,8 | 3,9 |
| 38 α -séliène | 1496* | 1520 | 0,2 | - | 0,6 | 0,1 | 0,5 |
| 39 α -muurolène | 1496* | 1721 | 0,3 | - | 0,9 | 0,2 | 1,7 |
| 40 γ -cadinène | 1496* | 1752 | 0,9 | 1,0 | - | 1,0 | - |
| 41 δ -amorphène | 1500* | 1635 | 1,6 | - | 1,0 | - | 1,1 |
| 42 α -bulnésène | 1500* | 1711 | - | 0,1 | - | 0,1 | - |
| 43 δ -cadinène | 1510 | 1751 | 0,2 | 1,0 | 0,1 | 1,0 | 1,2 |
| 44 β -élémol | 1532 | 2094 | 9,1 | 26,8 | 8,4 | 25,8 | 10,8 |
| 45 sélina-4(15),7(11)-diène | 1534 | 1772 | 0,1 | - | - | - | - |
| 46 α -cadinène | 1535 | 1785 | 1,0 | - | - | - | - |
| 47 (E)-nérolidol | 1541 | 2049 | 1,1 | 3,4 | 1,6 | 3,3 | 1,0 |
| 48 germacrène B | 1552 | 1833 | 2,4 | 0,8 | - | 1,4 | 1,1 |
| 49 spathulenol | 1561 | 2114 | tr | - | - | - | - |
| 50 épi-cubénol | 1567 | 2062 | tr | - | - | - | - |
| 51 <i>cis</i> -guai-6-èn-10 β -ol | 1575 | 1993 | 6,3 | 0,6 | 6,4 | 0,4 | 0,7 |
| 52 amorph-4-èn-10 β -ol | 1577 | 2083 | tr | 0,1 | 2,6 | 0,1 | - |
| 53 guaiol | 1580 | 2083 | 1,2 | 0,3 | 0,6 | 0,2 | 0,1 |
| 54 eudesm-6-èn-4 α -ol | 1604 | 2092 | 2,2 | 0,3 | 1,3 | 0,1 | tr |
| 55 7-épi- γ -eudesmol | 1609 | 2036 | 0,4 | 0,3 | 0,6 | 3,6 | 0,3 |
| 56 germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol | 1611 | 2188 | 2,4 | 3,6 | 2,4 | 2,4 | 4,4 |

| | | | | | | | | |
|-------|--------------------------------|-------|------|------|------|------|------|------|
| 57 | <i>trans</i> -guai-6-èn-10β-ol | 1612 | 2158 | 1,4 | 2,4 | 1,2 | 2,5 | 1,5 |
| 58 | γ-eudesmol | 1614 | 2178 | 1,4 | 2,5 | 1,3 | 0,2 | 1,4 |
| 59 | alismol | 1617 | 2270 | 1,2 | 0,2 | 1,0 | 5,3 | 0,8 |
| 60 | érémophilen-11-ol Δ9-10 | 1623 | 2198 | 4,2 | 8,0 | 3,8 | tr | 4,1 |
| 61 | τ-muurolol | 1623 | 2084 | 0,1 | tr | 1,5 | 2,6 | 0,7 |
| 62 | τ-cadinol | 1627 | 2200 | 0,1 | - | 0,6 | - | tr |
| 63 | amorph-4-èn-10α-ol | 1630 | 2173 | 2,2 | tr | 2,4 | 1,4 | 1,0 |
| 64 | β-eudesmol | 1641* | 2244 | 5,5 | 3,9 | 6,1 | 3,9 | 1,0 |
| 65 | α-cadinol | 1641* | 2244 | 0,7 | 0,5 | 0,3 | 0,1 | 0,6 |
| 66 | selin-11-èn-4α-ol | 1641* | 2210 | tr | - | - | - | - |
| 67 | valérianol | 1644 | 2238 | 2,1 | 2,8 | 2,3 | 2,8 | 1,8 |
| 68 | α-eudesmol | 1643 | 2214 | 4,4 | 3,1 | 4,4 | 3,1 | 1,5 |
| 69 | 7-épi-α-eudesmol | 1646 | 2238 | 0,5 | 0,1 | - | tr | - |
| 70 | eudesm-7(11)-èn-4α-ol | 1649 | 2228 | 0,4 | - | 0,4 | 0,2 | - |
| 71 | (E)-phytol | 2104 | 2620 | 0,3 | 0,2 | tr | 0,1 | 0,4 |
| Total | | | | 93,1 | 97,4 | 96,2 | 97,8 | 96,0 |

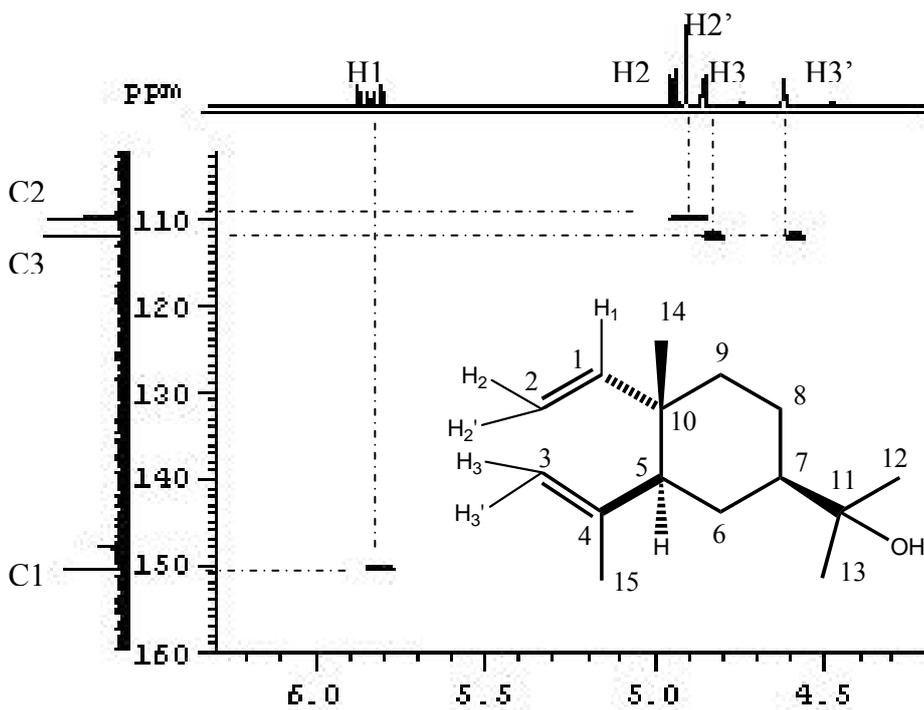
Annexe 14 : Composition chimique détaillée des extraits micro-ondes du genre *Fortunella*.

| Constituants | Ir ^a | Ir ^p | <i>F. japonica</i> | <i>F. crassifolia</i> | <i>F. obovata</i> | <i>F. margarita</i> | <i>F. hinsii</i> |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------|-----------------------|-------------------|---------------------|------------------|
| 1 β-pinène | 971 | 1114 | - | tr | - | - | - |
| 2 myrcène | 980 | 1159 | - | 0,1 | - | - | tr |
| 3 limonène | 1021* | 1201 | 0,1 | 1,1 | 0,3 | 0,1 | tr |
| 4 β-phellandréne | 1021* | 1210 | - | 0,1 | - | - | - |
| 5 (E)-β-ocimène | 1036 | 1249 | - | 0,6 | - | - | tr |
| 6 δ-élémente | 1339 | 1467 | 2,1 | 0,3 | 1,5 | 2,4 | 7,8 |
| 7 α-cubébène | 1345 | 1454 | tr | - | 0,1 | - | - |
| 8 α-ylangène | 1368 | 1480 | - | - | 0,9 | - | - |
| 9 α-copaène | 1373 | 1488 | tr | - | 0,1 | - | - |
| 10 β-bourbonène | 1381 | 1515 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | - | - |
| 11 β-élémente | 1384 | 1588 | 3,3 | 1,0 | 2,0 | 3,6 | 1,9 |
| 12 β-ylangène | 1413 | 1568 | tr | - | - | - | - |
| 13 (E)-β-caryophyllène | 1423 | 1593 | tr | 9,9 | 1,2 | 0,6 | 2,1 |
| 14 thujopsène | 1435* | 1618 | - | - | 0,2 | - | - |
| 15 α-guaiène | 1435* | 1602 | 0,1 | - | 0,1 | - | - |
| 16 β-gurjunène | 1441 | 1593 | 0,4 | - | 0,9 | 0,5 | - |
| 17 (E)-β-farnésène | 1448 | 1635 | - | - | 1,0 | - | - |
| 18 α-humulène | 1454 | 1666 | tr | 1,3 | 0,4 | 0,7 | 0,4 |
| 19 γ-murolène | 1467 | 1685 | 0,7 | - | 0,4 | - | - |
| 20 β-chamigrène | 1475* | 1703 | 0,2 | - | 0,2 | - | - |
| 21 α-amorphène | 1475* | 1686 | 1,0 | 1,1 | 0,1 | - | 1,1 |
| 22 germacrène D | 1475* | 1712 | 9,9 | 26,1 | 4,1 | 11,6 | 20,0 |
| 23 γ-humulène | 1475* | 1721 | 0,3 | - | 0,3 | - | - |
| 24 (E)-β-bergamotène | 1475* | 1714 | 0,4 | - | tr | - | - |
| 25 β-sélinène | 1475* | 1718 | 0,3 | - | 0,5 | - | - |
| 26 <i>cis</i> -eudesma-6,11-diène | 1480 | 1718 | - | - | - | 0,1 | - |
| 27 γ-amorphène | 1493* | 1671 | - | - | 0,1 | - | - |
| 28 β-vetispirène | 1493* | 1746 | - | - | tr | - | - |
| 29 germacrène bicyclo | 1496* | 1728 | tr | 8,4 | 0,3 | 2,1 | 2,5 |
| 30 α-sélinène | 1496* | 1520 | - | - | 0,2 | 0,3 | 0,5 |
| 31 α-murolène | 1496* | 1721 | - | 1,4 | 0,3 | - | 0,4 |
| 32 γ-cadinène | 1496* | 1752 | 0,2 | - | tr | - | - |
| 33 δ-amorphène | 1500* | 1635 | 0,2 | - | 0,5 | - | 0,9 |
| 34 δ-cadinène | 1510 | 1751 | 0,3 | 1,1 | 0,3 | 0,6 | 0,4 |
| 35 β-élémol | 1532 | 2094 | 12,4 | 18,6 | 7,8 | 15,5 | 19,5 |
| 36 sélina-4(15),7(11)-diène | 1534 | 1772 | 0,4 | - | - | - | - |
| 37 α-cadinène | 1535 | 1785 | 0,5 | - | - | - | - |
| 38 (E)-nérolidol | 1541 | 2049 | 2,1 | 2,9 | 2,1 | 0,9 | 0,7 |
| 39 germacrène B | 1552 | 1833 | 4,7 | - | 1,8 | 1,8 | - |
| 40 <i>cis</i> -guai-6-èn-10β-ol | 1575 | 2083 | 9,0 | 0,6 | 5,1 | 8,4 | - |
| 41 amorph-4-èn-10β-ol | 1577 | 2083 | 1,6 | 1,1 | 0,9 | 0,6 | - |
| 42 guaiol | 1580 | 1983 | 1,5 | 0,3 | 2,3 | 0,7 | - |
| 43 epi-cubénol | 1582 | 2062 | tr | - | - | - | - |
| 44 eudesm-6-èn-4α-ol | 1604 | 2092 | 0,8 | - | 1,2 | 0,9 | - |
| 45 7-épi-γ-eudesmol | 1609 | 2036 | 0,2 | 0,6 | 0,4 | 1,1 | - |
| 46 germacra-1(10),5-dièn-4α-ol | 1611 | 2188 | 7,1 | 1,1 | 6,8 | 6,9 | 9,9 |
| 47 <i>trans</i> -guai-6-èn-10β-ol | 1612 | 2158 | 1,8 | 1,6 | 2,0 | 5,0 | 1,9 |
| 48 γ-eudesmol | 1614 | 2178 | 0,8 | 1,5 | 1,9 | 2,6 | 1,5 |
| 49 alismol | 1617 | 2270 | 3,5 | 0,2 | 0,1 | 2,1 | 1,0 |
| 50 eremophilèn-11-ol Δ9-10 | 1623 | 2198 | 4,4 | 5,4 | 6,8 | 4,8 | 5,9 |
| 51 τ-murolol | 1623 | 2084 | 1,5 | 0,2 | 1,9 | 1,7 | 1,5 |
| 52 τ-cadinol | 1627 | 2200 | 0,8 | - | 1,0 | - | - |
| 53 amorph-4-èn-10α-ol | 1630 | 2173 | 0,1 | 1,2 | 1,8 | 0,5 | 3,3 |
| 54 β-eudesmol | 1641* | 2244 | 8,2 | 3,2 | 12,5 | 10,5 | 6,2 |
| 55 α-cadinol | 1641* | 2244 | 1,1 | tr | 2,1 | 0,1 | 0,3 |
| 56 valerianol | 1644 | 2238 | 1,8 | 2,4 | 5,4 | 1,4 | 2,0 |
| 57 α-eudesmol | 1643 | 2214 | 6,4 | 2,3 | 13,1 | 6,1 | 2,0 |
| 58 7-épi-α-eudesmol | 1646 | 2238 | 0,2 | - | - | - | - |
| 59 eudesm-7(11)-èn-4α-ol | 1649 | 2228 | 0,5 | - | - | 0,5 | - |
| 60 (Z)-phytol | 2074 | 2545 | 0,2 | - | - | - | - |
| 61 (E)-phytol | 2104 | 2620 | 3,8 | 0,1 | 1,1 | 1,2 | 0,4 |
| Total | | | 95,2 | 96,0 | 94,3 | 95,9 | 94,1 |

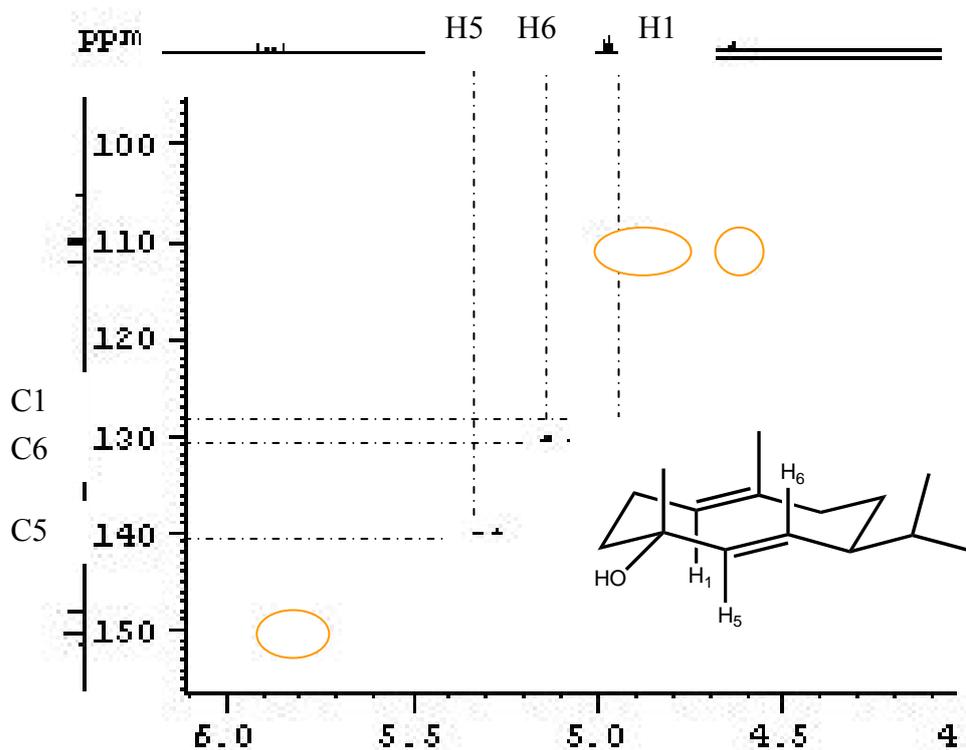
Annexe 15 : Spectre de masse en mode IE des *cis* et *trans*-guai-6-èn-10 β -ol



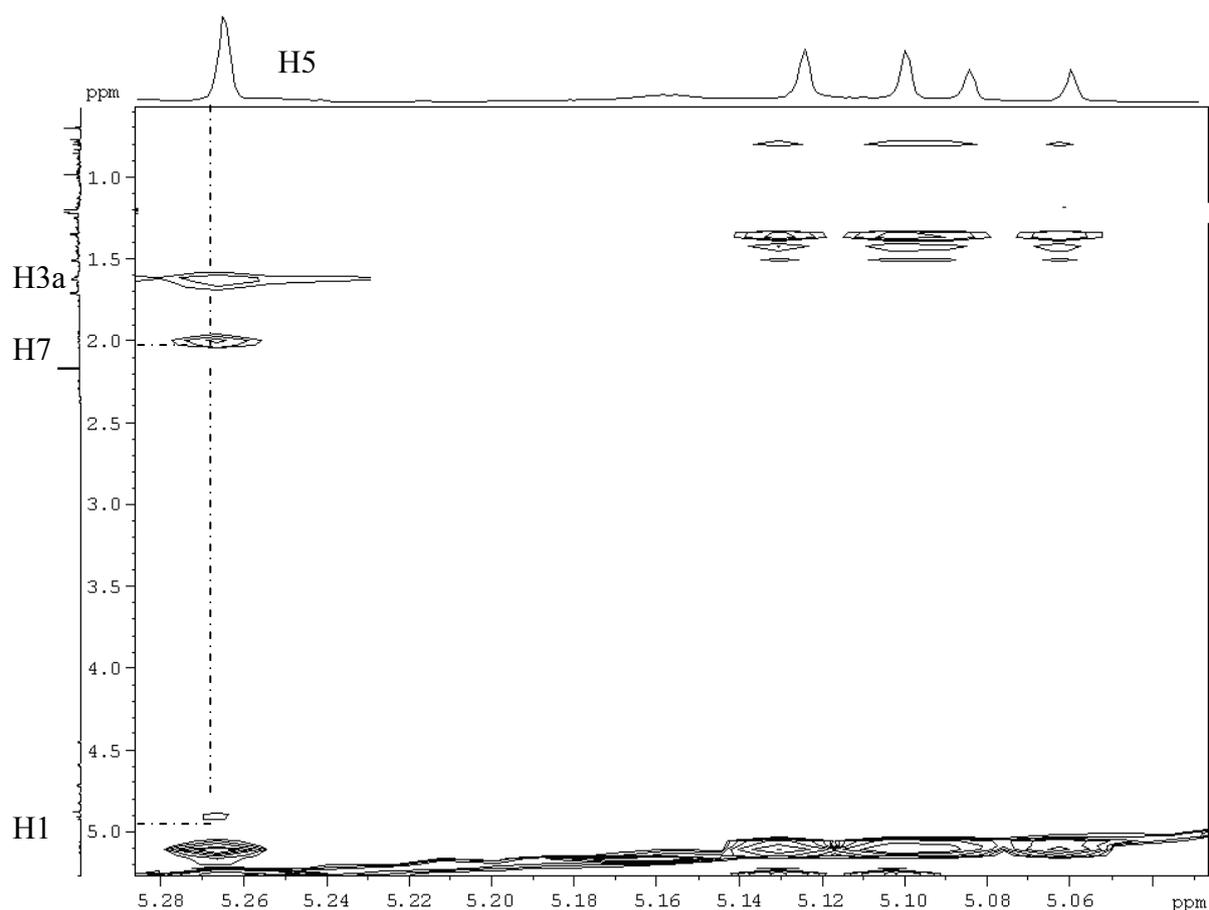
Annexe 16: Corrélations HSQC (zones des protons oléfiniques) du β -élémol.



Annexe 17 : Corrélations HSQC (zones des protons oléfiniques) du β -élémol (plots entourés) et du germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol.



Annexe 18 : Corrélations NOESY (corrélation ^1H - ^1H ; proximité spatiale) du germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol.



Résumé

Les travaux présentés dans ce mémoire contribuent d'une part, à la diversification de l'offre PPAM en région Corse en caractérisant les plantes par l'étude détaillée de la composition chimique des huiles essentielles et d'extraits et d'autre part, au développement de la RMN du ^{13}C en tant qu'outil d'analyse des mélanges complexes naturels. Ainsi, nous avons étudié par CPG (IR), CPG-SM et RMN du ^{13}C la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits (hydrolat et micro-ondes) obtenus à partir de quatre espèces de menthe poussant à l'état spontané en Corse ainsi que de cinq espèces du genre *Fortunella* cultivés à la station INRA-GEQA de San Ghjulianu.

La majorité des huiles essentielles de *M. aquatica*, *M. pulegium* et *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* possèdent des compositions chimiques fréquemment décrites dans la littérature. En revanche, certaines huiles essentielles de *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* présentent une composition jamais décrite, caractérisée par la présence majoritaire de la pipériténone (73,5 %). De la même manière, les huiles essentielles et extraits d'hydrolat de la sous-espèce *insularis*, endémique corso-sarde, possèdent des compositions chimiques originales, caractérisées par d'importantes teneurs en pulégone (respectivement 44,4 et 14,8 %) mais surtout en *cis-cis*-p-menthénolide (respectivement 27,3 et 67,3 %). Cette lactone p-menthanique, possédant le motif α -méthylène- γ -butyrolactone, n'avait jamais été identifiée à partir d'une source naturelle. Si la différenciation botanique des deux sous-espèces *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* et ssp. *insularis* apparaît délicate, la prise en compte du critère présence (ssp. *insularis*)/absence (ssp. *suaveolens*) de la *cis-cis*-p-menthénolide, constitue un outil fiable pour la détermination de la sous espèce.

Les huiles essentielles de fruits du genre *Fortunella* présentent des similitudes avec celles du genre *Citrus* avec des teneurs en limonène voisines de 90%. Par contre, les d'huiles essentielles et extraits (hydrolat et micro-ondes) de feuilles de *Fortunella japonica* présentent des compositions chimiques, très originales caractérisés par des fortes teneurs en sesquiterpènes. Le germacrène D et le β -élémol sont les composés majoritaires. L'utilisation de la RMN du ^{13}C nous a permis d'identifier de nombreux sesquiterpènes oxygénés peu communs tels que le germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol, l'amorph-4-èn-10 β -ol, l'amorph-4-èn-10 α -ol et le *trans*-guai-6-èn-10 β -ol. L'étude des huiles essentielles de fruits et de feuilles ainsi que des extraits micro-ondes de cinq espèces du genre *Fortunella* (*F. japonica*, *F. margarita*, *F. obovata*, *F. crassifolia* et *F. hindsii*) montre que seules des variations quantitatives peuvent permettre de différencier ces espèces.

DISCIPLINE

Chimie Organique et Analytique

MOTS CLÉS

Mentha, *Fortunella*, huile essentielle, hydrolat, extraction assistée par micro-ondes, RMN du ^{13}C , lactone p-menthanique, sesquiterpènes oxygénés,

ABSTRACT

This study has two objectives, on one hand, contributes to diversify the offer especially in the domain of Plant Perfume Aromatic and Medicine in Corsica by characterising chemical composition of their essential oils and extracts. On the other hand, it contributes to develop an analytical method for complex natural mixtures based on using ^{13}C NMR spectroscopy without preliminary isolation of components. Analysis of chemical compositions of essential oils (EO) and extracts (micro-wave assisted and hydrolate) of mints growing wild in Corsica and five species from the gender *Fortunella* has been done by combination of GC(RI), GC/MS and ^{13}C NMR.

EO from *M. aquatica*, *M. pulegium* and *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* posses chemical compositions widely reported in the literature. In contrary, EO from *M. suaveolens* ssp. *suaveolens* belonging to the piperitenone chemotype (73.5 %) appears original. In the same way, EO and hydrolate extract (HE) from the *insularis* subspecies, an endemic species of Corsica and Sardinia, posses an original chemical composition characterized by the association of pulegone (respectively 44.4 and 14.8 %) and *cis-cis*-p-menthenolide (respectively 27.3 and 67.3 %), a p-menthane α -methylene- γ -butyrolactone described for the first time as a natural product. Botanical differentiation of both sub-species (*suaveolens* and *insularis*) is a complex task. The occurrence (ssp. *insularis*) and the lack (ssp. *suaveolens*) of *cis-cis*-p-menthenolide in EO permits to deduce the belonging to each subspecies. The chemical composition of their essential oils may be considered as an additional tool to the authentification of botanically close subspecies.

EO of fruits from the gender *Fortunella* are close to EO from the gender *Citrus* characterized by high contents of limonene (> 90%). EO, HE and Microwave assisted Extract (ME) of leaves from the gender *Fortunella* are characterized by a sesquiterpen rich chemical composition (germacrene D and β -elemol). ^{13}C NMR has shown to be a powerful tool to identify unusual compounds like germacra-1(10),5-dien-4 α -ol, amorph-4-en-10 β -ol, amorph-4-en-10 α -ol and *trans*-guai-6-en-10 β -ol which added originalities to EO, HE and ME. Determination of chemical composition of EO from fruits, EO and ME from leaves from five species from *Fotunella* permits to differentiate each species only by their quantitative variation.

DOMAIN

Analytical and Organic Chemistry

KEYWORDS

Mentha - *Fortunella* – Natural complex mixtures – Essential oils – Hydrolat extract
Microwave assisted extraction – ^{13}C NMR -- p-Menthane Lactones – Oxygenated
sesquiterpenes.
