



HAL
open science

La RMN du carbone-13, outil d'analyse . Etude phytochimique de *Clinipodium ascendens*, *Bupleurum fruticosum* et *Santolina corsica*

Kaï Liu, Félix Tomi

► To cite this version:

Kaï Liu, Félix Tomi. La RMN du carbone-13, outil d'analyse . Etude phytochimique de *Clinipodium ascendens*, *Bupleurum fruticosum* et *Santolina corsica*. Chimie. Université de Corse, 2008. Français. NNT: . tel-00604114

HAL Id: tel-00604114

<https://theses.hal.science/tel-00604114v1>

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

Kai LIU

le 27-06-2008

**LA RMN DU CARBONE-13, OUTIL D'ANALYSE
ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE *CLINOPODIUM ASCENDENS*,
BUPLEURUM FRUTICOSUM ET *SANTOLINA CORSICA*.**

Directeur de thèse : Pr. Félix TOMI

JURY

| | | |
|------|-----------------|--|
| Mme. | R. VILA | Professeur, Université de Barcelone (Rapporteur) |
| Mme | C. MENUT | Professeur, Université de Montpellier (Rapporteur) |
| M. | F. CASABIANCA | Directeur du LDA2A |
| M. | A.F. BERNARDINI | Professeur, Université de Corse |
| M. | J. CASANOVA | Professeur, Université de Corse |
| M. | F. TOMI | Professeur, Université de Corse |

*À la mémoire de mes grands-parents
À ma mère et mon père
À ma sœur*

学如逆水行舟，不进则退

Etudier, c'est comme ramer à contre courant, si vous n'avancez pas vous reculez.

-----Proverbe chinois

实践是检验真理的唯一标准

La vérité doit s'inspirer de la pratique. C'est par la pratique que l'on conçoit la vérité. Il faut corriger la vérité d'après la pratique.

-----MAO Ze Dong

Nature is indeed the eternal problem, and when it is solved, we know not only Nature but ourselves; the problem of Nature is the problem of human life.

----- Zen Buddhism

*Dio vi salvi Regina
E madre universale
Per cui favor si sale
Al paradiso*

*Voi siete gioia e riso
Di tutti scunsulati
Di tutti i tribulatti
Unica speme*

*A voi suspira e geme
Il nostro afflito core
In un mare di dolore
E d'amarezza*

*Maria, mar di dolcezza
I vostri occhi pietosi
Materni ed amurosi
A noi volgete*

*Noi miseri accogliete
Nel vostro santo velo
Il vostro figlio in celo
A noi mostate*

*Gradite ed ascoltate
Ô vergine maria
Dolce e clemente e pia
Gli affleti nostri*

*Voi da nemici nostri
A noi date vittoria
E poi l'eterna gloria
In paradiso*

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

CC : Chromatographie sur Colonne
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance
CLHP-CPG-SM : Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Chromatographie en Phase Gazeuse et Spectrométrie de Masse
CLHP-¹H RMN : Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Résonance Magnétique Nucléaire du ¹H
CLHP-SM-¹H RMN : Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse et à la Résonance Magnétique Nucléaire du ¹H
CLHP-SM : Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse
CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse
Ir : Indices de rétention
CPG(Ir) : Chromatographie en Phase Gazeuse (associée aux Indices de rétention)
IRTF : la spectroscopie Infra-Rouge à la Transformée de Fourier
CPG-IRTF : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la spectroscopie Infra-Rouge à la Transformée de Fourier
CPG-IRTF-SM : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la spectroscopie Infra-Rouge à la Transformée de Fourier et Spectrométrie de Masse
CPGMD : Chromatographie en Phase Gazeuse MultiDimensionnelle
CPGP : Chromatographie en Phase Gazeuse Préparative
SM : Spectrométrie de Masse
SM(ICN) : Spectrométrie de Masse (mode Ionisation Chimique Négative)
SM(ICP) : Spectrométrie de Masse (mode Ionisation Chimique Positive)
SM(IE) : Spectrométrie de Masse (mode Impact Electronique)
CPG-SM : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
DEPT : Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
RMN (1D et 2D) : Résonance Magnétique Nucléaire (mono- et bidimensionnelle)
COSY : Correlation Spectroscopy (corrélation ¹H-¹H simple liaison)
HSQC : Heteronuclear Simple Quantum Correlation (corrélation ¹H-¹³C simple liaisons)
HMBC : Heteronuclear Multiple Bonds Correlation (corrélation ¹H-¹³C longue distance, deux ou trois liaisons)
ppm : partie par million
 δ : déplacement chimique
 $\delta^1\text{H}$: déplacement chimiques RMN ¹H
 $\delta^{13}\text{C}$: déplacement chimiques RMN ¹³C
 $\Delta\delta$: variation de déplacement chimique
SFME : Solvant Free Extraction Microwave

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|-----|
| Figure 1: les méthodes d'analyse d'un mélange complexe | 12 |
| Figure 2: identification des constituants d'un mélange complexe par RMN du carbone 13 | 33 |
| Figure 3: déplacements chimiques de carbones du linalol (1) | 48 |
| Figure 4: déplacements chimiques de carbones du linalol (1) et variations moyennes observées en présence d'un dérivé phénolique (1a) (détails en annexe 1). | 50 |
| Figure 5: variations moyennes des déplacements chimiques des carbones du linalol en présence d'une cétone (1b), d'un acétate (1c), d'un aldéhyde (1d), d'un oxyde (1e). (annexe 2-annexe5) | 52 |
| Figure 6: variations moyennes des déplacements chimiques des carbones du linalol observées en présence d'un dérivé alcool (1f) (annexe 6). | 54 |
| Figure 7: déplacements chimiques de carbones du (E)-nérolidol (2), du (Z)-nérolidols (3) et du (6E ,10E)- géranyllinalol (4). | 57 |
| Figure 8: variations moyennes des déplacements chimiques des carbones du (E)-nérolidol (2a), du (Z)-nérolidol (3a) et du (6E ,10E)- géranyllinalol (4a) observées en présence d'un dérivé phénolique. (annexe7-annexe9). | 59 |
| Figure 9: variations moyennes des déplacements chimiques des carbones du (E)-nérolidol (2b), (Z)-nérolidol (3b) et du (6E ,10E)- géranyllinalol (4b) observées en présence d'une cétone (annexe10-annexe12). | 60 |
| Figure 10: variations moyennes des déplacements chimiques des carbones du (E)-nérolidols(2c), (Z)-nérolidols (3c) et (6E ,10E)- géranyllinalol (4c) observées en présence d'un alcool (annexe 13-15). | 62 |
| Figure 11: déplacements chimiques des carbones du citronellol (5), et du tétrahydrogéraniol(6). | 63 |
| Figure 12: variations moyennes des déplacements chimiques des carbones du citronellol (5a), tétrahydrogéraniol (6a) observées en présence d'un dérivé phénolique (annexe 16-17). | 63 |
| Figure 13: variations moyennes des déplacements chimiques observées en présence d'une dérivé cétone citronellol (5b), tetrahydrogeraniol (6b) et en présence d'un dérivé alcool, citronellol (5c), tétrahydrogéraniol(6c) (annexe 18-21). | 64 |
| Figure 14: déplacements chimiques de carbones du géraniol (7), du néral (8) et variations moyennes observées en présence d'un phénol (7a, 8a), d'un alcool (7b, 8b), et d'un acétate (7c, 8c),(annexe 22-27). | 65 |
| Figure 15: les rameaux de <i>Clinopodium ascendens</i> . | 71 |
| Figure 16: schéma de fractionnement de l'huile essentielle de <i>Clinopodium ascendens</i> de Madère. | 76 |
| Figure 17: les rameaux de <i>Bupleurum fruticosum</i> . | 92 |
| Figure 18: schéma de fractionnement de l'huile essentielle de <i>B. fruticosum</i> L. | 99 |
| Figure 19: échantillonnage de <i>B. fruticosum</i> . | 112 |
| Figure 20: ACP de 37 échantillons d'huiles essentielles de <i>B.fruticosum</i> de Corse. | 116 |
| Figure 21: <i>Santolina corsica</i> en floraison à Bistugliu (Centre corse). | 131 |
| Figure 22: schéma de fractionnement de l'huile essentielle de <i>Santolina corsica</i> . | 135 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|-----|
| Tableau 1: variations des déplacements chimiques des carbones du linalol en fonction de la concentration. | 49 |
| Tableau 2: variation des déplacements chimiques des carbones du linalol (0,5 mol.L ⁻¹) en fonction de la concentration de verbenone (0,05-0,5 mol.L ⁻¹) | 56 |
| Tableau 3: variation des déplacements chimiques des carbones du linalol (0,5 mol.L ⁻¹) en fonction de la concentration de carvacrol (0,05-0,5 mol.L ⁻¹). | 56 |
| Tableau 4: structure et déplacements chimiques de la trans-isopulégone observés dans la fraction F2 et décrits dans la littérature (δ C, ppm). | 77 |
| Tableau 5: structure et déplacements chimiques de RMN 1H et 13C observés dans fraction F2 de la cis-isopulégone (δ C, ppm). | 78 |
| Tableau 6: structure et données RMN 1H et ¹³ C du néoiso-isopulégol. | 80 |
| Tableau 7: fractionnement de l'huile essentielle de <i>C. ascendens</i> . | 81 |
| Tableau 8: structures et données RMN ¹³ C des 4 isomères de l'isopulégol. | 83 |
| Tableau 9: structures et données RMN ¹³ C des 4 isomères de l'isopulégol. | 85 |
| Tableau 10: résultats des tests anti-bactériens et anti-fongiques par disques. | 89 |
| Tableau 11: principaux composés présents dans l'huile essentielle de <i>B. fruticosum</i> (données de la littérature). | 95 |
| Tableau 12: identification par RMN du carbone-13 des principaux constituants d'un échantillon d'huile essentielle de <i>B. fruticosum</i> . | 98 |
| Tableau 13: structure et attribution des déplacements chimiques des protons et des carbones de l'isovalérate de cinnamyle. | 102 |
| Tableau 14: structure et attribution des déplacements chimiques des protons et des carbones du 2-méthylbutyrate de cinnamyle. | 103 |
| Tableau 15: identification par CPG-Ir et RMN du carbone-13 des constituants d'une huile essentielle de population de <i>B. fruticosum</i> après fractionnement. | 104 |
| Tableau 16: bilan de l'analyse d'un échantillon d'huile essentielle de <i>B. fruticosum</i> de Corse par CPG(Ir), CPG-SM et RMN du carbone-13. | 106 |
| Tableau 17: évolution de la composition chimique de l'huile essentielle du <i>B. fruticosum</i> en fonction du stade de développement de la plante. | 108 |
| Tableau 18: composition chimique de l'huile essentielle de <i>B. fruticosum</i> de tiges, feuilles et fleurs. | 110 |
| Tableau 19: composition chimique des HE de <i>B. fruticosum</i> de Corse. | 114 |
| Tableau 20: composition chimique des huiles essentielles, obtenues par hydrodistillation (HE) et par extraction sans solvant assistée par micro-ondes (SFME). | 121 |
| Tableau 21: composition chimique de l'HE et de l'extrait de l'hydrolat de <i>B. fruticosum</i> . | 123 |
| Tableau 22: composition chimique de 4 extraits d'hydrolat de <i>B. fruticosum</i> . | 125 |
| Tableau 23: identification par CPG-Ir et RMN du carbone-13 des composés issus du fractionnement de F3. | 136 |
| Tableau 24: identification par CPG-Ir et RMN du carbone-13 des composés issus du fractionnement de F3.1. | 138 |
| Tableau 25: données RMN ¹ H et ¹³ C du lyratol. | 139 |
| Tableau 26: données RMN ¹ H et ¹³ C du butyrate de lyratyle. | 140 |
| Tableau 27: données RMN ¹ H et ¹³ C de l'isovalérate de lyratyle. | 141 |
| Tableau 28: données RMN ¹ H et ¹³ C de l'isolyratol et de l'épi-isolyratol. | 143 |
| Tableau 29: données RMN ¹ H et ¹³ C de l'isolyratone. | 145 |
| Tableau 30: composition chimique de l'huile essentielle de <i>S. corsica</i> . | 147 |
| Tableau 31: composition chimique de l'huile essentielle de fleurs et tiges de <i>S. corsica</i> . | 150 |
| Tableau 32: activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>S. corsica</i> . | 154 |
| Tableau 33: activité antibactérienne de fractions de l'huile essentielle de <i>S. corsica</i> . | 154 |

AVANT PROPOS

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe «Chimie et Biomasse» de l'Université de Corse, associée au CNRS (UMR 6134), dirigée par le Professeur Joseph CASANOVA, sous la direction du Professeur Félix TOMI.

Tout d'abord, je profite de l'occasion qui m'est ainsi donnée pour exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur Félix TOMI tant pour m'avoir accordé sa confiance que pour m'avoir guidé dans mon travail tout au long de ces années. Ses compétences, ses précieux conseils, sa disponibilité et sa gentillesse à mon égard ont contribué au bon déroulement de ce travail de recherche. J'ai trouvé en lui un directeur toujours disponible et ouvert.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur Joseph CASANOVA. C'est grâce à sa bienveillance que j'ai pu réaliser cette thèse dans son laboratoire de Vignola, à Ajaccio. J'ai été très sensible à sa grande expérience et ses précieux conseils. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

Je suis très sensible à l'honneur que me font Madame le Professeur Roser VILA (Université de Barcelone), et Madame le Professeur Chantal MENUT (Université de Montpellier) en acceptant de juger ce travail. Je suis très heureux de bénéficier de leurs recommandations et je tiens à leur exprimer ma sincère reconnaissance pour cette marque d'intérêt.

Que Monsieur Francis CASABIANCA, Directeur du Laboratoire Départemental d'Analyses du conseil général de la Corse du Sud trouve ici l'expression de mes sincères remerciements pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail en acceptant de participer à ce jury.

Monsieur le Professeur Antoine-François BERNARDINI (Université de Corse) a toujours manifesté à mon égard sympathie et bienveillance. Je lui témoigne ici de mon profond attachement et le remercie d'avoir accepté de participer à ce jury.

Mes plus vifs remerciements vont à Madame le Professeur Paula CASTILHO de l'Université de Madère et Madame le Professeur Liliane BERTI de l'Université de Corse pour leur précieuse aide dans les études menées en collaboration.

Je suis également très reconnaissant envers Mesdames Dominique de ROCCA SERRA, Pascale BRADESI, Monsieur Vincent CASTOLA Maîtres de Conférences à l'Université de Corse, ainsi que Monsieur le Professeur Ange BIGHELLI à l'Université de Corse pour leurs gentillesse et leurs encouragements constants

A Mesdames Cathy LUGREZI et Marie-Christine BOSQUET personnels CNRS du laboratoire une vive reconnaissance pour leur soutien moral, leur disponibilité à mon égard, leurs conseils avisés et leur gentillesse.

Je tiens également à remercier vivement à Gilles NOTTON, Philippe POGGI et Marc MUSELLI de l'équipe «Systèmes à Sources Renouvelables d'Énergie» pour leur sympathie, leur gentillesse, leur bonne humeur.

Le plaisir de l'étude et de la recherche a parfois été obscurci par de longs moments de doutes. Pour leur soutien, leur aide, ou tout simplement leur présence pendant ces périodes, je veux dire ici ma profonde reconnaissance envers tous mes camarades : Muriel VELLUTINI, Dominique LESUEUR, Jean-Brice BOTI, Emilie DUQUESNOY, Joséphine OTTAVIOLI, Sylvain SUTOUR, Mathieu PAOLI de l'équipe « Chimie et Biomasse » Paul-Georges ROSSI de l'équipe « Biochimie et biologie moléculaire du végétal », Julien PAOLINI de l'équipe « Chimie des Produits Naturels », ainsi qu' Owen CLUS, Rachel BAILE, Christophe DARRAS, Said DIAF de l'équipe «Systèmes à Sources Renouvelables d'Énergie»,

Je tiens également à exprimer mes remerciements à Ludmil STOYANOV, pour son amitié et son aimable disponibilité concernant les problèmes d'informatique.

Je tiens à remercier aussi :

- Monsieur Pierre-Antoine ALESSANDRI, Producteur d'huiles essentielles, pour sa gentillesse, sa disponibilité et pour m'avoir fourni l'huile essentielle de Bupleurum fruticosum.

- Les membres du personnel CNRS du laboratoire et notamment Messieurs Jean-Claude ROMANO et Yves THIBAUDAT pour leur soutien amical.

Je ne peux oublier de remercier l'ensemble de mes amis et notamment Alex, Vanina et Zhang Xiao Dong pour m'avoir toujours soutenu.

Enfin, il y a six ans, j'ai souhaité quitter la Chine pour continuer mes études en France. Je remercie tout particulièrement ma famille qui m'a toujours soutenu dans mes choix et qui malgré les kilomètres a toujours su m'encourager surtout pendant les moments de doute qui surviennent toujours avec l'éloignement. Merci Maman, Merci Papa, Merci ma grande sœur.

SOMMAIRE

| | |
|---|----|
| INTRODUCTION..... | 1 |
| CHAPITRE I LES METHODES D'ANALYSE DES MELANGES COMPLEXES NATURELS | 8 |
| I. L'IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS DES MELANGES COMPLEXES NATURELS | 11 |
| I.1. Analyse par les méthodes conventionnelles (voie A)..... | 13 |
| I.1.1 La CPG et le couplage de la CPG avec une technique spectroscopique..... | 13 |
| I.1.1.1. La CPG et les indices de rétention..... | 13 |
| I.1.1.2. La CPG bidimensionnelle (CPG x CPG)..... | 14 |
| I.1.1.3. Le couplage CPG-SM..... | 15 |
| I.1.1.4. La combinaison du couplage CPG-SM et des indices de rétention..... | 16 |
| I.1.1.5. La CPG-SM(ICP) ou CPG-SM(ICN)..... | 16 |
| I.1.1.6. Le couplage CPG-SM-SM..... | 18 |
| I.1.1.7. Le couplage CPG-IRTF..... | 18 |
| I.1.1.8 Le couplage CPG-IRTF-SM..... | 19 |
| I.1.2. La CLHP et les couplages avec une technique spectroscopique..... | 20 |
| I.1.2.1. Le couplage CLHP-SM et CLHP-SM-SM..... | 20 |
| I.1.2.2. Le couplage CLHP-CPG-SM..... | 20 |
| I.1.2.3. Le couplage CLHP-RMN ¹ H..... | 21 |
| I.2. Identifications des constituants après séparation totale (purifications) ou partielle (enrichissement) : voie : B | 22 |
| I.3. Analyse par RMN du carbone-13 sans séparation préalable : voie C..... | 24 |
| I.3.1 Intérêt de la RMN du carbone-13..... | 24 |
| I.3.2. Identification des constituants en mélange par RMN du carbone-13..... | 26 |
| I.3.2.1. Observation et individualisation des signaux..... | 26 |
| I.3.2.2. Attribution des signaux..... | 29 |
| I.3.3 La méthode d'analyse développée au laboratoire..... | 32 |
| I.3.4. Application à l'analyse d'huiles essentielles ainsi qu'à d'autres mélanges naturels | 35 |
| I.3.4.1. Caractérisation d'huiles essentielles..... | 35 |
| I.3.4.2. Identification de stéréoisomères..... | 37 |
| I.3.4.3. Identification de molécules thermosensibles..... | 38 |
| I.3.4.4. Identification simultanée de composés neutres et acides..... | 38 |
| I.3.4.5. Étude de la variabilité chimique..... | 39 |
| I.3.4.6. L'analyse qualitative et quantitative de composés non volatiles..... | 39 |
| I.3.4.7. Différentiation énantiomérique..... | 40 |
| I.3.4.8. L'analyse structurale de nouvelles molécules..... | 40 |
| II. PROBLEMATIQUE DE LA RECHERCHE..... | 43 |
| CHAPITRE II VARIATION DES DEPLACEMENTS CHIMIQUES DES CARBONES DE COMPOSES TERPENIQUES EN MELANGE | 45 |
| I. MÉLANGES BINAIRES LINALOL-COMPOSÉ OXYGÉNÉ | 50 |
| I.1. Mélanges binaires linalol-composé phénolique..... | 50 |

| | |
|---|-----|
| I.2. Mélange binaire linalol-cétone/ester/aldéhyde/oxyde | 51 |
| I.3. Mélanges binaires linalol-alcool | 53 |
| I.4. Influence de la dilution du linalol | 54 |
| II. MÉLANGES BINAIRES DES (E)- ET (Z)-NÉROLIDOLS ET DU (6E, 10E)- GÉRANYLLINALOL AVEC DES COMPOSÉS OXYGÉNÉS | 56 |
| II.1. Mélanges binaires des (E)- et (Z)-nérolidols et du (6E, 10E)- géranyllinalol avec des dérivés phénoliques. | 58 |
| II.2. Mélanges binaires des (E)- et (Z)-nérolidols et du (6E,10E)- géranyllinalol avec des cétones. | 60 |
| II.3. Mélanges binaires des (E)- et (Z)-nérolidols et du (6E,10E)- géranyllinalol avec des alcools..... | 61 |
| III. MÉLANGE BINAIRE CITRONELLOL ET DU TÉTRAHYDROGÉRANIOL AVEC DES PHÉNOLS, DES ALCOOLS OU DES CÉTONES | 62 |
| IV. MÉLANGES BINAIRES DU GÉRANIAL ET DU NÉRAL AVEC UN PHÉNOL, UN ALCOOL OU UN ACÉTATE. | 65 |
| V. BILAN DE L'ÉTUDE..... | 66 |
| CHAPITRE III L'HUILE ESSENTIELLE DE CLINOPODIUM ASCENDENS (JORDAN) SAMPAIO DE MADERE..... | |
| I. INTRODUCTION | 69 |
| II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE..... | 71 |
| III. ETUDE DÉTAILLÉE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE PARTIES AÉRIENNES DE <i>C. ASCENDENS</i> | 74 |
| III.1. Analyse d'un échantillon d'huile essentielle totale..... | 74 |
| III.2. Fractionnement et étude détaillée..... | 75 |
| III.3. Identification des trans et cis-isopulégones..... | 76 |
| III.4. Identification du néoiso-isopulégol..... | 79 |
| III.5. Données spectrales des 4 isomères de l'isopulégol..... | 82 |
| IV. BILAN DE L'ÉTUDE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>CLINOPODIUM</i> <i>ASCENDENS</i> | 84 |
| V. ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>CLINOPODIUM</i> <i>ASCENDENS</i> | 88 |
| CHAPITRE IV L'HUILE ESSENTIELLE DE BUPLEURUM FRUTICOSUM DE CORSE | |
| I. LE GENRE <i>BUPLEURUM</i> | 91 |
| II. L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>BUPLEURUM FRUTICOSUM</i> L..... | 97 |
| II.1. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Bupleurum fruticosum</i> L..... | 97 |
| II.1.1. Analyse d'une huile essentielle de population | 97 |
| II.1.2. Fractionnement et étude détaillée de l'huile essentielle | 98 |
| II.2. La composition chimique de l'huile essentielle en fonction de l'état physiologique de la plante et des différentes parties du végétal..... | 107 |
| II.2.1. Influence de l'état physiologique de la plante sur la composition de l'huile essentielle obtenue à partir des parties aériennes. | 107 |
| II.2.2. Composition des huiles essentielles obtenues à partir de différentes parties du végétal, tiges, feuilles et fleurs | 109 |
| II.3. Etude de la variabilité chimique de l'huile essentielle de <i>B. fruticosum</i> | 111 |
| III. L'EXTRACTION ASSISTÉE PAR MICRO-ONDES ET L'HYDROLAT DE <i>B.</i> <i>FRUTICOSUM</i> | 117 |

| | |
|--|-----|
| III.1. Comparaison de la composition de l'huile essentielle obtenue par l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes et par hydrodistillation..... | 117 |
| III.2. Composition chimique de l'extrait de l'hydrolat de <i>B. fruticosum</i> L..... | 122 |
| IV. BILAN DE L'ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES DE <i>B. FRUTICOSUM</i> DE CORSE..... | 126 |
| CHAPITRE V CARACTERISATION DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>SANTOLINA</i> | |
| <i>CORSICA</i> DE CORSE | 128 |
| I. <i>SANTOLINA</i> <i>CORSICA</i> | 130 |
| II. ANALYSE D'UNE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>SANTOLINA</i> <i>CORSICA</i> | 133 |
| II.1. Fractionnement de l'huile essentielle de <i>S. corsica</i> | 134 |
| II.2. Identification des constituants absents de la bibliothèque de spectres « terpènes » | 142 |
| III. ANALYSE D'UNE L'HUILE ESSENTIELLE DE FLEURS DE <i>SANTOLINA</i> | |
| <i>CORSICA</i> | 149 |
| IV. ETUDE DE LA VARIABILITE CHIMIQUE DE <i>Santolina corsica</i> | 151 |
| V. ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>SANTOLINA</i> | |
| <i>CORSICA</i> | 153 |
| CONCLUSION | 155 |
| PARTIE EXPERIMENTALE..... | 161 |
| BIBLIOGRAPHIE | 169 |
| ANNEXES | 194 |

INTRODUCTION

Introduction

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre des recherches auxquelles se consacre depuis une vingtaine d'années l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse qui fait partie de l'UMR-CNRS 6134, SPE (Sciences Pour l'Environnement). L'objectif général est de contribuer à augmenter la rentabilité économique de la biomasse en caractérisant les produits qui en sont issus en vue de leur valorisation. Aujourd'hui, les produits naturels connaissent un réel succès dans des secteurs tels que la parfumerie, la cosmétique, la pharmacie ou bien encore l'agro-alimentaire.

Un produit naturel se présente presque toujours sous la forme d'un mélange complexe de composés appartenant ou non à une même famille chimique. Sa caractérisation, qui passe par la connaissance de sa composition chimique, est un facteur déterminant de sa commercialisation. Cette caractérisation 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 lors de la commercialisation.

Pour la grande majorité des populations rurales des pays en développement, les plantes médicinales ont toujours constitué des ressources précieuses. Ainsi, la médecine traditionnelle occupe une place importante dans les cultures asiatique et africaine. 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 dans 3600 exploitations. Une centaine d'espèces est cultivée mais de nombreuses espèces sont aussi récoltées en l'absence de mise en cultures. Le secteur des PPAM touche majoritairement des marchés tels que la parfumerie, la cosmétique, l'aromathérapie et l'agroalimentaire. Le développement de cette filière en France souffre toutefois d'une concurrence de plus

en plus prononcée au plan international et d'un contexte réglementaire européen de plus en plus difficile.

En Corse, le secteur PPAM, malgré sa petite taille (6 producteurs), bénéficie d'une très bonne image autour de deux produits-phares (l'immortelle et le romarin) et d'une ressource végétale diversifiée et spécifique. Cependant, la production des huiles essentielles est réalisée à partir de matières premières issues majoritairement 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 source, meilleurs rendements, rentabilité, ...).

La plupart des substances naturelles extraites des plantes aromatiques se présentent sous forme de mélanges complexes constitués de plusieurs dizaines de composés en proportions variables et pouvant présenter des structures et des fonctions chimiques très variées. Conventionnellement, l'analyse des constituants d'un mélange complexe naturel est réalisée de différentes manières en fonction du résultat recherché (analyse de routine ou étude approfondie), de la complexité du mélange ou de la nature des constituants qui le composent (volatils ou non).

Pour cela, de nombreuses techniques analytiques sont aujourd'hui disponibles, la démarche adoptée pour l'analyse des constituants d'un mélange complexe naturel 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 est le premier critère à prendre en compte et elle implique souvent la mise en œuvre de plusieurs techniques complémentaires. Globalement, on distingue les deux voies analytiques suivantes.

Introduction

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), 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 complexes, 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 soit 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 proton et du carbone-13...). Cette démarche est sans aucun doute plus longue à mettre en œuvre mais aussi plus fiable, en partie grâce à la RMN du carbone-13 qui apporte des informations extrêmement précieuses sur le squelette carboné de la molécule.

Parallèlement, l'utilisation de la RMN du carbone-13 comme outil analytique a connu ces dernières années un essor important dans plusieurs domaines. Ainsi, à la suite des travaux de Formáček et Kubezka, notre équipe a mis au point et développé une nouvelle méthode d'identification des constituants des mélanges complexes naturels, par RMN du carbone-13, 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 méthodologique, notre travail a d'abord consisté à poursuivre le développement de la méthode d'analyse par RMN du carbone-13 par des études destinées à mieux appréhender le phénomène de la variation des déplacements chimiques des carbones qui constitue un des trois paramètres de notre méthode d'analyse. Nous avons aussi contribué à l'enrichissement de la bibliothèque «Terpènes» propre au laboratoire qui contient environ 700 spectres de composés terpéniques de référence.

- d'un point de vue plus finalisé, nous avons étudié la composition chimique de deux huiles essentielles de Corse (*Bupleurum fruticosum* et *Santolina corsica*) en relation avec les producteurs installés en région corse et une troisième *Clinopodium ascendens* provenant de l'île de Madère dans le cadre d'une approche sur la biodiversité insulaire.

Ainsi dans le premier chapitre, nous ferons un tour d'horizon des principales techniques 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 carbone-13 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, le deuxième chapitre, nous examinerons le phénomène des variations des déplacements chimiques des carbones dans le spectre du mélange par rapport aux valeurs de références contenues dans la bibliothèque « terpènes ». Nous avons choisi de mesurer cette variation à l'aide de mélanges binaires associant d'une part, des alcools mono-, sesqui- et diterpéniques (linalol, nérolidol, geranylinalol) et d'autre part, des dérivés phénoliques ou carbonylés (cétones, aldéhydes, esters). Nous examinerons également le comportement d'aldéhydes α , β -insaturés (cital) vis-à-vis d'alcools et de dérivés phénoliques ou carbonylés.

Dans le troisième chapitre, nous appliquerons notre technique d'identification des constituants des huiles essentielles par RMN du carbone-13 à l'analyse de l'huile essentielle de *Clinopodium ascendens* de l'île de Madère en collaboration avec l'université de Madère. L'échantillonnage, l'obtention de l'huile essentielle et l'étude antibactérienne ont été réalisées à Madère. Notre implication dans cette étude concerne l'identification de molécules dont certaines sont absentes des bibliothèques de spectres (CPG/SM et RMN ^{13}C).

Nous proposerons dans le quatrième chapitre, l'analyse par RMN ^{13}C d'un échantillon d'huile essentielle de *Bupleurum fruticosum* qui est commercialisée par les producteurs locaux, afin de caractériser cette plante par l'étude détaillée de la composition chimique. Nous examinerons aussi divers paramètres pour une éventuelle production (période de récolte, variabilité chimique intraspécifique,...). Nous utiliserons des outils statistiques d'interprétation pour réaliser l'étude sur la variabilité intraspécifique (ACP, K-means). Enfin, nous présenterons les résultats d'une part, sur une nouvelle technique d'obtention des huiles essentielles par micro-ondes et d'autre part, sur l'hydrolat ou eau florale obtenu conjointement à l'huile essentielle.

Le dernier chapitre sera consacré à l'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle d'une plante endémique cyrno-sarde, *Santolina corsica* afin de proposer un élargissement de la gamme d'huiles essentielles produites en Corse. Nous

Introduction

montrons en particulier les potentialités de la méthode pour la caractérisation de cette huile essentielle qui renferme de nombreux terpènes irréguliers présentant une grande variété de squelettes. Nous insisterons sur l'identification de nouveaux monoterpènes irréguliers. Enfin, nous présenterons les résultats obtenus en collaboration avec l'équipe « Biochimie et biologie moléculaire du végétal » dirigée par Mme le Professeur Liliane Berti, sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne de cette huile essentielle.

CHAPITRE I

LES METHODES D'ANALYSE DES MELANGES COMPLEXES NATURELS

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'hémisynthèse de produits pharmaceutiques, de vitamines, de substances odorantes, etc. [1]

Les mélanges naturels peuvent être schématiquement repartis en deux groupes : les volatils et les non volatils. Dans le groupe des volatils, on trouve surtout les huiles essentielles obtenues par entraînement à la vapeur d'eau (à l'échelle industrielle), par hydrodistillation (à l'échelle du laboratoire) ou par expression à froid de plantes à essence (zestes d'agrumes). A cette catégorie, on peut associer, bien que ce ne soient plus des huiles essentielles si l'on tient compte de la définition de celles-ci, les mélanges obtenus par extraction assistée par micro-ondes et même, dans certains cas, les extraits au CO₂ supercritique. Les molécules volatiles présentes dans ces 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 [1] et des composés non terpéniques à chaîne linéaire. Les composés non volatils du métabolisme secondaire (qui doivent être distingués des composés du métabolisme primaire glucides, lipides et acides aminés), sont constitués de diverses familles de composés. Nous distinguerons, à titre d'exemple, les terpènes et stéroïdes (diterpènes, triterpènes, phytostérols), les dérivés phénoliques (flavonoïdes, tanins,...), les alcaloïdes, les coumarines, etc [2].

La valorisation ou la commercialisation de ces mélanges naturels, quelle soit leur application, est en général précédée d'une étape de caractérisation qui inclut l'analyse de leur composition chimique (identification et quantification des constituants). Ce délicat travail nécessite de disposer d'outils analytiques rapides et fiables, chacun d'eux possédant sa spécificité et son domaine d'application.

I. L'IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS DES MELANGES COMPLEXES NATURELS

Les techniques analytiques pouvant être mises en œuvre pour l'identification des constituants d'un mélange complexe sont nombreuses et variées. Cependant, l'identification et la quantification des constituants d'un mélange naturel demeurent toujours des opérations délicates qui nécessitent souvent l'utilisation de plusieurs techniques complémentaires [3,4].

De manière conventionnelle, l'identification des constituants d'un mélange complexe naturel s'effectue selon deux voies (Figure 1) :

- La voie A met en œuvre le couplage « en ligne » d'une ou plusieurs techniques chromatographiques (CPG, CLHP), permettant d'individualiser les constituants et d'une ou plusieurs techniques spectroscopiques qui permettent de les identifier par comparaison de leur données spectrales avec celles de produits connus. D'une manière générale, cette voie est particulièrement bien adaptée aux analyses de routine où l'identification des constituants ne présente pas de difficultés majeures (huiles essentielles déjà étudiées, contrôle de qualité, ...). L'utilisation des couplages multiples a néanmoins démontré son efficacité dans le cas d'analyses fines de mélanges complexes.
- La voie B quant à elle s'apparente à celle qui est utilisée pour élucider la structure d'un composé nouveau (c'est-à-dire, dont les données spectrales ne sont pas décrites dans la littérature). C'est la voie séparation-identification. Elle nécessite l'isolement préalable des constituants avant leur analyse, par les diverses techniques séparatives : partition acido-basique, distillation fractionnée, cristallisation, extraction sélective par les solvants, chromatographie sur colonne (CC), sur couche mince (CCM), CLHP ou CPG préparatives. Les composés purifiés sont soumis à toute la panoplie d'analyses, incluant la RMN du proton, du carbone-13 et la RMN bidimensionnelle (2D). Néanmoins, quand il s'agit d'identifier les composés d'un mélange dont les

structures et les données spectrales sont décrites dans la littérature, une séparation (purification) partielle peut s'avérer suffisante.

- L'analyse peut également être menée selon la voie C (Figure 1), plus originale, qui met en œuvre la Résonance Magnétique Nucléaire du carbone-13 (RMN ^{13}C) comme technique d'identification des constituants d'un mélange complexe, sans séparation ni dérivatisation préalables ou éventuellement après une étape de séparation aussi réduite que possible. Dans le domaine des huiles essentielles, cette troisième voie, initiée par les travaux de Formáček et Kubeczka, a été développée, optimisée et informatisée par l'équipe « Chimie et Biomasse » qui en a fait une véritable méthode d'identification des constituants d'un mélange naturel. De plus, cette technique peut être utilisée pour la quantification des composés difficilement quantifiables avec les techniques conventionnelles.

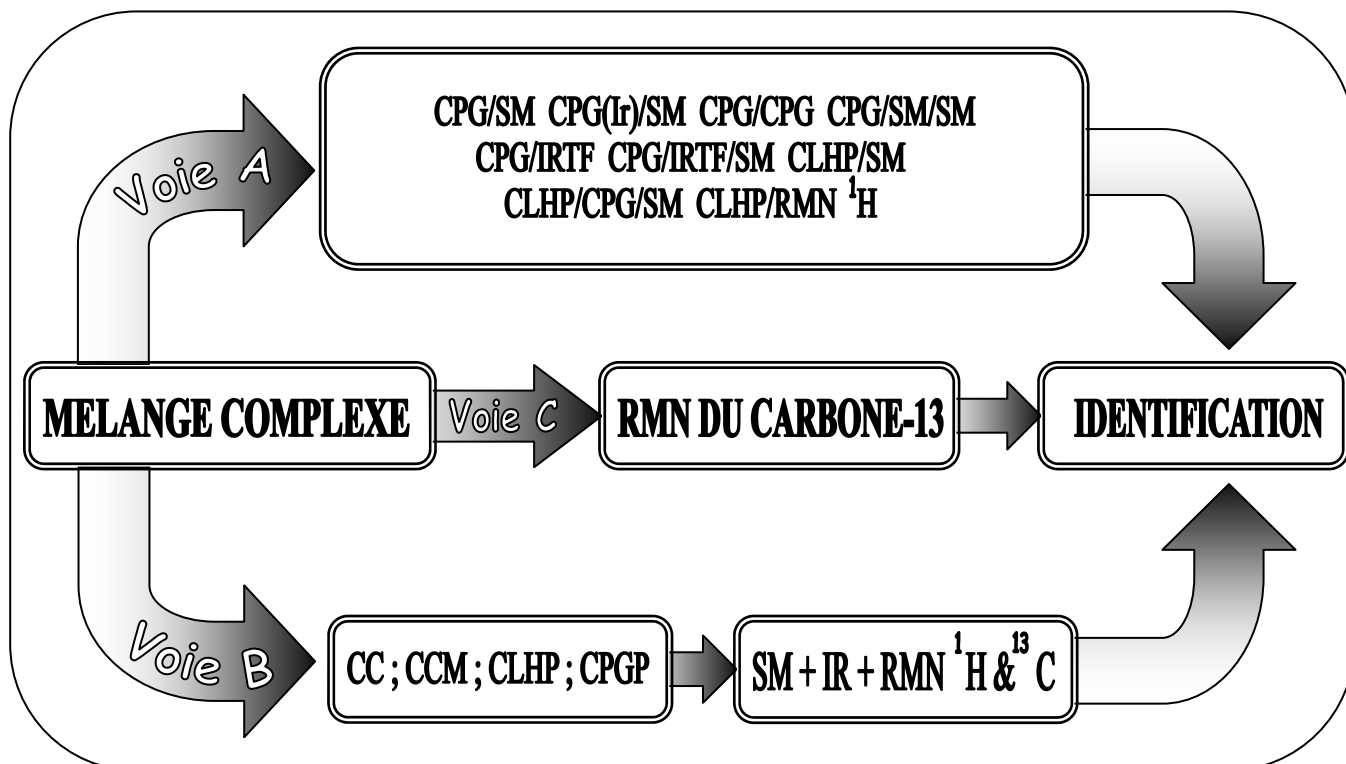


Figure 1 : les méthodes d'analyse d'un mélange complexe

I.1. Analyse par les méthodes conventionnelles (voie A)

I.1.1 La CPG et le couplage de la CPG avec une technique spectroscopique

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 [5,6]. 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 [5].

I.1.1.1. La CPG et les indices de rétention

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. L'identification d'une substance peut donc 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) [7], ou en programmation de température par interpolation linéaire indices de rétention ou indices de Van Den Dool et Kratz (Ir) [8]. 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 [9]. 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 naturellement volatiles comme celles qui sont naturellement 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 dérivatisation (acétylation, silylation) [10, 11]. Encore faut-il s'assurer que la réaction de dérivatisation soit 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).

I.1.1.2. La CPG bidimensionnelle (CPG x CPG)

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 [12,13]. 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 [14] 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 [15] ou d'aliments [16]. 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 [17,18]. À titre d'exemple, Mondelo et coll. ont élué séparément le β -bisabolène, l'acétate de néryle et le bicyclogermacrène qui co-éluait en CPG conventionnelle dans une huile essentielle de *Citrus*.

Néanmoins, malgré tous les perfectionnements apportés à la résolution et à la reproductibilité des colonnes chromatographiques, ceci ne peut suffire à une bonne identification, divers couplages de la CPG avec les techniques spectroscopiques ont été développés.

I.1.1.3. Le couplage CPG-SM

D'un point de vue analytique, d'importants progrès ont été réalisés en couplant la CPG avec des appareils tels que le spectromètre de masse (SM). La CPG couplée à la SM en mode impact électronique (IE), dite CPG-SM(IE), est la technique la plus utilisée pour l'analyse des produits naturels. Le principe de la SM-IE 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 cette molécule. Très souvent, le spectre de masse est caractéristique d'une molécule donnée et, en théorie, il est donc possible d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux de composés de référence, contenus dans des bibliothèques de spectres informatisées commerciales [19-25] ou élaborées au Laboratoire. Cependant, il faut utiliser les bibliothèques de spectres commerciales avec précaution, car bien que très

utiles, elles ne sont pas forcément les plus performantes. En effet, étant donnée la diversité des composés présents dans ces banques, il est rare qu'une interrogation n'obtienne pas de réponse; même si à cette proposition d'identification est associée une note de concordance moyenne. L'identification doit être considérée en prenant en compte le type de composé analysé. En général, l'utilisation de la banque réalisée au sein du Laboratoire, contenant les spectres de références enregistrés dans les mêmes conditions expérimentales que celles des mélanges à étudier, donne des résultats nettement plus fiables que les banques commerciales. Ceci est particulièrement vrai pour l'analyse des huiles essentielles contenant de nombreux sesquiterpènes, qui, construit à partir du même synthon isoprénique, présentent des spectres de masse identiques ou insuffisamment différenciés.

I.1.1.4. La combinaison du couplage CPG-SM et des indices de rétention

L'utilisation conjointe de la spectrométrie de masse et des indices de rétention calculés sur deux colonnes de polarité différente (CPG), permet, en général, l'identification d'un grand nombre de constituants dans les mélanges complexes [26-31] dont les huiles essentielles [28-31]. Ainsi Vernin et coll. ont mis au point un logiciel qui, par la prise en compte simultanée des indices de rétention et des spectres de masse, a permis l'identification des constituants terpéniques de plusieurs huiles essentielles[32-35]. De même, Cavaleiro a développé une méthode basée sur le même principe, qui tient compte des données de la bibliothèque du Laboratoire et celles constituées à partir de la littérature [36].

I.1.1.5. La CPG-SM(ICP) ou CPG-SM(ICN)

Des problèmes d'identification peuvent subsister quand on utilise la SM-IE, même associée aux indices de rétention. 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) [37,38]. Ce mode

d'ionisation douce permet de différencier certaines molécules (des esters par exemple), par l'observation des pics moléculaires, quand ceux-ci ne sont pas visibles en mode impact électronique. Plus précisément, il s'agit des ions quasi moléculaires $[M+H]^+$ et $(M+H)^-$. L'observation de ces ions donne accès à la masse molaire des composés. Aussi, certains auteurs ont utilisé la SM(ICP) afin de différencier certains alcools des esters correspondants par l'observation de leurs pics moléculaires. Il faut signaler qu'en SM(IE), ces molécules peuvent perdre soit une molécule d'eau soit une molécule d'acide acétique et présenter des spectres de masse identiques [37,38]. L'examen des fragmentations fournit également des informations sur la structure des molécules. Ainsi, les quatre stéréoisomères de l'isopulégol sont différenciés sur la base de leurs spectres de masse obtenus en utilisant l'isobutane comme gaz réactif [38]. De même, la connaissance de ces ions MH^+ , MH^- 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 réactif [39]. Divers sesquiterpènes ont pu être identifiés en utilisant ces techniques d'ionisation douces [37]. La SM(ICN) s'est révélée efficace pour déterminer la masse de certaines substances soufrées [40].

Toutefois, cette technique a montré ses limites pour l'identification de molécules ayant des structures voisines. Ainsi, le nérol et le géraniol qui ne diffèrent que par la stéréochimie d'une double liaison, présentent des spectres de masse ICN identiques [41]. Cette non sélectivité occasionnelle, associée à la difficulté d'obtention des spectres reproductibles quand ils sont enregistrés dans différents laboratoires, fait que la SM(ICN) ou la SM(ICP) n'ont pas connu un essor considérable. En fait, cette technique d'ionisation douce doit donc surtout être considérée comme une technique complémentaire de la SM(IE) pour l'identification des constituants des huiles essentielles [42].

I.1.1.6. Le couplage CPG-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, etc... ont conduit, récemment, à la mise en oeuvre de la spectrométrie de masse multidimensionnelle à double analyseur (SM/SM) [43] ou à triple analyseur [44]. Cette technique consiste à sélectionner les ions correspondant à un rapport m/z choisi au moyen d'un premier analyseur qui joue ainsi le rôle d'un filtre. Les fragments de l'ion secondaire constituent un deuxième spectre de masse qui diffère en fonction de l'origine de l'ion primaire [45]. Dans le domaine des huiles essentielles, Decouzon et coll. ont montré que la SM/SM-ICN permet la différenciation des quatre stéréoisomères du dihydrocarvéol à partir des fragments caractéristiques obtenus, qui diffèrent en fonction de la stéréochimie axiale ou équatoriale des groupements hydroxyle et méthyle [46]. Ce couplage a aussi été utilisé dans l'analyse de l'huile essentielle de vétiver de Chine pour mettre en évidence la présence de 20 composés dont l'identification ne pouvait être réalisée uniquement par CPG-SM. Les auteurs ont donc pu identifier 118 composés dans cette huile essentielle et confirmer la présence de l' α -cédrène, de l'acoradiène et du khusimène qui n'avaient pas pu être mis en évidence par CPG-SM [47].

I.1.1.7. Le couplage CPG-IRTF

La spectrophotométrie infrarouge renseigne en général sur les fonctions chimiques présentes dans les molécules et elle permet également de différencier les isomères. Le couplage de la CPG avec l'IRTF a été rendu possible car les limites de détection de l'IRTF ont considérablement été améliorées ces dernières années grâce au développement d'interfaces performantes [48]. Cette technique permet l'analyse des substances volatiles. L'IRTF renseigne, bien entendu, sur les fonctions chimiques présentes dans les molécules. Il différencie les stéréoisomères géométriques éventuels (tout particulièrement la stéréochimie E/Z des doubles liaisons disubstituées). Il

permet également l'identification de certaines molécules par l'examen du domaine dit «des empreintes digitales».

Le couplage CPG-IRTF s'applique à l'analyse de diverses familles de composés : les produits pétroliers et leurs additifs, les arômes, les essences naturelles, les produits de synthèse (pour l'identification des produits secondaires, des impuretés, ...) [49,50]. A titre d'exemple, le couplage CPG/IRFT s'est avéré déterminant pour l'identification du (E,E)-2,4-tridécadienal présent dans l'huile essentielle de *Bifora radians* [51]. Il est particulièrement intéressant lorsqu'il permet d'identifier des molécules présentant des spectres de masse insuffisamment différenciés comme par exemple les isomères du farnésol [52]. L'IRTF a également démontré son efficacité en permettant l'identification du germacrène B et du bicyclogermacrène dans les huiles essentielles d'orange et de pamplemousse [53]. Cependant dans le domaine des huiles essentielles, le couplage CPG/IRFT doit plutôt être utilisé en complémentarité de la SM et des Indices de rétention, plutôt que comme technique unique d'analyse [54].

I.1.1.8 Le couplage CPG-IRTF-SM

Hedges et coll. ont mis en œuvre la CPG couplée en parallèle à deux détecteur IRTF et SM pour l'analyse de l'huile essentielle d'*Eucalyptus australiana* [55]. Ceci a permis d'identifier d'un nombre important de produits en faible quantité à côté du 1,8-cinéole ultra majoritaire. De plus, une meilleure séparation et détection peuvent être obtenues par l'utilisation de la CPG multidimensionnelle (CPGMD) à trois colonnes, une pré-colonne de polarité intermédiaire et deux colonnes analytiques polaire et apolaire, combinées avec deux détecteurs spectroscopiques (CPGMD/IRTF/SM) [56].

I.1.2. La CLHP et les couplages avec une technique spectroscopique

I.1.2.1. Le couplage CLHP-SM et CLHP-SM-SM

Les composés thermolabiles, polaires et ceux ayant une très haute température de vaporisation sont quelquefois non élués et donc indétectables par CPG. La chromatographie liquide s'adresse donc à ces substances peu ou pas volatiles, thermolabiles ou polaires. La mise en œuvre du couplage de la chromatographie liquide haute performance avec la spectrométrie de masse (CLHP-SM) nécessite de contourner certains problèmes dus aux conditions opératoires des deux techniques : haute pression, température ambiante et phase liquide pour la CLHP ; vide poussé, température plus élevée et phase gazeuse pour la SM. Le développement de microcolonnes à très faible débit a rendu possible ce couplage. Ainsi, le couplage CLHP-SM a été utilisé pour l'identification de coumarines et de flavones dans différentes huiles essentielles d'agrumes [57] et pour l'analyse de xanthones, de sécoiridoïdes et de flavones dans les extraits méthanoliques de différentes espèces de la famille gentianacées [58]. D'autres travaux ont mis en œuvre pour l'analyse de terpènes (diterpènes acides ou glycosylés, triterpènes), d'alcaloïdes ou bien encore de composés phénoliques [59-62].

La spectrométrie de masse en tandem (SM-SM) couplée avec la chromatographie liquide est utilisée, par exemple, pour la détermination de la streptomycine et de ses dérivés dans le lait et le miel [63]. De même l'analyse de procyanidines dans le chocolat a été réalisée par CLHP-SM (IE) et CLHP-SM-SM [64].

I.1.2.2. Le couplage CLHP-CPG-SM

Dans le couplage CLHP/CPG/SM, l'utilisation de la CLHP permet un premier fractionnement. En effet, les constituants sont séparés par classe de composés avant l'introduction dans la colonne capillaire de la CPG, où une nouvelle séparation est réalisée. Ce pré-fractionnement permet une fiabilité plus grande dans l'identification

par SM en limitant les coélutions et a donné d'excellents résultats dans l'analyse des huiles essentielles de diverses variétés d'agrumes [65,66].

I.1.2.3.Le couplage CLHP-RMN ¹H

La RMN du proton 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). Ainsi, l'utilisation du couplage CLHP- RMN ¹H s'est considérablement développée depuis l'apparition d'aimants supraconducteurs de plus en plus performants (jusqu'à 21,1 Tesla) permettant d'abaisser le seuil de détection pour les composés purs à des valeurs de l'ordre du nanogramme [67]. Les mesures sont effectuées selon deux modes : le «flux stoppé» (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 [68]. L'utilisation des sondes de RMN a été adaptée depuis quelques temps à l'identification des composés dissous dans un flux chromatographique. Le problème d'interprétation des spectres RMN ¹H lié aux pics intenses des solvants a été résolu en supprimant ces pics par une irradiation sélective et parfois en utilisant des solvants deutériés qui permettent de s'affranchir des « techniques de suppression » du solvant [69-71].

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 [72] et de flavonoïdes dans un extrait méthanolique de feuilles de *Sorocea bomplandii* du Brésil [73]. Plus récemment, la CLHP-RMN-¹H a permis l'identification des produits de dégradation issus de l'acide 5-aminosalicylique dans un médicament générique [74].

Par ailleurs, le couplage de la CLHP, de la RMN, de la SM et de la SPE a permis, sans purification préalable, la détection et d'identification des composés connus ou

inconnus présents dans des échantillons biologiques complexes ou encore dans des extraits de plantes [75].

Ainsi, après avoir résumé les avantages et les inconvénients de différents couplages d'une technique chromatographique avec une technique spectroscopique, illustré par les exemples précédents, nous pouvons constater que la voie se révèle performante dans de nombreux types d'analyse, analyses de routine, de contrôle de qualité mais également d'analyses fines, à condition que puissent être mis en œuvre les moyens techniques adéquats et éventuellement plusieurs techniques complémentaires. Pourtant, toutes ces méthodes ont leurs propres limites. Ainsi, les analyses d'huiles essentielles extrêmement complexes (ciste, vétiver, ...) ont nécessité la mise en œuvre d'une séquence en deux étapes illustrée par la voie B décrite ci-dessous.

I.2. Identifications des constituants après séparation totale (purifications) ou partielle (enrichissement) : voie : B

L'identification des différents composés d'un mélange complexe peut également être réalisée selon le principe de la voie B, basé sur la séparation des constituants préalablement à leur identification. Cette procédure est comparable, ou presque, à celle mise en œuvre lors de l'identification de molécules nouvelles. L'isolation (ou l'enrichissement dans une fraction) des constituants peut être effectuée par une ou plusieurs techniques chromatographiques telles la chromatographie sur colonne (CC), la chromatographie sur couche mince (CCM), la CLHP et la CPG préparative (CPGP). La distillation fractionnée ou la cristallisation peuvent aussi être mises en œuvre. L'identification est par comparaison des données spectrales avec celles de composés de référence : spectres de masse, spectres IR, spectres de RMN du proton et du carbone-13, RMN bidimensionnelle, lorsque la quantité de produit isolé est suffisante. Cette voie est extrêmement fiable et elle permet de déterminer sans difficulté toutes les molécules rencontrées dans les mélanges naturels et décrites dans la littérature. L'élucidation de la structure d'un composé qui n'a jamais été décrit, se fait dans la foulée, mais nécessite une très grande pureté.

Bien que cette voie en deux étapes ait été délaissée au profit des couplages « en ligne » plus rapide, elle se révèle souvent indispensable dans le cas de l'analyse de mélanges naturels très complexes. A titre d'exemple nous pouvons citer les nombreux travaux de Weyerstahl et coll., menés sur la composition de diverses huiles essentielles extrêmement complexes [76-81] et qui illustrent bien l'intérêt de cette technique. Ainsi, l'huile essentielle du vétiver d'Haïti a été fractionnée en deux parties, un acide et l'autre neutre. La partie neutre est ensuite soumise à une distillation fractionnée qui sépare les produits légers des produits lourds. Les différents constituants sont séparés par chromatographie répétitive sur colonne puis éventuellement par CCM. Les constituants sont ensuite analysés par CPG/SM, RMN ¹H et par fois RMN ¹³C. Près de 170 composés sesquiterpéniques possédant des squelettes très divers (eudesmane, seco-eudesmane, éremophilane, guaiane, salvialane, cédrane, oppositane, prézizaane), mono ou poly fonctionnalisés. La partie acide est soumise à une réaction d'estérification ou de réduction avant la séparation des constituants appartenant aux familles. zizaane, khusiane, spirovétivane et cyclocopacamphane.

Nous pouvons également mentionner les travaux de Braun et coll. [82] qui ont analysé une huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis* L. Chaque fraction obtenue après la distillation fractionnée de l'huile essentielle a été ensuite fractionnée par chromatographie répétitive sur gel de silice ou gel de silice imprégné de nitrate d'argent. Les auteurs ont caractérisé 155 composés, presque tous par CPG/SM.

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, est donc généralement réservée à l'analyse pour les mélanges non volatils, d'huiles essentielles complexes ainsi que d'extraits. 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 carbone-13 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.

I.3. Analyse par RMN du carbone-13 sans séparation préalable : voie C

La RMN du carbone-13 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 carbone-13, 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 dans le domaine des huiles essentielles [83, 84], 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 carbone-13 un véritable outil d'analyse des mélanges complexes naturels [85, 86], complémentaire des techniques conventionnelles développées. Nous allons développer cette méthode dans les paragraphes suivants.

I.3.1 Intérêt de la RMN du carbone-13

Malgré sa faible abondance isotopique naturelle (1,1%) et son moment gyromagnétique qui le rendent environ 5700 fois moins sensible que le proton [87], le

carbone-13 est malgré tout préféré aux autres noyaux dans la 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 carbone-13 autant de raies de résonance qu'il y a de carbones dans la molécule ;
- Les spectres de RMN du carbone-13 peuvent être simplifiés par irradiation totale 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 large bande produit une augmentation d'intensité du signal [88] ;
- 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 [86] ;
- L'enregistrement des spectres de RMN ^{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 ^{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 ^{13}C peut être considéré comme « l'empreinte digitale » de la molécule.

I.3.2. Identification des constituants en mélange par RMN du carbone-13

L'identification des constituants d'un mélange par RMN ^{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, 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.

I.3.2.1. 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. Examinons ces différents points :

Grâce au développement des aimants supraconducteurs, la RMN voit sa sensibilité augmenter avec l'intensité du champ magnétique des aimants (21,1 Tesla pour les plus performants). 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 impulsionsnelles 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% [87, 89]. Cette technique est couramment utilisée lors de l'enregistrement des spectres de mélanges, ne serait ce que pour simplifier les spectres.

Pour améliorer le rapport S/B et observer le maximum de signaux dans le spectre, il est nécessaire 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 mesurable, 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 enregistrée séparément [88]. 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. On peut signaler que 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 [87, 90] ;

- de même, la méthode du «Zero Filling» permet d'augmenter le nombre de points de digitalisation sur le signal de décroissance libre d'induction avant transformée de Fourier. Les pics sont alors définis par un nombre de points plus importants, ce qui donne une meilleure définition des signaux [87, 91] ;

- 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 a pu observer 29 signaux sur les 30 attendus, certains d'entre eux n'étant séparés que de 0,003 ppm [92].

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, lord 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.

I.3.2.2. Attribution des signaux

L'identification d'un composé par RMN ^{13}C dans un mélange complexe repose principalement sur l'attribution des déplacements chimiques des carbones qui le constituent. 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- ^{13}C superposables ou insuffisamment différenciés.

La fréquence de résonance des carbones d'une molécule donnée (déplacement chimique) 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 carbone-13. 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 impulsionnelles, 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 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 comme données de référence pour l'identification des composés en mélange.

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

- Allerhand et Mapple ont utilisé la RMN ^{13}C pour identifier les constituants dans un échantillon d'essence sans plomb [93]. Etant donnée la complexité du spectre (1600 raies de résonance ont été individualisées en utilisant des spectres partiels) l'identification 32 hydrocarbures a été réalisée par enregistrement d'une série de spectres d'un même échantillon enrichi à chaque fois avec un produit de référence et par comparaison avec le spectre initial ;

- dans des coupes pétrolières à bas point d'ébullition, Brekke et coll. [94] ont réalisé, en se référant aux valeurs moyennes des déplacements chimiques des carbones de composés purs et en mélanges artificiels, l'identification de six à huit hydrocarbures ;

- en 1991, Matlengiewicz et coll. ont mis au point un programme informatique d'aide à l'identification des composés en mélange prenant en compte les déplacements chimiques et les intensités relatives des signaux, qui leur a permis d'identifier 10 hydrocarbures monoaromatiques présents dans un mélange artificiel [95] ;

- Markowetz et coll. [96] 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 coll. [97] ont analysé les constituants du vin (alcools, sucres, acides organiques, acides aminés). Plus récemment Kosir et Kidric [98] 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 [99], à la distribution des acides gras sur le glycérol [100-102], à la position et à la stéréochimie des doubles liaisons [103].

Dans le domaine des huiles essentielles, nous rappellerons que l'utilisation de la RMN ^{13}C pour l'identification des constituants majoritaires est due à Formáček et Kubezka [83, 84, 104, 105]. 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.

Par la suite, diverses études ont été réalisées ponctuellement. Ainsi, la RMN ^{13}C a permis l'identification des principaux composés de l'huile essentielle de *Echinophora sibthorpiana* [106] et de 12 sesquiterpènes présents dans une fraction chromatographique de l'huile essentielle de bois de *Guarea guidonia* [107]. Plus récemment, une méthode d'identification des constituants d'un mélange complexe par RMN du carbone-13 a été développée par Ferreira et coll. [108]. 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).

I.3.3 La méthode d'analyse développée au laboratoire

Depuis 1989, l'équipe « Chimie et Biomasse » utilise la RMN du carbone-13 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 [85, 86].

Selon la méthode mise au point et développée au laboratoire, l'identification des composés dans le spectre RMN-¹³C 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 ne nécessite donc aucune individualisation préalable des constituants. 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 2). 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.

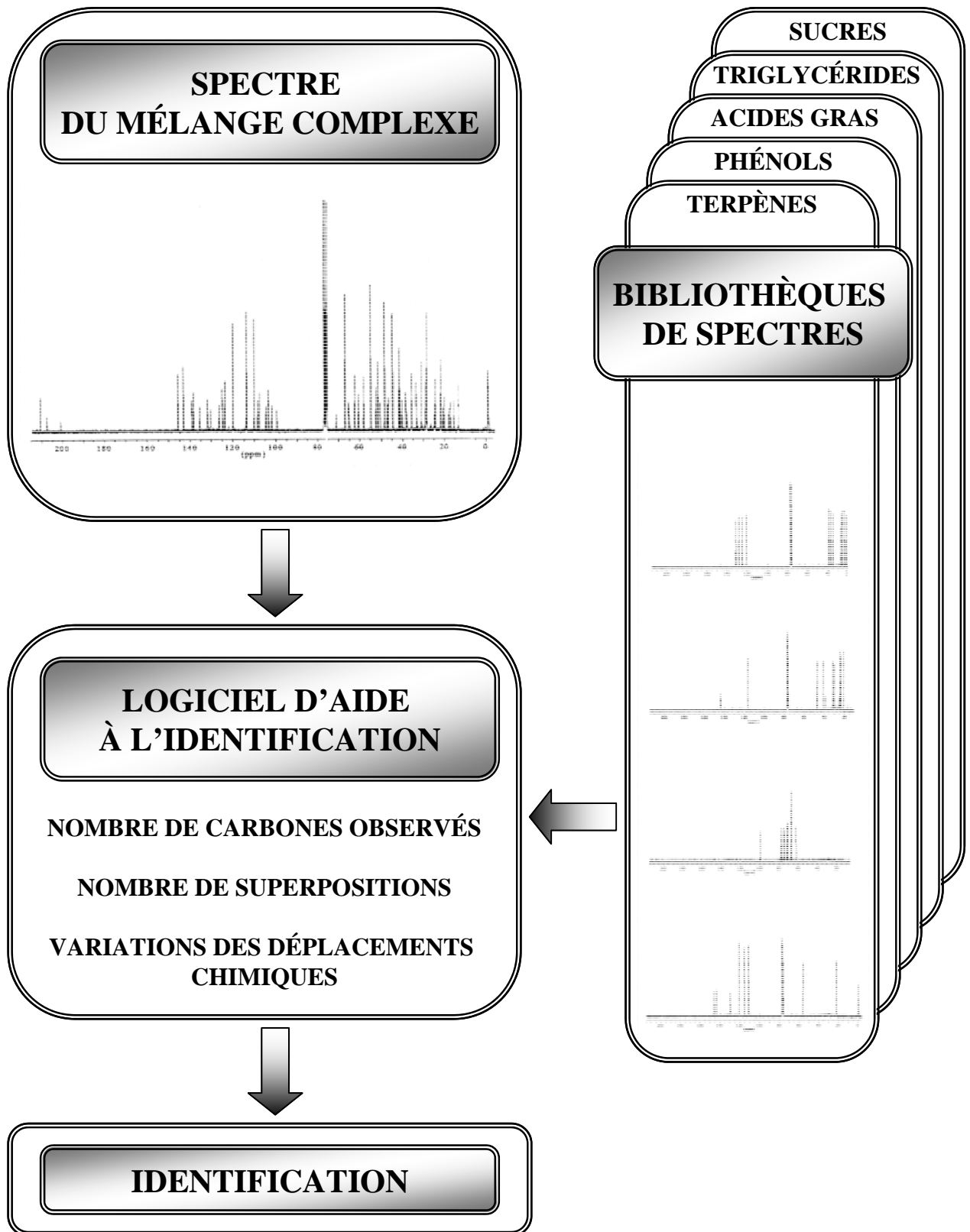


Figure 2 : identification des constituants d'un mélange complexe par RMN du carbone-13.

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 (nature du solvant, dilution, paramètres d'enregistrement des spectres). Ainsi, différentes banques 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 publiées 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 [109-111].

L'utilisation de la RMN ^{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 :

1) 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 [112] ;

2) 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%) ;

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 ;

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

5) 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.

I.3.4. Application à l'analyse d'huiles essentielles ainsi qu'à d'autres mélanges naturels

L'analyse par RMN du carbone-13, 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.

I.3.4.1. 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-¹³C, 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 [112] avaient été identifiés par RMN-¹³C 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-¹³C de l'huile essentielle de feuilles d'*Eupatorium coelestinum* [113] du Viêt-Nam, a clairement montré la présence, parmi les composés majoritaires, du cis-cadin-4-en-7-ol, dont les indices de rétention et le spectre de masse n'étaient pas présents dans les bibliothèques commerciales [113],

- un sesquiterpène inhabituel, le 1,5-epoxysalvial-4(14)-ene, 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 [114],

- le presifiperfolan-9a-ol a été détecté pour la première fois dans l'huile essentielle d'*Artemisia vulgaris* du Viêt-Nam [115],

- le 9-hydroxynérolidol et un de ses isomères ont été trouvés dans l'huile essentielle de *Fokienia hodgibsi* du Viêt-Nam [116],

- la 5-[(E)-hexylidene]-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 [117],

- de nombreuses autres plantes ont été ainsi étudiées et leur huile essentielle caractérisée : *Myrtus communis* [118], *Cistus ladaniferus* [119], *Stachys glutinosa* [120], *Ferula arigonii* [121], *Ferula communis* [122] de Corse, *Rosmarinus officinalis* [123], *Thymus herba barona* [124, 125], de Corse et de Sardaigne, *Lavandula dendata* [126], *Thymus ciliatus* et *T. fontanesii* [127, 128] d'Algérie, *Pistacia lentiscus* de Corse et d'Algérie [129, 130, 131], *Lippia multiflora* de Côte d'Ivoire [132], *Xylopi aethiopica* de Guinée [133], *Commiphora africana* du Benin [134], *Ocimum canum*, *O. gratissimum*, *O. minimum* de Sao Tomé et Príncipe [135], *Acanthopanax trifoliatum* [136], *Enhydra fluctuans* [137], *Baekkea frutescens* [138], *Hibiscus abelmoschus* [139], *Illicium griffithii* [140, 141] et du Viêt-Nam, trois espèces de Piper du Panama et de Bolivie [114, 142], trois espèces d'*Hedyosmum* de Costa Rica [143], etc.

I.3.4.2. Identification de stéréoisomères

La RMN-¹³C 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 [144], dont nous avons vu, dans un paragraphe précédent que l'identification avait nécessité l'utilisation de la SM/SM-ICN [46]. De même, les isomères géométriques des sesquiterpènes linéaires farnésol, acétate de farnésyle et farnésal ont pu être différenciés malgré la similitude des structures [145].

Tout aussi intéressante est la distinction de l' α -cédrène et de l' α -funébrène d'une part, du β -cédrène et du β -funébrène d'autre part, dans les huiles essentielles de bois de cèdre [86] et de *Cupressus funebris* [146]. 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 ¹³C 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 [147].

I.3.4.3. Identification de molécules thermosensibles

La RMN ^{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 [148]. 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/IK et en CPG/SM. Une appréciation correcte de la teneur des différents constituants de l'huile essentielle a 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 [149]. En effet une partie de l'ascaridole s'isomérisse thermiquement en isoascaridole au cours de l'analyse en CPG.

I.3.4.4. Identification simultanée de composés neutres et acides

Les acides diterpéniques sont abondants dans les résines des conifères (acide abietique, acide pimarique, acide palustrique, acide levopimarique,...) où ils se présentent en mélange avec des composés neutres tel l' α -pinène, des aldéhydes et alcools diterpéniques polycycliques (pimaral, pimarol,...) ou macrocycliques (cembrane et dérivés). La caractérisation des résines nécessite donc une partition acido-basique qui précède l'analyse proprement dite de chacune des deux fractions. Les composés acides, ne peuvent être détectés, par CPG/IK et par CPG/SM, en absence de dérivatisation. Par contre, l'identification et la quantification des diterpènes acides et neutres dans des oléorésines et des extraits de *Pinus nigra* ssp. *laricio* de Corse ont pu être réalisées par la RMN- ^{13}C sans partition acido-basique préalable [150]. De même, des acides sesquiterpéniques minoritaire ont été identifiés, après

partition acido-basique, dans les huiles essentielles d'*Inula graveolens* [151] et de *Dittrichia viscosa* [152].

I.3.4.5. Étude de la variabilité chimique

En permettant l'identification, des composés jusqu'à une teneur de 0,3-0,5% la RMN du carbone-13, combinée à la 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 aux huiles essentielles de *Calamintha nepeta* [153], *Cistus ladaniferus* [154], *Ferula communis* [122], *Inula graveolens* [151], *Juniperus phoenicea* [155], *J. oxycedrus* [156], *Lavandula stoechas* [157], *Pinus nigra ssp. laricio* [158], *Pinus pinaster* [159], *Pistacia lentiscus* [129], *Thymus herba barona* [124] de Corse, *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* [160] et *Thymus carnosus*, *T. caespititius*, *T. camphoratus* [161-163] du Portugal, *Elsholtzia blanda*, *E. penduliflora*, *E. winitiana* [164] et *Baekkea frutescens* du Viêt-nam [165], *Lavandula dentata* L [166], *Pistacia lentiscus* [130, 131] d'Algérie. Par ailleurs, plus de 200 variétés d'agrumes cultivées en Corse ont fait l'objet d'une étude [167-170] destinée à proposer une aide à leur classification taxonomique, sur la base de la composition chimique de leurs huiles essentielles.

I.3.4.6. L'analyse qualitative et quantitative de composés non volatils

La méthode développée au laboratoire a été appliquée avec succès à l'identification et la quantification de composés « lourds » ou peu volatils comme les triterpènes du liège [171-173] et des feuilles d'olivier [174], les sucres dans les miels [175] et les extraits au solvant des feuilles de *Pinus nigra* et *Abies alba* [176], les triglycérides d'huiles d'olive, d'extraits de farine de châtaigne et du lait [177], ainsi que les composés phénoliques et les sucres ou l'hydroxyaldéhyde présents dans les liquides de pyrolyse de la biomasse [178-180].

I.3.4.7. Différentiation énantiomérique

Depuis quelques années, des travaux sont menés au laboratoire afin d'évaluer les potentialités de la RMN ^{13}C , en utilisant des réactifs de déplacement chimique chiraux, pour analyse énantiomérique des constituants des huiles essentielles. Ainsi, en ce qui concerne les composés de référence il a été possible de déterminer la pureté énantiomérique de certains monoterpènes oxygénés. Il s'agit d'alcools terpéniques linéaires mono-, sesqui- ou diterpéniques, [181], d'alcools, cétones et acétates en série menthanique [147,182]. Il a également été démontré par des expériences de différenciation énantiomérique menées directement sur les huiles essentielles, sans purification préalable des constituants qu'il était possible de savoir que seul l'énantiomère (+) de la fenchone était présent dans l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* de Corse [157] et que seul l'énantiomère (-) de l'acétate de bornyle est présent dans l'huile essentielle d'*Inula graveolens* de Corse [183]. Par contre la fenchone (ou le camphre) dans la lavande sauvage de Corse sont présentes sous forme d'un mélange d'énantiomères (60/40) Il a également été démontré, en utilisant les complexes binucléaires $\text{Ag}(\text{fod})\text{-Yb}(\text{hfc})_3$ que les énantiomères des oléfines mono et sesquiterpéniques pouvaient être différenciés tout autant que ceux du furanodiène qui ne possède pas de carbone asymétrique et qui de plus s'isomérisent en CPG [184].

I.3.4.8. 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 ^1H , RMN ^{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 [90]. 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 [185].

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 ^1H , la RMN ^{13}C et la RMN 2D. Ainsi, le trans-dauc-8-en-4 β -ol a été identifié dans l'huile essentielle de *Daucus carota* [186], le 4-épi-cis-dihydroagarofurane dans l'huile essentielle de *Cedrelopsis grevei* de Madagascar [187], l'eudesm-5-en-11-ol dans l'huile essentielle d'*Helichrysum italicum* de Corse [188], les esters de β -cyclolavandulyle et de β -isocyclolavandulyle dans l'huile essentielle de *Peucedanum paniculatum* de Corse [189]. 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 [190]

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 carbone-13 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.

II. PROBLEMATIQUE DE LA RECHERCHE

Nous avons vu tout au long du premier chapitre que l'analyse de la composition d'une huile essentielle constitue une opération délicate qui nécessite pour atteindre une fiabilité totale de mettre en œuvre plusieurs techniques. Dans ce contexte, nous avons démontré les possibilités, les atouts et les avantages de la méthode d'analyse par RMN du carbone 13 développée par l'équipe Chimie et Biomasse.

Deux objectifs étroitement liés sont poursuivis dans ce travail :

- d'un point de vue méthodologique, il s'agit de contribuer à l'étude du phénomène de variation des déplacements chimiques. En effet la méthode développée au laboratoire nécessite la comparaison des valeurs des déplacements chimiques des carbones dans le mélange avec celles de produits de référence, contenues dans des bibliothèques de données spectrales construites avec des spectres enregistrés au laboratoire ou encore avec des données de la littérature récente. Cette variation des déplacements chimiques est généralement inférieure à 0,05 ppm mais peut exceptionnellement, être 10 fois supérieure. En réalisant de nombreux mélanges binaires associant des alcools et diverses molécules possédant des fonctions oxygénées (alcool, phénol, oxydes, cétones, aldéhydes, esters), nous pouvons mesurer les variations et ainsi approfondir le mode d'interaction entre les molécules afin de mieux appréhender, et à court terme de prévoir le phénomène de la variation des déplacements chimiques.

- parallèlement, il s'agit de contribuer à la caractérisation chimique de produits issus de la biomasse et en particulier les huiles essentielles en vue de leur éventuelle valorisation. Il s'agit au-delà de la connaissance académique de la plante, de fournir aux producteurs d'huiles essentielles locaux, des données scientifiques objectives sur cette plante. Dans cet esprit, nous avons réalisé une étude phytochimique sur une plante de l'île de Madère *Clinopodium ascendens* en collaboration avec le Professeur Paola Castillo de l'Université de Madeira et deux plantes de Corse : *Bupleurum fruticosum* et *Santolina corsica*, espèce endémique cyrno-sarde. Ainsi, nous avons mis

en œuvre la méthode basée sur la RMN du carbone-13, mise au point et développée au laboratoire, afin de caractériser les huiles essentielles des parties aériennes (fleurs, tiges, feuilles) à travers l'identification de leur constituants mais aussi de leur activité antimicrobienne. Par ailleurs, il nous a semblé intéressant d'élargir nos investigations sur *Bupleurum fruticosum*, à l'huile essentielle obtenue par extraction par micro-ondes en l'absence de solvant et à l'extrait au solvant de l'hydrolat.

Lors de ce travail, nous nous proposons de mettre également en œuvre les séquences de la RMN 1D et 2D pour la caractérisation de molécules, nouvelles ou non, dont les données spectrales n'ont jamais été décrites dans la littérature.

CHAPITRE II

**VARIATION DES DEPLACEMENTS CHIMIQUES DES CARBONES
DE COMPOSES TERPENIQUES EN MELANGE**

Ainsi que nous l'avons signalé dans le chapitre précédent, l'identification, par RMN ^{13}C , des terpènes présents dans une huile essentielle, nécessite la comparaison des valeurs des déplacements chimiques des carbones dans le mélange avec celles de produits de référence, contenues dans des bibliothèques de données spectrales construites avec des spectres enregistrés au laboratoire ou encore avec des données de la littérature récente. Cette identification nécessite la prise en compte de quatre paramètres :

- le nombre de signaux des carbones observés, par rapport au nombre attendu, en tenant compte de la symétrie de certaines molécules et du fait que les carbones quaternaires présentent des temps de relaxation plus longs que ceux des carbones protonés peuvent ne pas être observés (composés minoritaires) ;

- le nombre de superpositions des signaux qui peuvent se produire fortuitement,
- la variation des déplacements chimiques entre les spectres des composés de référence et ceux des mélanges.

- enfin, l'observation de l'intensité des signaux dans un spectre peut également aider à leur attribution à tel ou tel composé quand les valeurs de déplacements chimiques sont très proches.

En ce qui concerne la variation des déplacements chimiques, les nombreuses études menées au laboratoire sur des mélanges naturels très variés (plusieurs milliers de spectres enregistrés et traités), montrent que ces variations sont faibles et dans la très grande majorité des cas demeurent inférieures ou égales à 0,05 ppm et ce, quelles que soient la structure des molécules et les fonctions chimiques présentes dans ces molécules. Cela est probablement dû au fait que les mélanges naturels, et les huiles essentielles en particulier, contiennent un nombre important de constituants et qu'en conséquence, la teneur relative de chacun d'eux n'est pas très élevée.

Néanmoins, des variations plus importantes des valeurs de déplacements chimiques ont été observées ponctuellement pour certaines associations. Par exemple,

la présence simultanée au sein d'une huile essentielle d'alcools terpéniques et de dérivés phénoliques (thymol, carvacrol) peut induire, sur certains carbones de ces derniers, des variations de déplacement chimique plus importantes que prévu. C'est pourquoi, une étude globale a été réalisée au laboratoire afin d'appréhender le sens et l'amplitude de ces variations sur chacun des carbones de la molécule considérée.

Afin d'évaluer l'influence de la présence d'autres molécules présentes dans le mélange sur les déplacements chimiques des phénols substitués par divers groupements (alkyle, méthoxy), nous avons utilisé des mélanges binaires, les deux composés étant présents à des concentrations plus importantes que celles que l'on observe dans les mélanges naturels [191]. Les phénols choisis étaient d'une part, le thymol et le carvacrol, phénols terpéniques substitués par des groupements alkyle, d'autre part, l'eugénol et la vanilline, appartenant à la famille des phénylpropanoïdes ou en découlant. Divers enseignements ont été tirés de ces expériences :

- tout d'abord, la présence d'un hydrocarbure terpénique dans le mélange binaire (une oléfine plus précisément) n'induit aucune variation des déplacements chimiques des carbones des dérivés phénoliques,

- la même observation est faite avec des mélanges binaires de phénols diversement substitués (thymol, carvacrol, 2,5-diméthylphénol),

- en présence d'un alcool ou d'une cétone, les déplacements chimiques de certains carbones du thymol et du carvacrol subissent des variations. Ainsi les carbones C1 (qui porte la fonction hydroxyle, nomenclature de l'UIPAC) et C2 sont déblindés tandis que les carbones C4 et C5 sont blindés.

- des variations moins importantes ont été observées sur les carbones du noyau aromatique de l'eugénol et de la vanilline, probablement parce que le groupement hydroxyle est moins disponible à cause d'une liaison hydrogène intramoléculaire avec le groupement méthoxy en α .

Les résultats obtenus suggèrent que les variations des déplacements chimiques observées sur les carbones du noyau phénoliques sont dues à la présence de liaisons

hydrogène intermoléculaires entre l'hydrogène du phénol et l'oxygène de l'alcool ou du carbonyle.

Au cours des nombreuses analyses d'huiles essentielles très diverses réalisées au laboratoire, nous avons parfois observé des variations des déplacements chimiques de certains carbones de molécules terpéniques oxygénées et insaturées, à l'image du linalol (3,7-diméthyl-octa-1,6-dien-3-ol), qui est présent dans la composition d'huiles essentielles très variées (thym, lavande, basilic,) ou encore du géraniol et du néral (3,7-diméthyl-octa-2,6-dienal E et Z), aldéhydes α,β -insaturés, présents dans les huiles essentielles de cymbopogon, cubèbe et mélisse. Nous nous sommes donc proposés d'étudier le comportement du linalol d'une part et du citral (mélange de géraniol et de néral) d'autre part, dans des mélanges binaires dans lesquels ces molécules se trouvent en présence d'un dérivé phénolique, d'un alcool, d'une cétone, d'un aldéhyde ou d'un acétate comme cela est fréquemment le cas dans une huile essentielle. Nous avons choisi de compléter ces études en examinant la variation de déplacement chimique des carbones de sesquiterpènes et diterpènes apparentés au linalol, à savoir le nérolidol et le géranyllinalol. Nous avons également examiné le comportement du citronellol et du tétrahydrogéraniol.

Avant d'aborder cette étude, nous nous sommes assurés de l'influence de la concentration sur les déplacements chimiques des carbones du linalol. L'attribution des déplacements chimiques des carbones du linalol ne présente pas de difficulté et a été faite en accord avec les données de Bohlmann et al. [192].

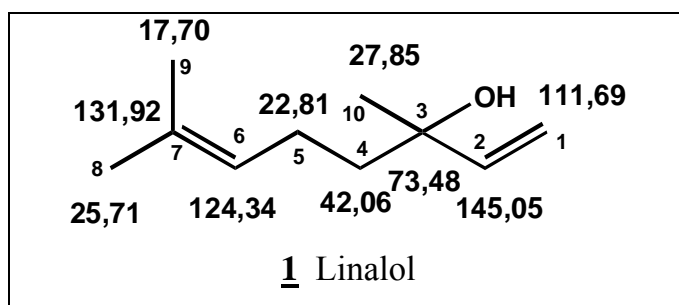


Figure 3 : déplacements chimiques de carbones du linalol (**1**)

Nous avons utilisé une gamme de concentrations (0,125 mol.L⁻¹ – 1,0 mol.L⁻¹) qui va au delà de ce qui est observé dans les huiles essentielles. En effet, dans une analyse classique, nous utilisons environ 40 mg d'huile essentielle dans 0,5 mL de solvant. Nous prendrons donc comme concentration de référence, celle que nous utilisons pour l'enregistrement des spectres de référence qui ont servi à construire la bibliothèque de spectres, à savoir 0,25 mol.L⁻¹ (soit environ 19 mg de linalol complété à 0,5 mL avec le chloroforme deutéré). Une telle quantité de linalol correspond d'ailleurs à une teneur voisine de 50% de ce composé dans une huile essentielle.

Tableau 1: variations des déplacements chimiques des carbones du linalol en fonction de la concentration.

| n° C | $\Delta\delta$ 0,125 mol.L ⁻¹ | 0,25* mol.L ⁻¹ | $\Delta\delta$ 0,5 mol.L ⁻¹ | $\Delta\delta$ 0,75 mol.L ⁻¹ | $\Delta\delta$ 1,0 mol.L ⁻¹ |
|------|--|---------------------------|--|---|--|
| C1 | 0,00 | 111,70 | -0,01 | -0,01 | -0,01 |
| C2 | 0,00 | 145,04 | 0,01 | 0,02 | 0,04 |
| C3 | 0,00 | 73,50 | -0,02 | -0,03 | -0,06 |
| C4 | -0,01 | 42,06 | 0,00 | 0,02 | 0,05 |
| C5 | 0,00 | 22,81 | 0,00 | 0,00 | 0,01 |
| C6 | -0,01 | 124,33 | 0,01 | 0,04 | 0,08 |
| C7 | 0,03 | 131,95 | -0,03 | -0,08 | -0,15 |
| C8 | 0,01 | 25,71 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C9 | 0,01 | 17,70 | 0,00 | 0,00 | -0,01 |
| C10 | 0,02 | 27,87 | -0,02 | -0,04 | -0,08 |

**référence*

Nous constatons tout d'abord, que pour les concentrations 0,125 et 0,5 mol.L⁻¹, les variations des déplacements chimiques sont inférieures à 0,05 ppm et peuvent donc être considérées sans influence lors de l'identification du linalol dans une huile essentielle. Pour les concentrations plus importantes, 0,75 et 1,0 mol.L⁻¹, les variations les plus importantes concernent le carbone sp² C7 et dans une moindre mesure le carbone C6 et le méthyle C10.

Nous avons enregistré les spectres des molécules précitées en mélange binaire (mélange équimoléculaire, 0,5 mol.L⁻¹) avec d'autres composés oxygénés et calculé la variation moyenne du déplacement chimique (ainsi que l'écart type) provoquée sur chaque carbone par la présence de chaque famille de composés. Cette concentration a été choisie pour amplifier d'éventuelles variations des déplacements chimiques. Cette étude devrait nous permettre d'évaluer l'influence de la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires sur les variations de déplacements chimiques des carbones des molécules de référence. Pour chacune de ces molécules, nous avons calculé pour chaque carbone :

- la variation moyenne du déplacement chimique = $\Delta\delta_m$
- l'écart type = ET.

Pour faciliter la lecture, les tableaux donnant le détail des résultats sont reportés en annexes ($\Delta\delta$ pour les carbones de la molécule dans chaque mélange, valeur moyenne du $\Delta\delta$ et écart type) et nous avons reporté les valeurs moyennes sur les figures afin de mieux visualiser l'influence du composé en mélange.

I. MELANGES BINAIRES LINALOL-COMPOSE OXYGENE

I.1. Mélanges binaires linalol-composé phénolique

Nous avons enregistré huit spectres de mélanges binaires dans lesquels le linalol est en présence d'un composé phénolique en quantité équimolaire. Les phénols sélectionnés sont : 2-éthylphénol, 3-éthylphénol, 4-éthylphénol, 3,4-diméthylphénol, 3,5-diméthylphénol, 3-méthoxyphénol, carvacrol et thymol.

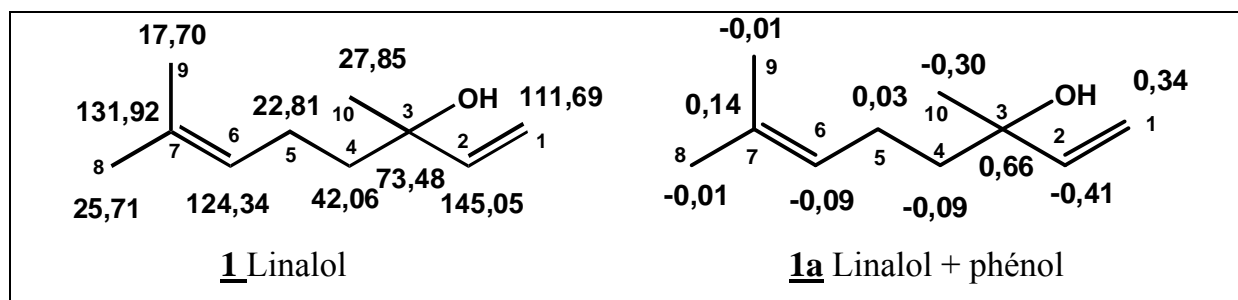


Figure 4 : déplacements chimiques de carbones du linalol (**1**) et variations moyennes observées en présence d'un dérivé phénolique (**1a**) (détails en annexe 1).

Nous constatons que les variations sont importantes et peuvent correspondre à des blindages ou à des déblindages. Il est vraisemblable que les variations observées avec les dérivés phénoliques soient dues à la présence d'une liaison hydrogène entre l'atome d'hydrogène de la fonction phénol et l'oxygène de l'alcool de linalol [191]. On s'attend donc à ce que les plus fortes variations soient observées pour les carbones qui sont proches de la fonction alcool. C'est effectivement ce qui est observé : le carbone quaternaire C3 qui porte le groupement hydroxyle et le méthyle ($\Delta\delta = +0,66$ ppm) et le carbone sp^2 méthylénique C1 ($\Delta\delta = +0,34$ ppm) sont fortement déblindés alors que le méthyne sp^2 C2 et le méthyle C10 sont blindés respectivement de $-0,41$ et $-0,30$ ppm. L'influence du phénol est beaucoup moins importante sur le quatrième carbone en β de l'hydroxyle, à savoir le carbone méthylénique C4 ($\Delta\delta = -0,09$ ppm). Elle est pratiquement négligeable sur les déplacements chimiques des carbones C5, C8 et C9 ($\Delta\delta \leq 0,03$ ppm). Enfin, cette influence du phénol est moyennement importante sur les carbones éthyléniques C6 ($\Delta\delta = -0,09$ ppm) et C7 ($\Delta\delta = +0,14$ ppm), malgré leur éloignement par rapport à la fonction alcool. A priori, une liaison hydrogène qui expliquerait les variations des carbones C1, C2, C3 et C10 proches de la fonction alcool, ne peut justifier la variation du déplacement chimique des carbones C5 et surtout C7, situés pratiquement à l'autre bout de la chaîne. Nous remarquons toutefois, que la variation de déplacement chimique est de même amplitude mais de signe opposé à ce que nous avons observé lors de l'enregistrement de spectres en solution concentrée ($1,0 \text{ mol.L}^{-1}$) ($\Delta\delta = -0,15$ ppm pour C7).

I.2. Mélange binaire linalol-cétone/ester/aldéhyde/oxyde

Les mélanges du linalol avec les composés ci-dessous (rapport équimolaire) ont été réalisés et leurs spectres enregistrés:

- cétones : menthone, pulégone, camphre, fenchone, verbénone,
- aldéhydes : géraniol, périllaldéhyde, myrténal, 2-vanilline, cuminaldéhyde
- esters : acétates de géranyle, de citronellyle, de néo-menthyle, d' α terpinyle et de bornyle,

- oxydes : 1,8-cinéole, oxydes d' α et de β -pinène, cis et trans époxydes de limonène

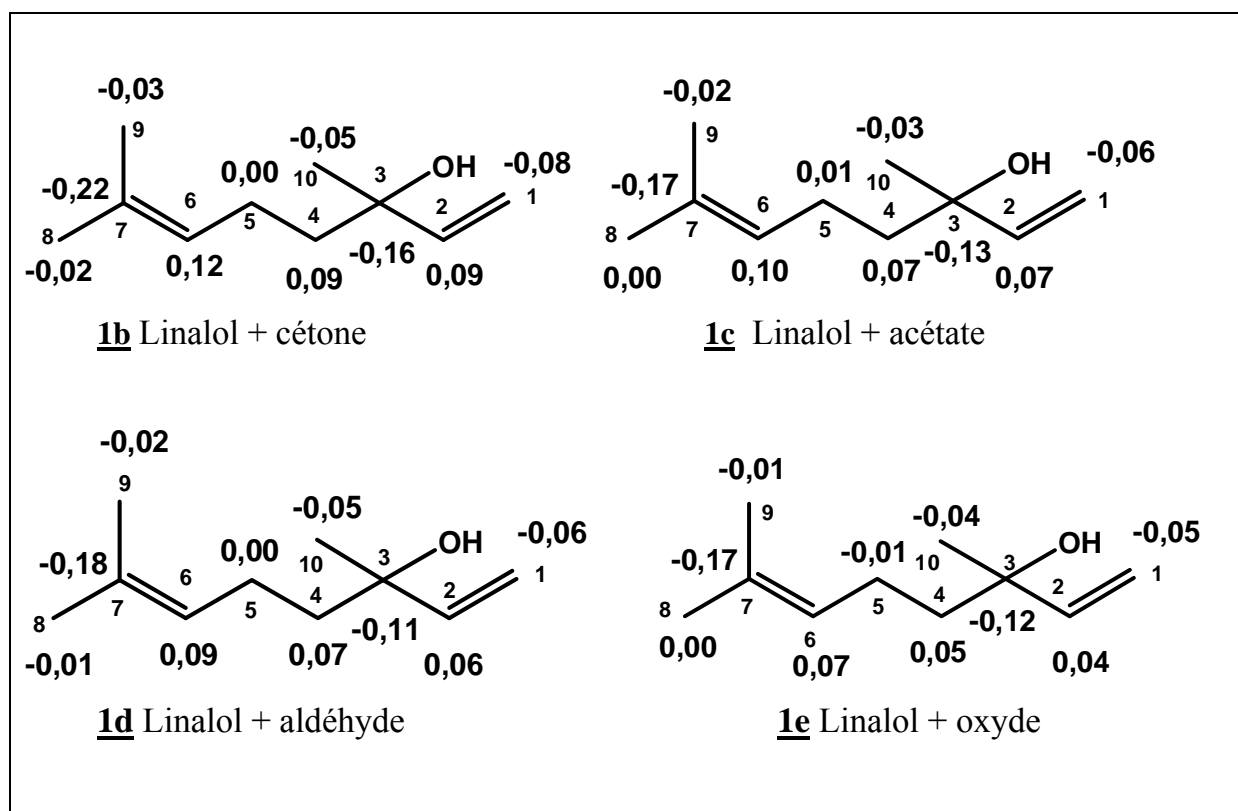


Figure 5 : variations moyennes des déplacements chimiques des carbones du linalol en présence d'une cétone (**1b**), d'un acétate (**1c**), d'un aldéhyde (**1d**), d'un oxyde (**1e**). (annexe 2-annexe5)

Pour l'ensemble des carbones des molécules carbonylées (cétones **1b**, esters **1c**, aldéhydes **1d**) et pour les oxydes (**1e**), les variations des déplacements chimiques mesurées sont de même sens et d'amplitude voisine. Seules les cétones conduisent à des variations légèrement plus importantes. Par contre, nous remarquons que ces variations ($\Delta\delta$ max = -0,22 ppm) sont beaucoup moins intenses que celles qui étaient dues à la présence d'un dérivé phénolique ($\Delta\delta$ max = +0,66 ppm).

De manière inattendue, c'est le carbone tétrasubstitué sp^2 C7 qui subit la plus forte variation ($\Delta\delta$ compris entre -0,22 ppm et -0,17 ppm) alors que les autres carbones éthyléniques subissent des variations de leur déplacement chimique deux à trois fois moins importantes : -0,05 à -0,08 ppm pour C1, +0,04 à +0,09 ppm pour C2 et +0,07 à

+0,12 ppm pour C6. Au voisinage de la fonction alcool, les variations sont appréciables uniquement pour le carbone fonctionnalisé C3 (-0,11 à -0,16 ppm).

De nouveau, on peut imaginer que les variations des déplacements chimiques observées pour les carbones proches de la fonction alcool sont dues à la formation d'une liaison hydrogène entre l'hydrogène de l'hydroxyle et l'oxygène simplement ou doublement lié de la molécule partenaire. Par contre, comme nous l'avons déjà noté pour les mélanges linalol-phénol, la variation observée pour les carbones C6 et surtout C7, situés en δ et ϵ de l'hydroxyle, demeure inexplicée.

I.3. Mélanges binaires linalol-alcool

Dans ce paragraphe, nous décrivons les variations des déplacements chimiques des carbones de linalol provoquées par la présence d'une des molécules suivantes possédant une fonction alcool (primaire, secondaire ou tertiaire) et présentant diverses structures (linéaire, cyclique ou bicyclique pontée): nérol, menthol, α -terpinéol, terpinen-4-ol, alcool périllylique, bornéol, et fenchol

D'une manière générale, les variations des déplacements chimiques des carbones sont encore moins importantes que celles qui avaient été observées en présence de dérivé phénolique, de composé carbonylé ou d'oxyde. De nouveau, c'est le carbone tétrasubstitué sp^2 C7 qui subit la plus forte variation ($\Delta\delta = -0,13$ ppm) suivi par le carbone sp^3 C10 ($\Delta\delta = -0,09$ ppm) et le carbone fonctionnalisé C3 ($\Delta\delta = -0,07$ ppm). Les autres carbones sp^2 subissent des variations deux à trois fois moins importantes que celle de C7, à savoir $\Delta\delta = +0,06$ ppm pour C6, $+0,03$ ppm pour C2 et $-0,01$ ppm pour C1. Pour le carbone C10 situé au voisinage de la fonction alcool, le $\Delta\delta$ est un peu plus élevé que pour les autres composés oxygénés ($-0,09$ ppm vs $-0,05$ ppm).

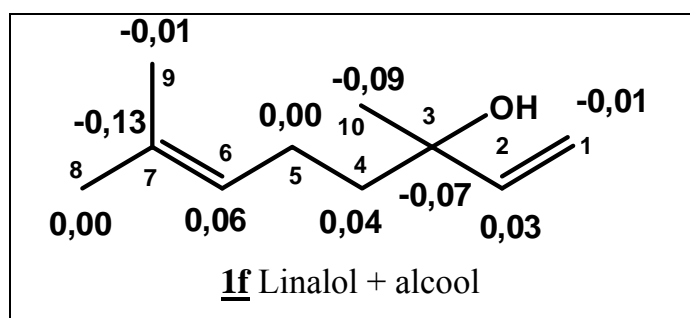


Figure 6 : variations moyennes des déplacements chimiques des carbones du linalol observées en présence d'un dérivé alcool (**1f**) (annexe 6).

La présence d'un alcool, en mélange avec le linalol, induit des variations des déplacements chimiques des carbones de ce dernier, de même sens mais moins importantes que les autres composés oxygénés non phénoliques (Figure 6).

Il est probable que les liaisons hydrogène intermoléculaires créées se fassent aussi bien entre l'hydrogène de l'hydroxyle du linalol et l'oxygène de l'autre alcool qu'en sens inverse. Cependant, ici également, compte tenu de la distance, il est à priori difficile d'imputer la variation observée pour le carbone C7, à la présence d'une liaison hydrogène.

I.4. Influence de la dilution du linalol

Il nous restait à vérifier si les variations des déplacements chimiques des carbones du linalol, induites par la présence d'un autre composé oxygéné, sont linéaires en fonction de la concentration relative du linalol et du composé partenaire. Pour ces expériences nous avons choisi, d'une part le carvacrol et d'autre part la verbénone, deux molécules qui induisent des variations de déplacement chimique importantes. Nous avons enregistré deux séries de spectres en conservant la concentration du linalol ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$) et en faisant varier les concentrations relatives de la verbénone d'une part et du carvacrol d'autre part, de $0,05$ à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Les résultats sont décrits dans les tableaux 2 et 3.

La variation des déplacements chimiques des carbones du linalol présente un caractère quasiment linéaire en fonction du rapport linalol/verbénone ou linalol/carvacrol. Nous constatons que même pour les plus fortes concentrations, la variation de déplacement chimique des carbones du linalol en présence de verbénone demeure faible et permet son identification aisée. En présence du carvacrol et compte tenu des variations plus importantes observées, particulièrement sur les carbones C1, C2 et C3, l'identification du linalol peut devenir délicate pour des concentrations élevées de carvacrol. Néanmoins, dans les conditions expérimentales que nous utilisons (environ 40 mg d'huile essentielle complétée à 0,5 mL avec le chloroforme deutéré), de telles concentrations (jusqu'à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$) de carvacrol et/ou de l'autre alcool sont rarement atteintes. Il nous faut donc simplement retenir qu'en ce qui concerne le linalol, des déplacements chimiques supérieurs à 0,05 ppm peuvent être observés pour les carbones C1, C2 et C3, lorsque le linalol est en présence d'un dérivé phénolique.

Dans les deux cas, il est probable que les liaisons hydrogène intermoléculaires créées sont responsables de ces variations. Par contre et compte tenu de la distance, il est à priori difficile d'imputer la variation observée pour le carbone C7, à la présence d'une liaison hydrogène. Des liaisons faibles de type Van der Waals et plus précisément des interactions dipôle permanent-dipôle induit (Debye) sont probablement responsables de cette observation.

Tableau 2 : variation des déplacements chimiques des carbones du linalol (0,5 mol.L⁻¹) en fonction de la concentration de verbenone (0,05-0,5 mol.L⁻¹)

| n°C | linalol 0,5 mol.L ⁻¹ | $\Delta\delta$ 0,05 mol.L ⁻¹ | $\Delta\delta$ 0,1 mol.L ⁻¹ | $\Delta\delta$ 0,2 mol.L ⁻¹ | $\Delta\delta$ 0,3 mol.L ⁻¹ | $\Delta\delta$ 0,4 mol.L ⁻¹ | $\Delta\delta$ 0,5 mol.L ⁻¹ |
|-----|------------------------------------|--|---|---|---|---|---|
| C1 | 111,69 | -0,02 | -0,02 | -0,04 | -0,05 | -0,07 | -0,10 |
| C2 | 145,05 | 0,02 | 0,02 | 0,03 | 0,04 | 0,05 | 0,07 |
| C3 | 73,48 | -0,04 | -0,04 | -0,09 | -0,11 | -0,14 | -0,20 |
| C4 | 42,06 | 0,02 | 0,02 | 0,03 | 0,04 | 0,05 | 0,06 |
| C5 | 22,81 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,02 |
| C6 | 124,34 | 0,03 | 0,03 | 0,05 | 0,07 | 0,08 | 0,11 |
| C7 | 131,92 | -0,06 | -0,05 | -0,11 | -0,14 | -0,17 | -0,25 |
| C8 | 25,71 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | -0,01 |
| C9 | 17,70 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,03 |
| C10 | 27,85 | 0,00 | 0,00 | -0,02 | -0,03 | -0,03 | -0,05 |

Tableau 3 : variation des déplacements chimiques des carbones du linalol (0,5 mol.L⁻¹) en fonction de la concentration de carvacrol (0,05-0,5 mol.L⁻¹).

| n°C | linalol 0,5 mol.L ⁻¹ | $\Delta\delta$ 0,05 mol.L ⁻¹ | $\Delta\delta$ 0,1 mol.L ⁻¹ | $\Delta\delta$ 0,2 mol.L ⁻¹ | $\Delta\delta$ 0,3 mol.L ⁻¹ | $\Delta\delta$ 0,4 mol.L ⁻¹ | $\Delta\delta$ 0,5 mol.L ⁻¹ |
|-----|------------------------------------|--|---|---|---|---|---|
| C1 | 111,69 | 0,04 | 0,09 | 0,11 | 0,16 | 0,22 | 0,25 |
| C2 | 145,05 | -0,04 | -0,09 | -0,12 | -0,17 | -0,25 | -0,28 |
| C3 | 73,48 | 0,07 | 0,17 | 0,22 | 0,30 | 0,43 | 0,48 |
| C4 | 42,06 | 0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,02 | -0,03 | -0,04 |
| C5 | 22,81 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,03 | 0,03 |
| C6 | 124,34 | 0,01 | -0,01 | -0,03 | -0,03 | -0,05 | -0,07 |
| C7 | 131,92 | 0,00 | 0,03 | 0,04 | 0,04 | 0,06 | 0,09 |
| C8 | 25,71 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 |
| C9 | 17,70 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | -0,01 | -0,01 |
| C10 | 27,85 | -0,04 | -0,07 | -0,09 | -0,14 | -0,20 | -0,21 |

II. MELANGES BINAIRES DES (E)- ET (Z)-NEROLIDOLS ET DU (6E, 10E)- GERANYLLINALOL AVEC DES COMPOSES OXYGENES

Le squelette du nérolidol peut être considéré comme un « sesquialol » c'est-à-dire une molécule de linalol sur laquelle est greffé un synthon isoprénique. Il se

présente sous la forme de deux stéréoisomères en fonction de la stéréochimie (E) et (Z) de la double liaison en position 6. Le géranyllinalol est un diterpène que l'on peut considérer comme une base de linalol sur laquelle ont été greffés deux synthons isopréniques liés tête-queue. Il se présente sous la forme de quatre stéréoisomères en fonction de la stéréochimie des doubles liaisons en position 6 et 10. Il est d'ailleurs vendu sous forme d'un mélange des 4 stéréoisomères dans lequel l'isomère (6E ,10E) est nettement majoritaire.

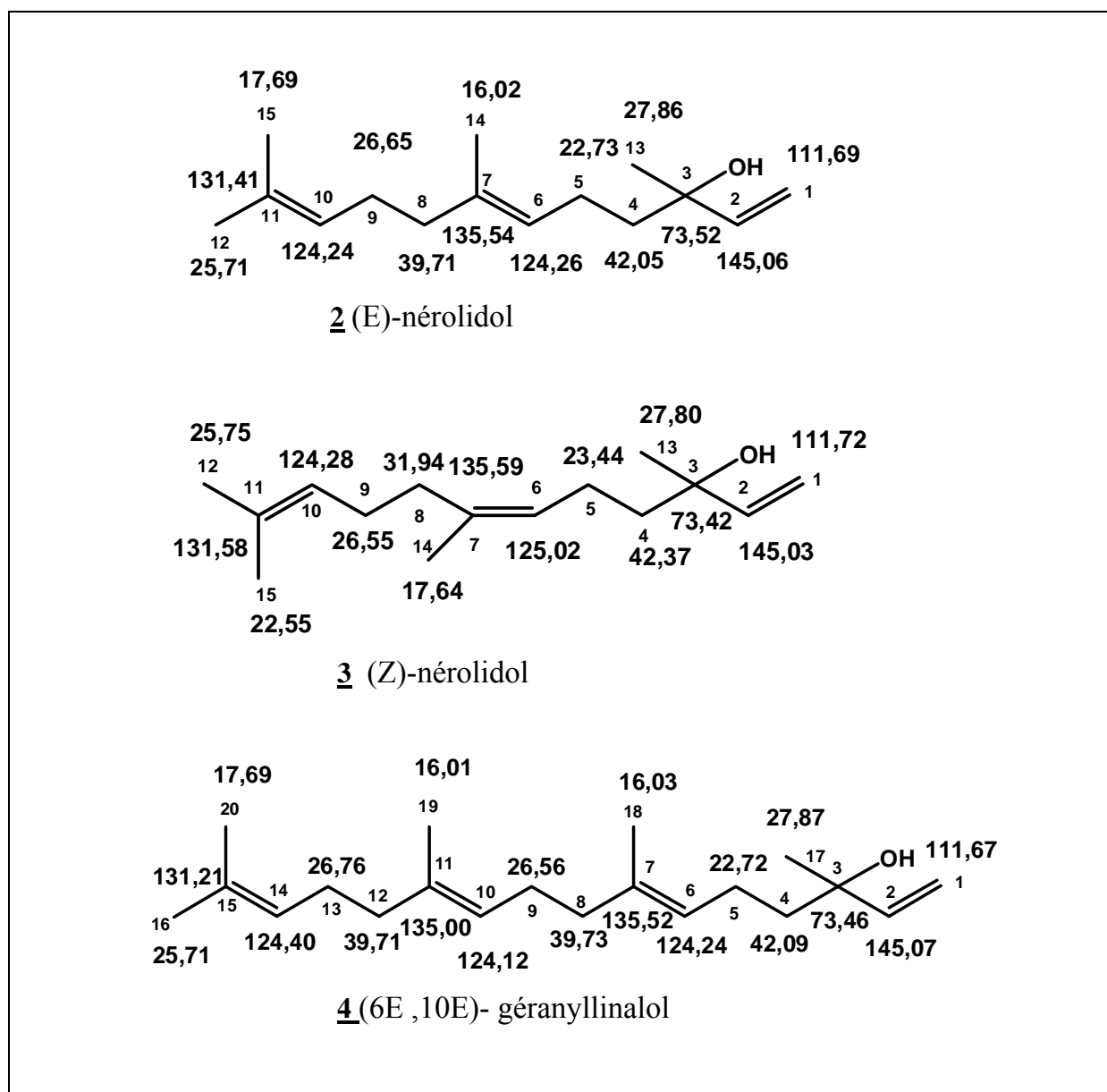


Figure 7 : déplacements chimiques de carbones du (E)-nérolidol (**2**), du (Z)-nérolidols (**3**) et du (6E ,10E)- géranyllinalol (**4**)

L'attribution des déplacements chimiques des carbones des (E)- et (Z)-nérolidols et du (6E,10E)-géranyllinalol a été réalisée au laboratoire, l'utilisation d'un réactif de déplacement chimique (RDC) ayant permis de lever toutes les ambiguïtés [193]. En effet, avec cette technique, il est possible de suivre l'évolution linéaire des déplacements chimiques de tous les carbones de la molécule en fonction d'un rapport de concentration RDC/substrat croissant. Les valeurs des variations de déplacement chimique, induites par le RDC, diminuent d'un bout à l'autre de la chaîne carbonée au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la fonction complexante (la fonction alcool en l'occurrence). Ainsi, à titre d'exemple, les signaux résonnant à 124,25 et 125,06 ppm sont attribués aux carbones C6 des isomères E et Z, respectivement tandis que ceux résonnant à 124,28 et 124,29 ppm appartiennent aux carbones C10 de ces mêmes isomères.

II.1. Mélanges binaires des (E)- et (Z)-nérolidols et du (6E, 10E)-géranyllinalol avec des dérivés phénoliques.

Dans le cas de mélange des nérolidols ou du geranyllinalol avec des composés phénoliques (carvacrol, thymol, 3-isopropylphénol, 4-éthylphénol, 3,5-diméthylphénol) les résultats sont très proches de ceux obtenus avec le linalol (Figure 8). Le carbone tétrasubstitué C3 qui porte l'hydroxyle et le méthyle (**2a**, **3a**, $\Delta\delta = +0,68$ ppm ; **4a**, $\Delta\delta = +0,70$ ppm) et le carbone sp^2 C1 (**2a**, **3a**, **4a**, $\Delta\delta = 0,35$ ppm) sont fortement déblindés alors que le carbone sp^2 C2 (**2a**, **3a**, **4a**, $\Delta\delta = -0,44$ ppm) et le méthyle C13 (**2a**, **3a**, $\Delta\delta = -0,30$ ppm) ou C17 (**4a**, $\Delta\delta = -0,31$ ppm) sont blindés. Nous constatons que la variation du déplacement chimique s'atténue rapidement avec l'éloignement par rapport à la fonction alcool à l'exception des carbones sp^2 C6 (**2a**, $\Delta\delta = -0,14$ ppm ; **3a**, **4a**, $\Delta\delta = -0,11$ ppm) et C7 (**2a**, **4a**, $\Delta\delta = +0,14$ ppm ; **3a**, $\Delta\delta = +0,11$ ppm).

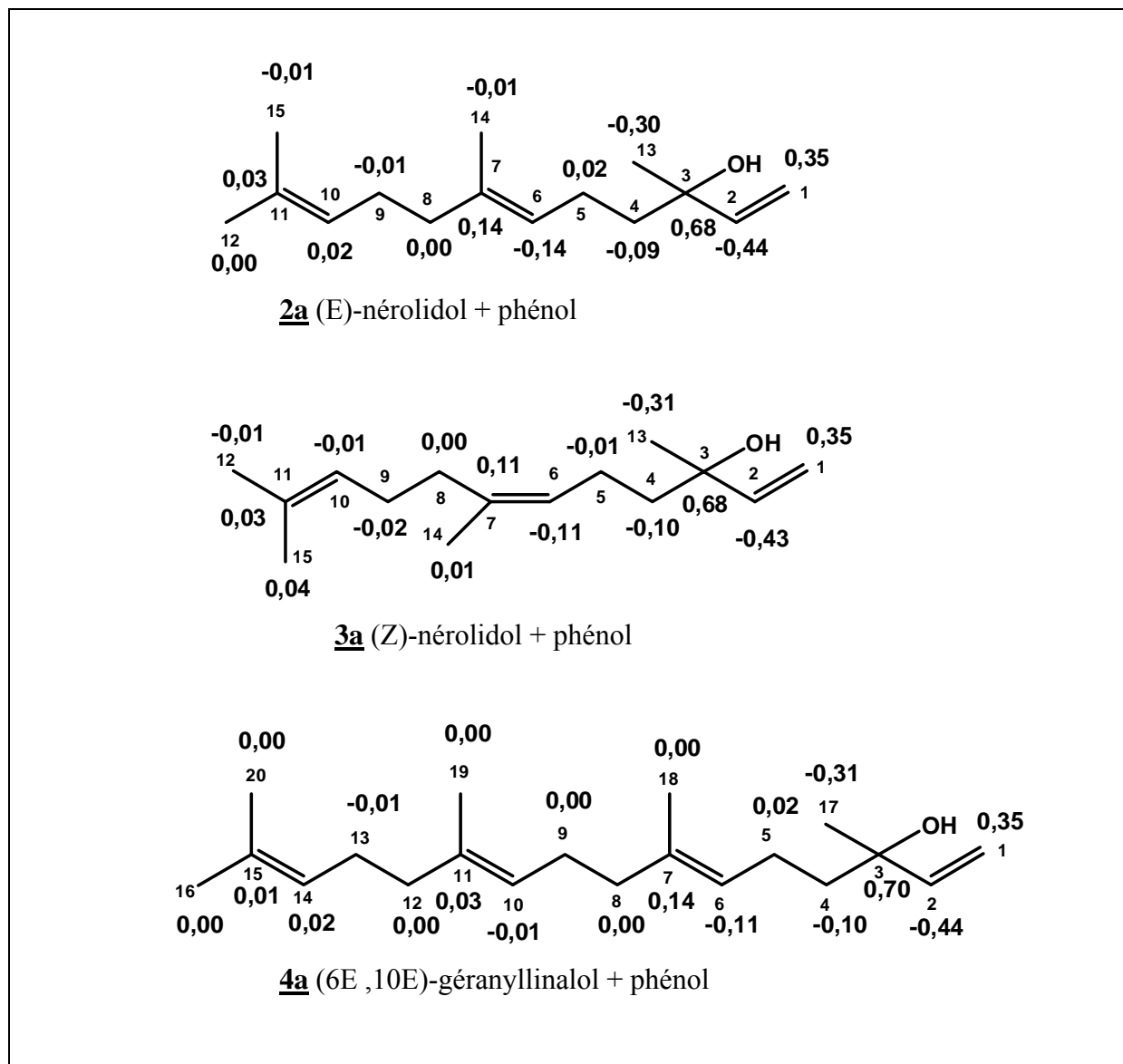


Figure 8 : variations moyennes des déplacements chimiques des carbones du (*E*)-nérolidol (**2a**), du (*Z*)-nérolidol (**3a**) et du (6*E*,10*E*)-géranyllinalol (**4a**) observées en présence d'un dérivé phénolique. (annexe7-annexe9) .

II.2. Mélanges binaires des (E)- et (Z)-nérolidols et du (6E,10E)-géranyllinalol avec des cétones.

Dans le cas de mélange du (E)-nérolidol **2** avec des cétones (camphre, fenchone, verbénone, carvone, pulégone), les variations des déplacements chimiques sont beaucoup plus faibles que celles qui avaient été observées avec les dérivés phénoliques. Les carbones qui présentent des variations de déplacement chimique supérieures à 0,05 ppm sont les carbones C1 ($\Delta\delta = -0,08$ ppm) et surtout et C3 qui porte la fonction alcool ($\Delta\delta = -0,16$ ppm) et C7 beaucoup plus éloigné ($\Delta\delta = -0,17$ ppm). Ces variations sont tout à fait similaires à celles mesurées pour le linalol. Nous observons également une variation très importante du déplacement chimique du carbone C11, vraiment très éloigné de la fonction alcool ($\Delta\delta = -0,10$ ppm).

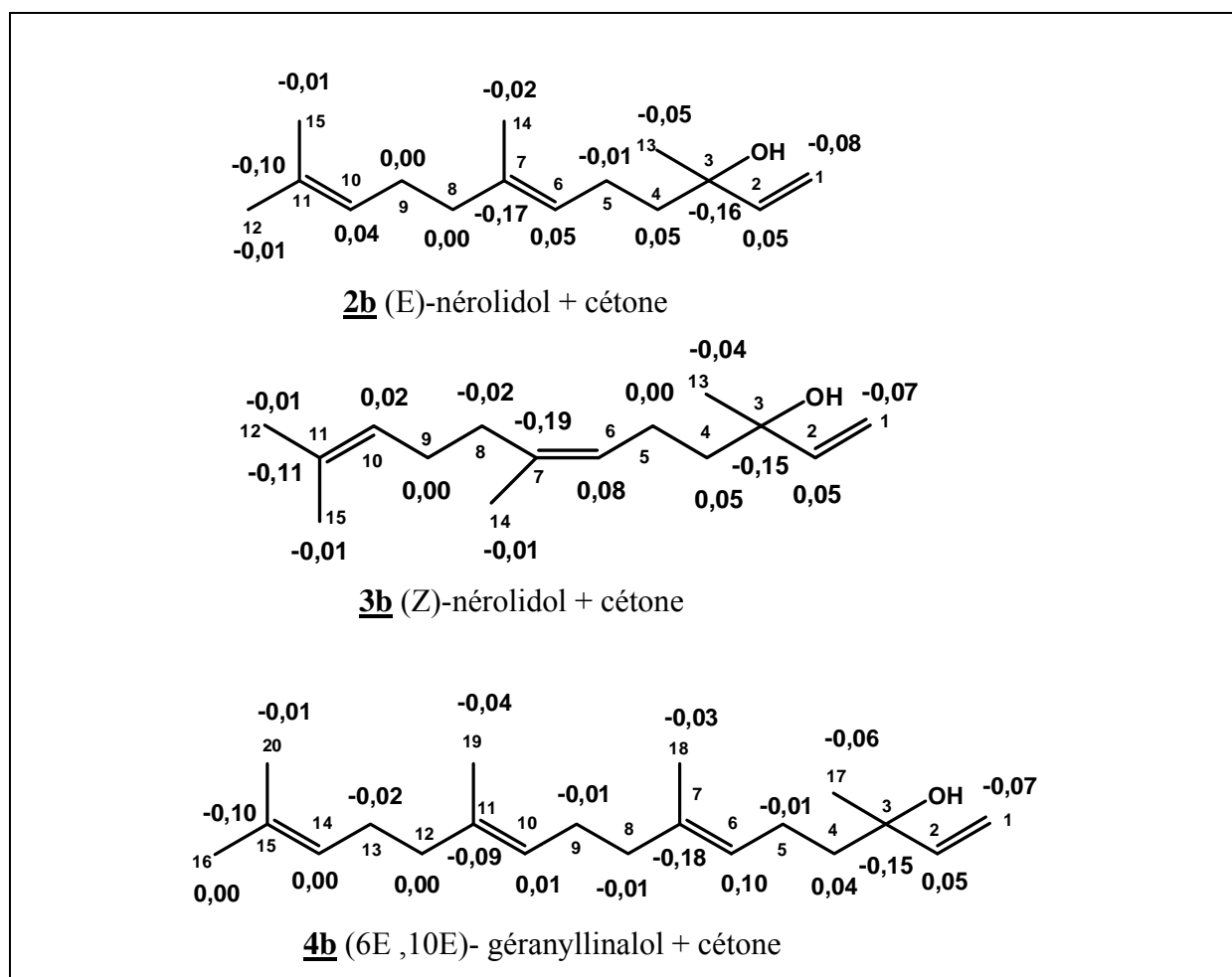


Figure 9 : variations moyennes des déplacements chimiques des carbones du (E)-nérolidol (**2b**), (Z)-nérolidol (**3b**) et du (6E,10E)-géranyllinalol (**4b**) observées en présence d'une cétone (annexe10-annexe12).

Par comparaison avec l'isomère (E), les variations observées sur les carbones du (Z)-nérolidol **3**, sont similaires. Les plus fortes valeurs concernent le carbone C3 fonctionnalisé (-0,15 ppm) ainsi que les Csp² C7 et C11 respectivement -0,19 et -0,11 ppm.

Le (6E, 10E) géranyllinalol a un comportement tout à fait comparable à celui du (E)-nérolidol. Ainsi, en présence d'une cétone, les variations de déplacement chimique les plus importantes sont observées pour les carbones C3 et C7 ($\Delta\delta = -0,15$ et $-0,18$ ppm), suivis par les carbones éthyléniques quaternaires C11 et C15 ($\Delta\delta = -0,09$ et $-0,10$ ppm).

II.3. Mélanges binaires des (E)- et (Z)-nérolidols et du (6E,10E)-géranyllinalol avec des alcools.

Dans le cas du mélange des (E)- et (Z)-nérolidols **2** et **3** et du (6E,10E)-géranyllinalol **4** avec des alcools (menthol, bornéol, fenchol, terpinéol-4, perillylalcool), nous constatons, comme dans le cas du linalol, des variations assez faibles pour les carbones proches de la fonction alcool C3 (-0,07 et -0,08 ppm) et C13 (pour **2c** et **3c**) et C17 pour **4c** (-0,09 ppm et -0,12 ppm) liées à la présence des liaisons hydrogène. Par contre, les variations observées sur le C7 (-0,11 et -0,12 ppm) pour **2c**, **3c** et **4c** mais aussi le C11 (-0,07, -0,06, -0,05 ppm) pour **2c**, **3c** et **4c** ne peuvent probablement pas être reliées à la présence de liaisons hydrogène.

Comme dans le cas du linalol, les variations de déplacement chimique concernant des Csp² et plus particulièrement les carbones quaternaires, qui ne s'atténuent pas avec l'allongement de la chaîne carbonée (nérolidols et géranyllinalol), traduisent une probable interaction entre les doubles liaisons et la fonction alcool. Des liaisons de Van der Waals entre un dipôle permanent (la fonction alcool) et un dipôle induit (la double liaison) pourraient être responsables de ces variations. Cette interaction présente un caractère intermoléculaire puisqu'elle diminue avec la dilution.

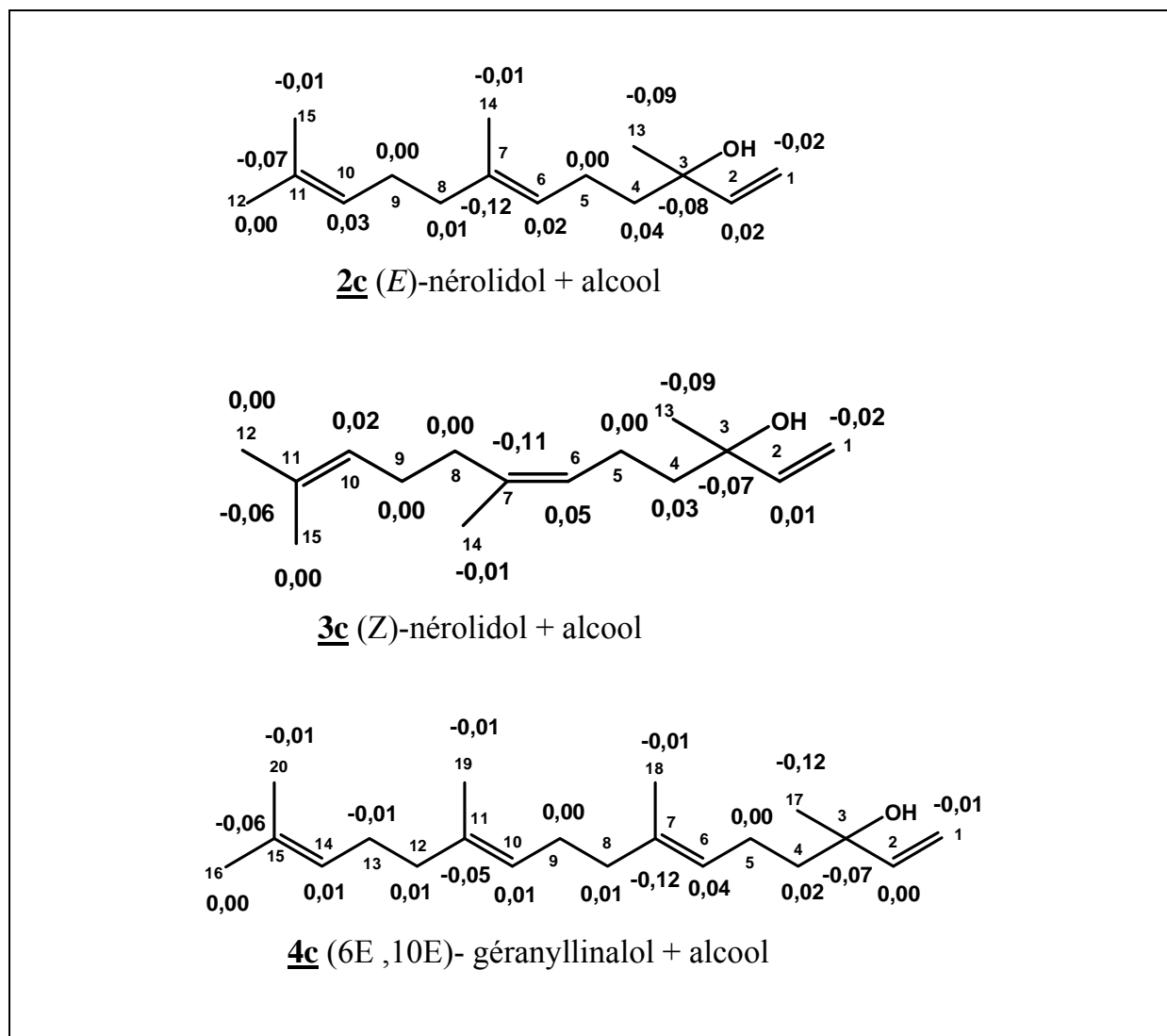


Figure 10 : variations moyennes des déplacements chimiques des carbones du (*E*)-nérolidols(**2c**), (*Z*)-nérolidols (**3c**) et (6*E*,10*E*)- géranyllinalol (**4c**) observées en présence d'un alcool (annexe 13-15).

III. MELANGE BINAIRE CITRONELLOL ET DU TETRAHYDROGERANIOL AVEC DES PHENOLS, DES ALCOOLS OU DES CETONES

Afin d'étudier la relation entre la position de l'alcool et celle de la double liaison C6-C7, nous avons choisi de travailler avec le citronellol. Dans ce composé l'alcool est primaire et est porté par le C1 et la seule double liaison est en bout de chaîne. Cette double liaison est absente dans le tetrahydrogéraniol (dihydrocitronellol). Ces deux

molécules ne sont pas directement comparables au linalol, à cause de la position de la fonction alcool en C1 sur ces deux molécules, en C3 sur le linalol. Néanmoins, leur comportement est susceptible de fournir des informations complémentaires. L'attribution des déplacements chimiques des carbones a été réalisée de manière conventionnelle et est en accord avec les résultats obtenus par Bohlmann *et al.* [192]

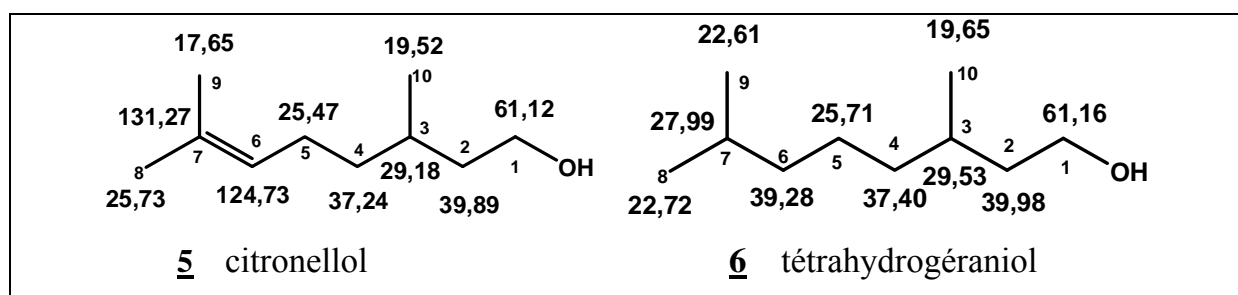


Figure 11 : déplacements chimiques des carbones du citronnellol (5), et du tétrahydrogéraniol(6).

Au vu des résultats reportés dans la Figure 12, nous constatons que, en présence de phénols, les variations concernent uniquement deux carbones proches de la fonction alcool : C2 ($\Delta\delta = -0,23$ et $-0,22$ ppm) et C1 ($\Delta\delta = +0,10$ et $+0,15$ ppm). Il semblerait donc que les variations observées avec le phénol et ses dérivés soient dues par conséquent à la présence de liaisons hydrogène entre l'atome d'hydrogène de la fonction phénol et l'oxygène de l'alcool de citronnellol. On n'observe pas de variation des déplacements chimiques de carbones situés en bout de chaîne, qu'ils soient saturés ou insaturés.

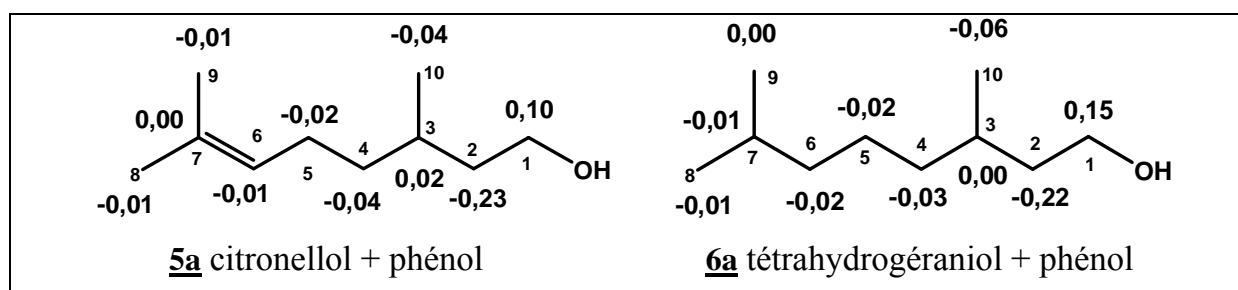


Figure 12 : variations moyennes des déplacements chimiques des carbones du citronnellol (5a), tétrahydrogéraniol (6a) observées en présence d'un dérivé phénolique (annexe 16-17).

En ce qui concerne les mélanges de citronnellol avec les cétones et les alcools on constate que les variations des déplacements chimiques sont élevées pour le C1 (-0,21 ppm et -0,19 ppm) et toujours appréciables pour le C7 (-0,16 ppm et -0,10 ppm). Dans le cas de du tétrahydrogéraniol, la seule variation notable de déplacement chimique est observée sur le C1 qui porte la fonction alcool. En l'absence de la double liaison C6-C7, la variation de déplacement chimique pour le C7 est nulle. Ces résultats confirment une probable interaction entre la double liaison et la fonction oxygénée.

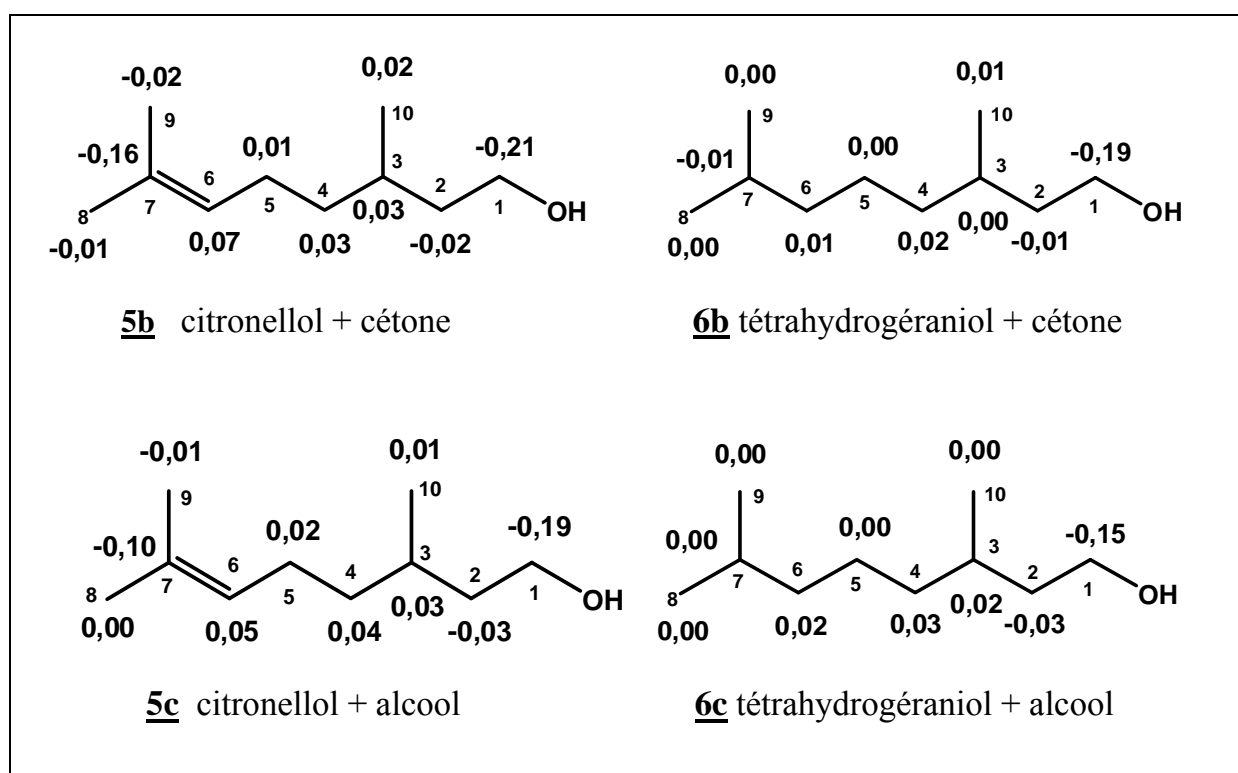


Figure 13 : variations moyennes des déplacements chimiques observées en présence d'un dérivé cétone citronnellol (**5b**), tétrahydrogéraniol (**6b**) et en présence d'un dérivé alcool, citronnellol (**5c**), tétrahydrogéraniol(**6c**) (annexe 18-21).

IV. MELANGES BINAIRES DU GERANIAL ET DU NERAL AVEC UN PHENOL, UN ALCOOL OU UN ACETATE.

L'attribution des déplacements chimiques des carbones du géraniol et du néral a été réalisée de manière conventionnelle et est en accord avec les résultats de Bohlmann *et al.* [192].

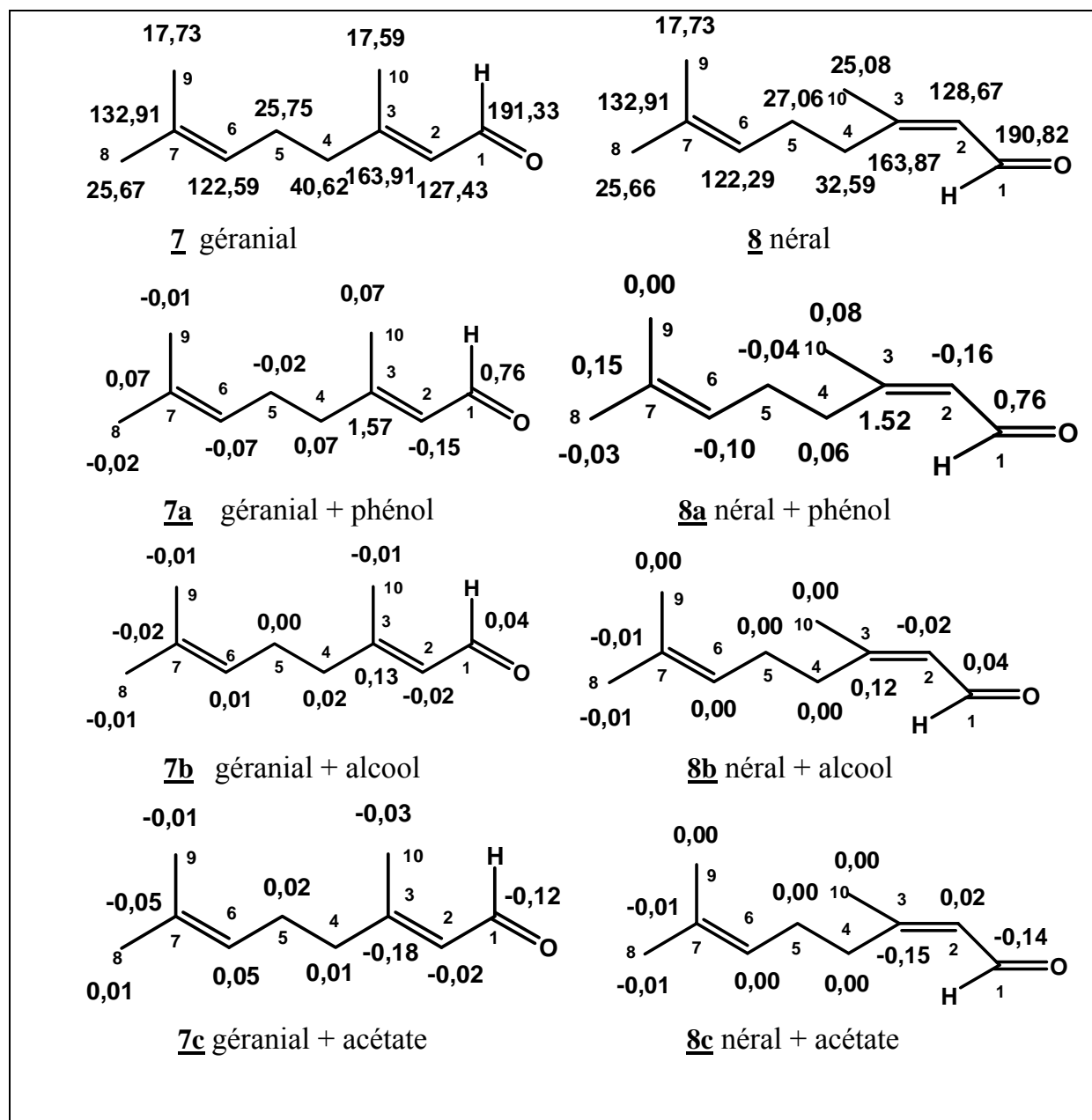


Figure 14 : déplacements chimiques de carbones du géraniol (7), du néral (8) et variations moyennes observées en présence d'un phénol (7a, 8a), d'un alcool (7b, 8b), et d'un acétate (7c, 8c), (annexe 22-27).

Nous reportons ici les résultats obtenus relatifs à la variation des déplacements chimiques des aldéhydes α , β -insaturés en présence de phénols, d'alcools ou d'esters (acétates). Nous avons choisi comme molécule de référence, le néral et le géranial qui sont fréquemment présents dans les huiles essentielles (citronnelle, cubèbe et mélisse).

Nous avons enregistré les spectres de différents mélanges d'aldéhydes avec une série de phénols (carvacrol, thymol, 3-isopropylphénol, 4-éthylphénol, 3,5-diméthylphénol). Nous constatons de très fortes variations des déplacements chimiques des carbones aldéhydiques C1 ($\Delta\delta = +0,76$ ppm) et encore plus du carbone oléfinique quaternaire C3 ($\Delta\delta = +1,57$ et $1,52$ ppm). Le carbone C2 subit une légère variation en sens inverse ($\Delta\delta = -0,15$ et $-0,16$ ppm). Ces variations peuvent s'expliquer par la formation de liaisons hydrogène importantes entre l'oxygène du carbonyle et l'hydrogène du dérivé phénolique. Par contre, les variations de déplacement chimique de tous les autres carbones demeurent faibles et inférieures ou égales à $0,07$ ppm.

En présence d'alcools (linalol, géranol, bornéol, α terpinéol), les variations des déplacements chimiques sont beaucoup plus faibles et toujours inférieures à $0,05$ ppm excepté pour le carbone C3 ($\Delta\delta = +0,13$ et $0,12$ ppm). Dans ce cas, également, nous pouvons suspecter la formation de liaison hydrogène, plus faibles qu'avec les phénols, entre l'oxygène du carbonyle et l'hydrogène de la fonction alcool.

Enfin, quand les deux aldéhydes sont en présence d'un acétate, on observe également des variations des déplacements chimiques de carbones C1 ($\Delta\delta = -0,12$ et $-0,14$ ppm) et C3 ($\Delta\delta = -0,18$ et $-0,15$ ppm). Les déplacements chimiques de tous les autres carbones ont des variations inférieures à $0,05$ ppm.

V. BILAN DE L'ETUDE

Au cours de cette étude sur la variation de déplacement chimique des carbones de molécules terpéniques en présence de composés oxygénés, nous nous sommes plus

particulièrement intéressés à des molécules comportant la sous structure linalol, le linalol lui-même **1**, les (*E*) et (*Z*)-nérolidols, **2** et **3**, ainsi que le (*E,E*)-géranyllinalol **4**. A titre de comparaison, nous avons également examiné le citronellol **5** et le tétrahydrogéraniol **6**. Les résultats obtenus montrent que, dans la plupart des cas, les variations observées sont dues à la formation de liaisons hydrogène. Néanmoins, le mode de formation des liaisons hydrogène intermoléculaires n'est pas le même pour les dérivés phénoliques et pour les composés oxygénés (alcools, esters, composés carbonylés, oxydes)

De manière globale, l'effet due à la présence de liaison hydrogène se propage, comme attendu, à travers les liaisons. Les variations des déplacements chimiques des carbones, induites s'atténuent au fur et à mesure que l'on s'éloigne du site de complexation sauf s'il existe une ou plusieurs doubles liaisons dans la chaîne. Pour les alcools de type linalol (la fonction de alcool est portée par le carbone C3), il y a deux comportements induits par les différents composés oxygénés, d'une part les dérivés phénoliques et d'autre part les autres composés oxygénés, alcool, aldéhyde, cétone, acétate ou oxyde. Les variations des déplacements chimiques des carbones voisins de la fonction alcool sont de signe opposé selon que la molécule de référence est en mélange avec un phénol ou un des autres composés oxygénés. La même observation est faite avec les carbones éthyléniques quaternaires (par exemple le C7 du linalol). Par ailleurs, la modification de la stéréochimie d'une double liaison ne semble pas jouer un rôle.

Cependant la formation de liaisons hydrogène ne peut à elle seule expliquer les variations de déplacement chimique observées et concernant les C_{sp^2} et plus particulièrement les carbones quaternaires des molécules comportant la sous structure linalol (linalol, nérolidols et géranyllinalol). Il existe probablement une interaction entre les doubles liaisons et la fonction oxygénée. Cette interaction présente un caractère intermoléculaire puisque les variations des déplacements chimiques diminuent avec la dilution. Des liaisons de Van der Waals entre un dipôle permanent

(la fonction oxygénée) et un dipôle induit (la double liaison) pourraient être responsables de ces variations.

Pour les molécules de citronellol et de tétrahydrogéraniol où la fonction d'alcool est portée par le carbone C1, les variations des déplacements chimiques des carbones sont très faibles. Enfin, en ce qui concerne les d'aldéhydes α, β -insaturés, les variations les plus importantes sont observées sur les carbones C1 et C3. Ces variations sont nettement plus importantes quand l'aldéhyde est en mélange avec un phénol qu'avec un autre composé oxygéné. Par ailleurs, nous observons des effets opposés suivant que l'on mélange un aldéhyde avec un phénol ou un alcool ou avec un acétate.

D'un point de vue pratique, il ressort de cette étude que des variations des déplacements chimiques de certains carbones des molécules terpéniques oxygénées sont mises en évidence lorsque ces molécules sont en mélange. Néanmoins, les concentrations que nous avons utilisées pour mettre en évidence ces variations sont plus importantes que celles que nous avons observées lors de l'analyse d'une huile essentielle. La connaissance des carbones qui subissent les variations, du sens de ces variations et de leur amplitude relative, doit nous permettre d'affiner nos analyses et de mieux appréhender la présence de ces molécules dans un mélange naturel.

CHAPITRE III

**L'HUILE ESSENTIELLE DE *CLINOPODIUM ASCENDENS*
(JORDAN) SAMPAIO DE MADERE**

I. INTRODUCTION

Le travail décrit dans ce chapitre entre dans le cadre du programme de coopération entre l'Université de Corse et l'Université de Madeira (Funchal, Portugal) relatif à l'étude de la biodiversité végétale insulaire par la production et l'analyse d'huiles essentielles. Cette coopération a été initiée par une étude relative à l'identification et à la quantification de deux lactones sesquiterpéniques, la costunolide et la dihydrocostus lactone dans l'huile fixe de *Laurus azorica* [194]. Elle se poursuit, dans le cadre de cette thèse.

Les résultats décrits ci-après concernent la caractérisation de l'huile essentielle de *Clinopodium ascendens*, plante qui pousse à l'état spontané dans l'île de Madère. Pratiquement, l'échantillonnage, l'obtention de l'huile essentielle et l'étude antibactérienne ont été réalisés à Madère, le fractionnement et les analyses chromatographique et spectroscopique ont été réalisés en Corse.

Dans ce chapitre, nous allons tout d'abord décrire en détail l'analyse d'une huile essentielle de *C. ascendens*, réalisé par combinaison de la chromatographie sur colonne ouverte de silice, la CPG(Ir), la CPG-SM et de la RMN du carbone-13. Un certain nombre de composés dont les données spectrales (RMN ¹³C) étaient soit absentes de nos bibliothèques de spectres ou non décrites dans la littérature, ont fait l'objet d'une étude particulière qui sera détaillée. Enfin, nous décrirons l'activité antibactérienne de cette huile essentielle.

II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Clinopodium ascendens Moeuch est une plante de la famille des Labiées assez répandu dans le sud de l'Europe. C'est une plante, à l'odeur agréable de menthe, qui pousse en lisières des bois et taillis. La plante est annuelle : elle pousse en général au printemps et la période de floraison se situe aux environs de septembre à novembre. Les fleurs sont rassemblées en petites grappes groupées à la naissance des feuilles. Les deux lèvres du calice sont très inégales et bordées de longs cils. Le tube de la corolle est presque droit. Les feuilles sont bordées de dents peu profondes.



Figure 15 : les rameaux de *Clinopodium ascendens*.

La classification taxonomique de cette plante a évolué au cours du temps et a fait l'objet de diverses dénominations associés aux genres *Calamintha*, *Satureja* et *Clinopodium*. D'ailleurs, Morin et al. [195] rappellent que les frontières entre les cinq genres proches *Calamintha* Miller, *Micromeria* Benth, *Satureja* L., *Clinopodium* L. et *Acinos* Miller sont mal définies et suggèrent d'utiliser les marqueurs chemotaxonomiques pour les différencier.

Trois grandes espèces se côtoient dans le genre *Calamintha* :

i) *Calamintha nepeta* Savi, (Lesser Calamint), calament des montagnes (Mountain Calamint) ou Baume des montagnes (Mountain Balm);

ii) *Calamintha sylvatica* Bromf (syn. *Calamintha intermedia* Braun), calament des bois (Wood Calamint, Woodland Calamint);

iii) *Calamintha sylvatica* Bromf. ssp *ascendens* P.W. Ball, calament commun (Common Calamint) ; synonymes : *Calamintha ascendens* Jordan, *Satureja ascendens* Maly, *Calamintha menthifolia* Host, *Calamintha clinopodium*, *Melissa calamintha* et enfin *Clinopodium ascendens* (Jordan) Sampaio. C'est cette dernière dénomination qui est aujourd'hui retenue et que nous utiliserons.

C. ascendens est une plante particulièrement prisée par les anciens herboristes. Elle est utilisée en médecine populaire dans diverses applications, résumées ci-dessous et pour lesquelles nous conserverons la dénomination d'origine.

- Stuart, se référant à *Calamintha ascendens* (calament commun, calament des montagnes ou baume des montagnes), note que les feuilles peuvent-être utilisées comme un cataplasme pour soigner les contusions ainsi que les douleurs causées par la sciatique [196] ;

- Cependant, Wren signale le même type d'utilisation pour *Calamintha officinalis* Moeuch (synonyme *Calamintha menthifolia* Host), plante pour laquelle il emploie les termes de calament commun, calament des montagnes mais aussi basilic sauvage ou « basilic-thym » [197] ;

- le calament intervient également dans les traitements psychiques. Il a été utilisé pour calmer l'hystérie, dans le traitement de la mélancolie car il procure un effet euphorique ;

- l'infusion sert à combattre les troubles de l'estomac, du foie et la rate [198]. Le calament intervient également, sous forme de sirop, comme expectorant pour combattre la fièvre et la toux [198] ;

- l'huile essentielle est utilisée pour frictionner la peau, en particulier pour soulager les douleurs due aux névralgies ou à la sciatique. Appliquée avec un coton sur une dent cariée, elle est supposée avoir une action contre la douleur.

Seulement trois études concernant la composition chimique de *C. ascendens* ont été décrites. Les deux premières sont relatives à des huiles essentielles d'origine d'espagnole :

- un premier échantillon, qui possède une activité antimicrobienne et antipyrétique, contient la pulégone comme composé majoritaire (54,5%), associée à l'isomenthone (15,2%), au 1,8-cinéole (12,6%) et au menthol (10,2%) [199,200] ;

- deux autres échantillons (l'un sauvage, l'autre cultivé) sont dominés par l'isomenthone (36,8 et 43,3%), produit majoritaire, associé au 1,8-cinéole (18,4 et 14,0%) et à la pulégone (7,8 et 4,7%), et présentent une activité antifongique [201] ;

- la troisième analyse décrit la composition d'une huile essentielle d'origine turque avec l'oxyde de pipéritone (21,8%), le limonène (15,7%) et l'oxyde de pipériténone (10,5%), comme composés majoritaires [202].

III. ETUDE DETAILLEE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE PARTIES AERIENNES DE *C. ASCENDENS*

Les parties aériennes de *C. ascendens* produisent par hydrodistillation une huile essentielle pratiquement incolore, qui possède les caractéristiques suivantes (Données pour l'échantillon étudié):

- indice de réfraction = $1,475 \pm 0.002$,
- densité = $0,903 \pm 0,06$
- pouvoir rotatoire = $-53,1 \pm 0,1^\circ$.

Les rendements varient de 1,78 et 2,26%, respectivement (rendements calculés par rapport au végétal séché), pour des plantes récoltées pendant la phase végétative et pendant la période de floraison. Chaque mesure résulte de la moyenne obtenue pour trois distillations.

Pour réaliser cette étude, nous disposions donc de divers échantillons d'huile essentielle de *Clinopodium ascendens*, en quantités variables, qui nous ont été fournis par le Professeur Paula Castilho de l'université de Madère. L'échantillon, dont la quantité était plus importante, a été utilisé pour l'analyse détaillée.

III.1. Analyse d'un échantillon d'huile essentielle totale

Dans la continuité des travaux menés au laboratoire sur la caractérisation des huiles essentielles, nous avons privilégié l'utilisation de la RMN ^{13}C pour l'identification des constituants. Aussi, dans un premier temps, l'analyse de l'échantillon d'huile essentielle de *C. ascendens*, a été réalisée par CPG, en prenant en compte les indices de rétention sur deux colonnes de différente polarité et par RMN ^{13}C , sans séparation préalable des constituants. Alors que le profil chromatographique de l'échantillon laissait suspecter une huile essentielle riche en monoterpènes (oxygénés), avec un composé très majoritaire (environ 75%, I_r apol/pol = 1159/1587). L'interrogation de la bibliothèque « Terpènes » du Laboratoire n'a permis d'identifier que 2 composés, aisément repérés sur le chromatogramme en utilisant leurs indices de rétention sur colonnes apolaire et polaire, par comparaison avec ceux des produits de

référence. Il s'agit en fait de deux monoterpènes minoritaires, la pulégone (6,9%) et le limonène (2,5%).

Parallèlement, l'interrogation de la bibliothèque de données RMN ^{13}C « Littérature » du laboratoire ne donne pas non plus de résultats probants, si ce n'est la présence probable de la trans-isopulégone parmi les composés minoritaires. De plus, l'examen du chromatogramme nous démontre que le composé très majoritaire co-élue avec un autre constituant sur colonne apolaire. L'analyse de l'huile essentielle par SM permet l'identification de quelques composés minoritaires et suggère la structure de l'isopulégone (isomère non spécifié) pour ce composé majoritaire et pour un autre composé (4,5% sur colonne polaire, $I_r = 1592$) qui est donc probablement la trans-isopulégone, observée par RMN. Les deux molécules présentent des spectres de masse identiques, donnant ainsi un argument supplémentaire à la présence d'isomères. Dans ce contexte, il nous a semblé plus judicieux de réaliser un fractionnement de l'huile essentielle sur colonne ouverte de silice avant de poursuivre l'analyse.

III. 2. Fractionnement et étude détaillée

Nous avons réalisé le fractionnement de 531 mg sur colonne ouverte de SiO_2 avec un gradient d'élution pentane/oxyde de diéthyle (Figure 16). Nous avons obtenu 7 fractions (F1-F7) qui ont été analysées par CPG(I_r) et par RMN ^{13}C (Tableau 7).

L'analyse de la fraction F1, élue au pentane, permet d'identifier deux hydrocarbures sesquiterpéniques, le (E)- β -caryophyllène (47,6%) et le bicyclogermacrène (9,7%). Les hydrocarbures monoterpéniques présents dans l'huile essentielle, ont disparu lors de l'évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif. Curieusement, le pipéritone (6,3%) est également observée dans cette fraction.

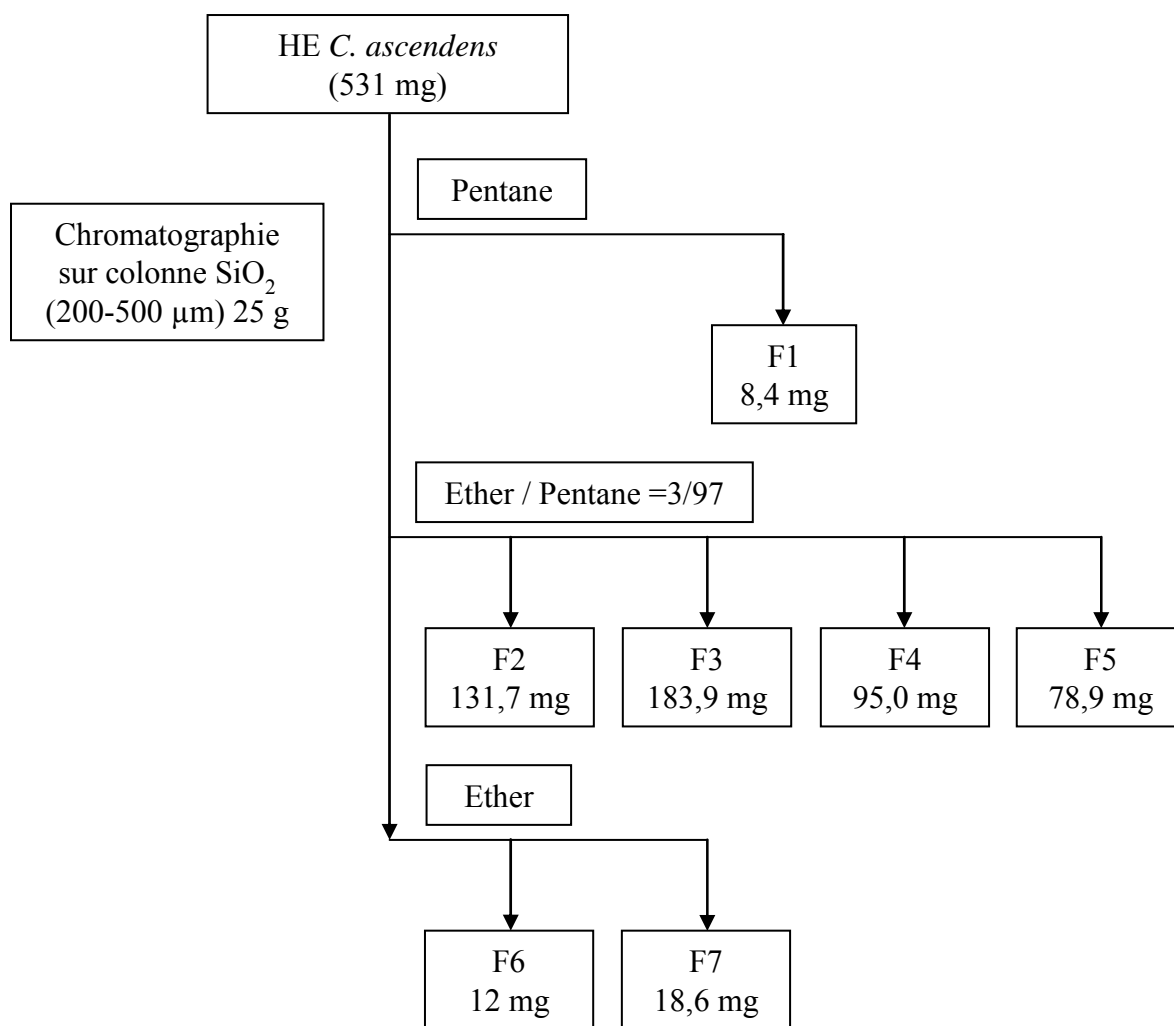
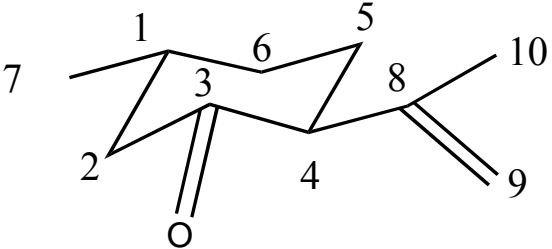


Figure 16: schéma de fractionnement de l'huile essentielle de *Clinopodium ascendens* de Madère.

III.3. Identification des trans et cis-isopulégones

Les fractions F2-F5, de loin les plus importantes en masse, contiennent le composé majoritaire de l'huile essentielle, à une teneur variant de 60 à 87 % (F2). Le spectre de RMN ¹³C de la fraction F2 fait apparaître une série de dix raies de résonance appartenant au composé majoritaire ainsi qu'une vingtaine d'autres signaux d'intensité beaucoup plus faible. La recherche informatisée permet d'identifier la pulégone à partir de la bibliothèque « Terpènes » ainsi que la trans-isopulégone à partir de la bibliothèque « Littérature ». La structure et les déplacements chimiques de cette dernière sont présentés dans la tableau 4.

Tableau 4 : structure et déplacements chimiques de la trans-isopulégone observés dans la fraction F2 et décrits dans la littérature ($\delta^{13}\text{C}$, ppm).

| | n° C | δ | δ [203] |
|---|------|----------|----------------|
|  | 1 | 35,36 | 35,24 |
| | 2 | 50,56 | 50,48 |
| | 3 | 210,17 | 210,18 |
| | 4 | 57,68 | 57,64 |
| | 5 | 31,13 | 31,11 |
| | 6 | 33,86 | 33,78 |
| | 7 | 22,36 | 22,25 |
| | 8 | 143,49 | 143,42 |
| | 9 | 112,82 | 112,76 |
| | 10 | 21,28 | 21,26 |

La teneur du composé majoritaire dans la fraction F2, est suffisamment importante pour que puissent être enregistrés et exploités les spectres de RMN 1D (^1H et ^{13}C , DEPT) et 2D (HSQC) (Tableau 5). Le spectre obtenu à l'aide de la séquence DEPT permet d'identifier deux carbones quaternaires (211,79 et 142,77 ppm), deux méthines (56,91 et 33,34 ppm), quatre méthylènes (112,16, 48,20, 30,12 et 27,61 ppm) et deux méthyles (21,65 et 20,56 ppm). Ces données, en conjonction avec la valeur du pic moléculaire observé en SM ($m/z = 152$) conduisent à la formule brute $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$. La structure de la molécule, qui possède trois centres d'insaturation, contient donc une fonction carbonyle (211,79 ppm) et un méthylène exocyclique (C résonnant à 142,77 ppm et CH_2 résonnant à 112,16 ppm) et un cycle. Ces informations sont confortées par l'étude du spectre du proton dans lequel on observe bien les deux protons vinyliques (4,96 et 4,79 ppm) ainsi qu'un méthyle résonnant sous forme d'un doublet ($\delta = 0,98$ ppm) et un méthyle vinylique ($\delta = 1,73$ ppm). La molécule est donc une cyclohexanone substituée par un groupement isopentényle et par un groupement méthyle, autrement dit, une menthone insaturée. Il s'agit de la cis-isopulegone. Les protons du cycle sont attribués en tenant compte des corrélations proton-carbone dans le spectre HSQC.

Tableau 5 : structure et déplacements chimiques de RMN ^1H et ^{13}C observés dans fraction F2 de la cis-isopulégone (δ C, ppm).

| | n° C | δ ^{13}C | DEPT | δ $^1\text{H}^*$ |
|--|------|--------------------------|-----------------|--|
| | 1 | 33,34 | CH | 2,15 (m) |
| | 2 | 48,20 | CH ₂ | 2,39 (d, J = 9.3 Hz) 2,20 (d, J=7.8 Hz) |
| | 3 | 211,79 | C | - |
| | 4 | 56,91 | CH | 2,98 (t, J = 6,4 Hz) |
| | 5 | 27,61 | CH ₂ | 2,15 (m) 1,84 (m) |
| | 6 | 30,12 | CH ₂ | 1,84 (m) 1,61 (m) |
| | 7 | 20,56 | CH ₃ | 0,98 (d, J = 6,6 Hz) |
| | 8 | 142,77 | C | - |
| | 9 | 112,16 | CH ₂ | 4,96 (s) 4,79 (s) |
| | 10 | 21,65 | CH ₃ | 1,73 (s) |

* attributions proton-carbone réalisées par la corrélation hétéronucléaire simple liaison HSQC

La stéréochimie cis des substituant est confirmée par l'examen des déplacements chimiques du méthyle C7, dans les deux isomères. En effet, on observe un blindage d'environ 1,8 ppm (20,56 vs 22,36 ppm) dans l'isomère cis par rapport à l'isomère trans. Cet effet γ stérique est encore plus marqué sur le carbone C5 (27,61 vs 31,13 ppm). La disposition axiale du méthyle dans l'isomère cis est confirmée par l'examen des déplacements chimiques des carbones C1, C2 et C6. En effet, ces derniers sont plus déblindés dans l'isomère trans par rapport à ceux de l'isomère cis (C1 : 35,36 vs 33,34 ; C2 : 50,56 vs 48,20 et C6 : 33,86 vs 30,12 ppm). Ces différences sont dues à la perte, dans l'isomère cis, des dispositions anticoplanaires des hydrogènes vicinaux, induisant un blindage des déplacements chimiques [204]. Nous remarquons également, si l'on en juge par les valeurs des constantes de couplage, que la cis-isopulégone

n'adopte probablement pas une véritable conformation chaise mais plutôt une conformation chaise aplatie ou conformation croisée.

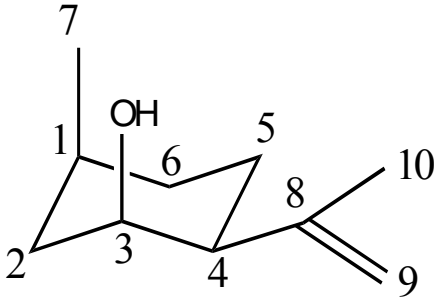
Il est intéressant de noter que les deux isopulégones isomères présentent les mêmes indices de rétention sur colonnes apolaire. En effet, aussi bien la BP1 que la DB5 se sont montrées inefficaces pour la séparation de ces deux composés. Sur colonne polaire, les deux composés sont séparés par cinq points d'indices (1587 et 1592). Comme attendu, les deux isomères présentent des spectres de masse insuffisamment différenciés. A l'inverse, ils sont facilement identifiables par RMN ¹³C, puisque aucune superposition de leurs déplacements chimiques n'est observée.

III.4. Identification du néoiso-isopulégol

L'analyse de la fraction oxygénée F6 par CPG/Ir montre la présence d'un composé majoritaire (71,5%, Ir apol = 1166 ; Ir pol = 1614) et de plusieurs composés minoritaires dont la pulégone, le linalol et un alcool sesquiterpénique, le spathulénol. Les données de la SM ainsi que les indices de rétention d'un autre composé minoritaire (1142/1568) sont en accord avec la structure du néo-isopulégol. Tous ces composés sont également présents dans la fraction suivante F7, dans laquelle nous identifions, de plus, le bornéol, l' α -terpinéol et un autre isomère de l'isopulégol, à savoir l'iso-isopulégol (Ir = 1159/1632, 8,1%).

L'analyse par CPG-SM suggère la structure de l'isopulégol pour ce composé. Néanmoins, la concordance des indices de rétention avec ceux de l'isopulégol de référence (Ir apol = 1135 ; Ir pol = 1575) n'est pas bonne. L'examen du spectre de RMN du carbone-13 confirme que le composé majoritaire de la fraction 6 n'est pas l'isopulégol dont les données spectrales sont présentes dans notre bibliothèque de spectres. Il ne s'agit pas non plus de l'iso-isopulégol, ni du néo-isopulégol, également identifiés dans les fractions en tant que composés minoritaires. L'ensemble des données chromatographiques et spectroscopiques (SM et RMN) nous laisse suspecter la présence du quatrième isomère, à savoir le néoiso-isopulégol.

Tableau 6 : structure et données RMN ^1H et ^{13}C du néoiso-isopulégol.

| | n°C | $\delta^{13}\text{C}$ | DEPT | $\delta^1\text{H}^*$ |
|---|-----|-----------------------|-----------------|---|
|  | 1 | 27,88 | CH | 1,83 (m) |
| | 2 | 37,80 | CH ₂ | 1,71 (m) |
| | 3 | 68,32 | CH | 3,93 (q, J = 4,0 Hz) |
| | 4 | 48,04 | CH | 2,17 (dt, J = 9,8 et 3,8 Hz) |
| | 5 | 21,29 | CH ₂ | 1,86 (td, J = 9,8 et 3,8 Hz) ; 1,36(m) |
| | 6 | 31,12 | CH ₂ | 1,57 (m), 1,53 (m) |
| | 7 | 21,29 | CH ₃ | 1,11 (d, J = 7,1 Hz) |
| | 8 | 146,84 | C | ----- |
| | 9 | 112,16 | CH ₂ | 4,97 (s), 4,86 (s) |
| | 10 | 23,48 | CH ₃ | 1,79 (s) |

* attributions proton-carbone réalisées par l'expérience de corrélation hétéronucléaire simple liaison HSQC

Une quantité plus importante de ce composé a été obtenue par réduction par LiAlH_4 , de la cis-isopulégone présente dans l'huile essentielle brute, à une teneur de 75%. Le composé inconnu, qui représentait 6% de l'huile essentielle, voyait sa teneur atteindre 79% dans l'huile essentielle « réduite ». Sur le spectre de RMN du carbone-13, nous observons une série de 9 raies de résonance d'intensité importante. Les données de la SM ($m/z = 154$) et la réalisation d'une séquence DEPT nous suggèrent la formule brute $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$. Nous sommes en présence d'un carbone quaternaire (146,84 ppm), 3 méthines (68,32, 48,04 et 27,88 ppm), 4 méthylènes dont 1 Csp² (112,16, 37,80, 31,12 et 21,29 ppm) et 2 méthyles (23,48 et 21,29 ppm). Il faut noter que la superposition à 21,29 ppm de deux résonances appartenant à un carbone méthylénique et un méthyle. Les valeurs des déplacements chimiques, en RMN du proton et du carbone-13 mettent en évidence la présence d'une fonction alcool à 68,32, ppm et d'une double liaison (142,77 et 112,16 ppm) et de deux groupements méthyle (21,29 et 23,48 ppm) dont un en position vinylique puisque la séquence HSQC montre la corrélation du $\delta^{13}\text{C}$ (23,48 ppm) avec $\delta^1\text{H}$ (1,79 ppm). La molécule possède par conséquent une structure cyclique compatible avec celle du néoiso-isopulégol.

L'expérience de corrélation hétéronucléaire simple liaison HSQC associe le carbone méthyne C3 (68,32 ppm) avec le signal à 3,93 ppm ainsi que le carbone C4 (48,32 ppm) avec le signal à 2,17 ppm présentant une multiplicité caractéristique de doublet de triplet ($J = 9,8$ et $3,8$ Hz). Comme dans le cas de la *cis*-isopulégone, les valeurs des constantes de couplage montrent que cette molécule adopte une conformation chaise aplatie ou conformation croisée.

Au terme de notre étude sur la composition chimique de l'huile essentielle de *C. ascendens*, nous avons identifié vingt-trois composés par combinaison des techniques chromatographiques (CC et CPG (Ir)) et de la RMN ^{13}C . Treize composés sont identifiés à l'aide de la bibliothèque de spectres du laboratoire, un à l'aide des données de la littérature et deux après purification ou hémisynthèse.

Tableau 7 : fractionnement de l'huile essentielle de *C. ascendens*.

| Composés | Ir A | Ir P | HE | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 | F7 |
|--------------------------------------|------|------|-------------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Eluant | | | | 100 | 97/3 | 97/3 | 97/3 | 97/3 | 100 | 100 |
| Masses (mg) | | | 531 | 8 | 132 | 184 | 95 | 79 | 12 | 19 |
| α -pinène | 930 | 1026 | 0,2 | | | | | | | |
| sabinene | 964 | 1120 | tr | | | | | | | |
| β -pinène | 970 | 1110 | 0,2 | | | | | | | |
| myrcène | 980 | 1164 | 0,2 | | | | | | | |
| <i>p</i> -cymène | 1011 | 1274 | 0,1 | | | | | | | |
| limonène | 1022 | 1206 | 2,5 | | | | | | | |
| (<i>Z</i>)- β -ocimène | 1024 | 1235 | 0,1 | | | | | | | |
| terpinolène | 1080 | 1280 | tr | | | | | | | |
| linalol | 1083 | 1554 | 0,1 | | | | | | 1,2 | 1,9 |
| menthone | 1133 | 1467 | 0,1 | | | | | | | |
| <i>néo</i> -isopulégol | 1142 | 1568 | 0,2 | | | | | | 1,3 | 0,4 |
| bornéol | 1148 | 1707 | tr | | | | | | | 2,8 |
| <i>cis</i> -isopulégone * | 1159 | 1587 | 75,2 | | 86,7 | 85,5 | 79,2 | 60,0 | | |
| <i>trans</i> -isopulégone * | 1159 | 1592 | 4,5 | | 6,1 | 5,4 | 5,0 | 3,0 | | |
| <i>iso</i> -isopulégol* | 1159 | 1632 | 0,2 | | | | | | | 8,1 |
| <i>néoiso</i> -isopulégol | 1166 | 1614 | 6,0 | | | | 2,7 | 15,2 | 71,5 | 18,2 |
| α -terpinéol | 1173 | 1703 | tr | | | | | | | 1,8 |
| pulégone | 1216 | 1654 | 6,9 | | 5,5 | 6,7 | 10,5 | 8,4 | 8,4 | 1,4 |
| piperitone | 1228 | 1736 | tr | 6,3 | | | | | | |
| (<i>E</i>)- β -caryophyllène | 1420 | 1600 | 0,3 | 47,6 | | | | | | |
| bicyclogermacrène | 1493 | 1708 | 0,1 | 9,7 | | | | | | |

| | | | | | | | |
|------------------------|------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------------------|
| spathulénol | 1564 | 2133 | 0,2 | | 5,1 | 5,1 | 7,2 |
| oxyde de caryophyllène | 1571 | 1990 | 0,2 | | | | |
| Total (%) | | | 97,3 | 63,6 | 98,3 | 97,6 | 97,4 91,7 87,5 41,8 |

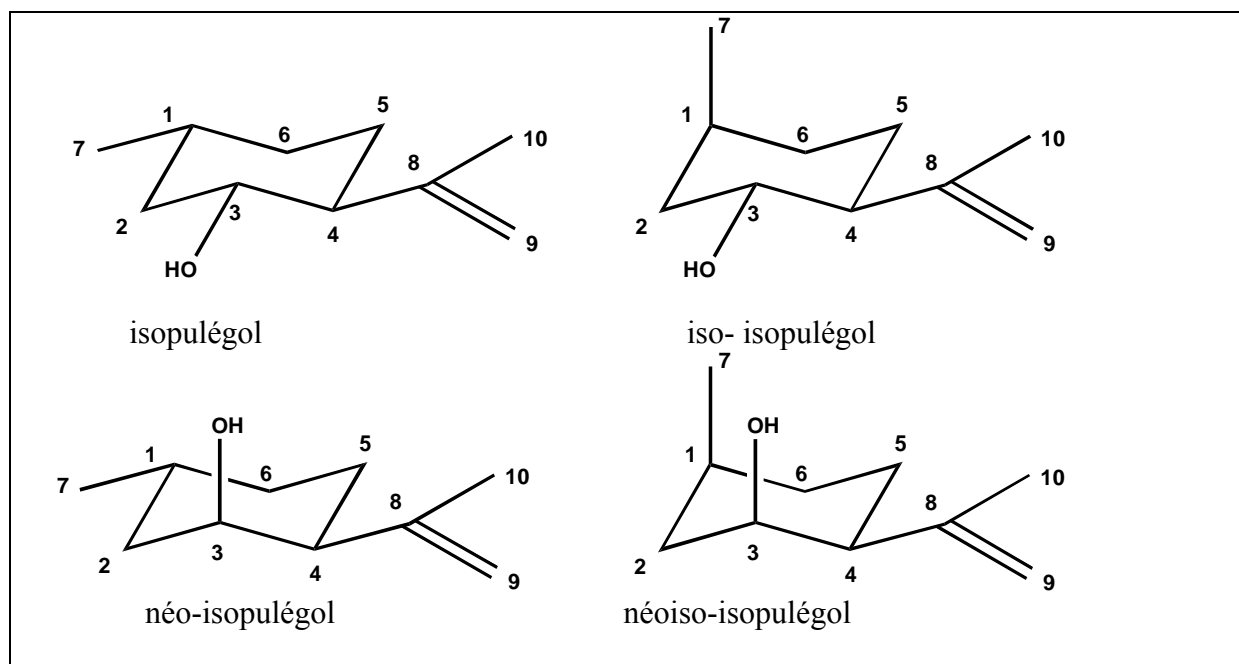
*L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les noms sont suivis d'un astérisque. * : pourcentage sur colonne polaire. Ir A et Ir P: indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP-1) et polaire (BP-20). -: indices de rétention non déterminés. tr: composés à l'état de trace <0,05%.*

III.5. Données spectrales des 4 isomères de l'isopulégol

Puisque nous disposons maintenant des quatre isomères de l'isopulégol, il nous a semblé intéressant de comparer leurs données spectrales (Tableau 8). Dans le néoiso-isopulégol, nous notons particulièrement le blindage important du C5 (21,29 ppm). En effet, la disposition axiale du méthyle et du groupement hydroxy induit un effet γ stérique marqué sur le carbone C5 si on le compare avec les trois autres isomères. Cette disposition entraîne aussi la perte des dispositions anticoplanaires des hydrogènes vicinaux, induisant un blindage des déplacements chimiques de C2, C4 et C6 [204].

Afin de participer à l'enrichissement de la banque de terpènes du laboratoire, nous avons aussi synthétisé l'acétate de néoiso-isopulégyle à partir du chlorure d'acétyle en présence de triméthylamine. L'ensemble des déplacements chimiques des différents carbones de cette molécule ainsi que ceux des trois autres isomères sont données dans la partie annexe en fin de mémoire (annexe 28).

Tableau 8: structures et données RMN ^{13}C des 4 isomères de l'isopulégol.



| | isopulégol [205] | néo-isopulégol[205] | iso-isopulégol | néoiso-isopulégol |
|---------|------------------|---------------------|----------------|-------------------|
| carbone | δ (ppm) | δ (ppm) | δ ppm) | δ (ppm) |
| C-1 | 31,46 | 25,80 | 28,26 | 27,88 |
| C-2 | 42,70 | 40,95 | 39,48 | 37,80 |
| C-3 | 70,37 | 66,33 | 66,48 | 68,32 |
| C-4 | 54,14 | 48,41 | 54,81 | 48,04 |
| C-5 | 29,68 | 23,94 | 24,74 | 21,29 |
| C-6 | 34,34 | 34,77 | 30,92 | 31,12 |
| C-7 | 22,24 | 22,24 | 18,59 | 21,29 |
| C-8 | 146,67 | 147,32 | 146,66 | 146,84 |
| C-9 | 112,81 | 111,28 | 112,63 | 112,16 |
| C-10 | 19,21 | 22,77 | 19,45 | 23,48 |

IV. BILAN DE L'ETUDE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *CLINOPODIUM ASCENDENS*.

Vingt trois composés, qui représentent 97,3% de la composition chimique de l'huile essentielle, ont été identifiés par combinaison des trois techniques : CPG(Ir), CPG-SM et RMN ¹³C. Les composés possédant le squelette menthanique substitué en C3 sont les plus importants, à la fois en nombre et en teneur (Tableau 9):

- le composé majoritaire, la *cis*-isopulégone représente plus de 75% de l'huile essentielle.

- l'isomère *trans* de l'isopulégone et la pulégone elle-même sont présentes à des teneurs de 4,5% and 6,9% respectivement ;

- trois des quatre isomères de l'isopulégol (Tableau 8) ont été identifiés dans cette huile essentielle : le *néoiso*-isopulegol (6,0%), le *néo*-isopulegol (0,2%) et l'*iso*-isopulegol (0,2%), tandis que l'isopulégol lui-même n'était pas détecté ni par spectrométrie de masse, ni par RMN ;

- les quatre sesquiterpènes identifiés représentent moins de 1% de l'huile essentielle ;

- aucune variation significative de la composition chimique n'a été observée pour cette huile essentielle, que ce soit en termes de localisation dans l'île de Madère, ou que ce soit en fonction du stade de développement de la plante.

Jusqu'à ce jour, la présence simultanée des deux isomères de l'isopulégone n'a été reportée, à notre connaissance, que pour deux plantes : *Agathosma crenulata* (buchu) [206] en très faible quantité et *Cyclotrichium organifolium* [207] à des teneurs plus importantes.

L'isomère *cis* de l'isopulégone résultant de la voie biogénétique du (-)-limonène, présent dans les menthes [208,209] est l'énantiomère dextrogyre, de configuration 2R, 5R. L'huile essentielle de *Clinopodium ascendens* étudiée ici, est lévogyre et contient majoritairement (75%), la 2S, 5S-(-)-*cis*-isopulégone.

Tableau 9 : bilan de l'étude de la composition chimique de l'HE de *C. ascendens*.

| Composés | Ir A | Ir P | HE | Identification |
|--------------------------------------|------|------|-------------|--|
| α -pinène | 930 | 1026 | 0,2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| sabinène | 964 | 1120 | tr | Ir, SM |
| β -pinène | 970 | 1110 | 0,2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| myrcène | 980 | 1164 | 0,2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| <i>p</i> -cymène | 1011 | 1274 | 0,1 | Ir, SM |
| limonène | 1022 | 1206 | 2,5 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| (<i>Z</i>)- β -cymène | 1024 | 1235 | 0,1 | Ir, SM |
| terpinolène | 1080 | 1280 | tr | Ir, SM |
| linalol | 1083 | 1554 | 0,1 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| menthone | 1133 | 1467 | 0,1 | Ir, SM |
| <i>néo</i> -isopulégol | 1142 | 1568 | 0,2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| bornéol | 1148 | 1707 | tr | Ir, SM |
| <i>cis</i> -isopulégone * | 1159 | 1587 | 75,2 | Ir, SM, RMN ¹ H & ¹³ C |
| <i>trans</i> -isopulégone * | 1159 | 1592 | 4,5 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| <i>iso</i> -isopulégol* | 1159 | 1632 | 0,2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| <i>néoiso</i> -isopulégol | 1166 | 1614 | 6,0 | Ir, SM, RMN ¹ H & ¹³ C |
| α -terpinéol | 1173 | 1703 | tr | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| pulégone | 1216 | 1654 | 6,9 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| pipéritone | 1228 | 1736 | tr | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| (<i>E</i>)- β -caryophyllène | 1420 | 1600 | 0,3 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| bicyclogermacrène | 1493 | 1708 | 0,1 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| spathuléol | 1564 | 2133 | 0,2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| oxyde de caryophyllène | 1571 | 1990 | 0,2 | Ir, SM |
| Total (%) | | | 97,3 | |

L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les noms sont suivis d'un astérisque. * : pourcentage sur colonne polaire. Ir A et Ir P: indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP-1) et polaire (BP-20). tr: composés à l'état de trace <0,05%.

La composition de l'huile essentielle de *Clinopodium ascendens* (syn = *Calamintha sylvatica* ssp *ascendens*) de Madère diffère considérablement de celle des échantillons d'origine espagnole [199,200] qui contiennent la pulégone (54.5%), l'isomenthone (15,2%), le cinéole (12,6%) et le menthol (10,2%), ou l'isomenthone (36.8%), le cinéole (18,4%) ainsi que la pulégone (16.6%) comme composés majoritaires[201].

Cette composition se différencie également de celle des autres espèces de calament :

- ainsi, deux études menées sur l'huile essentielle de *Calamintha sylvatica* Bromf. subsp. *sylvatica* du sud de l'Europe, fait apparaître des différences importantes: la première fait état de la pulégone comme composé majoritaire (54,2%) [210], tandis que dans la seconde étude, c'est l'oxyde de *cis*-piperitone [211] qui est majoritaire (66,6%, 69,2% and 74,6%, en fonction du stade de développement de la plante, pré-floraison, pleine floraison et après floraison).

- l'huile essentielle de trois populations de *Calamintha sylvatica* Bromf. (sous espèce non précisée), native de la région montagneuse du sud-ouest de la Serbie [212] présente également l'oxyde de *cis*-pipéritone comme composé majoritaire (48,9-59,2%).

- Une revue de la littérature montre que les divers taxons de *Calamintha* produisent presque exclusivement des dérivés menthaniques qui portent une fonction oxygénée sur le carbone C3. La seule exception concerne l'huile essentielle de *Calamintha officinalis* dans laquelle la carvone, cétone menthanique oxydée en position C6, est prédominante (60%) [213].

- L'huile essentielle de *Calamintha nepeta* ssp *nepeta* ou ssp *glandulosa*, a fait l'objet de nombreuses études. Les travaux de Baldovini [153] *et al.*, dans notre laboratoire, font état d'une importante variabilité chimique. En Corse, l'existence de trois types chimiques a été démontrée. Certains échantillons présentent la pulégone (associée à divers autres monoterpènes menthaniques tels la menthone, l'isomenthone, le menthol ou la pipéritone) ou la menthone, ou encore la carvone comme composés

majoritaires de ces huiles essentielles. D'autres échantillons sont dominés par les oxydes de pipéritone et/ou de pipériténone. Sarer *et al.* [214] avaient identifié la pulégone comme composé majoritaire de l'huile essentielle de *Calamintha nepeta* ssp. *glandulosa*. Flamini *et al.* [215] ont observé un large spectre d'activités antimicrobiennes pour un échantillon d'huile essentielle de *Calamintha nepeta* (*sensu lato*) d'origine italienne, dont la composition révèle aussi la pulégone comme constituant majoritaire.

La composition chimique des huiles essentielles d'autres espèces de *Calamintha* a été étudiée ponctuellement. Par exemple :

- l'huile essentielle d'une population de *Calamintha vardarensis* originaire du sud de la République de Macédoine (ex Yougoslavie) [212] contenait l'oxyde de *cis*-pipéritone comme composé majoritaire (65,6%) ;

- Baser [216] a étudié la composition des huiles essentielles de cinq taxa de *Calamintha* originaires de Turquie, identifiant leurs composés majoritaires comme suit : l'isopinocampone (49-56%) pour *C. grandifolia*; l'oxyde de pipériténone (67%) pour *C. incana*; la pulégone (36%) et l'acétate de menthyle (28%) pour *C. pamphylica* ssp *pamphylica*; la pulégone (38%, associée à la menthone 10%, à l'acétate de menthyle 9%, et au menthol 9%) pour *C. pamphylica* ssp *davisii* et l'oxyde de *trans*-pipéritone (25-58%) pour *C. nepeta* ssp *glandulosa*.

Dans notre revue de la littérature, nous n'avons jamais observé que l'isopulégone ait été trouvée comme composé majoritaire de l'huile essentielle d'une espèce de *Calamintha*. Cependant, une teneur appréciable en isopulégone (isomère non précisé) a été trouvée dans l'huile essentielle de *Tanacetum khorassanicum* (Krasch.) Parsa (13%) [217], et de *Micromeria libanotica* Boiss. (6,5%) [218]. Baser *et al.* [207, 216] ont observé la présence de la *cis*-isopulégone (en proportions variables, 4-52%) dans l'huile essentielle de *Cyclotrichium origanifolium*, une espèce endémique de Turquie. A notre connaissance, c'est la plus forte teneur de *cis*-isopulégone reportée dans la littérature (identifiée à partir de son spectre de masse et indices de rétention).

Il apparaît donc que le calament que nous avons étudié et qui pousse à l'état spontané dans l'île de Madère, contient une huile essentielle dont la composition, très largement dominée par la cis-isopulégone, diffère considérablement de celle des échantillons d'origine espagnole ou turque qui ont fait l'objet d'études. Manifestement la cis-isopulégone joue un rôle d'antibiotique aussi important que celui dévolu à la pulégone elle-même.

Aussi, il pourrait être intéressant d'utiliser cette huile essentielle en remplacement des huiles essentielles riches en pulégone. En effet, la pulégone montre une toxicité hépatique (supérieure d'ailleurs pour l'isomère R-(+) que pour l'isomère S-(-)), probablement due à des profils métaboliques différents. Quand la S-(-)-isopulégone est utilisée comme substrat, seule une petite quantité d'un seul métabolite (le menthofurane) est observée, la substance demeurant majoritairement non métabolisée. WHO [219], FEMA [220] et AFC [221] sont unanimes pour admettre que l'isopulégone est significativement moins hépatotoxique que la pulégone.

V. ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *CLINOPODIUM ASCENDENS*.

L'activité biologique de l'huile essentielle de *Clinopodium ascendens* a été testée dans les laboratoires de l'Université de Madère avec l'objectif de valider l'utilisation traditionnelle de cette plante. L'huile essentielle a été testée sur sept micro-organismes suivants qui sont des pathogènes humains fréquemment rencontrés:

- Bactéries gram + : *Staphylococcus aureus* CCMI 335, *Streptococcus mutans* CCMI 1022 et *Streptococcus faecium* CCMI 338
- Bactéries gram - : *Agrobacterium tumefaciens* et *Escherichia coli* CCMI 270,
- Champignon : *Botrytis cinerea* CCMI 899 et *Candida albicans* CCMI 209

La méthode de diffusion par disques est utilisée et la zone d'inhibition est mesurée en mm. La rifampicine pour les bactéries, la 5-fluorocytosine pour *C. albicans* et la carbendazime pour *B. cinerea* sont utilisées comme témoins positifs

Tableau 10: résultats des tests anti-bactériens et anti-fongiques par disques.

| Microorganismes | HE | Rifampicine | Carbendazime | 5 fluorocytosine |
|------------------------|----|-------------|--------------|------------------|
| <i>A. tumefasciens</i> | 20 | 40 | n.t. | n.t. |
| <i>E. coli</i> | 22 | 15 | n.t. | n.t. |
| <i>S. aureus</i> | 15 | 35 | n.t. | n.t. |
| <i>S. faecium</i> | - | 20 | n.t. | n.t. |
| <i>S. mutans</i> | - | 45 | n.t. | n.t. |
| <i>B. cinerea</i> | 20 | n.t. | 30 | n.t. |
| <i>C. albicans</i> | - | n.t. | n.t. | 15 |

- absence d'activité ; n.t : non testé

Les résultats (Tableau 10) obtenus ont montré que l'huile essentielle de *Clinopodium ascendens* présente une activité antibactérienne contre *Agrobacterium tumefasciens* *Escherichia coli* et dans une moindre mesure *Staphylococcus aureus* et *B. cinerea*. Par contre l'huile essentielle est inactive *vis-à-vis* de *S. faecium*, *S. mutans* et *C. albicans*. Il est étonnant de constater que cette huile essentielle utilisée de manière traditionnelle pour traiter les maux de dents ne présente aucune activité *vis-à-vis* de la bactérie *S. faecium* qui est un pathogène humain de la cavité buccale.

CHAPITRE IV

L'HUILE ESSENTIELLE DE *BUPLEURUM FRUTICOSUM* DE CORSE

I. LE GENRE *BUPLEURUM*

Le genre *Bupleurum* appartient à la famille des Apiaceae (Ombellifères), qui comprend environ 200 espèces [222] est essentiellement localisé dans l'hémisphère Nord (Europe, Asie et l'Afrique du Nord. Dans l'aire méditerranéenne, le genre buplèvre est représenté par environ une trentaine d'espèces dont *Bupleurum fruticosum*, *B. falcatum* ssp. *cernum*, *B. rotundifolium*, *B. salicifolium* ssp. *acciphyllum* Certaines sont endémiques des îles Canaries comme *B. hadiense* ou des îles Baléares comme *B. barceloi*.

Depuis plus de 2000 ans, comme l'atteste un ouvrage de pharmacopée chinois, les racines de nombreuses espèces sont utilisées fréquemment dans la médecine traditionnelle pour le traitement de diverses affections parmi lesquelles : la fièvre, la grippe, les inflammations, l'hépatite, la malaria [222]. Les racines de buplèvre sont connues sous le nom de Chaihu en chinois, Saiko en japonais et Shiko en coréen. Environ, 50 espèces du genre *Bupleurum* ont fait l'objet d'études conduisant à la caractérisation d'environ 120 dérivés de saikosaponines [223-227] qui sont formellement des triterpènes avec une entité glycoside, plus de 50 lignanes [228, 229] ainsi qu'un grand nombre de coumarines [230], de flavonoïdes [231], de stérols [232], de phénylpropanoïdes [233, 234]. En ce qui concerne les huiles essentielles, plus de 220 composés ont été identifiés [222, 235-239].

Aujourd'hui plusieurs espèces de buplèvre sont inscrites dans les pharmacopées chinoise et japonaise. Au delà de leurs propriétés médicales qui ont fait l'objet de dizaines de publications et ont conduit aux dépôts de plus de 400 brevets, ces plantes sont utilisées comme supplément diététiques. Aussi pour répondre à cette forte demande, de nombreuses espèces font l'objet de mises en cultures. C'est le cas de *Bupleurum chinense* en Chine et de *Bupleurum falcatum* au Japon [222].

Bupleurum fruticosum L. ou buplèvre ligneux appartient à la section des *Coriacea* Godron et à la famille des *Apiaceae*. Cette espèce, poussant à l'état spontané, est particulièrement répandue sur le pourtour du bassin méditerranéen, notamment dans les régions à garrigue et lieux stériles: Provence, Languedoc, Roussillon, Italie, Corse, Afrique du Nord, Syrie, Liban [236, 238, 240]. En Corse, il est assez fréquemment trouvé depuis le bord de mer jusqu'à une altitude d'environ 800m et, bien qu'aucune étude pédologique n'ait été réalisée, sa répartition semble liée à la présence de sols schisteux (Castagniccia, Cortenais, Cap corse). Une seule station, qui comprend moins d'une trentaine de pieds, est localisée dans le sud de la Corse sur un sol granitique.



Figure 17 : les rameaux de *Bupleurum fruticosum*.

Le buplèvre est une ombellifère vivace, à souche épaisse et ligneuse. Sous arbrisseau de un à deux mètres de haut, il est possède des rameaux très feuillus. Ses feuilles sont éparses, coriaccées, persistantes, oblongues, atténuées à la base, sessiles, veinées en réseaux et munies d'une bordure étroite et transparente. Les ombelles sont

convexes constituées de 8 à 12 rayons égaux. L'involucre et l'involucelle présentent plusieurs folioles réfléchies, caduques à maturité, plus courtes que les rayons et les pédicelles. Le fruit est oblong, à côtes saillantes, aiguës [240].

Bupleurum fruticosum possède une odeur forte, principalement due à la présence d'huile essentielle dans le bois et les feuilles. Les animaux ont une certaine répulsion pour cet arbuste mais paradoxalement le parfum et la saveur des fruits, qui rappellent ceux du fenouil, font que ceux ci sont parfois utilisés comme épice [237, 241]. Cette plante est aussi employée en médecine populaire comme remède anti-inflammatoire et anti-microbien. L'huile essentielle, extraite à partir du *B. fruticosum*, présente aussi une activité anti-inflammatoire et également une activité antispasmodique [242].

Les principales études concernent l'extraction et la purification de nouveaux composés obtenus par extraction aux solvants (*n*-hexane, méthanol ou dichlorométhane) des racines de buplèvre. Ces extraits contiennent des produits "lourds" (non volatils) qui présentent un intérêt en pharmacologie. Les saponines triterpéniques, notamment, possédant une activité hémolytique importante [243, 244]. D'autres extraits, obtenus à partir des feuilles du buplèvre, contiennent des dérivés phénylalkylés [233, 234] et des coumarines [234].

Relativement peu d'études concernent la composition chimique de l'huile essentielle du buplèvre (Tableau 11). Une étude ancienne, évidemment peu détaillée, décrit une huile essentielle d'origine italienne (Sardaigne) caractérisée par la présence de l' α -pinène, du β -phellandrène et d'un composé oxygéné dénommé bupleurol, qui serait un alcool terpénique isomère du citronellol [245]. En 1970, Peyron et Roubeau [236] analysèrent une huile essentielle obtenue à partir de sommités fleuries cueillies dans les Alpilles (France) et ils mirent en évidence la présence de monoterpènes cycliques ou bicycliques, l' α -pinène et le β -pinène étant les plus abondants. Ils tentèrent de vérifier la présence du bupleurol mais ne trouvèrent aucune trace de cet alcool.

Depuis 1987, les travaux sont plus précis et plus détaillés et quatre compositions chimiques ont été mises en évidence. Plusieurs études, en particulier, concernent des plantes poussant en Italie, plus précisément en Sardaigne à l'état sauvage, et cultivés à l'Institut Botanique d'Urbino. Cependant, les huiles essentielles, souvent obtenues par hydrodistillation, proviennent de matériel végétal différent (feuilles/rameaux, rameaux, sommités fleuries ou fruits).

Une première composition est dominée par le β -phellandrène et le sabinène. Elle a été observée :

- i) dans un échantillon originaire de Sardaigne, obtenu à partir de jeunes tiges porteuses de feuilles et de fleurs (β -phellandrène/sabinène = 64,5%/20,7%) [246] ;
- ii) dans une huile essentielle de feuilles provenant de végétaux cultivés à l'Institut Botanique d'Urbino (Italie) (β -phellandrène/sabinène = 38,7%/39,7%) [237] ;
- iii) dans une huile essentielle préparée à partir de feuilles récoltées dans le même institut ainsi que celle de plants obtenus par multiplication in vitro (le β -phellandrène et le sabinène représentent respectivement 41,7/35,8% et 60,9/12,8%) [247].

- une composition γ -terpinène/ α -phellandrène (49,8%/18,3%) est décrite pour un échantillon d'huile essentielle de tiges provenant de plants également cultivés à l'Institut Botanique d'Urbino [247].

- la composition riche en γ -terpinène (48,8%) est décrite pour un échantillon provenant d'Italie obtenu par hydrodistillation de rameaux [237] ;

- la composition α -pinène/ β -pinène (41,2%/35,9%) est reportée pour une huile essentielle de fruits provenant d'Espagne [242].

- enfin la composition β -phellandrène/ α -pinène (49,3%/15,3%) est caractéristique d'une huile essentielle originaire de Lybie obtenue à partir de sommités fleuries [248].

Il faut aussi signaler l'étude réalisée par Dugo et al. sur un échantillon de *Bupleurum fruticosum* de Sicile en 2002. 65 composés qui représentent près de 98% de la composition totale ont été identifiés par le couplage CPG (haute résolution) /SM. Toutefois, l'échantillon analysé a été obtenu par hydrodistillation/extraction

simultanée et non par hydrodistillation. L' α -pinène (21,7%), le β -phellandrène (21,3%) et le β -pinène (13,2%) sont les composés majoritaires.

Tableau 11 : principaux composés présents dans l'huile essentielle de *Bupleurum fruticosum* (données de la littérature).

| Constituants | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| α -pinène | 1,7 | - | 1,9 | 2,6 | 0,1 | 15,3 | 41,2 | - | 0,3 | 21,7 |
| sabinène | 6,1 | 20,7 | 35,7 | 39,7 | 12,8 | 3,5 | - | 12,1 | 7,1 | 6,7 |
| β -pinène | 0,3 | - | 0,6 | 0,4 | - | 9,1 | 35,9 | - | - | 13,2 |
| α -phellandrène | 2,8 | - | 2,9 | 2,3 | 18,3 | - | 3,1 | 12,2 | 18,3 | 0,7 |
| β -phellandrène | 72,3 | 64,5 | 41,7 | 38,7 | 60,9 | 49,3 | - | - | 1,6 | 21,3 |
| γ -terpinène | 1,5 | 2,0 | 0,8 | - | 1,4 | 0,1 | 2,5 | 48,8 | 49,8 | 3,0 |

A : thèse de LOTA (tiges et feuilles, réf. 249), B : Manunta et al. 1987 (tiges et feuilles, réf. 246), C : Bertoli et al 2004 (feuilles, ref.247), D : Manunta et al. 1992 (branches, réf. 237), E : Bertoli et al. 2004 (plants multipliés in vitro, ref.247), F : Giamperi et al. 1998 (fleurs, réf. 248), G : Lorente et al. 1989 (fruits, réf. 242), H : Manunta et al. 1992 (feuilles, réf. 237), I: Bertoli et al 2004 (tiges, réf.247), J : Dugo et al.2002 Réf.239)

Une étude préliminaire, récemment réalisée dans notre équipe par Marie-Laure Lota [249], avait permis de montrer que l'huile essentielle de buplèvre de Corse semble caractérisée par de fortes teneurs en β -phellandrène, souvent supérieures à 70%. Quelques échantillons étudiés présentent toutefois une composition chimique assez proche de celle décrite en Italie avec une association β -phellandrène/sabinène.

De plus, un suivi de la composition chimique sur une période de 18 mois avait montré que celle ci est remarquablement constante et n'est pas influencée par les différents stades physiologiques. Le rendement calculé par rapport à la masse de végétal subit de plus fortes variations de 0,9 à 2,7% et présente un maximum autour de la période de floraison. Enfin, il semblerait que les différentes parties du végétal (tiges, feuilles) contiennent une huile essentielle dont la composition est similaire, contrairement aux résultats décrits dans la littérature [237, 247]. Ainsi le γ -terpinène, majoritaire dans les huiles essentielles de tiges (48,8-49,8%) est quasiment absent de feuilles (0,0 et 0,8%). A contrario, l'association β -phellandrène/sabinène domine dans

les huiles essentielles de feuilles (hydrodistillation et extraction par SPME) provenant de plants cultivés [237] ou obtenus par multiplication *in vivo* [247]

L'objectif de ce travail s'inscrit dans le cadre d'une étude globale entreprise au laboratoire sur la famille des Apiacées poussant à l'état spontané en Corse : *Daucus carota* (carotte sauvage) [250], *Crithmum maritimum* (criste marine) [251], *Ferula communis* (férule commune) [122], *Peucedanum paniculatum* (peucedan à panicules) [182] afin de contribuer à la caractérisation de ces plantes à travers la composition de leur huile essentielle. Certaines de ces huiles essentielles sont produites et commercialisées en Corse. Elles sont utilisées comme matière première dans divers secteurs industriels (cosmétologie, aromathérapie, agro-alimentaire, pharmacologie). Il est donc important de connaître précisément leur composition chimique afin de les situer par rapport à celles produites dans d'autres pays du pourtour méditerranéen et de déterminer différents paramètres (période de distillation, rendement, etc) pouvant être utiles aux producteurs installés en région Corse

Nous avons choisi de poursuivre et de compléter l'étude initiée dans notre équipe sur l'huile essentielle de buplèvre. Cet objectif nous conduira d'abord à examiner la composition chimique détaillée d'une huile essentielle collective fournie par un producteur installé dans la région d'Ajaccio. Ensuite, nous nous intéresserons aux compositions des huiles essentielles obtenues à partir des différentes parties de la plante (tiges, feuilles, fleurs). Enfin, nous tenterons de cerner l'homogénéité de la composition ou à l'inverse l'existence d'une variabilité chimique par l'analyse d'une trentaine d'échantillons individuels d'huile essentielle de buplèvre provenant de différentes localités de Corse.

II. L'HUILE ESSENTIELLE DE *BUPLEURUM FRUTICOSUM* L

II.1. Composition chimique de l'huile essentielle de *Bupleurum fruticosum* L

Nous avons analysé un échantillon de population (collectif) fourni par un producteur installé en Corse et obtenu par entraînement à la vapeur dans un appareil industriel (cuve de 3000 L). Cette huile essentielle a été obtenue à partir des différentes parties du végétal récolté dans le centre de la Corse.

II.1.1. Analyse d'une huile essentielle de population

Nous avons analysé, par CPG-Ir et par RMN du ^{13}C , l'huile essentielle fournie par le producteur. A partir du spectre unique de l'huile essentielle, nous avons identifié huit composés majoritaires (tableau 12) dont la quantification a ensuite été réalisée par CPG-Ir, les différents composés étant repérés sur le chromatogramme en fonction de leurs indices de rétention sur colonnes polaire et apolaire.

Parmi les huit composés terpéniques identifiés, qui représentent environ 91,1% de la composition totale de l'huile essentielle, on dénombre sept composés hydrocarbonés avec un composé nettement majoritaire, le β -phellandrène (66,7%). Les autres composés hydrocarbonés ont une teneur variant de 9,3% pour le sabinène à 1,2% pour le γ -terpinène. On note la présence d'un seul composé oxygéné, avec une teneur appréciable, l'acétate de géranyle (1,9%).

Les signaux de tous les carbones des huit composés identifiés sont présents dans le spectre de RMN ^{13}C et une seule superposition de signaux observés pour un carbone de l' α -pinène et du limonène. Les variations des déplacements chimiques ($\Delta\delta$) des carbones dans le spectre du mélange, par rapport aux valeurs des composés de référence sont extrêmement faibles, inférieures ou égales à 0,07 ppm pour tous les carbones de tous les produits identifiés.

Après cette analyse préliminaire, de nombreux composés minoritaires, en particulier des oxygénés demeurent non identifiés. Aussi dans un but de caractérisation plus fine, cet échantillon d'huile essentielle a été analysé par CPG-Ir, CPG/SM et RMN ¹³C. Parallèlement, il a été soumis à un fractionnement sur colonne de silice avec un gradient pentane/ oxyde de diéthyle. Les résultats sont condensés dans le tableau 15.

Tableau 12 : identification par RMN du carbone-13 des principaux constituants d'un échantillon d'huile essentielle de *B. fruticosum*.

| Composés | Ir apol | Ir pol | RMN | SUP | % |
|---------------------|---------|--------|-------|-----|-------|
| α-pinène | 931 | 1022 | 10/10 | 1 | 1,6 |
| sabinène | 966 | 1114 | 10/10 | 0 | 9,3 |
| myrcène | 983 | 1164 | 10/10 | 0 | 2,3 |
| α-phellandrène | 997 | 1151 | 10/10 | 0 | 2,4 |
| limonène | 1020 | 1200 | 10/10 | 1 | 5,7* |
| β-phellandrène | 1020 | 1210 | 10/10 | 0 | 66,7* |
| γ-terpinène | 1047 | 1242 | 9/9 | 0 | 1,2 |
| acétate de géranyle | 1363 | 1765 | 12/12 | 0 | 1,9 |
| TOTAL (%) | | | | | 91,1 |

Ordre d'élution et pourcentages des composés donnés sur colonne apolaire, sauf ceux qui portent un astérisque (), pourcentages sur colonne polaire ; ^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 carbone-13 par rapport au nombre de carbones attendus ; SUP : nombre de superpositions.*

II.1.2. Fractionnement et étude détaillée de l'huile essentielle

Nous avons soumis 1,03g 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 18.

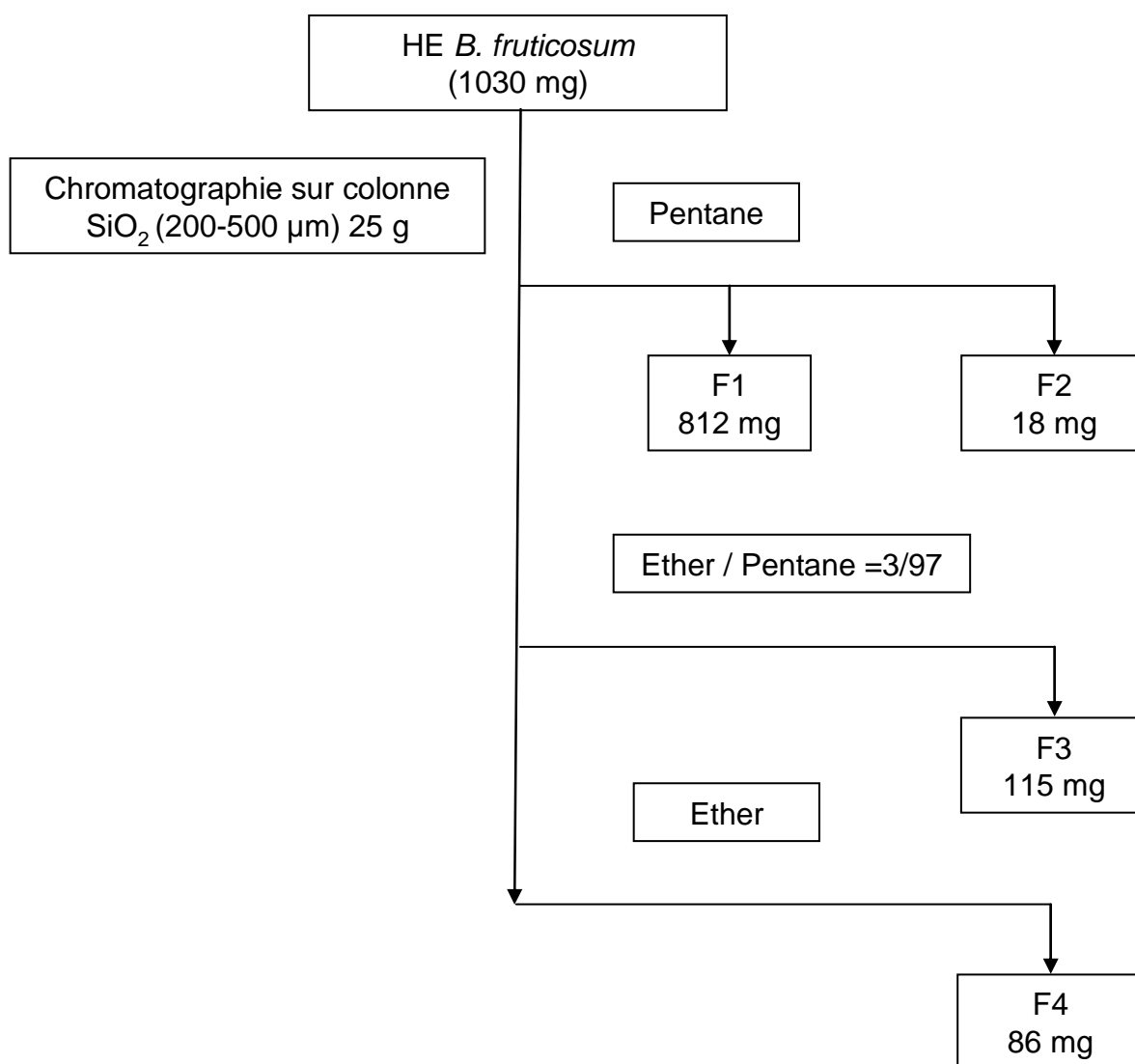


Figure 18 : schéma de fractionnement de l'huile essentielle de *B. fruticosum* L.

Quatre fractions, notées F1, F2, F3 et F4, sont éluées respectivement avec le pentane (F1 et F2) et avec un mélange pentane et l'oxyde de diéthyle (97/3) (F3) et avec l'oxyde de diéthyle (F4). Chacune des fractions est analysée par la combinaison CPG-Ir et RMN du ^{13}C (Tableau 15).

Dans la fraction F1 et malgré un fort pourcentage de β -phellandrène, nous identifions quelques monoterpènes oléfiniques, présents en faibles proportions, dont certains avaient déjà été identifiés dans l'huile essentielle. Nous identifions également le para-cymène, dont la teneur était trop faible pour qu'il puisse être identifié par RMN

dans l'huile essentielle. D'ailleurs, l'observation des pourcentages du para-cymène (1,9%) ainsi que ceux du γ -terpinène (0,5%) et de l' α -phéllandrène (0,9%) montre qu'une aromatisation partielle des deux derniers composés est probablement survenue lors de la chromatographie sur colonne.

Dans la fraction F2, à côté des monoterpènes déjà observés (sabinène, myrcène, para-cymène, limonène, β -phellandrene, γ -terpinène), les composés nouvellement identifiés sont des sesquiterpènes oléfiniques : trans- β -farnésène, germacrène D, bicyclogermacrène, et β -bisabolène.

L'analyse de la fraction F3, éluée avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle 97/3 permet d'identifier cinq composés supplémentaires, en plus de l'acétate de géranyle. Il s'agit de divers esters (acétate d'octyle, isovalérate d'hexyle, acétate de bornyle, acétate de citronellyle) et de l'estragole possédant le squelette phénylpropanoïde. Nous traiterons à part le cas du 2-méthylbutyrate de cinnamyle et de l'isovalérate de cinnamyle, dont nous n'avons pas les valeurs des déplacements chimiques des carbones dans notre bibliothèque de spectres et que nous avons préparés à partir de l'alcool cinnamique.

Enfin, l'analyse de la fraction F4 permet d'identifier 7 nouveaux composés, en plus du décanol, composé majoritaire, qui représente 27,8% de la fraction. Il s'agit de la cryptone, composé nor-terpénique, qui résulte formellement de l'oxydation du β -phéllandrène, du linalol, du terpinen-4-ol ainsi que de deux alcools sesquiterpéniques épimères, le viridiflorol et le lédol. Curieusement, l'élémicine, de la famille des phénylpropanoïdes, qui ne possède pas de fonction alcool ou phénol, est éluée dans cette fraction.

Lors de l'analyse de l'huile essentielle par CPG-SM, deux composés dont les indices de rétention sur colonnes apolaire et polaire sont respectivement 1646/2310 et 1655/2334, n'ont pas été formellement identifiés, bien que la structure de deux esters de cinnamyle ait été suggérée. Ces deux composés se retrouvaient dans la fraction F3

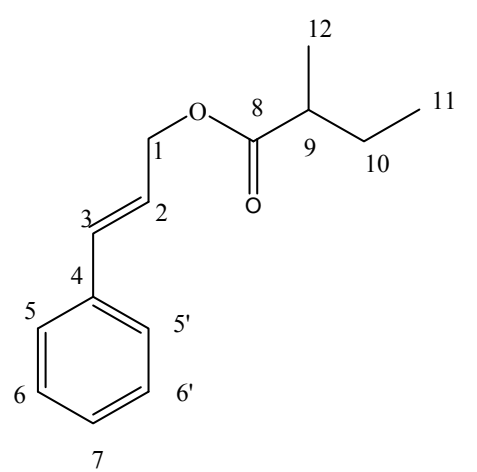
avec des teneurs de 3,4 et 8,8%, respectivement. Dans le spectre de RMN ^{13}C de la fraction F3, il apparaît, après soustraction des signaux des composés identifiés, une série de raies de résonance non attribuées, effectivement proches de celles de l'alcool cinnamique. Ces données confirmeraient donc la présence du noyau cinnamyle dans la structure de nos deux composés non identifiés. L'examen des autres signaux non attribués dans le spectre de RMN nous a amenés, en tenant compte des déplacements chimiques et des intensités relatives, à proposer la structure de l'isovalérate et du 2-méthylbutyrate de cinnamyle pour ces deux composés, le plus abondant et le moins abondant, respectivement. Ainsi, les signaux à 176,53 ppm et 64,78 ppm laissent suspecter la présence d'un ester de cinnamyle. De plus, la présence de signaux à 41,11 ppm (méthyne), 26,82 ppm (méthylène), 16,65 ppm (méthyle), 11,67 ppm (méthyle) est caractéristique du motif 2-méthylbutyrate tandis que les carbones de l'isovalérate résonnent à 43,44, 25,75 et 22,44 ppm.

En conséquence, plutôt que de tenter de séparer ces deux esters de structure extrêmement proches, nous avons entrepris de les préparer, à partir de l'alcool cinnamique et des chlorures correspondants, les chlorures de 2-méthylbutyryle et d'isovaléryle, en présence de triméthylamine. Les données spectrales de ces composés sont reportées dans les tableaux 13 et 14. L'attribution des déplacements chimiques des protons et des carbones (^1H et ^{13}C) a été réalisée par utilisation de séquences de RMN 1D et 2D (DEPT, corrélations proton-carbone HSQC et proton-carbone longue distance HMBC) et ne présente pas de difficulté particulière. Cependant, nous notons que les protons méthylénique diastéréotopes portés par le carbone C10 ne sont pas équivalents et se présentent sous la forme de multiplets (1,72 et 1,50 ppm). La présence du carbone asymétrique C9 est responsable de cette non-équivalence [252].

Tableau 13 : structure et attribution des déplacements chimiques des protons et des carbones de l'isovalérate de cinnamyle.

| N° C | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) | DEPT | $\delta^1\text{H}$ (ppm, J en Hz) | HMBC |
|---------|-----------------------------|-----------------|-----------------------------------|-------------|
| 1 | 64,79 | CH ₂ | 4,74 (dd ; J = 6,4; 1,4) | 2,3 |
| 2 | 123,37 | CH | 6,28 (dt ; J=15,8 ; 6,4) | 1, 3, 4 |
| 3 | 134,08 | CH | 6,65 (bd ; J=15,8) | 1, 2, 4 |
| 4 | 136,28 | C | ----- | |
| 5, 5' | 126,61 | CH | 7,38 (m) | 3, 7 |
| 6, 6' | 128,61 | CH | 7,32 (m) | 4 |
| 7 | 128,04 | CH | 7,26 (m) | 5, 5' |
| 8 | 172,96 | C | ----- | |
| 9 | 43,44 | CH ₂ | 2,24 (d, J= 7,3) | 10, 11, 11' |
| 10 | 25,75 | CH | 2,14 (m) | 11 |
| 11, 11' | 22,44 | CH ₃ | 0,97 (d, J=6,7) | 9, 10 |

*la corrélation entre les hydrogènes et les carbones qui les portent est déterminée grâce au spectre HSQC

Tableau 14 : structure et attribution des déplacements chimiques des protons et des carbones du 2-méthylbutyrate de cinnamyle.


| n° C | δ C | DEPT | δ H (ppm, J en Hz) | HMBC |
|-------|------------|-----------------|-------------------------------------|------------|
| 1 | 64,79 | CH ₂ | 4,74 (dd ; J=6,4; 1,2) | 2, 3 |
| 2 | 123,48 | CH | 6,28 (dt ; J=15,9; 6,4) | 4 |
| 3 | 133,96 | CH | 6,45 (bd ; J= 15,9) | 4, 5 |
| 4 | 136,32 | C | - | - |
| 5, 5' | 126,61 | CH | 7,38 (m) | 3,7 |
| 6, 6' | 128,61 | CH | 7,32 (m) | 4 |
| 7 | 128,02 | CH | 7,25 (m) | 5 |
| 8 | 176,56 | C | --- | - |
| 9 | 41,12 | CH | 2,43 (hex J = 7,0) | 10, 11, 12 |
| 10 | 26,83 | CH ₂ | 1,72 (m J = 7,4) , 1,50 (m J=7,4) | 9, 11,1 2 |
| 11 | 11,65 | CH ₃ | 0,92 (t, J=7,4) | 9, 10 |
| 12 | 16,64 | CH ₃ | 1,17 (d, J=7,0) | 9, 10, |

*la corrélation entre les hydrogènes et les carbones qui les portent est déterminée grâce au spectre HSQC

Le fait de disposer des deux esters de cinnamyle nous a permis d'une part, de confirmer la présence de ces composés avec des teneurs respectives de 3,4 et de 8,8 % dans la fraction F3 (ainsi que dans l'huile essentielle, 0,3 et 0,4%, respectivement) et d'autre part, d'enrichir la bibliothèque de spectres de RMN ¹³C du laboratoire. Les

esters de cinnamyle ne sont pas fréquemment présents dans les huiles essentielles sauf dans certaines d'entre eux comme l'acétate de cinnamyle dans l'huile de cassia. Ils sont particulièrement recherchés pour leurs propriétés fixatives et pour donner des notes orientales dans les parfums [253,254]. Les esters de cinnamyle sont présents dans les baumes (baume du Pérou, Benjoin du Laos, Benjoin de Sumatra) qui peuvent être définis comme des oléo-résines contenant des proportions importantes d'acide benzoïque, d'acide cinnamique et de leurs esters. L'acide cinnamique et ses esters entrent dans la composition d'écrans photoprotecteurs où ils font écran comme les salicylates, ou l'acide p-aminobenzoïque aux UV B (290-320 nm) mais pas aux UV A [1]

Tableau 15 : identification par CPG-Ir et RMN du carbone-13 des constituants d'une huile essentielle de population de *Bupleurum fruticosum* après fractionnement.

| COMPOSES ^a | Ir A | Ir P | F1 | F2 | F3 | F4 | Identification |
|---------------------------|------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------------------|
| α -pinène | 931 | 1027 | 1,7 | - | - | - | Ir, RMN ¹³ C |
| sabinène | 967 | 1129 | 9,8 | 8,1 | - | - | Ir, RMN ¹³ C |
| myrcène | 982 | 1166 | 2,3 | 5,9 | - | - | Ir, RMN ¹³ C |
| acétate d'hexyle | 994 | 1275 | - | - | 1,8 | - | Ir, RMN ¹³ C |
| α -phellandène | 999 | 1171 | 0,9 | - | - | - | Ir, RMN ¹³ C |
| 3-carène | 1006 | 1153 | 0,5 | - | - | - | Ir, RMN ¹³ C |
| para-cymène | 1013 | 1276 | 1,8 | 6,1 | - | - | Ir, RMN ¹³ C |
| limonène* | 1026 | 1207 | 6,3 | 12,5 | - | - | Ir, RMN ¹³ C |
| β -phellandène* | 1026 | 1222 | 68,0 | 25,9 | - | - | Ir, RMN ¹³ C |
| γ -terpinène | 1050 | 1250 | - | 3,1 | - | - | Ir, RMN ¹³ C |
| linalol | 1084 | 1550 | - | - | - | 3,1 | Ir, RMN ¹³ C |
| cryptone | 1157 | 1683 | - | - | - | 4,2 | Ir, RMN ¹³ C |
| terpinéol-4 | 1163 | 1605 | - | - | - | 8,6 | Ir, RMN ¹³ C |
| estragole | 1176 | 1678 | - | - | 10,9 | - | Ir, RMN ¹³ C |
| acétate d'octyle | 1193 | 1478 | - | - | 10,5 | - | Ir, RMN ¹³ C |
| isovalérate d'hexyle | 1226 | 1448 | - | - | 3,9 | - | Ir, RMN ¹³ C |
| décanol | 1255 | 1768 | - | - | - | 27,8 | Ir, RMN ¹³ C |
| acétate de bornyle | 1271 | 1583 | - | - | 1,3 | - | Ir, RMN ¹³ C |
| acétate de citronellyle | 1335 | 1666 | - | - | 5,2 | - | Ir, RMN ¹³ C |
| acétate de géranyle | 1361 | 1762 | - | - | 38,5 | - | Ir, RMN ¹³ C |
| trans- β -farnésène | 1448 | 1669 | - | 5,2 | - | - | Ir, RMN ¹³ C |
| germacrène | 1479 | 1713 | - | 5,2 | - | - | Ir, RMN ¹³ C |

| | | | | | | | |
|--------------------------------|------|------|------|-------------|------------|-------------|-------------------------|
| bicyclogermacrène | 1495 | 1738 | - | 10,4 | - | - | Ir, RMN ¹³ C |
| β-bisabolène | 1503 | 1730 | - | 1,9 | - | - | Ir, RMN ¹³ C |
| élémicine | 1517 | 2237 | - | - | - | 2,8 | Ir, RMN ¹³ C |
| viridiflorol | 1587 | 2093 | - | - | - | 11,1 | Ir, RMN ¹³ C |
| lédol | 1598 | 2037 | - | - | - | 4,3 | Ir, RMN ¹³ C |
| 2-méthylbutyrate de cinnamyle* | 1646 | 2310 | - | - | 3,4 | - | Ir, RMN ¹³ C |
| isovalérate de cinnamyle* | 1655 | 2334 | - | - | 8,8 | - | Ir, RMN ¹³ C |
| TOTAL (%) | | | 91,3 | 84,3 | 84,3 | 61,9 | |

^a *Ordre d'éluion et pourcentages des composés donnés sur colonne apolaire ; sauf ceux qui portent un astérisque (*), pourcentages sur colonne polaire ; Ir A, Ir P : indices de rétention sur colonne apolaire (BP-1) et polaire (BP-20); tous les constituants sont identifiés par CPG l'écriture en gras indique les constituants identifiés par la RMN du carbone-13 ; tr. ≤ 0,05% ;*

L'huile essentielle de population de *Bupleurum fruticosum* a également été analysée par CPG-SM, ce qui a permis l'identification de 5 composés minoritaires. Le bilan global de l'analyse est décrit dans le tableau 16.

Au total, l'analyse de l'huile essentielle de buplèvre par différentes techniques complémentaires CPG (IrA et IrP), CPG-SM et RMN ¹³C, a permis l'identification de 34 composés, qui représentent 97,8 % de la composition de l'huile essentielle totale (Tableau 16). Parmi les composés non identifiés, il ne subsiste que quelques composés minoritaires dont la teneur n'excède pas 0,1%. Tous les composés, à l'exception de cinq oléfines monoterpéniques (présentes à une très faible teneur et identifiées par SM et par leurs indices de rétention), ont été identifiés dans au moins une des fractions de chromatographie par RMN ¹³C.

En conclusion de cette analyse détaillée, nous retiendrons que la composition de l'échantillon collectif d'huile essentielle de *Bupleurum fruticosum* est largement dominée par le β-phellandrène qui représente plus des deux tiers de la composition totale. Les deux autres composés présents à des teneurs appréciables sont le sabinène (9,3%) et le limonène (5,6%). Plusieurs autres oléfines monoterpéniques présentent des teneurs comprises entre 1,2 et 1,4% (α-pinène, myrcène, α-phellandrène, γ-terpinène). Parmi les composés oxygénés, seul l'acétate de géranyle (1,9%) présente

un pourcentage supérieur à 1%. De nombreux esters (linéaires, terpéniques et phénylpropanoïdes) sont trouvés en faible quantité.

Tableau 16 : bilan de l'analyse d'un échantillon d'huile essentielle de *Bupleurum fruticosum* de Corse par CPG(Ir), CPG-SM et RMN du carbone-13.

| COMPOSES ^a | Ir A | Ir P | HE% | Identification |
|---------------------------|------|------|------|-----------------------------|
| α -thujène | 923 | 1027 | 0,1 | Ir, SM |
| α -pinène | 931 | 1027 | 1,6 | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| camphène | 944 | 1073 | 0,1 | Ir, SM |
| sabinène | 967 | 1129 | 9,3 | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| β -pinène | 972 | 1116 | 0,3 | Ir, SM |
| myrcène | 982 | 1166 | 2,3 | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| acétate d'hexyle | 994 | 1275 | 0,1 | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| α -phellandrène | 999 | 1171 | 2,4 | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| 3-carène | 1006 | 1153 | 0,4 | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| α - terpinène | 1011 | 1176 | 0,2 | Ir, SM |
| para-cymène | 1013 | 1276 | 0,3 | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| limonène* | 1026 | 1207 | 5,6 | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| β -phellandrène* | 1026 | 1222 | 67,7 | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| γ - terpinène | 1050 | 1250 | 1,2 | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| terpinolène | 1080 | 1288 | 0,2 | Ir, SM |
| linalol | 1084 | 1550 | 0,1 | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| cryptone | 1157 | 1683 | 0,1 | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| terpinéol-4 | 1163 | 1605 | 0,3 | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| estragole | 1176 | 1678 | 0,5 | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| acétate d'octyle | 1193 | 1478 | 0,5 | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| isovalérate d'hexyle | 1226 | 1448 | 0,2 | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| décanol | 1255 | 1768 | 0,8 | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| acétate de bornyle | 1271 | 1583 | tr | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| acétate de citronellyle | 1335 | 1666 | 0,3 | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| acétate de géranyle | 1361 | 1762 | 1,9 | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| trans- β -farnésène | 1448 | 1669 | tr | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| germacrène | 1479 | 1713 | tr | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| bicyclogermacrène | 1495 | 1738 | 0,2 | Ir, SM, ¹³ C RMN |

| | | | | |
|--------------------------------|------|------|------|-----------------------------|
| β -bisabolène | 1503 | 1730 | tr | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| élémicine | 1517 | 2237 | 0,1 | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| viridiflorol | 1587 | 2093 | 0,3 | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| lédol | 1598 | 2037 | 0,1 | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| 2-méthyl butyrate de cinnamyle | 1646 | 2310 | 0,3 | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| isovalérate de cinnamyle | 1655 | 2334 | 0,4 | Ir, SM, ¹³ C RMN |
| TOTAL (%) | | | 97,8 | |

^a *Ordre d'élution et pourcentages des composés donnés sur colonne apolaire ; sauf ceux qui portent un astérisque (*), pourcentages sur colonne polaire ; Ir A, Ir P : indices de rétention sur colonne apolaire (BP-1) et polaire (BP-20); tous les constituants sont identifiés par CPG et également par CPG/SM ; tr. ≤ 0,05%*

II.2. La composition chimique de l'huile essentielle en fonction de l'état physiologique de la plante et des différentes parties du végétal

Afin de caractériser le plus complètement possible l'huile essentielle de *B. fruticosum* de Corse, nous avons entrepris l'étude de divers paramètres susceptibles d'entraîner une variation de la composition chimique. Lors de l'étude réalisée par Marie-Laure Lota, un suivi de la composition chimique des parties aériennes sur une période de 18 mois montrait que celle-ci demeurait sensiblement constante, toujours dominée par le β -phellandrène. Nous avons contrôlé ce point en réalisant trois prélèvements dans deux stations, avant, pendant et après floraison. Nous avons également centrés nos travaux sur la composition des huiles essentielles obtenues à partir des différentes parties du végétal. En effet, deux publications [237,247] signalent des différences quantitatives et qualitatives importantes entre les huiles essentielles de feuilles et de tiges.

II.2.1. Influence de l'état physiologique de la plante sur la composition de l'huile essentielle obtenue à partir des parties aériennes.

Nous avons suivi l'évolution de la composition chimique de deux stations situées dans le centre de la Corse, à Casanova de Venaco et Saint Pierre de Venaco. Dans

chaque station, trois prélèvements ont été réalisés, avant floraison (AvF), en pleine floraison (PF) et après floraison (ApF). Nous ne nous sommes intéressés qu'aux composés majoritaires, à savoir, ceux qui présentent au moins une fois une teneur supérieure ou égale à 0,5%. Les 13 composés pris en compte représentent de 92,6 à 96,6% de la composition chimique de l'huile essentielle (Tableau 17).

Tableau 17 : évolution de la composition chimique de l'huile essentielle du *Bupleurum fruticosum* en fonction du stade de développement de la plante.

| Station | Casanova de Venaco | | | Saint Pierre Venaco | | | | |
|---|--------------------|-------------|-------------|---------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Ir A | Ir P | AvF | PF | ApF | AvF | PF | ApF |
| Composés ^a | | | | | | | | |
| α -pinène | 931 | 1027 | 1,9 | 1,8 | 1,8 | 2,0 | 2,0 | 1,9 |
| sabinène | 967 | 1129 | 7,3 | 6,0 | 8,2 | 1,5 | 1,2 | 1,2 |
| myrcène | 982 | 1166 | 2,3 | 2,1 | 2,2 | 2,1 | 2,3 | 2,0 |
| acétate d'hexyle | 993 | 1273 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,5 | 1,2 |
| α -phellandrène | 999 | 1171 | 2,6 | 3,0 | 2,5 | 3,0 | 3,5 | 2,3 |
| para-cymène | 1013 | 1276 | 0,3 | 0,2 | 0,5 | 0,3 | 0,1 | 0,6 |
| limonène* | 1026 | 1207 | 5,6 | 5,4 | 5,4 | 5,8 | 5,9 | 5,9 |
| β-phellandrène* | 1026 | 1222 | 72,8 | 73,6 | 70,4 | 75,7 | 78,3 | 71,6 |
| γ -terpinène | 1050 | 1250 | 0,3 | 0,3 | 1,4 | 0,1 | 0,1 | 0,2 |
| cryptone | 1157 | 1683 | 0,3 | - | 0,2 | 0,8 | - | 2,1 |
| terpinéol -4 | 1163 | 1605 | 0,6 | 0,4 | 0,9 | 0,2 | - | 0,1 |
| décanol | 1255 | 1768 | 0,3 | 1,2 | 0,8 | 1,2 | 0,2 | 1,6 |
| acétate de géranyle | 1361 | 1762 | 1,2 | 1,6 | 2,1 | 1,8 | 1,5 | 1,9 |
| Total | | | 95,7 | 95,7 | 96,6 | 92,6 | 94,6 | 92,6 |
| Rendement % | | | 1,2 | 2,9 | 2,6 | 0,8 | 2,4 | 2,4 |

^a Ordre d'éluion et pourcentages des composés donnés sur colonne apolaire sauf ceux qui portent un astérisque (pourcentage sur colonne polaire) ; Ir A, Ir P : indices de rétention sur colonne apolaire (BP-1) et polaire (BP-20); tous les constituants sont identifiés par CPG; l'écriture en gras indique les constituants identifiés par la RMN du carbone-13.

Les rendements, calculés par rapport à la masse de végétal frais, sont particulièrement élevés en période de floraison et d'après floraison tandis qu'ils sont notoirement plus faibles lorsque la plante est récoltée avant la floraison. Dans les deux stations et quelle que soit la période de récolte, la composition demeure sensiblement

constante et dominée par le β -phellandrène. Nous pouvons également signaler que le pourcentage de β -phellandrène est maximal en période de floraison, respectivement 73,6% et 78,3%, sans que cette différence soit néanmoins significative par rapport aux périodes d'avant et d'après floraison. Parmi les autres constituants oléfiniques, le sabinène (1,2-8,2%) et le limonène (5,4-5,9%) sont toujours les plus importants. Les échantillons de la station de Casanova de Venaco présentant cependant des pourcentages de sabinène plus importants que ceux de la station de Saint Pierre Venaco : 6,0-8,2% vs 1,2-1,5%. Les α et β -pinènes, l' α -phellandrène, le myrcène, le γ -terpinène, le 3-carène et le p-cymène sont présents dans toutes les huiles essentielles à des teneurs inférieures à 4%. La fraction oxygénée est très minoritaires et principalement constituée de composés acycliques, terpéniques ou non : l'acétate de géranyle (1,2-2,1%), le décanol (0,3-1,6%), le linalol (0,2-0,4%), La cryptone, composé nor-terpénique, dont la structure est proche du β -phellandrène dépasse ponctuellement 2% (Saint Pierre de Venaco, après floraison). Ces résultats confirment ceux qui avaient été obtenus par Marie-Laure Lota, dans notre laboratoire, il y a quelques années [249]. La composition chimique de l'huile essentielle d'une station de buplèvre suivie durant 18 mois ne présentait que très peu de variations.

II.2.2. Composition des huiles essentielles obtenues à partir de différentes parties du végétal, tiges, feuilles et fleurs

La comparaison de la composition chimique des huiles essentielles, obtenues à partir des différentes parties de la plante, a été réalisée sur des pieds individuels correspondant trois stades physiologiques de la plante : avant floraison (Avril 2005, station de Tolla) ; floraison (septembre 2005, stations de Saint Pierre de Venaco et Casanova de Venaco) ; après floraison (Octobre 2005, station de Saint Pierre de Venaco). Chaque fois, l'expérience a été dupliquée, mais les résultats étant similaires un seul échantillon par station a été reporté dans le tableau 18.

Tableau 18 : composition chimique de l'huile essentielle de *Bupleurum fruticosum* de tiges, feuilles et fleurs.

| Station | | | Tolla | Tolla | SPV | SPV | SPV | SPV | CV | CV |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|
| Date de récolte | | | 04/05 | 04/05 | 10/05 | 10/05 | 09/05 | 09/05 | 09/05 | 09/05 |
| Composés ^a | Ir A | Ir P | feuille | tige | feuille | tige | fleur | Tige feuille | fleur | Tige feuille |
| α -pinène | 931 | 1027 | 2,1 | 2,1 | 1,8 | 1,8 | 1,5 | 2,0 | 1,6 | 1,9 |
| sabinène | 967 | 1129 | 0,9 | 0,9 | 2,2 | 1,1 | 2,5 | 1,5 | 1,0 | 1,1 |
| myrcène | 982 | 1166 | 2,1 | 2,1 | 2,1 | 2,0 | 2,0 | 2,3 | 2,0 | 2,3 |
| acétate d'hexyle | 993 | 1273 | - | 0,4 | - | 1,5 | 0,3 | 0,3 | 0,1 | 0,2 |
| α -phellandrène | 999 | 1171 | 2,3 | 3,2 | 2,2 | 2,5 | 3,0 | 3,4 | 3,0 | 3,3 |
| 3-carène | 1006 | 1153 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| para-cymène | 1013 | 1276 | 0,5 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,2 |
| limonène* | 1026 | 1207 | 6,0 | 5,9 | 5,9 | 5,8 | 5,5 | 5,7 | 5,5 | 6,0 |
| β-phellandrène* | 1026 | 1222 | 80,0 | 75,4 | 74,6 | 71,9 | 71,3 | 77,3 | 71,8 | 79,1 |
| cryptone | 1157 | 1683 | 0,1 | 0,9 | 0,8 | 1,9 | 0,1 | - | 0,1 | tr |
| terpinéol-4 | 1163 | 1605 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | - | 0,2 | 0,1 |
| estragole | 1176 | 1678 | - | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 4,8 | - | 6,6 | tr |
| acétate d'octyle | 1193 | 1478 | 0,4 | 0,5 | 0,8 | 0,9 | 0,5 | 0,8 | 0,4 | 0,3 |
| décanol | 1255 | 1768 | 1,2 | 0,5 | 2,3 | 1,2 | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 0,7 |
| acétate de géranyle | 1361 | 1762 | 0,8 | 1,5 | 1,8 | 2,2 | 2,3 | 2,4 | 1,7 | 1,2 |
| élémicine | 1517 | 2237 | 0,2 | tr | 0,6 | - | 0,1 | - | - | 0,2 |
| isovalérate. de cinnamyle | 1655 | 2334 | tr | 0,7 | - | 0,2 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | 0,3 |
| TOTAL | | | 97,1 | 94,3 | 96,3 | 94,6 | 96,1 | 97,6 | 95,9 | 97,9 |
| Rendement(%) | | | 2,1 | 1,6 | 3,6 | 2,1 | 1,1 | 1,6 | 1,3 | 2,2 |

SPV : Saint Pierre de Venaco, CV Casanova de Venaco ; ^a Ordre d'éluion et pourcentages des composés donnés sur colonne apolaire sauf ceux qui portent un astérisque (pourcentage sur colonne polaire) ; Ir A, Ir P : indices de rétention sur colonne apolaire (BP-1) et polaire (BP-20); tous les constituants sont identifiés par CPG; l'écriture en gras indique les constituants identifiés par la RMN du carbone-13

Quelle que soit la station et quelle que soit la période de récolte, le rendement en huile essentielle, calculé par rapport à la masse de végétal frais, est toujours plus élevé pour les feuilles que pour les tiges, respectivement 2,2-3,6% vs 1,6-2,1%. Les fleurs présentent un rendement sensiblement plus faible 1,1 et 1,3%.

Quelle que soit la station et la période de récolte, nous constatons une très grande homogénéité dans la composition chimique des huiles essentielles obtenues à partir des tiges, des feuilles et même des fleurs. Le β -phellandrène est toujours le produit

ultra-majoritaire avec une teneur qui fluctue entre 71 et 80% de la composition totale. Tout au plus, pourrions nous signaler que son pourcentage semble légèrement supérieur dans l'huile essentielle de feuilles que dans celles de tiges et de fleurs. Le pourcentage des autres composés (limonène, α -phéllandrène, myrcène, α -pinène) subit aussi très peu de variations. Il faut toutefois noter que l'estragole semble caractéristique des huiles essentielles de fleurs (4,8 et 6,6%) puisque ce composé n'est présent dans les huiles essentielles de feuilles et de tiges qu'à de très faibles teneurs (0-0,2%).

La composition chimique de l'huile essentielle des différentes parties du végétal (tiges, feuilles, fleurs) présente une très grande homogénéité, contrairement aux résultats donnés dans la littérature [237, 247]. En effet, nous n'avons jamais caractérisé de composition chimique d'huile essentielle de tiges présentant le γ -terpinène majoritaire alors que celle-ci est associée à la composition β -phéllandrène/sabinène pour les huiles essentielles de feuilles [237, 247].

II.3. Etude de la variabilité chimique de l'huile essentielle de *B. fruticosum*

Nous avons vu dans la partie introductive de ce chapitre que divers compositions chimiques avaient été décrites pour l'huile essentielle de *B. fruticosum*. Il s'agit toujours d'huiles essentielles riches en hydrocarbures monoterpéniques, dominées respectivement par le β -phéllandrène (38,7-72,3%, accompagné par le sabinène, l' α -phéllandrène ou l' α -pinène), de l' α -pinène et du β -pinène (41,5 et 35,9%) ou du γ -terpinène (48,8 et 49,8% avec l' α -phéllandrène). Dans le but de caractériser pleinement l'huile essentielle de *B. fruticosum* poussant à l'état spontané en Corse, de confirmer l'homogénéité de la composition chimique ou de mettre en évidence une éventuelle variabilité chimique, nous avons analysé 37 échantillons préparés à partir des parties aériennes (tiges et feuilles) de *B. fruticosum*, récoltées dans divers sites de l'île (Figure 19). Tous les prélèvements ont été effectués entre avril et novembre durant la période 2005-2007. La composition chimique des 37 échantillons analysés et

le rendement en huile essentielle de chaque hydrodistillation sont reportés dans le tableau 19.

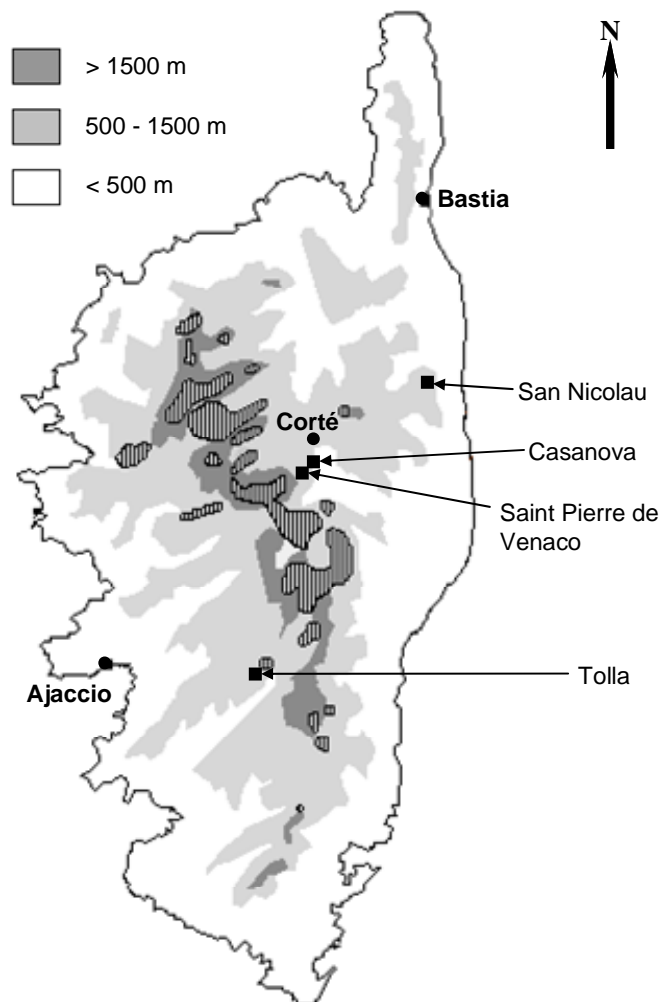


Figure 19 : échantillonnage de *B. fruticosum*.

Les rendements sont très variables, compris entre 0,79 et 7,10%. Cependant les valeurs maximales correspondent toujours à la période de floraison alors que les valeurs les plus faibles sont obtenues pour des échantillons récoltés avant floraison. Sur l'ensemble des échantillons, nous nous sommes intéressés aux 13 constituants majoritaires, représentant de 91,7% à 97,3% de la composition chimique globale de l'huile essentielle, identifiés par CPG-Ir et par RMN du ^{13}C dans plusieurs échantillons. L'échantillonnage est qualitativement très homogène puisque aucun

nouveau composé (supérieur à 0,5%) n'a été identifié par rapport aux analyses précédentes.

Les huiles essentielles sont caractérisées par une forte teneur de monoterpènes oléfiniques. La composition chimique est caractérisée par une forte proportion de β -phellandrène (59,0-80,3 %) tandis que le taux de sabinène varie sensiblement (0,9-19,0%). Le limonène (4,6-6,1%), l' α -pinène (1,5-7,0%), l' α -phellandrène (1,7-3,6%) et le myrcène (1,9-2,3%) présentent des teneurs appréciables dans l'ensemble des échantillons. Parmi les composés oxygénés, nous retrouvons le décanol (0,2-1,8%), le terpinéol-4 (0,0-2,1%) ainsi que l'acétate de géranyle (0,5-2,5%), la cryptone (0,0-2,1%).

L'analyse en composante principale réalisée avec les teneurs des 13 composés les plus abondants démontre clairement l'homogénéité de l'échantillonnage. L'huile essentielle de buplèvre ligneux de Corse est caractérisée par un pourcentage très élevé de β -phellandrène qui varie de 59,0% à 80,3%. Plus précisément, ce pourcentage est compris entre 70,0 et 80,3% pour 30 échantillons sur 37 et il fluctue entre 65.6 et 68.1% pour 8 échantillons. Enfin, les échantillons n°s 26 et 33, avec des teneurs en β -phellandrène égales à 62,8 et 59,0% contiennent, *a contrario*, des pourcentages plus élevés en sabinène, respectivement 19,0 et 15,3%, et se distinguent de l'ensemble des autres échantillons. Ils présentent une composition voisine de celle décrite pour des échantillons originaire de Sardaigne [246] et d'Italie [247] caractérisés par l'association β -phellandrène et sabinène respectivement (64,5 et 20,7%) et (60,9 et 12,8%). La composition chimique de l'huile essentielle de buplèvre ligneux de Corse est caractérisée par le β -phellandrène majoritaire (>70%) qui n'a jamais été décrite dans la littérature. Ponctuellement certains échantillons peuvent contenir des teneurs en sabinène proche de 20%.

Tableau 19 : composition chimique des HE de *B. fruticosum* de Corse.

| COMPOSES ^a | Ir A | Ir P | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|-----------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| α-pinène | 931 | 1027 | 1,8 | 1,9 | 1,8 | 1,8 | 1,7 | 1,9 | 1,7 | 2,0 | 1,7 | 2,0 | 1,7 | 1,6 | 2,0 |
| sabinène | 967 | 1129 | 9,4 | 7,3 | 10,3 | 3,1 | 10,4 | 2,2 | 7,3 | 1,5 | 0,9 | 0,9 | 6,7 | 9,8 | 0,9 |
| β-pinène | 972 | 1116 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| myrcène | 982 | 1166 | 2,1 | 2,3 | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 2,1 | 1,9 | 2,1 | 2,1 | 2,1 | 2,0 | 2,1 | 2,1 |
| α-phellandène | 999 | 1171 | 2,4 | 2,6 | 2,3 | 2,6 | 2,7 | 2,7 | 2,4 | 3,0 | 2,9 | 3,0 | 2,6 | 2,5 | 2,7 |
| para-cymène | 1013 | 1276 | 0,3 | 0,3 | 0,7 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,8 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,4 |
| limonène* | 1025 | 1207 | 5,4 | 5,6 | 5,4 | 5,8 | 5,2 | 5,7 | 5,3 | 5,8 | 5,7 | 6,0 | 5,6 | 5,3 | 5,9 |
| β-phellandène* | 1026 | 1222 | 70,0 | 72,8 | 68,2 | 76,8 | 67,8 | 75,5 | 67,2 | 75,7 | 76,5 | 75,8 | 73,4 | 71,1 | 75,2 |
| γ-terpinène | 1050 | 1250 | 0,5 | 0,3 | 1,1 | 0,7 | 1,2 | 0,2 | 1,7 | 0,1 | 0,1 | tr | 0,3 | 0,2 | tr |
| cryptone | 1157 | 1683 | 0,3 | 0,3 | 0,8 | 0,4 | 0,2 | 0,5 | 1,2 | 0,8 | 0,8 | 1,8 | 0,4 | 0,3 | 1,1 |
| terpinéol-4 | 1163 | 1605 | 0,8 | 0,6 | 0,9 | 0,3 | 0,9 | 0,3 | 1,2 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,7 | 0,2 |
| décanol | 1255 | 1768 | 0,7 | 0,3 | 0,5 | 0,7 | 0,8 | 1,4 | 1,0 | 1,2 | 1,0 | 0,5 | 0,8 | 0,8 | 1,0 |
| acétate de géranyle | 1361 | 1762 | 2,2 | 1,2 | 1,6 | 0,7 | 2,0 | 1,6 | 1,6 | 1,8 | 1,8 | 0,5 | 1,5 | 1,6 | 1,6 |
| TOTAL | | | 96,2 | 95,8 | 96,1 | 95,8 | 95,7 | 94,8 | 93,6 | 94,8 | 94,2 | 93,5 | 95,8 | 96,6 | 93,4 |
| Rendement % | | | 1,4 | 1,2 | 1,5 | 1,8 | 1,4 | 1,4 | 1,0 | 0,8 | 1,3 | 1,3 | 1,5 | 1,4 | 2,3 |

| COMPOSES ^a | Ir A | Ir P | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 |
|-----------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| α-pinène | 931 | 1027 | 2,0 | 7,0 | 1,8 | 1,8 | 1,8 | 1,9 | 1,9 | 1,9 | 1,8 | 1,8 | 1,9 | 2,0 | 1,5 |
| sabinène | 967 | 1129 | 1,2 | 4,8 | 2,4 | 1,2 | 6,0 | 1,0 | 1,0 | 1,3 | 2,2 | 5,1 | 1,2 | 1,0 | 19,0 |
| β-pinène | 972 | 1116 | 0,3 | 4,7 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| myrcène | 982 | 1166 | 2,3 | 2,0 | 2,1 | 2,1 | 2,1 | 2,1 | 2,2 | 2,2 | 2,1 | 2,1 | 2,0 | 2,3 | 2,3 |
| α-phellandène | 999 | 1171 | 3,5 | 2,7 | 3,2 | 3,2 | 3,0 | 2,9 | 2,9 | 3,0 | 2,1 | 1,7 | 2,3 | 3,3 | 2,3 |
| para-cymène | 1013 | 1276 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,6 | 1,1 | 0,6 | 0,2 | 0,3 |
| limonène* | 1025 | 1207 | 5,9 | 5,0 | 5,6 | 5,6 | 5,4 | 5,8 | 5,9 | 5,9 | 5,9 | 5,8 | 5,9 | 6,1 | 4,6 |
| β-phellandène* | 1026 | 1222 | 78,3 | 65,6 | 76,3 | 76,7 | 73,6 | 77,3 | 77,7 | 77,6 | 74,9 | 69,3 | 71,6 | 80,3 | 59,0 |
| γ-terpinène | 1050 | 1250 | 0,1 | 0,5 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,1 | tr | 0,1 | 0,1 | 0,5 | 0,2 | tr | 1,5 |
| cryptone | 1157 | 1683 | tr | 0,4 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,4 | 0,4 | 0,5 | 0,9 | 1,5 | 2,1 | 0,2 | tr |
| terpinéol-4 | 1163 | 1605 | tr | 0,4 | 0,2 | 0,1 | 0,4 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 0,7 | 0,1 | 0,1 | 2,1 |
| décanol | 1255 | 1768 | 0,2 | 0,7 | 1,8 | 1,8 | 1,2 | 1,1 | 1,1 | 0,9 | 2,5 | 1,7 | 1,6 | 0,8 | 1,1 |
| acétate de géranyle | 1361 | 1762 | 1,5 | 1,7 | 1,5 | 1,7 | 1,6 | 1,8 | 1,6 | 1,6 | 1,7 | 1,9 | 1,9 | 0,7 | 2,1 |
| TOTAL | | | 95,4 | 95,7 | 95,5 | 94,9 | 96,1 | 95,1 | 95,3 | 95,6 | 95,4 | 93,5 | 91,7 | 97,3 | 96,1 |
| Rendement % | | | 2,1 | 2,1 | 2,2 | 2,3 | 2,9 | 2,9 | 2,2 | 2,2 | 1,4 | 1,4 | 2,4 | 2,1 | 2,1 |

| COMPOSES ^a | Ir A | Ir P | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 |
|-----------------------|------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| α-pinène | 931 | 1027 | 1,8 | 2,0 | 2,0 | 1,9 | 2,0 | 2,2 | 1,7 | 2,2 | 1,9 | 2,1 | 2,1 |
| sabinène | 967 | 1129 | 8,2 | 1,1 | 0,9 | 2,3 | 4,4 | 1,0 | 15,3 | 0,9 | 9,8 | 1,0 | 1,0 |
| β-pinène | 972 | 1116 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,3 |
| myrcène | 982 | 1166 | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 2,3 | 2,4 | 2,4 | 2,3 | 2,4 | 2,3 |
| α-phellandrène | 999 | 1171 | 2,5 | 3,0 | 3,4 | 3,3 | 3,2 | 2,0 | 2,8 | 3,6 | 2,8 | 3,4 | 3,3 |
| para-cymène | 1013 | 1276 | 0,5 | 0,3 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,5 | 0,2 | 0,1 | 0,3 | 0,2 | 0,3 |
| limonène* | 1025 | 1207 | 5,4 | 5,9 | 5,9 | 5,7 | 5,6 | 6,2 | 4,9 | 5,7 | 5,3 | 6,1 | 6,1 |
| β-phellandrène* | 1026 | 1222 | 70,4 | 78,1 | 79,6 | 76,6 | 74,1 | 75,1 | 62,8 | 79,9 | 68,1 | 79,7 | 79,1 |
| γ-terpinène | 1050 | 1250 | 1,4 | 0,3 | 0,1 | 0,5 | 0,2 | tr | 1,7 | 0,1 | 2,1 | 0,1 | 0,2 |
| cryptone | 1157 | 1683 | 0,2 | 0,4 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 1,5 | tr | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,2 |
| terpinéol-4 | 1163 | 1605 | 0,9 | 0,1 | 0,1 | 0,4 | 0,4 | 0,2 | 1,7 | 0,1 | 0,9 | 0,2 | 0,1 |
| décanol | 1255 | 1768 | 0,8 | 0,7 | 0,6 | 0,9 | 0,9 | 0,7 | 0,8 | 0,6 | 0,7 | 0,4 | 0,4 |
| acétate de géranyle | 1361 | 1762 | 2,1 | 2,5 | 1,6 | 1,7 | 2,0 | 2,2 | 1,5 | 0,6 | 1,9 | 0,8 | 1,6 |
| TOTAL | | | 96,7 | 96,9 | 96,9 | 96,0 | 95,7 | 94,2 | 96,1 | 96,6 | 96,5 | 97,0 | 97,0 |
| Rendement % | | | 2,6 | 2,4 | 2,7 | 2,2 | 3,8 | 4,8 | 2,1 | 4,3 | 7,1 | 1,7 | 1,9 |

^a *Ordre d'élution et pourcentages des composés donnés sur colonne apolaire sauf ceux qui portent un astérisque (pourcentage sur colonne polaire) ; Ir A, Ir P : indices de rétention sur colonne apolaire (BP-1) et polaire (BP-20); tous les constituants sont identifiés par CPG; l'écriture en gras indique les constituants identifiés par la RMN du carbone-13, tr. ≤ 0,05%.*

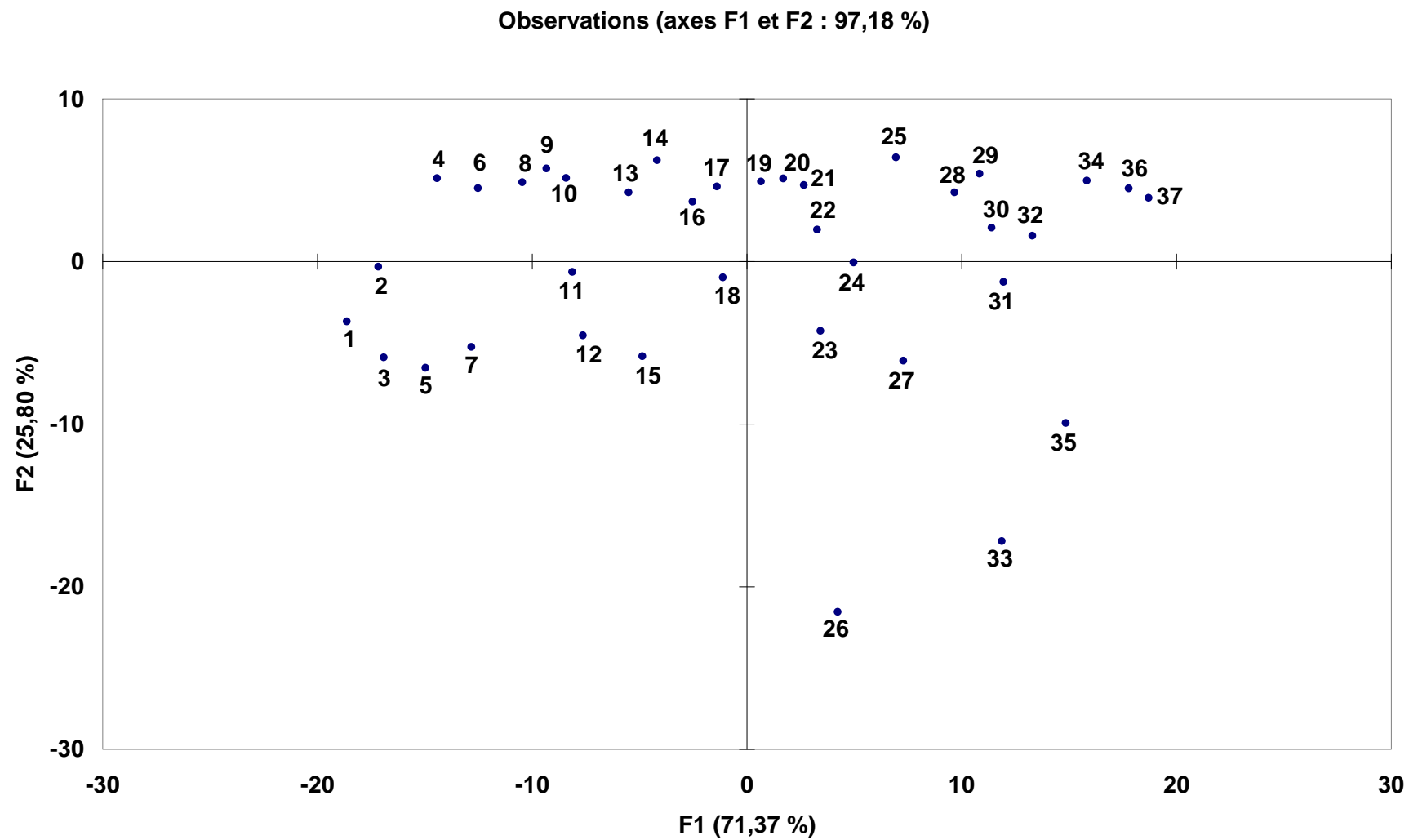
Station de Casanova : n°s1-5 prélevés en mai 2005, n°s15-18 prélevés en Juillet 2006, n°s 25-28 prélevés en novembre 2006, n°s 33-35 prélevés en juillet 2007, n°s 36 et 37 prélevés en octobre,

Station de Saint-Pierre de Venaco: n°6-10 prélevés en mai 2005, n°14 prélevé en septembre 2005, n°s 22-24 prélevés en octobre 2006, n°s 29 et 30 prélevés en Juin 2007, n°s 31 et 32 prélevés en juillet 2007,

Station de San Nicolau : n°s 11 et 12, prélevés en mai 2005,

Station de Tolla : n° 13 prélevé en avril 2005, n°s19-21 prélevés en juillet 2006

Figure 20 : ACP de 37 échantillons d'huiles essentielles de *B. fruticosum* de Corse.



III. L'EXTRACTION ASSISTEE PAR MICRO-ONDES ET L'HYDROLAT DE *B. FRUTICOSUM*

III.1. Comparaison de la composition de l'huile essentielle obtenue par l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes et par hydrodistillation

Les premiers travaux en vue de l'extraction des composés organiques assistée par les micro-ondes ont été publiés par Ganzler et coll. en 1986 [255]. Depuis cette date, différentes techniques d'extraction par micro-ondes ont été développées et de nombreux brevets ont été déposés :

- MAE pour Microwave Assisted Extraction où l'extraction avec un solvant assistée par micro-ondes ou MAE,
- VDMH pour Vacuum Microwave HydroDistillation où l'extraction est réalisée sous vide ;
- SFME (Solvent Free Extraction Microwave) est l'une des plus récentes [256] et a été, en particulier, développée par le groupe Chemat-Smadja à l'Université de la Réunion. Cette technique 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.

L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes consiste à placer la matière végétale dans un réacteur micro-ondes sans ajout d'eau ou de solvant organique. 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 dues 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 en 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 des différences de densité [257].

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 rigoureusement 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. En ce qui concerne l'hydrodistillation, le chauffage d'une grande quantité d'eau, dans laquelle se trouve plongée la matière végétale, permet de libérer l'huile essentielle contenue dans les cellules. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange « eau + huile essentielle ». Dans la seconde étape, ce mélange subit une distillation à une température égale de 100°C sous la pression atmosphérique. Il est ensuite refroidi et condensé dans un essencier de type Clévenger qui permet une distillation en continue sans modifier la teneur en eau de la matrice. L'eau et les molécules aromatiques, se séparent, du fait de leur différence de densité et l'huile essentielle est aisément récupérée.

Les deux modes d'extraction, bien que voisins, diffèrent cependant par la nature du chauffage et par le volume d'eau utilisé. Or les phénomènes de solubilité des composés organiques dans l'eau sont particulièrement importants dans une hydrodistillation ou encore un entraînement à la vapeur. Cependant, et en accord avec

de nombreuses publications, nous utiliserons le terme « huile essentielle » pour un échantillon obtenu par chauffage du végétal par micro-ondes sans solvant.

De très nombreuses publications réalisent la comparaison des compositions chimiques d'échantillons obtenus par SFME et hydrodistillation. Lucchesi et al. ont ainsi étudié les huiles essentielles de Labiées (*Ocimum basilicum*, *Mentha crispa* L., *Thymus vulgaris* [258], de Citrus (*Citrus sinensis* L.) [257] ainsi que celles obtenues à partir d'épices d'*Elletaria cardamomum* (cardamom) [259]. Dans ce dernier cas, il est nécessaire de faire tremper les épices dans l'eau avant l'extraction. Pour éviter cette étape, Wang et al. [260] utilisent des poudres à base de fer (Fe-CO) pour augmenter l'absorption des micro-ondes et le rendement en huile essentielle de *Cuminum cyminum* et *Zanthoxylum bungeanum*. Phutdhawong et al. [261] ont aussi comparé la composition chimique de l'huile essentielle de *Cinnamomum iners* Renw. ex Bl obtenue par micro-ondes et par hydrodistillation. Enfin Bendabou et al. [262] ont effectué une étude similaire sur *Origanum glandulosum* d'Algérie. Cette technique a été aussi utilisée pour l'extraction de triperpénoïdes contenus dans *Ganoderma atrum*

Dans la très grande majorité, les rendements sont proches voire supérieurs à ceux obtenus par hydrodistillation dans un temps plus court de l'ordre de 30 minutes alors qu'une hydrodistillation nécessite classiquement trois heures. A rendement équivalent, les auteurs constatent une augmentation de la proportion des composés oxygénés dans les huiles essentielles obtenues par SFME. Plusieurs explications sont avancées pour expliquer ces différences :

- l'observation des végétaux par Microscopie Electronique à Balayage montre des différences en termes de 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 [257].

Il est aussi 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'huile essentielle obtenue par SFME. Dans une huile essentielle obtenue par hydrodistillation, ces composés oxygénés seraient probablement présents dans l'hydrolat.

Nous avons poursuivi nos travaux en réalisant une étude comparative de l'huile essentielle obtenue d'une part par extraction assistée par micro-ondes et d'autre part, par hydrodistillation avec un appareil classique de type Clévenger. Deux pieds individuels de buplèvre provenant de la station de Casanova de Venaco, récoltés en octobre 2007, après la période de floraison, ont servi de base à cette étude.

Sur l'ensemble des quatre échantillons, analysés par CPG-Ir et par RMN du ^{13}C , nous avons identifié 27 constituants représentant de 97,8% à 99,1% de la composition chimique globale de l'huile essentielle (Tableau 20). Dix composés ont été identifiés au moins une fois par RMN, les 17 autres l'ont été par comparaison des indices de rétention avec ceux des mêmes composés observés lors de l'analyse détaillée décrite au début de ce chapitre.

Nous constatons tout d'abord que les rendements obtenus par SFME sont très inférieurs à ceux de l'hydrodistillation (0.21 et 0.25% vs 1,71 et 1,86%). Malgré plusieurs essais et l'examen de plusieurs paramètres (temps de chauffage, puissance de chauffage, teneur en humidité du végétal), nous n'avons jamais pu reproduire par micro-ondes, les rendements obtenus par hydrodistillation, mesurés à partir du végétal frais.

Nous notons aussi que les compositions chimiques des quatre échantillons (2 HE obtenues par hydrodistillation et 2 HE obtenues par micro-ondes) sont homogènes. Comme dans la littérature, nous notons que le pourcentage des composés oxygénés est légèrement plus élevé par SFME. Etant donné l'écart de rendement entre les deux techniques, la comparaison des compositions chimiques s'avère délicate. Dans ce cas,

l'extraction par micro-ondes permet d'obtenir rapidement, de manière simple et économique, une huile essentielle de composition très voisine à celle obtenue par hydrodistillation (tableau 20).

Tableau 20 : composition chimique des huiles essentielles, obtenues par hydrodistillation (HE) et par extraction sans solvant assistée par micro-ondes (SFME).

| COMPOSES ^a | Ir A | Ir P | HE 1 | SFME1 | HE 2 | SFME2 |
|--------------------------------|------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| α -pinène | 931 | 1027 | 2,1 | 1,1 | 2,1 | 1,3 |
| camphène | 944 | 1073 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| sabinène | 967 | 1127 | 1,0 | 0,7 | 1,0 | 0,9 |
| β -pinène | 972 | 1116 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | 0,3 |
| myrcène | 982 | 1166 | 2,4 | 2,0 | 2,3 | 2,0 |
| acétate d'hexyle | 992 | 1251 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 |
| α -phellandrène | 999 | 1171 | 3,4 | 3,5 | 3,3 | 2,8 |
| 3-carène | 1006 | 1153 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| para-cymène | 1013 | 1276 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,4 |
| limonène* | 1020 | 1207 | 6,1 | 6,1 | 6,1 | 5,9 |
| β -phellandrène* | 1020 | 1222 | 79,7 | 76,8 | 79,1 | 77,5 |
| γ -terpinène | 1050 | 1250 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,4 |
| terpinolène | 1080 | 1288 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,2 |
| linalol | 1084 | 1550 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| cryptone | 1157 | 1678 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,3 |
| terpinéol-4 | 1163 | 1606 | 0,2 | 0,0 | 0,1 | 0,1 |
| estragole | 1176 | 1674 | 0,2 | 0,3 | 0,1 | 0,3 |
| acétate d'octyle | 1193 | 1478 | 0,3 | 0,5 | 0,3 | 0,5 |
| isovalérate d'hexyle | 1226 | 1448 | 0,1 | 0,3 | 0,1 | 0,3 |
| décanol | 1255 | 1768 | 0,4 | 1,3 | 0,4 | 1,0 |
| acétate de citronellyle | 1335 | 1648 | 0,0 | 0,0 | 0,2 | 0,3 |
| acétate de géranyle | 1361 | 1762 | 0,8 | 1,2 | 1,6 | 2,5 |
| germacrène D | 1479 | 1713 | 0,0 | 0,1 | 0,2 | 0,2 |
| bicyclogermacrène | 1495 | 1738 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,2 |
| élémicine | 1517 | 2237 | 0,2 | 0,9 | 0,1 | 0,2 |
| 2 méthyl butyrate de cinnamyle | 1646 | 2310 | 0,0 | 0,2 | 0,1 | 0,2 |
| isovalérate de cinnamyle | 1655 | 2334 | 0,1 | 0,6 | 0,2 | 0,5 |
| TOTAL (%) | | | 98,7 | 97,8 | 99,2 | 99,1 |
| Re% | | | 1,71 | 0,21 | 1,86 | 0,25 |

^a Ordre d'éluion et pourcentages des composés donnés sur colonne apolaire sauf ceux qui portent un astérisque (pourcentage sur colonne polaire) ; Ir A, Ir P : indices de rétention sur colonne apolaire (BP-1) et polaire (BP-20); tous les constituants sont identifiés par CPG; l'écriture en gras indique les constituants identifiés par la RMN du carbone-13.

III.2. Composition chimique de l'extrait de l'hydrolat de *B. fruticosum* L

En région Corse, on observe depuis deux à trois ans, à côté de la production des huiles essentielles (immortelle, romarin, myrte, agrumes...), une demande croissante pour les hydrolats. Ces mélanges présentent une valeur ajoutée plus faible que les huiles essentielles mais peuvent être obtenues en quantités beaucoup plus importantes. Cependant, s'agissant de phases aqueuses, la conservation de ces mélanges s'avère délicate et des proliférations bactériennes peuvent survenir. L'hydrolat 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. Ils sont commercialement nommés « eau florale ». La vapeur d'eau re-condensée est plus ou moins aromatisée selon les plantes distillées. Les hydrolats contiennent des composants aromatiques des huiles essentielles qui présentent une solubilité dans l'eau.

Contrairement aux huiles essentielles, il existe très peu de données dans la littérature sur la composition chimique des hydrolats et a fortiori aucune étude concernant les hydrolats de *B. fruticosum*. Récemment, une étude a été réalisée dans notre laboratoire sur l'huile essentielle et l'hydrolat de *Mentha suaveolens* ssp. *insularis*. Nous avons réalisé d'une étude comparative de la composition chimique d'un échantillon d'huile essentielle et son extrait à l'oxyde de diéthyle de l'hydrolat. Nous avons suivi le même mode opératoire et l'hydrolat (300 mL environ) a été extrait par l'oxyde de diéthyle (3 x 30 mL). Après séchage sur MgSO₄ puis évaporation du solvant, on obtient un extrait (65,4 mg). Nous avons identifié par CPG-IR et par RMN du ¹³C, 27 constituants représentant de 64,3% et 98,4% de la composition chimique globale de l'extrait d'hydrolat et l'huile essentielle (tableau 21).

Nous constatons que la composition chimique de l'huile essentielle et de l'hydrolat sont très différentes. Cette observation était attendue car les composés majoritaires de l'huile essentielle qui sont des oléfines sont insolubles dans l'eau. L'extrait de l'hydrolat ne contient que des composés oxygénés qui, à des degrés divers, sont solubles dans l'eau.

Tableau 21 : composition chimique de l'HE et de l'extrait de l'hydrolat de *B. fruticosum* L.

| COMPOSES ^a | Ir A | Ir P | HE% | hydrolat |
|--------------------------------|------|------|-------------|-------------|
| acide angelique | 912 | 1793 | - | 17,9 |
| α -pinène | 931 | 1027 | 2,2 | - |
| camphène | 944 | 1073 | 0,1 | - |
| sabinène | 967 | 1127 | 0,9 | - |
| β -pinène | 972 | 1116 | 0,3 | - |
| déhydro-cinéole | 978 | 1183 | tr | - |
| myrcène | 982 | 1166 | 2,4 | - |
| acétate d'hexyle | 992 | 1251 | 0,1 | - |
| α -phellandrène | 999 | 1171 | 3,6 | - |
| 3-carène | 1006 | 1153 | 0,4 | - |
| α - terpinène | 1011 | 1176 | tr | - |
| para-cymène | 1013 | 1276 | 0,1 | - |
| limonène* | 1020 | 1207 | 5,7 | - |
| β -phellandrène* | 1020 | 1222 | 79,9 | - |
| β -ocimène | 1037 | 1240 | tr | - |
| γ - terpinène | 1050 | 1250 | 0,1 | - |
| terpinolène | 1080 | 1288 | tr | - |
| linalol | 1084 | 1550 | 0,1 | 3,9 |
| cryptone | 1157 | 1678 | 0,1 | 6,9 |
| terpinéol-4 | 1163 | 1606 | 0,1 | 4,1 |
| α -terpineol | 1172 | 1697 | tr | 1,6 |
| estragole | 1176 | 1674 | 0,3 | 0,5 |
| <i>cis</i> -pipéritol | 1182 | 1680 | tr | 1,4 |
| <i>trans</i> -pipéritol | 1191 | 1756 | - | 2,3 |
| acétate d'octyle | 1193 | 1478 | 0,3 | - |
| cuminaldehyde | 1213 | 1790 | tr | - |
| géraniol | 1234 | 1859 | tr | 0,1 |
| phellandral | 1251 | 1728 | - | 0,6 |
| décanol | 1255 | 1768 | 0,6 | 2,1 |
| cuminol | 1267 | 2119 | - | 3,0 |
| acétate de citronellyle | 1335 | 1648 | 0,3 | - |
| acétate de géranyle | 1361 | 1762 | 0,6 | 1,3 |
| élémicine | 1517 | 2237 | 0,2 | 16,8 |
| 2 méthyl butyrate de cinnamyle | 1646 | 2310 | tr | 0,4 |
| isovalérate de cinnamyle | 1655 | 2334 | tr | 1,4 |
| TOTAL (%) | | | 98,4 | 64,3 |

^a *Ordre d'éluion et pourcentages des composés donnés sur colonne apolaire sauf ceux qui portent un astérisque (pourcentage sur colonne polaire) ; IR A, IR P : indices de rétention sur colonne apolaire (BP-1) et polaire (BP-20); tous les constituants sont identifiés par CPG; l'écriture en gras indique les constituants identifiés par la RMN du carbone-13, tr. \leq 0,05%*

L'acide angélique, qui est le composé majoritaire (17,9%), le cuminol (3,0%), le *trans*-pipéritol (2,3%) et le phellandral (0,6%) ne sont pas présents dans l'huile essentielle. Du fait de leur solubilité dans l'eau, d'autres composés comme l'élémicine (16,8%) et la cryptone (6,9%) et dans une moindre mesure les esters de cinnamyle (isovalérate et butyrate) présentent des pourcentages plus élevés que dans l'huile essentielle.

Afin de mettre en évidence une éventuelle variabilité de la composition chimique des extraits d'hydrolat, nous avons réalisé 4 échantillons à partir des parties aériennes récoltés dans 4 sites de l'île. Les masses de végétal, les volumes d'eau et d'hydrolat sont les mêmes pour les quatre échantillons. Nous notons que la composition chimique de l'extrait d'hydrolat est moins homogène que celle de l'huile essentielle puisque la teneur en acide angélique varie de 4,5 à 27,1%. Il faut cependant noter que le pourcentage de composés identifiés est assez faible, de l'ordre de 65% bien que les composés majoritaires aient été identifiés.

Tableau 22 : composition chimique de 4 extraits d'hydrolat de *B. fruticosum*.

| COMPOSES ^a | Ir A | Ir P | H1 | H2 | H3 | H4 |
|--------------------------------|------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| acide angélique | 912 | 1793 | 3,6 | 27,1 | 3,7 | 4,5 |
| β-phellandrène* | 1020 | 1222 | 0,7 | 2,1 | 0,2 | 0,6 |
| linalol | 1084 | 1550 | 3,0 | 3,2 | 3,0 | 3,3 |
| cryptone | 1157 | 1678 | 10,6 | 6,7 | 21,9 | 7,5 |
| terpinéol-4 | 1163 | 1606 | 3,9 | 8,0 | 11,0 | 5,6 |
| α-terpineol | 1172 | 1697 | 1,4 | 1,5 | 2,7 | 3,0 |
| estragole | 1176 | 1674 | 0,2 | 0,7 | - | - |
| cis-piperitol | 1182 | 1680 | 1,7 | 1,4 | - | - |
| trans-piperitol | 1191 | 1756 | 2,3 | 1,7 | 1,5 | 3,4 |
| cuminaldehyde | 1213 | 1790 | - | - | 0,6 | - |
| géraniol | 1234 | 1859 | 1,9 | 1,0 | 0,6 | 1,6 |
| phellandral | 1251 | 1728 | 0,7 | 0,4 | 0,5 | 0,7 |
| décanol | 1255 | 1768 | 2,6 | 2,5 | 3,1 | 2,9 |
| cuminol | 1267 | 2119 | 3,9 | 2,4 | 9,1 | 8,6 |
| acétate de geranyle | 1361 | 1762 | 3,0 | 2,3 | 1,8 | 3,9 |
| élémicine | 1517 | 2237 | 17,6 | 3,4 | 6,3 | 14,5 |
| 2 méthyl butyrate de cinnamyle | 1646 | 2310 | 0,2 | - | 0,2 | - |
| isovalérate de cinnamyle | 1655 | 2334 | 0,8 | - | 0,7 | 0,7 |
| TOTAL (%) | | | 58,1 | 64,4 | 66,9 | 60,8 |

^a *Ordre d'éluion et pourcentages des composés donnés sur colonne apolaire sauf ceux qui portent un astérisque (pourcentage sur colonne polaire) ; Ir A, Ir P : indices de rétention sur colonne apolaire (BP-1) et polaire (BP-20); tous les constituants sont identifiés par CPG; l'écriture en gras indique les constituants identifiés par la RMN du carbone-13*

IV. BILAN DE L'ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES DE *B. FRUTICOSUM* DE CORSE

Au terme notre étude sur la composition chimique des huiles essentielles de *Bupleurum fruticosum* réalisés par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ¹³C, nous avons mis en évidence 34 composés dont 32 à l'aide de la bibliothèque de spectres du laboratoire. Deux esters de cinnamyle, dont la présence avait été suggérée par l'interrogation de notre banque de données et par l'analyse de spectre de RMN du carbone-13, ont été synthétisés à partir de l'alcool cinnamique. Ainsi, nous avons obtenu les deux séries de valeurs de déplacement chimiques pour ces deux composés et participer à l'enrichissement de la banque « Terpènes » du laboratoire.

L'huile essentielle de *Bupleurum fruticosum*, est caractérisée par une forte teneur en β -phellandrène qui représente plus des deux tiers de la composition totale. Parmi les composés oxygénés, seul l'acétate de géranyle présente un pourcentage supérieur à 1%. De nombreux esters (linéaires, terpéniques et phénylpropanoïdes) sont identifiés en faible quantité.

Quelque soit l'organe végétal (feuille, tige, fleur) et la période de récolte, la composition demeure remarquablement constante, dominée par le β -phéllandrène. L'analyse statistique en composante principale de la composition chimique de 37 échantillons collectés sur l'ensemble de l'île et prenant en compte les teneurs des 13 composés les plus abondants montre clairement l'homogénéité de composition chimique. L'huile essentielle de buplèvre de corse est caractérisée par une forte teneur en β -phellandrene Cette composition chimique semble spécifique à la Corse. Seuls deux échantillons présentent une composition chimique associant β -phellandrène et sabinène identique à celle décrite en Italie.

Nous avons testé une nouvelle technique d'obtention des huiles essentielles SFME (Solvent Free Extraction Microwave). Cette méthode plus rapide et plus respectueuse de l'environnement permet d'obtenir une huile essentielle dont la

composition est très voisine de celle obtenue par hydrodistillation. Cependant, nous n'avons pas pu, au cours de notre étude, déterminer des conditions opératoires adéquates qui permettent d'avoir un rendement se rapprochant de celui de l'hydrodistillation.

Enfin, nous avons déterminé la composition chimique d'un extrait de l'hydrolat de *B. fruticosum* de Corse. Ce type de mélange n'est constitué que de composés oxygénés qui présentent une grande variété de structure et de fonctions. Ce profil très singulier devrait permettre le développement surtout dans le domaine des fragrances pour ce type de produit.

CHAPITRE V

**CARACTERISATION DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *SANTOLINA*
CORSICA DE CORSE**

Au cœur du bassin méditerranéen, la Corse apparaît comme une île remarquable par sa géographie, son climat, sa géologie. Son couvert général est très varié et caractérisé par de nombreuses plantes à répartition restreinte qui constituent «*la flore endémique de la Corse*». Celle-ci comprend 296 taxons parmi lesquels 131 sont strictement corses et 75 sont cyrno-sardes (Corso-sardes). *Santolina corsica* est une endémique cyrno-sarde que l'on trouve fréquemment aux étages méso et supra-méditerranéens [263, 264].

L'origine de la flore corse a fait l'objet de nombreuses hypothèses qui ont été abondamment discutées. Aujourd'hui encore le débat sur ces diverses hypothèses demeure ouvert. Cependant, il existe un lien certain entre le pourcentage d'endémisme et l'isolement ancien du bloc corso-sarde (dérive vers le sud-est) qui a probablement eu lieu au Miocène inférieur [265]. Ce bloc a joué parfois un rôle de milieu conservateur pour des espèces, qui en présence de plantes plus agressives, auraient sans doute été éliminées. L'évolution des espèces végétales constituent aussi le fruit d'un processus d'évolution biologique unique avec, comparativement à des espèces continentales, une moindre possibilité d'échanges de gènes et bien moins d'apports extérieurs. La Flore endémique de la Corse possède de nombreuses espèces aromatiques endémiques susceptibles de fournir des huiles essentielles originales sous l'aspect de leurs compositions chimiques. Afin de déterminer le potentiel de ces produits naturels pour l'économie régionale, il s'avère primordial de caractériser précisément leurs compositions chimiques en vue de leur commercialisation par les producteurs locaux.

De nombreuses espèces endémiques : *Thymus herba-barona* [124], *Ferula arrigonii* [121], *Peucedanum paniculatum* [189], *Mentha suaveolens* ssp *insularis* ont fait l'objet de travaux au laboratoire. A titre d'exemple, les composés majoritaires de l'huile essentielle *Mentha suaveolens* ssp *insularis* [266], espèce endémique des îles de la méditerranée occidentale sont la pulégone (44,4%) et la *cis-cis*-para-menthénolide (27,3%). La présence de cette α -méthylène- γ -butyrolactone a été signalée pour la

première fois à l'état naturel. Dans les huiles essentielles de racines et des parties aériennes de *Peucedanum paniculatum* [189], une espèce endémique de Corse, huit nouveaux esters de β -cyclolavandulyle et de β -isocyclolavandulyle (acétate, propionate, isobutyrate et isovalérate) ont été identifiés. La réalisation de séquences de RMN 1D et 2D a permis de déterminer la structure de ces esters.

Lors de cette étude, nous avons complété et développé l'étude de l'huile essentielle de *Santolina corsica*, qui avait fait l'objet de travaux réalisés par Bernard Ferrari [267]. Pour cela, nous avons mis en œuvre une combinaison de la CC, de la CPG(Ir) et de la méthode d'analyse par RMN ^{13}C développée au laboratoire pour compléter l'étude sur la composition chimique de l'huile essentielle dans laquelle de nombreux composés demeuraient non identifiés. En effet, la composition chimique de l'huile essentielle de *S. corsica* est caractérisée par la présence d'une douzaine de monoterpènes irréguliers possédant les squelettes santolinane, artémisane, lavandulane qui représentent 30% de la composition globale. Cette composition est très originale par rapport à celles rencontrées habituellement pour les huiles essentielles du genre *Santolina*.

Ensuite, nous avons analysé une trentaine d'échantillons individuels d'huile essentielle provenant de différentes localités de la Corse. Enfin, nous avons examiné l'activité antibactérienne de cette huile essentielle vis-à-vis de certaines souches telles que *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

I. SANTOLINA CORSICA

La santoline Corse, *Santolina corsica* Jordan et Fourr., espèce endémique cyrno-sarde, appartient à la famille des Astéracées. Elle se présente sous la forme d'un sous-arbrisseau dense à feuillage persistant d'une taille d'environ 30 cm. Elle pousse de préférence sur des emplacements secs et rocailloux bénéficiant d'un fort ensoleillement et à une altitude pouvant aller jusqu'à 1700 mètres. En Corse elle semble localisée dans le centre de l'île [263]. En Sardaigne, elle se rencontre

fréquemment dans le Nord-Ouest de l'île. La floraison de cette espèce a lieu généralement durant la période juin-juillet et s'avère remarquable par la coloration jaune intense des fleurs (Figure 21). D'ailleurs le nom de la plante pourrait être dérivé du mot grec « xanthos » qui signifie jaune [268].

La santoline corse est morphologiquement assez proche de *Santolina insularis* (Genn.ex Fiori) Arrigonii, endémique sarde que l'on trouve fréquemment dans le massif du Gennargentu (Est de la Sardaigne). Par contre, ces deux plantes diffèrent par le caryotype [269], respectivement hexaploïde ($2n = 54$) et tétraploïde ($2n = 36$). Dans la classification actuelle, elles sont élevées au rang d'espèces alors que précédemment elles étaient nommées *Santolina chamaecyparissus* var *insularis* Genn. ex Fiori et *Santolina chamaecyparissus* var *corsica* Jordan et Fourr.

En pharmacie la plante était utilisée essentiellement comme vermifuge pour combattre les vers des viscères, et comme spasmolytique [270]. Elle est également connue pour ses propriétés anti-inflammatoires [263]



Figure 21 : *Santolina corsica* en floraison à Bistugliu (Centre corse).

Si près d'une centaine d'espèces de santoline ont été décrites, il apparaît cependant que l'on revienne souvent à un nombre d'espèces principales plus limité. Parmi les plus connues, on peut donc citer : *Santolina chamaecyparissus* L., qui se développe sur l'ensemble du bassin méditerranéen. En France, *S. chamaecyparissus* est connue sous le nom de « santoline », « santoline petit cyprès » ou « santoline blanche » ; sa floraison se situe de mai à juillet. *Santolina viridis* W., est présente dans les régions du sud de la France et du Nord de l'Espagne tandis que *Santolina pectinata* Lag., reste inféodée à la péninsule ibérique. D'autres espèces endémiques ont été signalées en Espagne et au Portugal [270]: *S. rosmarinifolia* L., *S. sedimentata*, *S. canescens*.

L'étude des huiles essentielles du genre *Santolina* porte essentiellement sur des plantes circumméditerranéennes. Ainsi, concernant l'espèce la plus répandue *S. chamaecyparissus*, l'artémisia cétone constitue souvent le composé majoritaire. Le β -phellandrène, le myrcène, le camphre, le bornéol et la longiverbénone sont fréquemment identifiés. En tenant compte des teneurs relatives de ces composés, il est possible de constituer trois groupes :

- dans le premier groupe, l'artémisia cétone est le composé majoritaire, associé au myrcène (échantillons collectés en France) [271] ; au myrcène et au cinéole (cultivars d'Inde) [272] ; au camphre [273] ; au β -phellandrene [274]; au camphre et au β -phellandrene [275] ; au camphre, au β -phellandrene et à la longiverbénone [276] ; ou encore au τ -cadinol [277].
- dans le deuxième type de composition rencontré le camphre est le composé majoritaire, associé au bornéol (ssp. *squarossa*) [278] ; au bornéol et au 1,8-cinéole (ssp *incana*) [278] ; au cubéol (variété *magonica*) [278] et à l'allooromadendrène (ssp. *squarossa*) [279].
- enfin, dans certains cultivars d'Allemagne et de Hongrie c'est la longiverbénone et le β -phellandrène qui sont les composés les plus importants, suivis par l'artémisia cétone [276].

Parmi, l'espèce *S. chamaecyparissus* et ses sous espèces, il y a aussi des travaux ponctuellement sur les espèces *S. insularis* (Italie) où le myrcène est le composé majoritaire associé au β -phellandrène [280], *S. ligustica* (Italie) où le myrcène, le 1,8-cinéole et terpineol-4 sont les composé majoritaire [281]. Le β -pinène et le β -phellandrène sont majoritaires dans *S. rosmarinifolia* (Espagne) [282]. Enfin dans *S. canescens* (Espagne) c'est le camphre qui est le composé le plus important [283].

A notre connaissance, seules trois publications concernent la composition chimique de l'huile essentielle de *S. corsica* dont deux réalisées à l'université de corse. La publication la plus ancienne concerne l'analyse d'un échantillon d'huile essentielle de *S. corsica* de Sardaigne [269]. Le camphre domine (18,5%) tandis que l'artémisia cétone (12,9%), le bornéol (7,4%) et l'aromadendrène (5,5%) sont les autres composés importants. Récemment, la composition chimique d'un échantillon provenant de Corse a été décrite et est dominée par l'artémisia cétone (20,0%), le β -phellandrène (14,4%) et le myrcène (11,7%). Cette huile essentielle présente aussi une activité antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* [284]. Enfin, le troisième article concerne la caractérisation de deux nouveaux aldéhydes sesquiterpéniques à squelette sesquilavandulane isolées à partir d'un échantillon d'huile essentielle de *S. corsica* de Corse [285]. Cette étude a été réalisée au sein de notre laboratoire et est décrite dans la thèse de Bernard Ferrari. Les travaux réalisés par Bernard Ferrari [267] ont également montré que les échantillons d'huile essentielle de *Santolina corsica*, analysés par RMN ^{13}C et CPG(Ir), contenaient une forte proportion de monoterpènes irréguliers présentant notamment les squelettes santolinane, artémisane et lavandulane.

II. ANALYSE D'UNE L'HUILE ESSENTIELLE DE *SANTOLINA CORSICA*

L'objet de cette étude est de compléter l'étude initiée dans notre équipe afin de caractériser le plus finement possible l'huile essentielle de *S. corsica*. Ainsi, nous avons étudié la composition chimique d'un échantillon collectif d'huile essentielle obtenue à partir des parties aériennes de *S. corsica* par CPG(Ir), CPG/SM et RMN du carbone-13. Le matériel végétal a été collecté en pleine floraison au mois de juillet à

Bistugliu (Centre Corse). L'huile essentielle a été obtenue par hydrodistillation, à l'aide d'un appareil de type Clévenger d'un volume de 6L. Le rendement en huile essentielle, calculé en fonction de la masse de végétal frais, est de 0,40%.

II.1. Fractionnement de l'huile essentielle de *S. corsica*

L'étude préalable réalisée au laboratoire ayant montrée la complexité de la composition chimique de l'huile essentielle, nous avons choisi de réaliser un fractionnement sur colonne ouverte en utilisant le pentane et/ou l'oxyde de diéthyle comme solvants. L'objectif étant d'isoler et de caractériser des composés qui n'étaient pas présents dans la banque de spectres du laboratoire. Dans une première étape, nous avons soumis 2,134 g d'huile essentielle à un fractionnement par chromatographie utilisant un gel de silice de granulométrie moyenne 60-200 µm. Cette première chromatographie a pour objectif de séparer les composés hydrocarbonés (fractions F1 et F2 éluées au pentane) des composés oxygénés (fraction F3 éluee par l'oxyde de diéthyle) (Figure 22). Toutes les fractions ont été étudiées par CPG(Ir), RMN du carbone-13 et CPG/SM.

La fraction F1, qui présente la masse la plus importante (1,142 g). L'étude de cette fraction a permis d'identifier 19 composés hydrocarbonés et un composé oxygéné qui représentent près de 97,5% de la fraction F1. Le pourcentage des composés non identifiés n'excédant pas 0,2%. L'ensemble des composés a été identifié par CPG(Ir) et CPG-SM en consultant la banque « Arômes » du Laboratoire de chimie des produits naturels (Université de Corse) et les bibliothèques commerciales de spectrométrie de masse. Par ailleurs, 14 de ces composés ont également été identifiés par RMN du carbone-13.

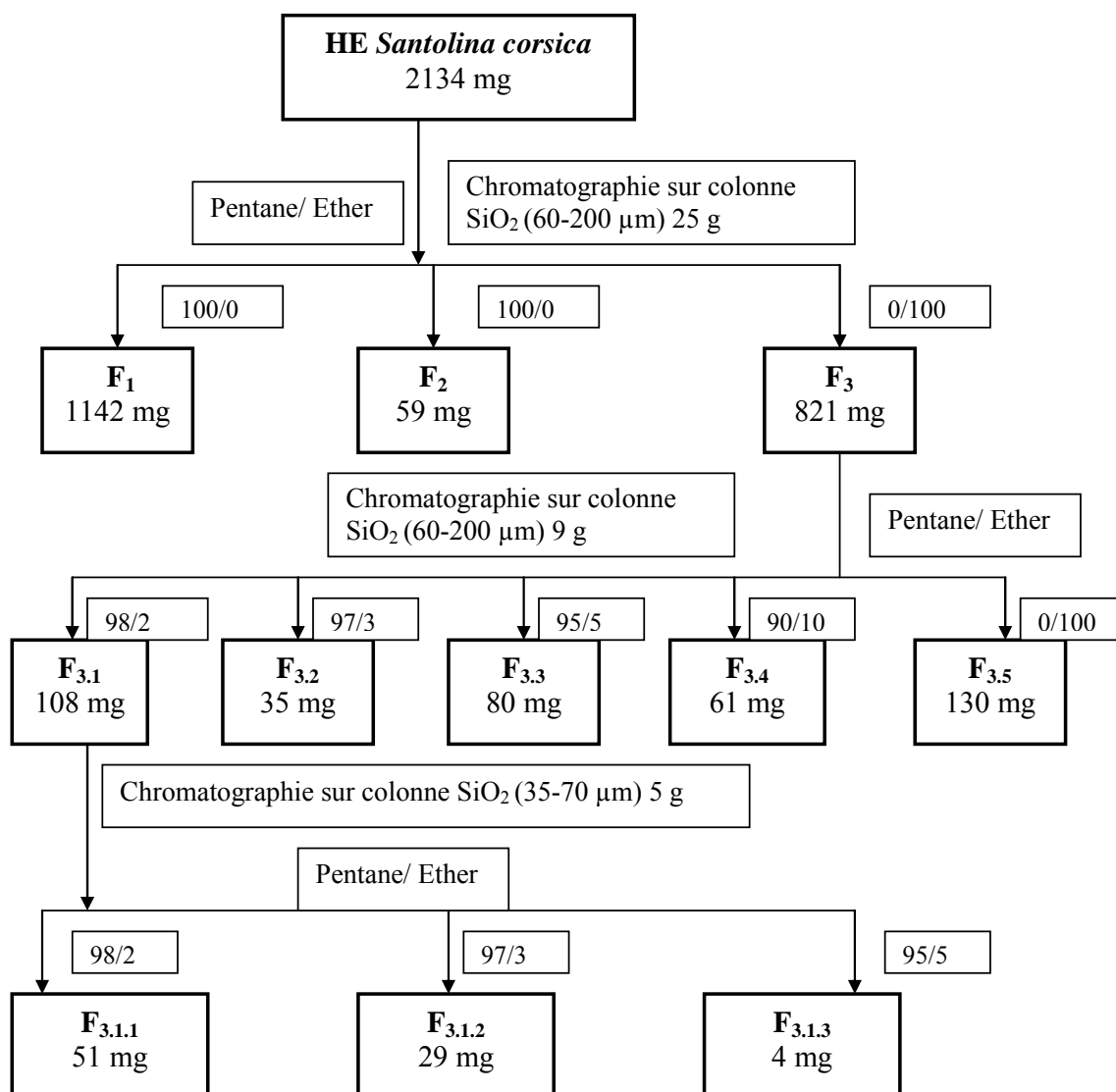


Figure 22: schéma de fractionnement de l'huile essentielle de *Santolina corsica*.

De la même façon, nous avons identifié 17 composés dans la fraction F2, qui représentent 89,2% de la composition globale. La quasi-totalité des composés avaient déjà été identifiés dans la fraction F1 à l'exception du bicyclogermacrène, du β -bisabolène et de l'acétate de liratyle. La masse cumulée des fractions F1 et F2 est de 1201 mg ce qui représente 56,3% de la masse totale de l'échantillon d'huile essentielle. Dans la fraction F1, le myrcène constitue le composé majoritaire 47,9%, suivi du santolinatriène (18,2%) et du β phellandène (17,2%).

La fraction oxygénée F3 (404 mg), a ensuite été soumise à une nouvelle chromatographie sur colonne de silice (60-200 µm) en utilisant un gradient d'élution pentane/oxyde de diéthyle (Tableau 23). Cinq fractions ont été récupérées (F3.1-F3.5), la fraction F3.1 éluée avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle 98/2 contient les oxydes, les dérivés carbonylés et les esters. Les fractions F3.2, F3.3 et F3.4 ont été éluées par des mélanges pentane/oxyde de diéthyle respectivement 97/3, 95/5, 90/10. Dans ces fractions, nous trouvons les aldéhydes et les alcools peu polaires. La fraction F3.5, obtenue avec une élution à l'oxyde de diéthyle, renferme les alcools très polaires.

La fraction F3.5 est caractérisée par la prédominance de composés oxygénés très polaires puisque le constituant majoritaire est le lyratol (53,4%), un monoterpène irrégulier présentant un squelette santolinane. D'autres alcools monoterpéniques irréguliers sont présents de manière significative dans cette fraction. Le yomogi alcool, possédant un squelette artémisane est présent à une teneur de 2,4%. Le squelette chrysanthémane (cyclopropane) est représentée par les isomères trans et cis du chrysanthémyle alcool avec respectivement des teneurs de 0,8% et 0,4%. Trois alcools linéaires sont aussi identifiés : le (Z)-hexen-3-ol (0,6%), le (E)-hexen-2-ol (0,4%) et l'hexanol-1 (0,4%).

Tableau 23 : identification par CPG-Ir et RMN du carbone-13 des composés issus du fractionnement de F3.

| Composés ^a | Ir A | Ir P | F3 | F3.1 | F3.2 | F3.3 | F3.4 | F3.5 |
|-----------------------|------|------|-----|------|------|------|-------|------|
| ELUANT | | | | 98/2 | 97/3 | 95/5 | 90/10 | 100 |
| MASSES(mg) | | | 404 | 108 | 35 | 80 | 61 | 130 |
| (Z)-hexen-3-ol | 831 | 1381 | 0,3 | - | - | - | - | 0,6 |
| (E)-hexen-2-ol | 840 | 1403 | 0,2 | - | - | - | - | 0,4 |
| hexanol-1 | 843 | 1347 | 0,2 | - | - | - | - | 0,4 |
| yomogi alcool | 984 | 1400 | 0,9 | - | - | - | - | 2,4 |
| isolyratone | 1014 | 1368 | 2,4 | 7,5 | - | - | - | - |
| 1,8-cinéole | 1021 | 1214 | 5,3 | 15,6 | 1,7 | 0,2 | - | - |
| santolina alcool | 1026 | 1402 | 0,1 | - | - | - | 3,5 | - |
| artémisia cétone* | 1043 | 1352 | 0,2 | 0,8 | - | - | - | - |

| | | | | | | | | |
|-----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| isolyratol D1 | | 1516 | 4,4 | - | 5,0 | 14,0 | 7,0 | - |
| isolyratol D2 | 1054 | 1556 | 9,5 | - | 6,2 | 29,4 | 22,5 | - |
| artémisia alcool | 1065 | 1503 | 0,6 | - | - | - | 2,6 | - |
| linalol | 1081 | 1544 | 0,8 | - | - | - | 2,5 | - |
| lyratal | 1098 | 1504 | 1,8 | 7,0 | 0,3 | - | - | - |
| lyratol | 1139 | 1780 | 20,8 | - | - | - | - | 53,4 |
| trans-chrysanthémyle alcool | 1141 | 1677 | 0,2 | - | - | - | - | 0,8 |
| cis-chrysanthémyle alcool | 1146 | 1660 | 0,1 | - | - | - | - | 0,4 |
| lavandulol | 1149 | 1674 | 0,5 | - | - | - | 3,4 | - |
| terpinèn-4-ol | 1160 | 1600 | 4,5 | - | 0,3 | 8,7 | 20,8 | - |
| α -terpinéol | 1172 | 1697 | 0,8 | - | - | - | - | 2,0 |
| acétate de lyratyle | 1250 | 1644 | 1,3 | 4,5 | 1,9 | 0,2 | - | - |
| butyrate de lyratyle | 1425 | 1785 | 0,2 | 0,7 | 0,2 | - | - | - |
| isovalérate de lyratyle | 1476 | 1805 | 0,2 | 0,3 | - | - | - | - |
| (E)-nérolidol | 1545 | 2038 | 0,2 | - | - | - | 1,2 | - |
| spathuléol | 1562 | 2125 | 0,2 | - | - | - | 0,7 | 1,5 |
| aldéhyde A1* | 1641 | 2150 | 0,5 | - | - | 7,7 | 1,6 | - |
| aldéhyde A2* | | 2155 | 1,6 | - | - | 3,2 | 0,6 | - |
| total (%) | | | 57,8 | 36,4 | 15,7 | 63,4 | 66,4 | 61,9 |

^a *Ordre d'éluion et pourcentages des composés donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les noms sont suivis d'un astérisque. * : pourcentage sur colonne polaire. Ir A, Ir P : indices de rétention sur colonne apolaire (BP-1) et polaire (BP-20); tous les constituants sont identifiés par CPG et également par la RMN du carbone-13, tr. \leq 0,05% ;*

En ce qui concerne la fraction F3.4, l'interrogation de la banque laboratoire permet d'identifier d'autres monoterpènes irréguliers : le santolina alcool (3,5%) et l'artémisia alcool (2,6%), mais aussi deux aldéhydes A1 et A2 présentant le squelette sesquilavandulane dont l'attribution des déplacements chimiques de RMN du ¹H et du ¹³C a été réalisée par Bernard Ferrari [285]. Les deux isomères : (2Z,7E) et (2E,7E) du 3,9-diméthyl-6-isopropyl-décatrien-2,7,9-al présentent respectivement des teneurs de 1,6% et 0,6%.

Cependant, sur le chromatogramme de la fraction F3.4, on observe les pics de deux composés non identifiés présents en quantité importante (environ 7,0% et 22,5%), les indices de rétention sont assez voisins : sur les deux colonnes : apolaire 1043/1054 et polaire 1516/1556. Ces deux composés, que nous les nommeront D1

(1043/1516) et D2 (1054/1556) sont présents à des teneurs plus élevées dans la fraction F3.3 (environ D1=14,0% et D2= 29,4%) et en plus faible quantité dans la fraction F3.2.

Afin d'isoler ces composés, nous avons choisi de réaliser une chromatographie sur gel de silice (35-70 μm) de la fraction cumulée F3.3 et F3.4 (98 mg) Trois fractions (3.3.1-F3.3.3) ont été obtenues par des mélanges pentane/oxyde de diéthyle respectivement 98/2, 97/3 et 95/5. La fraction F3.3.3 a été soumise à une chromatographie d'exclusion stérique en utilisant comme solvant le dichlorométhane. Il n'a pas été possible de séparer les deux composés D1 et D2 mais nous avons pu réaliser une analyse de leurs structures en utilisant diverses séquences de RMN 1D et 2D. L'identification de ces deux molécules : l'isolyratol et l'épi-isolyratol sont décrites dans les paragraphes suivants.

De manière similaire, nous avons soumis la fraction F3.1 à une chromatographie sur gel de silice (35-70 μm). Par interrogation de la banque « terpènes » pour les fractions F3.1.2 et F3.1.3, nous identifions de nouveaux monoterpènes irréguliers comme l'acétate de lyratyle et le lyratol qui avaient été identifiés lors de l'étude précédemment réalisée par Bernard Ferrari (Tableau 24).

Tableau 24 : identification par CPG-Ir et RMN du carbone-13 des composés issus du fractionnement de F3.1.

| Composés | Ir A | Ir P | F3.1 | F3.1.1 | F3.1.2 | F3.1.3 |
|-------------------------|------|------|------|--------|--------|--------|
| Eluant | | | 98/2 | 97/3 | 97/3 | 95/5 |
| Masses(mg) | | | 98 | 51 | 29 | 4 |
| isolyratone | 1014 | 1368 | 7,5 | 10,0 | 0,8 | 0,1 |
| 1,8-cinéole* | 1021 | 1214 | 15,6 | 3,0 | 26,1 | 3,7 |
| artémisia cétone* | 1043 | 1352 | 0,8 | 1,0 | | |
| lyratol | 1098 | 1504 | 7,0 | 4,9 | 13,3 | 3,9 |
| acétate de lyratyle | 1250 | 1644 | 4,5 | 2,2 | 11,4 | 16,1 |
| butyrate de lyratyle | 1425 | 1785 | 0,7 | 1,2 | 0,4 | |
| isovalérate de lyratyle | 1476 | 1805 | 0,3 | 2,1 | 0,1 | |
| total (%) | | | 36,4 | 24,4 | 52,1 | 23,8 |

Afin de réaliser l'attribution de l'ensemble des déplacements chimiques du lyratal, celui-ci a été préparé par oxydation du lyratol, isolé à partir de la fraction F3.5. Seuls les déplacements chimiques du proton [286] sont décrits dans la littérature et nous avons réalisé l'attribution des déplacements chimiques des carbones par RMN 2D (tableau 25).

Tableau 25: données RMN ^1H et ^{13}C du lyratal.

| C | $\delta(^{13}\text{C})$ | DEPT | $\delta(^1\text{H})$ | Proton ^a | Multiplicité (J, Hz) | $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY | HMBC ^b |
|----|-------------------------|-----------------|----------------------|---------------------|-----------------------|------------------------------|-------------------|
| 1 | 195,13 | CH | 9,46 | a | s | -- | 2,3,7 |
| 2 | 139,61 | C | -- | | -- | -- | -- |
| 3 | 153,08 | CH | 6,46 | | dq (9,6; 1,3) | 4,7 | 1,2,4,5,7,8 |
| 4 | 50,14 | CH | 3,87 | | dd (9,6; 6,9) | 3,8 | 2,3,5,6,8,9,10 |
| 5 | 144,60 | C | -- | | -- | -- | -- |
| 6 | 112,30 | CH ₂ | 4,89 | a | q (1,3) | 10 | 4,5,10 |
| | | | 4,84 | b | m | 10 | 4,5,10 |
| 7 | 9,36 | CH ₃ | 1,79 | | d (1,3) | 3 | 1,2,3 |
| 8 | 137,06 | CH | 5,85 | | ddd (17,2; 10,2; 6,9) | 4,9 | 3,4,5 |
| 9 | 116,43 | CH ₂ | 5,10 | a | dt (17,2;1,3) | 8 | 4,8 |
| | | | 5,15 | b | dt (10,2;1,3) | 8 | 4,8 |
| 10 | 21,12 | CH ₃ | 1,76 | | m | 6a,6b | 4,5,6 |

a. attributions $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ réalisées d'après l'expérience HSQC.

b. corrélation $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ longue distance, deux ou trois liaisons

Après interrogation de la banque « laboratoire » pour la fraction 3.1.1, plusieurs déplacements chimiques demeurent non attribués et présentent des similitudes avec l'acétate de lyratyle. En effet, nous notons la présence de valeurs de résonances correspondant au motif lyratyle mais aussi de signaux caractéristiques de fonctions esters qui résonnent à 173,5 et 172,9 ppm ainsi qu'autour de 69 ppm. De plus la présence de signaux qui résonnent à 36,25 (méthylène), 18,51 (méthylène) et 13,69

ppm (méthyle) et à 43,58 (méthylène), 25,75 (méthyne) et 22,43 ppm (méthyle, signal double), sont caractéristiques respectivement du motif butyrate et du motif isovalérate.

Cette fraction contenant de nombreux de composé minoritaires, une tentative de séparation de ces composés s'est révélée infructueuse. Ainsi, afin de confirmer notre hypothèse, nous nous sommes proposés de synthétiser le butyrate et l'isovalérate de à partir du lyratol et des chlorures d'acide correspondants. Les données spectrales obtenues par RMN 1D et 2D sont reportées dans les tableaux 26 et 27.

Tableau 26: données RMN ^1H et ^{13}C du butyrate de lyratyle.

| C | $\delta(^{13}\text{C})$ | DEPT | $\delta(^1\text{H})^a$ | Proton ^a | Multiplicité(J, Hz) |
|----|-------------------------|-----------------|------------------------|---------------------|----------------------|
| 1 | 69,57 | CH ₂ | 4,50 | a,b | br d (0,6) |
| 2 | 131,39 | C | --- | | --- |
| 3 | 128,87 | CH | 5,46 | | br d (8,8) |
| 4 | 49,21 | CH | 3,55 | | dd (8,8;6,7) |
| 5 | 146,60 | C | --- | | --- |
| 6 | 110,84 | CH ₂ | 4,78 | a,b | m |
| 7 | 14,12 | CH ₃ | 1,67 | | m |
| 8 | 139,15 | CH | 5,80 | | ddd (17,2; 9,6; 6,7) |
| 9 | 114,80 | CH ₂ | 5,05 | a | dt (9,6;1,5) |
| | | | 5,03 | b | dt (17,2;1,5) |
| 10 | 20,99 | CH ₃ | 1,70 | | m |
| 11 | 173,50 | C | --- | | --- |
| 12 | 36,26 | CH ₂ | 2,30 | | t (7,3) |
| 13 | 18,51 | CH ₂ | 1,65 | | m |
| 14 | 13,69 | CH ₃ | 0,95 | | t (7,4) |

a. attributions $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ réalisées d'après l'expérience HSQC.

Ainsi, nous avons pu confirmer la présence dans la fraction F3.1.1 la présence de l'acétate, du butyrate et de l'isovalérate de lyratyle à respectivement 2,2%, 1,2%, et 0,5%.

Tableaux 27: données RMN ^1H et ^{13}C de l'isovalérate de lyratyle.

| C | $\delta(^{13}\text{C})$ | DEPT | $\delta(^1\text{H})$ | Proton ^a | Multiplicité (J, Hz) |
|----|-------------------------|-----------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| 1 | 69,55 | CH ₂ | 4,50 | a, b | br s |
| 2 | 131,37 | C | --- | | --- |
| 3 | 128,97 | CH | 5,47 | | br d (8,2) |
| 4 | 49,21 | CH | 3,60 | | dd (8,2; 7,0) |
| 5 | 146,59 | C | --- | | --- |
| 6 | 110,83 | CH ₂ | 4,78 | a, b | m |
| 7 | 14,15 | CH ₃ | 1,68 | | br d (1,3) |
| 8 | 139,14 | CH | 5,80 | | ddd (17,8; 9,6; 7,0) |
| 9 | 114,80 | CH ₂ | 5,05 | a | dt (9,6; 1,5) |
| | | | 5,03 | b | dt (17,8; 1,5) |
| 10 | 20,98 | CH ₃ | 1,71 | | br s |
| 11 | 172,97 | C | --- | | --- |
| 12 | 43,49 | CH ₂ | 2,21 | | d (6,9) |
| 13 | 25,75 | CH | 2,12 | | m |
| 14 | 22,42 | CH ₃ | 0,96 | | d (6,6) |

a. attributions $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ réalisées d'après l'expérience HSQC.

Dans la fraction 3.1.1, le composé présentant une teneur de 10,0% n'est pas encore identifié. La présence d'un signal résonnant autour de 200 ppm et les indices de rétention (1014/1360) nous indiquent qu'il s'agit probablement d'un monoterpène possédant une fonction cétone. La série de déplacements chimiques présente aussi des similitudes avec le lyratol indiquant qu'il s'agit la encore d'un monoterpène irrégulier.

Cependant, malgré plusieurs tentatives, nous n'avons pas pu isoler cette molécule qui se dégrade très rapidement à la suite des fractionnements sur gel de silice. Pour identifier cette molécule, nous avons choisi une autre stratégie décrite dans le paragraphe suivant.

II.2. Identification des constituants absents de la bibliothèque de spectres « terpènes »

En ce qui concerne la fraction F3.3, l'interrogation d'une bibliothèque de spectres, conçue au laboratoire et constituée à partir des données de la littérature, a suggéré la structure de l'isolyratol [287, 288]. Le composé D1 (1042/1518) présente le même spectre de masse que l'isolyratol D2 (1052/1557). Nous avons soumis la fraction F3.3 à une série de chromatographie d'absorption (gel de silice) et exclusion stérique (séphadex) mais il n'a pas été possible d'isoler le composé D1 et de le séparer de l'isolyratol D2. Dans une fraction de chromatographie, qui contient les composés D2 et D1 dans un rapport 5/2, nous avons pu réaliser une étude complète par RMN 1D et 2D (^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC, HMBC). Nous avons tout d'abord l'ensemble des signaux correspondants à l'isolyratol qui sont bien en accord avec les données de la littérature [287, 288]. Ensuite, par soustraction des données appartenant à l'isolyratol, nous avons pu déterminer la structure du composé D1 que nous nommerons épi-isolyratol (tableau 28).

L'étude des spectres de RMN du ^1H et du ^{13}C ainsi que la séquence DEPT apportent des renseignements sur la nature de la molécule. Nous sommes en présence de deux carbones quaternaires (145,01 et 144,74 ppm), trois méthines (136,25, 76,07 et 56,20 ppm), trois méthylènes (116,28, 114,39, et 113,90 ppm) et deux méthyles (19,64, 16,63 ppm). Ces données sont en accord, avec la valeur du pic moléculaire observé en SM ($m/z = 152$) et conduisent à la formule $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$. La structure de cette molécule qui possède trois insaturations (trois carbones méthyléniques) et contient une fonction alcool secondaire (76,07 ppm) est de type santolinatriène.

Tableaux 28: données RMN ^1H et ^{13}C de l'isolyratol et de l'épi-isolyratol.

| isolyratol | | | | | |
|------------|-------------------------|-----------------|------------------------|----------------------------|-------------------|
| n°C | $\delta(^{13}\text{C})$ | DEPT | $\delta(^1\text{H})^a$ | Multiplicité (J, Hz) | HMBC ^b |
| 1 | 113,21 | CH ₂ | 4,96; 4,90 | <i>m</i> | 2,3,7 |
| 2 | 144,86 | C | -- | -- | --- |
| 3 | 75,86 | CH | 4,15 | <i>d</i> (8,4) | 1,2,4,5,7,8 |
| 4 | 56,11 | CH | 2,90 | <i>t</i> (8,4) | 2,3,5,6,8,9,10 |
| 5 | 144,76 | C | -- | -- | --- |
| 6 | 113,05 | CH ₂ | 4,81; 4,85 | <i>m</i> | 3,4,5,10 |
| 7 | 17,36 | CH ₃ | 1,74 | <i>dd</i> (1,4;0,8) | 1,2,3,4 |
| 8 | 136,83 | CH | 5,92 | <i>ddd</i> (17,0;10,2;8,4) | 2,3,4,5 |
| 9 | 117,78 | CH ₂ | 5,18 | <i>ddd</i> (17,0;1,7;0,7) | 4,8 |
| | | | 5,21 | <i>ddd</i> (10,2;1,7;0,7) | 4,8 |
| 10 | 20,65 | CH ₃ | 1,75 | <i>dd</i> (1,2;1,0) | 4,5,6 |

| épi-isolyratol | | | | | |
|----------------|-------------------------|-----------------|------------------------|-----------------------------|-------------------|
| n°C | $\delta(^{13}\text{C})$ | DEPT | $\delta(^1\text{H})^a$ | Multiplicité (J, Hz) | HMBC ^b |
| 1 | 114,39 | CH ₂ | 4,95; 4,90 | <i>m</i> | 2,3,7 |
| 2 | 144,74 | C | -- | -- | --- |
| 3 | 76,07 | CH | 4,09 | <i>d</i> (8,4) | 1,2,4,5,7,8 |
| 4 | 56,20 | CH | 2,90 | <i>t</i> (8,4) | 2,3,5,6,8,9,10 |
| 5 | 145,01 | C | -- | -- | --- |
| 6 | 113,90 | CH ₂ | 4,93; 4,97 | <i>m</i> | 3,4,5,10 |
| 7 | 16,63 | CH ₃ | 1,72 | <i>dd</i> (1,6; 0,8) | 1,2,3,4 |
| 8 | 136,25 | CH | 5,68 | <i>ddd</i> (17,2; 10,1;8,4) | 2,3,4,5 |
| 9 | 116,28 | CH ₂ | 5,07 | <i>ddd</i> (17,2;1,6;1,3) | 4,8 |
| | | | 5,04 | <i>ddd</i> (10,1;1,6;0,7) | 4,8 |
| 10 | 19,64 | CH ₃ | 1,78 | <i>dd</i> (1,6;0,8) | 4,5,6 |

a. attributions ^1H - ^{13}C réalisées d'après l'expérience HSQC.

b. corrélation ^1H - ^{13}C longue distance, deux ou trois liaisons.

Ces informations sont confortées par l'observation du spectre du proton dans lequel on observe trois protons vinyliques couplés entre eux (5,68 ; 5,07 et 5,04 ppm) qui présentent des constantes de couplages de 17,2 Hz (3J trans) et 10,2 Hz (3J cis) tandis que les quatre autres protons vinyliques se couplent peu (4,95 et 4,90 ppm ; 4,97 et 4,93 ppm).

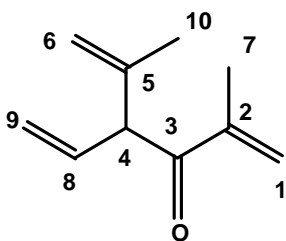
Les deux méthyles présentent des déplacements caractéristiques de la position vinylique (1,78 et 1,72 ppm). Le proton qui présente un déplacement chimique déblindé qui résonne à 2,90 ppm car il est position triplement allylique, présente une multiplicité de triplet due à deux couplages vicinaux fortuitement identiques (8,4 Hz). Ce proton est porté par le carbone qui résonne à 56,20 ppm. Ce proton est particulièrement intéressant puisqu'il permet à l'aise de la corrélation HMBC (corrélations proton-carbone longue distance de confirmer l'attribution de nombreux déplacements chimiques de RMN du carbone-13. En effet, ce proton H4 corréle d'une part avec C10 (19,64 ppm) mais pas C7 (16,63 ppm) et d'autre part corréle avec C6 (113,90 ppm) mais pas C1 (114,39 ppm).

Cet épimère de l'isolyratol est identifié pour la première fois dans une huile essentielle. Il faut signaler les hydroperoxydes correspondants ont été isolés à partir d'*Artemisia lamcea* [289]. Si les spectres de masses de ses deux composés sont identiques, les deux séries de déplacements chimiques de RMN du ^{13}C de l'isolyratol et de l'épi-isolyratol ne présentent aucune superposition.

La relation diastéréoisomérique entre les deux composés a pu être confirmée en réalisant l'oxydation d'un mélange d'isolyratol et d'épi-isolyratol qui conduit à la formation d'une seule cétone, la 2,5-diméthyl-4-vinyl-2,5-hexadien-3-one. La structure de cette cétone que nous nommerons isolyratone a été confirmée par une analyse structurale par RMN 1D et 2D (1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC, HMBC). Cette molécule correspond au composé présent à 10,0% dans la fraction F3.1.1 que nous n'avons pas pu isoler par l'utilisation de techniques chromatographiques. Ce composé n'avait jamais été trouvé en tant que produit naturel.

La réalisation d'une séquence DEPT nous informe de la présence de trois carbones quaternaires (200,39, 143,86 et 143,24 ppm), deux méthines (135,68 ; 58,44 ppm), trois méthylènes (124,86, 117,01 et 113,73 ppm) et deux méthyles (21,18, 18,07 ppm). Le composé présente quatre centres d'insaturation (une cétone α - β insaturée et trois méthylènes exo). L'analyse par SM montre un pic moléculaire à $m/z = 150$ en accord avec la formule $C_{10}H_{14}O$.

Tableau 29: données RMN 1H et ^{13}C de l'isolyratone.

|  | | | | | | | |
|--|------------------|-----------------|-----------------|--------|------------------------------|-------------------|-------------------|
| C | $\delta(^{13}C)$ | DEPT | $\delta(^1H)^a$ | Proton | Multiplicité (J, Hz) | $^1H-^1H$ COSY | HMBC ^b |
| 1 | 124,86 | CH ₂ | 6,02 | a | Broad s | 1b,7 | 2,3,7 |
| | | | 5,77 | b | m | 1a,7 | 2,3,7 |
| 2 | 143,86 | C | -- | | -- | -- | -- |
| 3 | 200,39 | C | -- | | -- | -- | -- |
| 4 | 58,44 | CH | 4,40 | | <i>bd</i> (8,1) | 8 | 3,5,6,8,9,10 |
| 5 | 143,24 | C | -- | | -- | -- | -- |
| 6 | 113,73 | CH ₂ | 4,93 | a | <i>quint</i> (1,4) | 6b,10 | 4,5,10 |
| | | | 4,81 | b | Broad s | 6a,10 | 4,5,10 |
| 7 | 18,07 | CH ₃ | 1,89 | | <i>dd</i> (1,4, 1,1) | 1a,1b | 1,2,3 |
| 8 | 135,68 | CH | 6,07 | | <i>ddd</i> (17,2, 10,2, 8,1) | 4,9 | 4 |
| 9 | 117,01 | CH ₂ | 5,17 | a | <i>ddd</i> (10,2, 1,4, 0,9) | 9b,8 | 4,8 |
| | | | 5,10 | b | <i>dt</i> (17,2, 1,4) | 9a,8 | 4,8 |
| 10 | 21,18 | CH ₃ | 1,74 | | <i>dd</i> (1,4, 1,0) | 6a,6b | 4,5,6 |

a. attributions $^1H - ^{13}C$ réalisées d'après l'expérience HSQC.

b. corrélation $^1H - ^{13}C$ longue distance, deux ou trois liaisons.

Les seules ambiguïtés résident dans l'attribution des carbones quaternaires C2 et C5 qui sont séparés par moins d'un ppm et les C sp² exo (124,86, 117,01 et 113,73 ppm). Le déplacement chimique 117,01 ppm corrèle avec les protons résonants à 5,10 et 5,17 ppm dont la multiplicité et les constantes de couplages correspondent à une entité vinylique. Dans la séquence HBMC, le proton H4 (4,40 ppm) corrèle avec 143,24 ppm mais pas avec 143,86 ppm permettant d'attribuer ces deux valeurs aux carbones C5 et C2. De la même façon, le proton H4 corrèle avec 117,01 ppm et 21,18 ppm mais pas avec 124,86 ppm et 18,07 permettant la aussi d'attribuer les C sp² méthyléniques et les deux méthyles.

L'étude de l'huile essentielle de *Santolina corsica* réalisée par combinaison des techniques chromatographiques et spectroscopiques (CC, CPG(Ir), RMN du carbone-13, CPG-SM) a permis l'identification de 50 composés qui représentent 88,2% de la composition totale de l'huile essentielle (tableau 30). Les composés majoritaires sont des monoterpènes oléfiniques : myrcène (34,6%), santolina triène (13,5%) et β -phellandrène (11,7%). Mais l'originalité de la composition chimique de cette huile essentielle réside dans la présence de monoterpènes irréguliers qui sont fréquemment identifiés dans les huiles essentielles du genre *Artemisia*. Ici, nous notons la présence simultanée de composés possédant cinq squelettes irréguliers ce qui confère à cette huile essentielle une réelle originalité:

- santolinane (santoline triène, isolyratone, épi-isolyratol, isolyratol, lyratal, lyratol et ses esters),
- artémisane (yomogi alcool, artémisia cétone, artémisia alcool),
- chrysanthémène (trans et cis chrysanthemyl alcool),
- lavandulane (lavandulol),
- sesquilavandulane (2Z,7E) et (2E,7E) du 3,9-diméthyl-6-isopropyl-décatrien-2,7,9-al.

Tableau 30 : composition chimique de l'huile essentielle de *Santolina corsica*.

| Constituants | Ir A | Ir P | HE | F1 | F2 | F3 | Identification |
|-----------------------------------|------|------|-------------------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------------|
| Masses (mg) | | | 2134 | 1142 | 59 | 821 | |
| (Z)-hex-3-en-1-ol | 832 | 1384 | 0,1 | - | - | 0,3 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| (E)-hex-2-en-1-ol | 842 | 1406 | 0,1 | - | - | 0,2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| hexanol-1 | 845 | 1349 | 0,1 | - | - | 0,2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| santolinatriène | 901 | 1030 | 13,5 | 18,2 | 10,2 | - | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| α-thujène | 923 | 1027 | tr | 0,1 | 0,1 | - | Ir, SM |
| benzaldéhyde | 929 | 1529 | tr | - | - | 0,1 | Ir, SM |
| α-pinène | 931 | 1025 | 0,3 | 0,3 | 0,1 | - | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| camphène | 943 | 1070 | tr | tr | - | - | Ir, SM |
| sabinène | 965 | 1124 | 2,6 | 3,7 | 2,9 | - | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| β-pinène | 970 | 1113 | 3,5 | 4,8 | 2,7 | - | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| déhydro-1,8-cinéole | 979 | 1191 | tr | - | - | 0,1 | Ir, SM |
| myrcène | 982 | 1166 | 34,6 | 47,9 | 39,0 | - | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| yomogi alcool | 984 | 1400 | 0,2 | - | - | 0,9 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 3-carène | 1005 | 1152 | tr | tr | - | - | Ir, SM |
| para-cymène | 1011 | 1265 | 0,1 | 0,3 | 1,5 | - | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| isolyratone | 1014 | 1368 | 1,0 | - | - | 2,4 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| limonène * | 1021 | 1203 | 1,5 | 1,7 | 1,6 | | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| β-phellandrène* | 1021 | 1214 | 11,7⁺ | 17,2 | 9,0 | | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| 1,8-cinéole* | 1021 | 1214 | 2,0⁺ | - | - | 5,3 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| santolina alcool | 1026 | 1402 | tr | - | - | 0,1 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| (Z)-β-ocimène | 1029 | 1251 | tr | tr | - | - | Ir, SM |
| artémisia cétone* | 1042 | 1349 | 0,1 | - | - | 0,2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| epi-isolyratol D1 | 1042 | 1518 | 1,3 | - | - | 4,4 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| γ-terpinène | 1048 | 1247 | 0,5 | 0,5 | 0,3 | | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| isolyratol D2 | 1052 | 1557 | 2,8 | - | - | 9,5 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| artémisia alcool | 1067 | 1510 | 0,1 | - | - | 0,6 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| terpinolène | 1078 | 1285 | 1,0 | 1,2 | 0,9 | | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| linalol | 1084 | 1545 | 0,1 | - | - | 0,8 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| lyratal | 1097 | 1505 | 0,5 | - | - | 1,8 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| lyratol | 1138 | 1784 | 6,1 | - | - | 20,8 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| <i>trans</i> chrysanthemyl alcool | 1141 | 1677 | tr | - | - | 0,2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| <i>cis</i> chrysanthemyl alcool | 1146 | 1660 | tr | - | - | 0,1 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| lavandulol | 1149 | 1674 | 0,1 | - | - | 0,5 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| cryptone | 1155 | 1673 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| terpinèn-4-ol | 1162 | 1600 | 1,4 | - | - | 4,5 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| α-terpinéol | 1172 | 1698 | 0,2 | - | - | 0,8 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| estragole | 1174 | 1670 | tr | - | - | 0,2 | Ir, SM |
| acétate de lyratyle | 1250 | 1647 | 0,4 | - | 4,3 | 1,3 | Ir, RMN ¹³ C |
| 7-α-silpherfol-5-ene | 1327 | 1426 | tr | 0,1 | - | | Ir, SM |

| | | | | | | | |
|--|------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------------|
| butyrate de lyratyle | 1425 | 1785 | tr | - | - | 0,2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| alloaromadendrène | 1460 | 1645 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| α-curcumène | 1470 | 1765 | 0,2 | 0,2 | 8,3 | | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| γ-curcumène | 1472 | 1691 | 1,0 | 0,8 | 3,7 | | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| isovalerate de lyratyle | 1476 | 1805 | tr | - | - | 0,2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| bicyclo germacrène | 1492 | 1734 | 0,2 | - | 3,8 | - | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| (E)-nérolidol | 1545 | 2038 | tr | - | - | 0,2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| spathuléol | 1562 | 2125 | tr | - | - | 0,2 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| oxyde de caryophyllène | 1580 | 1984 | tr | - | - | 0,2 | Ir, SM |
| (2Z,7E) 3,9-diméthyl-6-isopropyl-décatrien-2,7,9-al* | 1639 | 2150 | 0,2 | - | - | 0,5 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| (2E,7E) 3,9-diméthyl-6-isopropyl-décatrien-2,7,9-al* | | 2157 | 0,4 | - | - | 1,6 | Ir, SM, RMN ¹³ C |
| total (%) | | | 88,2 | 97,5 | 89,2 | 58,4 | |

^a *Ordre d'élution et pourcentages des composés donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les noms sont suivis d'un astérisque. * : pourcentage sur colonne polaire. Ir A, Ir P : indices de rétention sur colonne apolaire (BP-1) et polaire (BP-20) ; ⁺ pourcentages calculés avec les intensités des signaux des carbones (RMN-¹³C), tous les constituants sont identifiés par CPG et également par CPG/SM ; l'écriture en gras indique les constituants identifiés par la RMN du carbone-13 ; tr. ≤ 0,05% .*

III. ANALYSE D'UNE L'HUILE ESSENTIELLE DE FLEURS DE *SANTOLINA CORSICA*.

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle des sommités fleuries de *S. corsica*, a été réalisée à partir d'un pied individuel, collecté dans la région de Corte. Au préalable, nous avons séparé les fleurs et les autres parties aériennes (tiges) afin de se rapprocher du mode de prélèvement du végétal effectué par les producteurs d'huiles essentielles (coupe des sommités fleuries avec une faucille à dents). Les huiles essentielles ont été obtenues dans un appareil de type Clévenger. Les rendements sont voisins (0,2%, fleurs) et (0,4% ; tiges). A notre connaissance, aucune étude sur la composition chimique d'une huile essentielle de fleurs de *Santolina corsica* n'a été réalisée. Les résultats sont présentés dans le tableau 31. Nous constatons que la composition chimique des HE de fleurs et de tiges, diffèrent peu. Le santolinatriène et le β -phellandrène constituent les composés majoritaires. Dans les deux échantillons, le pourcentage de myrcène apparaît beaucoup plus faible que dans l'huile essentielle qui a servi pour le fractionnement (6,5-6,0% vs 34,6%) Nous notons cependant que la teneur en monoterpènes irréguliers (isolyratone, *épi*-isolyratol et isolyratol) est deux fois supérieure pour l'huile essentielle de tiges.

Tableau 31 : composition chimique de l'huile essentielle de fleurs et tiges de *S. corsica*.

| Composés ^a | Ir A | Ir P | fleurs | tiges |
|-------------------------------------|------|------|-------------|-------------|
| (Z)-hex-3-en-1-ol | 832 | 1384 | 0,1 | 0,2 |
| (E)-hex-2-en-1-ol | 842 | 1406 | tr | 0,1 |
| hexanol-1 | 845 | 1349 | 0,1 | 0,1 |
| santolinatriène | 901 | 1030 | 17,9 | 16,6 |
| α -thujène | 923 | 1027 | 0,1 | 0,1 |
| benzaldéhyde | 929 | 1529 | 0,1 | tr |
| α -pinène | 931 | 1025 | 0,5 | 0,5 |
| camphène | 943 | 1070 | tr | tr |
| sabinène | 965 | 1124 | 3,2 | 6,4 |
| β -pinène | 970 | 1113 | 4,1 | 6,5 |
| déhydro-1,8-cinéole | 979 | 1191 | tr | tr |
| myrcène | 982 | 1166 | 6,5 | 9,5 |
| yomogi alcool | 984 | 1400 | tr | tr |
| para-cymène | 1011 | 1265 | 0,2 | 0,1 |
| isolyratone | 1014 | 1368 | 2,0 | 1,1 |
| limonène* | 1021 | 1203 | 3,6 | 1,4 |
| β -phellandrène* [#] | 1021 | 1214 | 13,0 | 23,1 |
| 1,8-cinéole* [#] | 1021 | 1214 | 6,5 | 5,7 |
| santolina alcool | 1026 | 1402 | tr | tr |
| artémisia acétone* | 1042 | 1349 | 0,1 | 0,1 |
| épi-isolyratol* | 1042 | 1518 | 3,0 | 1,5 |
| γ -terpinène | 1048 | 1247 | 0,8 | 0,7 |
| isolyratol | 1052 | 1557 | 6,4 | 3,3 |
| artémisia alcool | 1067 | 1510 | 0,1 | 0,1 |
| terpinolène | 1078 | 1285 | 0,3 | 0,4 |
| linalol | 1084 | 1545 | 0,3 | 0,4 |
| lyratal | 1097 | 1505 | 1,2 | 0,8 |
| lyratol | 1138 | 1784 | 11,8 | 9,1 |
| lavandulol | 1149 | 1674 | 0,1 | 0,1 |
| cryptone | 1155 | 1673 | 0,2 | 0,1 |
| terpinèn-4-ol | 1162 | 1600 | 2,7 | 1,8 |
| α -terpinéol | 1172 | 1698 | 0,3 | 0,3 |
| estragole | 1174 | 1670 | tr | tr |
| acétate de lyratyle | 1250 | 1647 | 0,9 | 0,9 |
| 7- α -silpherfol-5-ène | 1327 | 1426 | 0,1 | - |
| butyrate de lyratyle | 1425 | 1785 | 0,2 | 0,1 |
| allo-aromadendrène | 1460 | 1645 | 0,2 | 0,1 |
| γ -curcumène | 1472 | 1682 | 0,6 | 0,2 |

| | | | | |
|---|------|------|------|------|
| bicyclogermacrène | 1492 | 1734 | 0,1 | tr |
| spathuléol | 1572 | 2115 | 0,2 | 0,1 |
| 3,9-diméthyl-6-isopropyl-2Z,7E,9-décatrienal* | 1639 | 2150 | - | 0,1 |
| 3,9-diméthyl-6-isopropyl-2E,7E,9-décatrienal* | 1639 | 2155 | 0,1 | 0,1 |
| total (%) | | | 87,6 | 91,7 |
| Rdt% | | | 0,2% | 0,4% |

^a *Ordre d'élution et pourcentages des composés donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les noms sont suivis d'un astérisque. * : pourcentage sur colonne polaire ; # : pourcentages calculés avec les intensités des signaux des carbones (RMN-¹³C), Ir A, Ir P : indices de rétention sur colonne apolaire et polaire ; tous les constituants sont identifiés par CPG ; l'écriture en gras les constituants identifiés par la RMN du carbone-13 ; , tr. ≤ 0,05% ;*

IV. ETUDE DE LA VARIABILITE CHIMIQUE DE *SANTOLINA CORSICA*.

Dans le but de mettre en évidence une éventuelle variabilité chimique, nous avons analysé 33 échantillons d'huile essentielle préparés à partir de parti aériennes. Ceux-ci proviennent de 4 stations situées à l'étage méso méditerranéen (environ 500 mètres d'altitude (Bistuglio, Casanova, Sermano, Isolaccio di Fiumorbo). Nous avons récolté le matériel végétal durant les mois de Juin-Juillet et la période 2005-2006. 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 0,12% et 0,97%. Les échantillons obtenus ont ensuite été analysés par CPG/Ir ainsi que par RMN du carbone-13. L'identification des constituants a été réalisée par CPG/Ir (Ir sur colonnes polaire et apolaire), en tenant compte de la composition chimique détaillée de l'huile essentielle exposée précédemment, et par RMN du carbone-13 lorsque leur teneur dépassait la limite de détection du spectromètre (environ 0,5%).

Sur l'ensemble des 33 échantillons (annexe 30), nous avons identifié 50 constituants qui représentent de 78,6% à 92,7% de la composition globale. A une exception près, l'ensemble des échantillons est caractérisée par l'association santolina

triène (9,3-42,9%), myrcène (6,1-37,1%), et le β -phellandrène (3,3-26,9%). Le sabinène (1,4-7,2%) et le β -pinène (1,6-7,1%) sont présents dans l'ensemble des échantillons. Parmi les monoterpènes irréguliers, le lyratol présente des teneurs proches de 10% (5,3-10,3%) dans 19 échantillons sur 33. Son pourcentage est environ deux fois plus faible dans 10 échantillons (2,3-4,5%) et très faible dans deux échantillons (0,3 et 1,5%). Dans les deux derniers échantillons, il atteint 11,8 et 14,4%. Le pourcentage des autres monoterpènes irréguliers varie notablement : yomogi alcool (0-3,7%), isolyratone (0,4-2,3%), *épi*-isolyratol (0,7-3,0%), isolyratol (1,6-6,4%), artémisia alcool (0-2,4%), lyratal (0,2-1,7%), lavandulol (0-0,5%), acétate de lyratyle (0,1-1,9%), butyrate de lyratyle (0-0,4%), isovalérate de lyratyle (0-0,2%) et (Z) et (E) sesquilandulal (0-0,9% et 0-0,8%).

Nous avons soumis nos résultats à des analyses statistiques des données (ACP et K-means). Cependant, celles-ci ne permettent pas de distribuer les 33 échantillons étudiés dans des groupes clairement constitués. Nous pouvons en conclure qu'il n'y a pas de différences significatives entre les différentes stations étudiées. Seul un échantillon (n°32, station Bistugliu), qui présente comme composés majoritaires, outre le myrcène (24,1%), le β -phellandrène (11,9%) et surtout une teneur élevée en artémisia cétone (18,9%), apparaît séparé des 32 autres échantillons. Le pourcentage de cette cétone est plus faible dans 4 échantillons (1,2-4,5%) et n'excède pas 0,5% dans les autres. Une composition chimique similaire avec l'artémisia cétone majoritaire (20,0%) suivi du β -phellandrène (14,4%), du myrcène (11,7%) et du santolina triène (8,2%) avait été décrite par Rossi et al. Pour un échantillon collecté au centre de la Corse. Cette composition apparaît atypique et ne peut pas être considérée comme représentative de la composition chimique de l'huile essentielle de *Santolina corsica* de Corse.

La composition chimique de l'huile essentielle de *Santolina corsica* de Corse diffère aussi de celle décrite pour un échantillon collecté en Sardaigne dont la composition chimique de l'huile essentielle est dominée par le camphre (18,5%), l'artémisia cétone (12,9%) et le bornéol (7,4%).

V. ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *SANTOLINA CORSICA*.

L'activité biologique de l'huile essentielle de *Santolina corsica* a été réalisée en collaboration avec l'équipe « Biochimie et biologie moléculaire du végétal » dirigée par Mme le professeur Liliane Berti et s'inscrivent dans les travaux de thèses de Paul-Georges Rossi qui a soutenu sa thèse de doctoral en 2007. L'huile essentielle et différentes fractions obtenues par chromatographie sur gel de silice ont été testées sur six micro-organismes suivants qui sont des pathogènes humains fréquemment rencontrés :

- Bactéries gram + : *Staphylococcus aureus* CPI53.156 (ATCC 6538P) et *Listeria innocua* CIP80.11 T (ATCC33090) 335,

- Bactéries gram - : *Enterobacter aerogenes* CIP 60.86 T (ATCC 13048) et *Escherichia coli* CIP 54.8(ATCC11775), *Pseudomonas aeruginosa* CIP A22 et *Campylobacter jejuni* NCTC 11168.

La méthode de diffusion par disques est utilisée et la zone d'inhibition est mesurée en mm. Les témoins positifs sont la pénicilline G (*S. aureus*), la rifampicine (*L. Innocua*), l'amikacine (*C. jejuni*) et la ciproflaxine (*E. Coli*, *P. Aeruginosa* et *E. Aerogenes*). Le DMSO (10%) est utilisé comme témoin négatif.

Tableau 32 : activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Santolina corsica*.

| Echantillons | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E. aerogenes</i> | <i>E. coli</i> | <i>L. innocua</i> | <i>S. aureus</i> | <i>C. jejuni</i> |
|-------------------|----------------------|---------------------|----------------|-------------------|------------------|------------------|
| Huile essentielle | 6 | 6.4 | 6.6 | 9.5 | 14.7 | 39.0 |
| Antibiotique | 34.2 | 29.7 | 34.6 | 34.3 | 41.8 | 35.0 |
| Témoin négatif | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |

L'activité antibactérienne contre *L. innocua* apparaît modérée tandis que la croissance de *S. aureus* (14,7 mm) et surtout *C. jejuni* (39 mm) est fortement inhibée. Afin de cibler les composés responsables de l'activité vis-à-vis de *S. aureus* et de *C. jejuni*, nous avons réalisé le fractionnement d'un échantillon d'huile essentielle sur gel de silice. Nous avons obtenu deux fractions. La fraction éluée au pentane « hydrocarbonée » et la fraction éluée à l'oxyde de diéthyle « oxygénée ». Afin d'augmenter la teneur en lyratol, une partie de cette dernière fraction a été soumise à une chromatographie sur gel de silice avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle

Tableau 33 : activité antibactérienne de fractions de l'huile essentielle de *S. corsica*.

| Echantillons | <i>S. aureus</i> | <i>C. jejuni</i> |
|------------------------------------|------------------|------------------|
| Fraction hydrocarbonée | 8.5 | 27.5 |
| Fraction oxygénée | 17.7 | 62.6 |
| Fraction enrichie en lyratol (84%) | 19 | 90 |
| Témoin positif (antibiotique) | 41,8 | 35 |
| Témoin négatif | 6 | 6 |

Comme attendu, l'activité de la fraction éluée au pentane qui contient majoritairement du myrcène est très faible. Par contre, la fraction éluée à l'oxyde de diéthyle et plus encore la fraction enrichie en lyratol montre des diamètres d'inhibition importants surtout vis-à-vis de *C. jejuni* (90 mm). Ces résultats indiquent que le lyratol est bien le responsable de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Santolina corsica*.

CONCLUSION

Conclusion

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'une contribution à la valorisation des ressources naturelles et plus particulièrement sur les huiles essentielles. Les huiles essentielles, qui trouvent de nombreuses applications dans des secteurs très variés, se présentent sous forme de mélanges complexes. Cette complexité réside à la fois dans le fait que les constituants possèdent des structures construites à partir de la même entité (synthon isoprénique) mais conduisant paradoxalement à une grande diversité de squelettes. La détermination de la composition chimique, la mise en évidence d'une éventuelle spécificité et le contrôle de la qualité constituent des étapes nécessaires pour la valorisation et donc la commercialisation dans les meilleures conditions possibles.

Deux stratégies sont traditionnellement utilisées pour réaliser ces analyses. 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 SM mais surtout par la RMN ^1H et de plus en plus, par la RMN ^{13}C .

L'équipe « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse s'inscrit dans une autre démarche et a mis au point et développé une méthode analytique axée sur l'utilisation de la RMN ^{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. Cette méthode a été appliquée avec succès à l'analyse de plusieurs familles de composés tels que les terpènes dans les huiles essentielles.

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 notre méthode d'analyse par RMN du carbone-13 par rapport à ces techniques conventionnelles et nous avons montré à travers de nombreux exemples que la RMN du carbone-13 constitue un outil tout à fait adapté à l'analyse des mélanges complexes, à conditions toutefois de fixer et de contrôler soigneusement les conditions expérimentales.

Le deuxième chapitre, nous avons étudié le phénomène de la variation des déplacements chimiques. En effet, l'identification, par RMN ^{13}C , des terpènes présents dans une huile essentielle, nécessite la comparaison des valeurs des déplacements chimiques des carbones dans le mélange avec celles de produits de référence. Dans ce contexte, la variation des déplacements chimiques entre les spectres des composés de référence et ceux des mélanges s'avère un facteur déterminant pour réaliser l'identification. Ainsi nous avons étudié, de nombreux mélanges binaires associant des alcools possédant la sous structure linalol (linalol, nérolidols et géranyllinalol) considérés comme molécules de références avec diverses molécules oxygénées (phénol, alcool, oxyde, cétone, aldéhydes ester). Il ressort de cette étude que les variations des déplacements chimiques sont liées à la présence de liaisons hydrogène intermoléculaires. En présence des dérivés phénoliques, la liaison hydrogène s'établit entre l'atome d'hydrogène de la fonction phénol et l'oxygène du linalol. En présence de molécules carbonyles ou d'autres alcools, on peut imaginer que la liaison hydrogène s'établit entre l'hydrogène de l'hydroxyle et l'oxygène simplement ou doublement lié de la molécule partenaire. Les variations des déplacements chimiques concernant des Csp^2 , situés en δ et ϵ de l'hydroxyle dans les alcools possédant la sous structure linalol (linalol, nérolidols et géranyllinalol) demeurent inexplicées. Ces variations qui ne s'atténuent pas avec l'allongement de la chaîne carbonée (nérolidols et géranyllinalol), traduisent une probable interaction entre la double liaison C6-C7 et les fonctions oxygénées. Des liaisons de Van der Waals entre un dipôle permanent (la fonction oxygénée) et un dipôle induit (la double liaison) pourraient être impliquées

Conclusion

dans ces variations. Enfin, en ce qui concerne les d'aldéhydes α , β -insaturés, les variations les plus importantes sont observées sur les carbones C1 et C3. Ces variations sont nettement plus importantes quand l'aldéhyde est en mélange avec un phénol qu'avec un autre composé oxygéné. Par ailleurs, nous observons des effets opposés suivant que l'on mélange un aldéhyde avec un phénol ou un alcool ou avec un acétate.

La deuxième partie de notre travail (chapitres 3, 4 et 5) a été consacrée à la caractérisation d'huiles essentielles de *Clinopodium ascendens* de Madère, et de *Bupleurum fruticosum* et *Santolina corsica* de Corse. Pour chaque huile essentielle, 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 ^{13}C).

L'étude sur l'huile essentielle de *Clinopodium ascendens* a été réalisée dans le cadre d'une collaboration entre l'Université de Madère au Portugal (analyses par CG/SM et activité antibactérienne) et notre équipe (fractionnement, identification des constituants. Après fractionnement, vingt trois composés, qui représentent 97,3% de la composition chimique de l'huile essentielle, ont été identifiés. L'huile essentielle est caractérisée par la présence à des teneurs très importantes de la *cis*-isopulégone (75,2%) et d'autres composés possédant le squelette menthanique substitué en C3 : la *trans*-isopulégone (4,5%), la pulégone (6,9%) et trois des quatre isomères de l'isopulégol: le *néoiso*-isopulégol (6,0%), le *néo*-isopulégol (0,2%) et l'*iso*-isopulégol (0,2%). La composition chimique de cette huile essentielle, diffère considérablement de celle des échantillons d'origine espagnole ou turque qui ont fait l'objet d'études. De plus, la *cis*-isopulégone joue un rôle d'antibiotique aussi important que celui dévolu à la pulégone elle-même.

Le chapitre 4 a été consacré à l'étude de l'huile essentielle de *Bupleurum fruticosum*, le buplèvre ligneux. Après fractionnement, nous avons mis en évidence 33 composés qui représentent 97,8% de la composition chimique totale. La plupart des

Conclusion

composés ont été identifiés grâce à la bibliothèque « terpènes » élaborée au laboratoire. Deux esters de cinnamyle ont été identifiés après synthèse (2-méthyl butyrate et isovalérate). L'analyse en composante principale réalisée sur 37 échantillons avec les teneurs des 13 composés les plus abondants montre que l'huile essentielle de buplèvre ligneux de Corse est caractérisée par un pourcentage très élevé de β -phellandrène qui représente plus des deux tiers de la composition totale. Les différentes parties du végétal (feuilles, tiges et fleurs) présentent aussi cette même composition chimique. Nous avons testé une nouvelle technique d'obtention des huiles essentielles par micro-ondes SFME (Solvant Free Extraction Microwave). Cette méthode rapide et respectueuse de l'environnement permet d'obtenir une huile essentielle dont la composition est très voisine de celle obtenue par hydrodistillation. Enfin, nous avons caractérisé un extrait d'hydrolat de *B. fruticosum* de Corse pour la valorisation dans le futur.

Enfin, la dernière partie de notre travail a concerné la caractérisation de l'huile essentielle d'une plante endémique cyrno-sarde, de *Santolina corsica* de Corse. Au terme du fractionnement, 50 constituants ont été identifiés. Cette huile essentielle été caractérisée par la présence de terpènes irréguliers possédant les squelettes artémisane, santolinane, lavandulane, chrysanthémane et sesquilandulane et représentant près de 30% de la composition globale des échantillons. Nous avons mis en évidence les potentialités de la méthode pour identifier les molécules terpéniques irrégulières et en particulier des diastéréoisomères (isolyratol et épi-isolyratol) qui présentent souvent des spectres de masse insuffisamment différenciés et des indices de rétention très proches. La réalisation d'un échantillonnage sur l'ensemble de la Corse a permis de montrer que l'huile essentielle de *Santolina corsica* est caractérisée par l'association du myrcène, du β -phellandrène et du santolina triène, permettant ainsi aux professionnels installés en Corse de disposer de données objectives. En collaboration avec l'équipe « Biochimie et biologie moléculaire du végétal » nous avons montré que l'huile essentielle de *Santolina corsica*, et plus particulièrement le lyratol, alcool monoterpénique irrégulier présentent une activité antimicrobienne vis-à-vis de *C. jejuni*. Cette étude a aussi permis d'identifier les monoterpènes irréguliers minoritaires

Conclusion

dans l'huile essentielle d'*Artemisia-herba-alba* Asso de Tunisie dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut des Régions Arides de Médénine. Ces résultats ont fait l'objet de la rédaction d'un article accepté pour publication dans Journal of Essential Oil Research.

PARTIE EXPERIMENTALE

MATERIEL VEGETAL

Les parties aériennes de *Santolina corsica* ont été prélevées en pleine floraison (juin-juillet 2005 et 2006) et distillées moins de 24 heures après la récolte. Les parties aériennes de *Bupleurum fruticosum* ont été prélevées avant, pendant et après floraison durant la période 2005-2007. Les rendements sont calculés par rapport à la masse de végétal frais.

HYDRODISTILLATION ET EXTRACTIONS

Les hydrodistillations ont été réalisées avec un appareil de type Clévenger (réacteurs de 2 et de 6 litres), pendant une durée de quatre heures. L'huile essentielle est conservée dans des flacons en verre ambrée à une température de 8°C.

Les extractions sans solvant assistées par micro-ondes ont été réalisées avec un four micro-ondes de laboratoire Milestone DRYDIST dont les dimensions sont les suivantes 35 cm x 35 cm x 35 cm (recouvert de PTFE). La fréquence micro-ondes est de 2450 MHz avec une puissance maximale de 1200 W pouvant être incrémentée de 1 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 150 g de parties aériennes de *Bupleurum fruticosum* dans le réacteur de 2 L. la durée de préchauffage est de 5 minutes avec une puissance de 500W, et une température de 200°C. La durée d'extraction est de 30 minutes avec une puissance 500W et une température de 100°C.

L'hydrolat de *Bupleurum fruticosum* (300 mL environ) a été extrait par l'oxyde de diéthyle (3 x 30 mL). Après séchage sur MgSO₄ puis évaporation du solvant, on obtient l'extrait.

CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE OUVERTE

L'huile essentielle de *Clinopodium ascendens* (531 mg) a été fractionnée par CC sur gel de silice de flash (ICN 200-500 μm , 25 g). Les fractions sont éluées au pentane (fraction oléfinique F1= 8,4 mg) puis à l'oxyde de diéthyle/pentane=3/97 (F2=131,7 mg, F3=183,9 mg, F4=95,0 mg, F5=78,9 mg) puis l'oxyde de diéthyle (F6=12 mg, F7=18 mg).

L'huile essentielle de *Bupleurum fruticosum* (1030 mg) a été fractionnée par CC sur gel de silice de flash (ICN 200-500 μm , 25 g). Les fractions sont éluées au pentane (fraction oléfinique F1= 812 mg, F2=18 mg), puis à l'oxyde de diéthyle/pentane=3/97 (F3=115 mg), puis l'oxyde de diéthyle (F4=86 mg).

L'huile essentielle de *Santolina corsica* (2134 mg) a été fractionnée par CC sur gel de silice de (ICN 60-200 μm , 25 g). Les fractions sont éluées au pentane (fraction oléfinique F1= 1142 mg, F2=59 mg), puis l'oxyde de diéthyle (F3=821 mg). La fraction F3 a été de nouveau soumise à un fractionnement par CC sur gel de silice (ICN 60-200 μm , 9 g). Les fractions sont éluées à l'oxyde de diéthyle/pentane=2/98 (F3.1=108 mg), puis à l'oxyde de diéthyle/pentane=3/97(F3.2=35 mg), puis à l'oxyde de diéthyle/pentane=5/95 (F3.3= 80 mg), puis à l'oxyde de diéthyle/pentane =10/90 (F4= 61 mg), enfin à l'oxyde de diéthyle (F3.5=130 mg). La fraction F3.1 a été fractionnée par CC sur gel de silice (ICN 35-70 μm , 5 g). Les fractions sont éluées à l'oxyde de diéthyle/pentane=2/98 (F3.1.1=51 mg), puis à l'oxyde de diéthyle/pentane=3/97(F3.1.2=35 mg), puis à l'oxyde de diéthyle/pentane=5/95 (F3.1.3= 4 mg),

CHROMATOGRAPHIE SUR GEL DE SEPHADEX

Nous utilisons 10g de séphadex dans 40 mL d'une solution de dichlorométhane-hexane (gradient 50/50) pendant 48 heures. Durant la chromatographie, l'élution est réalisée en mode isocratique en utilisant le dichlorométhane (100 mL) comme éluant.

PREPARATION DES COMPOSES

Réduction

Néo-iso-isopulégol

Un échantillon d'HE qui contient 75,2% de cis isopulégone (104 mg) en solution dans 20 ml de Et₂O anhydre est additionné goutte à goutte à une suspension de LiAlH₄ (27,5 mg) dans 30 ml de Et₂O anhydre refroidie par un bain d'eau glacée. Le mélange réactionnel, sous agitation magnétique, est ensuite porté à flux durant trois heures puis hydrolysé par addition d'une solution de NaOH 15% (2 mL) suivie d'eau glacée (2 mL). A l'aide d'une ampoule à décanter, la solution est lavée jusqu'à neutralité puis séchée sur Na₂SO₄. Le solvant est évaporé à l'évaporateur rotatif. Le mélange obtenu (80 mg) contient 79% de néo-iso-isopulégol.

Estérification

Dans un ballon bicol surmonté d'un réfrigérant et muni d'une ampoule à brome, l'alcool (1 équivalent) ainsi que la triéthylamine Et₃N (1,5 équivalents) sont mis en solution dans 30 ml de dichlorométhane, sous agitation magnétique. La solution est refroidie par un bain de glace. On additionne alors le chlorure d'acyle (2,5 équivalents dans 30 ml de dichlorométhane) goutte à goutte à l'aide de l'ampoule à brome. Le mélange réactionnel, laissé sous agitation, est porté à reflux pendant trois heures. On effectue alors un lavage à l'eau du mélange jusqu'à pH neutre. En fin la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium MgSO₄ et le solvant est éliminé à l'évaporateur rotatif. L'ester est alors purifié par CC sur gel de silice. Les rendements n'ont pas été optimisés.

isovalérate de cinnamyle :

cinnamyl alcool : 0,519 g (3,87 mmoles) ; Et₃N : 0,780 g (7,74 mmoles) ;

chlorure d'acide isovalérique : 0,978 g (7,74 mmoles), isovalérate de cinnamyle : 0,665 g (rendement : 78,6%)

2-méthyle butyrate de cinnamyle :

cinnamyl alcool : 0,276 g (2,05 mmoles) ; Et₃N 0,326 g (3,22 mmoles) ;

chlorure de l'acide 2-méthyle butyrique : 0,518 g (4,29 mmol) ; 2-méthyle butyrate de cinnamyle : 0,347 g (rendement : 80,3%)

butyrate de lyratyle :

mélange contenant le lyratol 70% 0,080 g (0,37 mmol), Et₃N : 0,105 g (0,80 mmol)
chlorure d'acide butyrique : 0,210 g (1,56 mmol) ; butyrate lyratyle : 0,027 g (0,12 mmol) rendement 32%

SM 70 eV, *m/z* (int. rel): 134(20), 121(12), 119(85), 106(17), 105(21), 93(28), 92(15), 91(35), 79(27), 77(22), 71(92), 55(15), 53(15), 43(100), 41(47), 39(21)

isovalérate de lyratyle :

mélange contenant le lyratol 70% : 0,053 g (0,35 mmol) ; Et₃N : 0,062 g (0,61 mmol) ; chlorure d'acide isovalérique : 0,102 g (0,85 mmol) ; isovalérate lyratyle : 0,043 g (0,18 mmol), (rendement : 51%).

SM 70 eV, *m/z* int. rel): 134(20), 121(12), 119(85), 106(17), 105(21), 93(28), 92(15), 91(35), 79(27), 77(22), 71(92), 55(15), 53(15), 43(100), 41(47), 39(21)

Oxydation

Oxydation du lyratol

Le lyratol (0,06 g ; 0,39 mmol) est mis en solution dans le chloroforme (5 mL) avec l'oxyde de manganèse (MnO₂) (0,101 g, 1,17 mmol) pendant une nuit à température ambiante avec agitation. Après filtration, la phase organique est séchée sur MgSO₄. Le solvant est chassé à l'évaporateur rotatif. On obtient le lyratol (56 mg, 0,31 mmol, rendement : 93%)

Oxydation du isolyratol et épi-isolyratol

Dans un ballon bicol surmonté d'un réfrigérant et muni d'une ampoule à brome, un mélange contenant l'isolyratol et l'épi-isolyratol (15 mg, 0,1 mmol) est mis en solution dans 2 mL de chloroforme, sous agitation magnétique. Le chlorochromate de pyridinium (43,5 mg, 0,2 mmol) est introduit en plusieurs ajouts. La solution est agitée pendant trois heures dans un bain de glace, puis à température ambiante pendant

trois heures. On effectue alors une filtration. Le solvant est éliminé à l'évaporateur rotatif et on obtient 13,5 mg de produit.

Epi-isolyratol : SM 70 eV, m/z (int. rel): 83(10), 82(100), 81(14), 79(15), 77(8), 71(70), 67(97), 65(9), 55(12), 53(22), 43(57), 41(63), 39(45), 40(9).

Isolyratone : SM 70 eV, m/z (int. rel): 135(5), 122(5), 107(8), 94(10), 81(8), 79(13), 77(7), 70(7), 69(90), 53(15), 42(8), 41(100), 39(58), 38(5).

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Les analyses de chromatographie en phase gazeuse ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe *Perkin Elmer Autosystem*, équipé d'un injecteur diviseur, de deux colonnes capillaires (50 m x 0,22 mm d.i ; épaisseur du film : 0,25 m), polaire (BP-20, polyéthylène glycol) et apolaire (BP-1, polyméthylsiloxane) et de 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 : 250°C ; température des détecteurs : 250°C ; programmation de température : de 60 à 220°C à 2°C/min puis un palier de 20 min à 220°C ; injection : mode split 1/60.

COUPLAGE CPG/SM

Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer autosystem XL, doté d'un injecteur automatique et de deux colonnes de polarité différentes (Rtx-1, polydiméthyl-siloxane, 50 x 0,22 mm d.i., et Rtoc-WAX, polyéthylène glycol, 60x0,25mm d.i.) couplé à un détecteur de masse Perkin TURBO MASS. Les molécules sont bombardées dans une source d'ionisation de 150°C par un faisceau électronique de 70eV, la détection se fait par un analyseur quadripolaire constitué d'un assemblage de quatre électrodes parallèles de section cylindrique. Le gaz vecteur est l'hélium et exerce une pression en tête de colonne de 43 psi. Le programme utilisé est une augmentation de température de 60 à 230°C par élévation de 2°C par minute avec un palier à 230°C pendant 30 minutes. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/80.

RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

Bruker 400 AVANCE, 9,4 Tesla, opérant à 400,132 MHz pour le proton et à 100,623 MHz pour le carbone-13

RMN du proton

Les spectres de RMN du proton ont été enregistrés avec les paramètres suivants : sonde de 5 mm : 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). Afin d'améliorer la résolution la multiplication de la FID par une exponentielle de type Lorentz-Gauss est utilisée.

RMN du carbone-13

Les spectres du carbone-13 ont été enregistrés avec les paramètres suivants : Sonde de 5 mm : 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 (250 ppm) ; résolution digitale de 0,183 Hz/pt. Le nombre d'accumulations est compris entre 2000 et 10000 pour chaque enregistrement. Les données du signal de précession libre (FID) sont multipliées avant la transformée de Fourier par une fonction exponentielle (LB = 1,0 Hz).

Pour l'enregistrement des spectres des huiles essentielles, une masse de 40 à 70 mg d'huile essentielle est dissoute dans 0,5ml de CDCl_3 additionné de tétraméthylsilane (TMS). Les déplacements chimiques sont donnés en ppm (δ) par rapport au TMS pris comme référence interne.

Expérience d'écho de spin

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 $[1/J(C,H)]$ calculé pour une constante de couplage $J(C,H) = 125\text{Hz} : 8,0 \text{ ms}$.

RMN 2D

Pour enregistrer les spectres de RMN 2D mettant en jeu les corrélations hétéronucléaires (HSQC, HMBC), nous avons utilisé les séquences impulsionnelles définies par les programmes Bruker.

Corrélation proton-proton COSY

Le spectre de corrélation proton-proton a été obtenu avec la séquence 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.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

1. Bruneton J., Pharmacognosie, Phytochimie Plantes Médicinales, 2^e édition, Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 1993.
2. Teisseire P.J., Chimie des substances odorantes, Tec & Doc., Lavoisier, Paris, 1991.
3. Coleman W.M., Lawrence B.M., A comparison of selected analytical approaches to the analysis of an essential oil, *Flav. Fragr. J.*, 1997, **12**, 1-8.
4. Joulain D., Methods for analyzing essential oils. Modern analysis methodologies : use and abuse, *Perfumer & Flavorist*, 1994, **19**, 5-17.
5. Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Wittier P. - Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Masson, Paris, 1995.
6. Martin A.J.P., Synge R.L.M., A new form of chromatogram employing two liquide phases. 1. A theory of chromatography. 2. Application of the microdetermination of the higher monoaminoacids in proteins, *Biochem. J.*, 1941, **35**, 1358-1368.
7. Kováts E., Gas chromatographic characterisation of organic substances in the retention index system, *Advances in Chromatography*, 1965, **1**, 229-247.
8. Van Den Dool H., Kratz P.D., A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, *J. Chromatogr.*, 1963, **11**, 463-471.
9. Grundschober F., The identification of individual components in flavorings and ed foods, *Z. Lebensm Unters Forsch*, 1991, **192**, 530-534.
10. Bielicka-Daszkiwicz K., D' bicka M., Voelkel A., Comparison of three derivatization ways in the separation of phenol and hydroquinone from water samples, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1052**, 233-236.
11. Rojas-Escudero E., Alarcón-Jiménez A. L., Elizalde-Galván P., Rojo-Callejas F., Optimization of carbohydrate silylation for gas chromatography, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1027**, 117-120.
12. Phillips J.B., Beens J., Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a hyphenated method with strong coupling between the two dimensions, *J. Chromatogr. A*, 1999, **856**, 331-347.
13. Dallüge J., Beens J., Brinkman U.A.T., Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool, *J. Chromatogr. A*, 2003, **1000**, 69-108.

Bibliographie

14. Vendeuvre C., Bertoncini F., Duval L., Duplan J.L., Thiébaud D., Hennion M. C., Comparison of conventional gas chromatography and comprehensive two-dimensional gas chromatography for the detailed analysis of petrochemical samples, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1056(1-2)**, 155-162.
15. Songa S.M., Marriott P., Kotsosb A., Drummerb O.H., Wynne P., Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry (GC/GC-TOFMS) for drug screening and confirmation, *Forensic Sci. Int.*, 2004, **143(2-3)**, 87-101.
16. Tranchida P.Q., Dugo P., Dugo G., Mondello L., Comprehensive two-dimensional chromatography in food analysis, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1054(1-2)**, 3-16.
17. Marriott P., Shellie R., Fergeus J., Ong R., Morrison P., High resolution essential oil analysis by using comprehensive gas chromatographic methodology, *Flav. Fragr. J.*, 2000, **15**, 225-239.
18. Mondello L., Casilli A., Tranchida P.Q., Dugo P., Dugo G., Comprehensive two-dimensional GC for the analysis of citrus essential oils, *Flav. Fragr. J.*, 2005, **20**, 136-140.
19. Sandra P., Bicchi C., Capillary gas chromatography in essential oil analysis, Huethig, Heidelberg, 1987.
20. Jennings W., Shibamoto T., Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography, Jovanovich H.B. Ed., Academic Press, New York, 1980.
21. Masada Y., Analysis of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry, John Wiley & sons, New York, 1976.
22. National Institute of Standards and Technology, PC Version 1.7 of The NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, The Perkin Elmer Corporation, 1999.
23. Mc Lafferty F.W., Stauffer D.B., Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th ed., Mass spectrometry library search system BenchTop/PBM, version 3.10d. Palisade Co., Newfield, 1994.
24. Joulain D., König W.A., The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons, E.B.-Verlag, Hamburg, 1998.
25. Adams R.P., Identification of essential oils by Ion Trap Mass Spectroscopy, Academic Press, Inc., San Diego, 1989.

Bibliographie

26. Lianga Y.Z., Xieb P., Chan K., Quality control of herbal medicines, *J.Chromatogr. B*, 2004, **812**, 53-70.
27. Maia J.G.S., Andradeb E.H., das Graças M., Zoghbib B., Aroma volatiles from two fruit varieties of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.), *Food Chem.*, 2004, **85**, 195-197.
28. Chericoni S., Flamini G., Campeol E., Cioni P. L., Morelli I., GC-MS analyses of the essential oil from the aerial parts of *Artemisia verlotiorum*: variability during the year, *Biochem. Syst. Ecol.*, 2004, **32(4)**, 423-429.
29. Bilia A.R., Flamini G., Taglioli V., Morelli I., Vincieri F.F., GC-MS analysis of essential oil of some commercial Fennel teas, *Food Chem.*, 2002, **76(3)**, 307-310.
30. Senatore F., Arnold N.A., Piozzi F., Chemical composition of the essential oil of *Salvia multicaulis* Vahl. var. *simplicifolia* Boiss. growing wild in Lebanon, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1052(1-2)**, 237-240.
31. Adio A.M., Paul C., Kloth P., König W.A., Sesquiterpenes of the liverwort *Scapania undulata*, *Phytochem.*, 2004, **65(2)**, 199-206.
32. Vernin G., Petitjean M., Poite J. C., Metzger J., Fraisse D., Suon K. N., Computer aids to chemistry, Vernin G., Chanon M., Horwood E., Eds, Chapitre VII, 294-333.
33. Vernin G., Metzger J., Suon K. N., Fraise D., Ghiglione C., Hamoud A., Párkányi C., GC/MS-SPECMA bank analysis of essential oils and aromas. GC/MS (EI-PCI) data bank analysis of sesquiterpenic compounds in juniper needle oil- Application of the mass fragmentometry SIM technique, *Lebensmittel-Wissenschaft and technology*, 1990, **23**, 25-33.
34. Vernin E., Pujol L., Vernin G., Metzger J., Analyse par CPG/SM/banque SPECMA des constituants mineurs d'une essence de feuilles de girofle d'Indonésie. Alkylation en catalyse par transfert de phase (CTP) des phénols du girofle, *Parfums, Cosmétiques, Arômes*, 1989, **89**, 81-94.
35. Vernin G., Volatil constituents of the essential oil of *Santolina chamaecyparissus* L., *J. Essent. Oil Res.*, 1991, **3**, 49-53.
36. Cavaleiro C., Oleos essenciais de *Juniperus* de Portugal, Thèse de Doctorat, Université de Coimbra, Portugal, 2001.
37. Schultze W., Lange G., Schmaus G., Isobutane and ammoniac chemical ionization mass spectrometry of sesquiterpene hydrocarbons, *Flav. Fragr. J.*, 1992, **7**, 55-64.

Bibliographie

38. Lange G., Schultze W., Differentiation of isopulegol isomers by chemical ionization mass spectrometry, in Bioflavour'87, P. Schreier Ed., W. de Gruyter & Co., Berlin, New-York, 1988 b, 115-122.
39. Paolini J., Costa J., Bernardini A.F., 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, 2005, *J. chromatogr. A*, **1076**, 170-178.
40. George G., Applications de l'ICN à l'analyse des mélanges aromatiques, thèse de doctorat de l'Université de Nice, 1984.
41. Bruins A. P., Negative ion chemical ionisation mass spectrometry in the determination of components in essential oils, *Anal. Chem.*, 1979, **51**, 967-972.
42. Zupanc M., Prošek M., Dušan M., Combined CI and EI Mass Spectra in the Analysis of Essential Oils, *J. High Resol. Chromatogr.*, 1992, **15**, 510-513.
43. Cambon A., La spectrométrie de masse multidimensionnelle et ses applications à l'analyse des mélanges complexes, *Science, Technique, Technologie*, 1989, **11**, 4-10.
44. Yost R.A., Enke C.G., Triple Quadrupole Mass Spectrometry for Direct Mixture Analysis and Structure Elucidation, *Anal. Chem.*, 1979, **51**, 1251-1264.
45. Rouessac F., Rouessac A., Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes, 6ème édition, sciences sup, Dunod, Liège, 2004.
46. Decouzon M., Geribaldi S., Rouillard M., Stural J.M., A New Look at the Spectroscopic properties of Dihydrocarveol Stereoisomers, *Flav. Fragr. J.*, 1990, **5**, 147-152.
47. Sellier N., Cazaussus A., Budzinski H., Lebon M., Structure determination of sesquiterpenes in chinese vetiver oil by gas chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1991, **557**, 451-458.
48. Sasaki T.A., Wilkins C.L., Gas chromatography with fourier transform infrared and mass spectral detection, *J. Chromatogr. A*, 1999, **842**, 341-349.
49. Iob A., Buenafe R., Abbas N.M., Determination of oxygenates in gasoline by FTIR, *Fuel*, 1998, **77(15)**, 1861-1864.
50. Thomaidis N.S., Georgiou C.A., Edible oil analysis by flow injection, *Lab. Autom. Inf. Manag.*, 1999, **34(2)**, 101-114.

Bibliographie

51. Latrasse A., Sémon E, Le Quéré J.L., Composition and major odorous compounds of the essential oil of *Bifora radians*, an aldehyde-producing weed, *J. High Resol. Chromatogr.*, 1991, **14**, 549-553.
52. Coleman III W.M., Gordon B.M., Lawrence B.M., Examinations of the matrix isolation fourier transform infrared spectra of organic compounds: part XII, *Appl. Spectrosc.*, 1989, **43**, 298-304.
53. Chamblee T.S., Karelitz R.L., Radford T., Clark B.C., Identification of sesquiterpenes in *Citrus* essential oils by cryofocusing GC/FT-IR, *J. Essent. Oil Res.*, 1997, **9**, 127-132.
54. Wilkins C.L., Multidimensional GC for qualitative IR and MS of mixtures, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 295-301.
55. Hedges L.M., Wilkins C.L., Components analysis of eucalyptus oil by Gas Chromatography-Fourier Transform-Infrared Spectrometry-Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. Sci.*, 1991, **29**, 345-350.
56. Krock K. A., Rangunathan N., Wilkins C. L., Multidimensional Gas Chromatography Coupled with Infrared and Mass Spectrometry for Analysis of *Eucalyptus* Essential Oils, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 425-430.
57. Dugo P., Mondello L., Dugo L., Stancanelli R., Dugo G., LC-MS for the identification of oxygen heterocyclic compounds in citrus essential oils, *J. pharm. Biomed. Anal.*, 2000, **24**, 147-154.
58. Wolfender J.L., Hostettmann K., Importance of LC/MS in plant analysis, *Spectroscopy Europe*, 1996, **8**, 7-12.
59. Kemmo S., Ollilainen V., Lampi A.-M., Piironen V., Determination of stigmasterol and cholesterol oxides using atmospheric pressure chemical ionisation liquide chromatography/mass spectrometry, *Food Chem.*, 2007, **101**, 1438-1445.
60. La Torre G.L., Saitta M., Vilasi F., Pellicanò T., Dugo G., Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection, *Food Chem.*, 2006, **94**, 640-650.
61. Waridel P., Wolfender J.-L., Lachavanne J.-B., Hostettmann K., 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.*, 2004, **65**, 2401-2410.
62. Mroczek T., Ndjoko K., Glowniak K., Hostettmann K., On-line structure characterization of pyrrolizidine alkaloids in *Onosma stellulatum* and *Emilia coccinea*

Bibliographie

by liquid chromatography–ion-trap mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1056**, 91-97.

63. Van Bruijnsvoort M., Ottink S.J.M., Jonker K.M., de Boer E., Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1058(1-2)**, 137-142.

64. Wollgast J., Pallaroni L., Agazzi M.E., Anklam E., Analysis of procyanidins in chocolate by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric and tandem mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. A*, 2001, **926**, 211-220.

65. Mondello L., Dugo P., Bartle K.D., 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), *Flav. Fragr. J.*, 1995, **10**, 33-42.

66. Munari F., Dugo G., Cotroneo A., Automated On-line HPLC-HRGC with Gradient Elution and Multiple GC Transfer Applied to the Characterization of Citrus Essential Oils, *J. High Resol. Chromatogr.*, 1990, **13**, 56-61.

67. Korhammer S.A., Bernreuther A., Hyphenation of High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Other Chromatographic Techniques (SFC, GPC, GC, CE) with Nuclear Magnetic Resonance (NMR): A review, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1996, **354**, 131-135.

68. Grenier-Loustalot M.F., Grenier P., Bounoure J., Grall M., Panaras R., Couplage direct chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) et résonance magnétique nucléaire du proton (RMN 1H). Appareillage, méthodologie, exemple d'application, *Analisis*, 1990, **18**, 200-207.

69. Victoria M., Elipe S., Advantages and disadvantages of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a hyphenated technique, *Analytica Chimica Acta*, 2003, **497**, 1-25.

70. Wolfender J.L., Ndjoko K., Hostettmann K., LC/NMR in natural products chemistry, *Current Organic Chemistry*, 1998, **2**, 575-596.

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

72. Pusecker K., Albert K., Bayer E., Investigation of hop and beer bitter acids by coupling of highperformance liquid chromatography to nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Chromatogr. A*, 1999, **836**, 245–252.

Bibliographie

73. Andrade Fabio D. P., Santos Lourdes C., Datchler Markus, Albert Klaus and Vilegas Wagner, Use of on-line liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectroscopy for the rapid investigation of flavonoids from *Sorocea bomplandii*, *J. Chromatogr. A*, 2002, **953**, 287-291.
74. Novak P., Tepeš P., Fistrić I., Bratoš I., Gabelica V., 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.*, 2006, **40**, 1268-1272.
75. Corcoran O., Spraul M., LC–NMR–MS in drug discovery, *Drug Discov. Today*, 2003, **8**, 624-631.
76. Weyerstahl P., Marschall H., Splittgerber U., Wolf D., 1,7-Cyclogermacrene-1(10),4-dien-15-al, a Sesquiterpene with a Novel Skeleton, and Other Sesquiterpenes from Haitian Vetiver Oil, *Flav. Fragr. J.*, 2000, **15**, 61-83.
77. Weyerstahl P., Marschall H., Splittgerber U., Wolf D., Analysis of the Polar Fraction of Haitian Vetiver Oil, *Flav. Fragr. J.*, 2000, **15**, 153-173.
78. Weyerstahl P., Marschall H., Splittgerber U., Wolf D., Surburg H., Constituents of Haitian Vetiver Oil, *Flav. Fragr. J.*, 2000, **15**, 395-412.
79. Weyerstahl P., Marschall H., Splittgerber U., Wolf D., New Sesquiterpene Ethers from Vetiver Oil, *Liebigs Ann.*, 1996, **7**, 1195-1199.
80. Weyerstahl P., Marschall H., Splittgerber U., Wolf D., New cis-Eudesm-6-ene Derivatives from Vetiver Oil, *Liebigs Ann.*, 1997, **7**, 1783-1787.
81. Weyerstahl P., Schlicht V., Synthesis of rac-Bisabol-3(15),10-dien-7-ol, *Liebigs Ann.*, 1997, **8**, 1789-1790.
82. Braun N.A., Meier M., Kohlenberg B., Hammerschmidt F.J., δ -Terpinyl acetate. A new natural component from the essential leaf oil of *Laurus nobilis* L. (Laureaceae), *J. Essent. Oil Res.* 2001, **13**, 95-97.
83. Formáček V., Kubeczka K.H., Essential oils analysis by capillary gas chromatography and carbon-13 NMR spectroscopy, John Wiley & Sons, Chichester, 1982.
84. Formáček V., Kubeczka K.H., ^{13}C NMR analysis of essential oils, in aromatic plants: Basic and applied aspects. Margaris N., Koedam A., Vokou D., Ed., Martinus Nijhoff Publishers, La Haye, 1982, 177-181.
85. Corticchiato M., Casanova J., Analyse des mélanges complexes par RMN du Carbone-13 : application aux huiles essentielles, *Analisis*, 1992, **20**(1), 51-58.

Bibliographie

86. Tomi F., Bradesi P., Bighelli A., Casanova J., Computer-aided identification of individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy, *J. Magn. Reson. Anal.*, 1995, **1**, 25-34.
87. Günther H., 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, 1994.
88. Williamson M., Neuhaus D., The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis, VCH, New York, 1989.
89. Hesse M., Meier H., Zeeh B., Méthodes spectroscopiques pour la chimie organique, Masson, Paris, 1997.
90. Claridge T.D.W., High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry, Tetrahedron Organic Chemistry Series volume 19, Elsevier, Oxford, 1999.
91. Brekke T., Kvalheim O.M., Signal treatment and signal analysis in NMR, Chap.20, Rutledge D.N. Ed., Elsevier, Amsterdam, 1996.
92. Alemany L.B., Exceptional Resolution and New Signals Detected in the ^{13}C NMR Spectra of Alkanes, *Magn. Res. Chem.*, 1989, **27**, 1065-1073.
93. Allerhand A., Maple S.R., Ultrahigh-resolution NMR. This new technique makes it possible to use NMR for the non-separative structural and quantitative analysis of complex mixtures, *Anal. Chem.*, 1987, **59**, 441A-452A.
94. Brekke T., Aksnes D.W., Sletten E., Solvent shifts and component identification of hydrocarbon mixtures by carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance spectrometry, *Anal. Chem.*, 1988, **60**, 591-596.
95. Matlengiewicz M., Henzel N., Laurens T., Nicole D., Rubini P., Rodehüser L., Computer aided analysis of carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance spectra of multicomponent mixtures. Part 1. Analysis of individual components in a synthetic mixture of monoaromatic hydrocarbons, *Analisis*, 1991, **19**, 13-17.
96. Markowetz A., Rapp A., ^{13}C -NMR spectroscopy in the analysis of wine, fruit juices and honey, *Bruker Report*, 1990, **1**, 38-39.
97. Chon C., Poulard A., Rabiller C., 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*, 1996, **30**, 73-83.

Bibliographie

98. Kosir I.J., Kidric J., Identification of amino acids in wines by one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 50-56.
99. Gunstone F.D., ¹³C NMR Studies of Mono-, Di- and Tri-Acylglycerols Leading to Qualitative and Semi-Quantitative Informations About Mixtures of These Glycerol Esters, *Chem. Phys. Lipids*, 1991, **58**, 219-224.
100. Bonnet M., Denoyer C., Renou J.P., High Resolution ¹³C NMR Spectroscopy of Rendered Animal Fats : Degree of Saturation of Fatty Acid Chains and Position on Glycerol, *Int. Food Sci. Tech.*, 1990, **25**, 399-408.
101. Wollenberg K.F., Quantitative High Resolution ¹³C Nuclear Magnetic Resonance of the Olefinic and Carbonyl Carbons of Edible Vegetable Oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1990, **67**, 487-494.
102. Sacchi R., Addeo F., Giudicianni I., Paolillo L., 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.*, 1992, **2**, 117-123.
103. Gunstone F.D., Pollard M.R., Scrimgeour C.M., Vedanayagam H.S., Fatty Acids. Part 50. ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Studies of Olefinic Fatty Acids and Esters, *Chem. Phys. Lipids*, 1977, **18**, 115-129.
104. Kubeczka K.H., Formáček V., Application of direct carbone-13 NMR spectroscopy in the analysis of volatiles, Schreier P. Ed., Walter de Gruyter & Co., Berlin, 1984, 219-230.
105. Formáček V., Kubeczka K.H., Quantitative analyse ätherischer öle Mittels ¹³C-NMR spekroskopie in aetherische öle, Kubeczka K.H., Ed. Thieme, Stuttgart, 1982, 42-53.
106. Ahmad V.U., Jassbi A.R., Analysis of the essential oil of *Echinophora sibthorpiana* guss. By means of GC, GC/MS and ¹³C-NMR techniques, *J. Essent. Oil Res.*, 1999, **11**, 107-108.
107. Núñez C.V., Roque N.F., Sesquiterpenes from the stem bark of *Guarea guidonia* (L.) sleumer (Meliaceae), *J. Essent. Oil Res.*, 1999, **11**, 439-440.
108. Ferreira M.J.P., Costantin M.B., Sartorelli P., Rodrigues G.V., Limberger R., Henriques A.T., Kato M.J., Emerenciano V.P., Computer-Aided Method for Identification of Components in Essential Oils by ¹³C NMR Spectroscopy, *Anal. Chim. Acta.*, 2001, **447**, 125-134.

Bibliographie

109. Bradesi P., Bighelli A., Tomi F., Casanova J., L'analyse des mélanges complexes par RMN du carbone-13, *Canadian J. Appl. Spectrosc.*, Partie 1, 1996, **41**, 15-24 ; Partie 2, 1996, **41**, 41-50.
110. Tomi F., Casanova J., Contribution de la RMN du carbone-13 à l'analyse des huiles essentielles, *Annales Fals. & Expertise Chim.*, 2000, **93**, 313-330.
111. Tomi F., Casanova J., ¹³C-NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from Labiatae, A review, *Acta Horticulturae*, 2006, **723**, 185-192.
112. Lesueur D, Bighelli A, Casanova J, Tran Minh Hoi and Tran Huy Thai, Composition of the essential oil of *Piper bavinum* C. DC. from Vietnam, *J Essent. Oil Res.*, sous presse.
113. Dung N.X., Cu L.D., Khien P.V., Muselli A., Casanova J., Bartel A., Leclercq P.A., Volatile Constituents of the stem and leaf oils of *Eupatorium coelestidum* L. from Vietnam, *J. Essent. Oil Res.*, 1998, **10**, 478-482.
114. Mundina M., Vila R., Tomi F., Gupta M.P., Adzet T., Casanova J., Cañigueral S., Leaf essential oils of three Panamanian Piper species, *Phytochem.*, 1998, **47**, 1277-1282.
115. Nguyen Thi Phuong Thao, Nguyen Thi Thuy, Tran Minh Hoi, Tran Huy Thai, Muselli A., Bighelli A., Castola V, Casanova J., *Artemisia vulgaris* L. from Vietnam: Chemical variability and composition of the oil along the vegetative life of the plant. *J. Essent. Oil Res.*, 2004, **16**, 358-361.
116. Lesueur D., Ninh Khac Ban, Bighelli A., Muselli A. Casanova J., Analysis of the root oil of *Fokienia hodginsii* (Dunn) Henry et Thomas (Cupressaceae) by GC, GC/MS and ¹³C-NMR. *Flav. Fragr. J.*, 2006, **21**, 171-174.
117. Boti JB, Koukoua G, N'Guessan TY, Muselli A, Bernardini A.F., Casanova J., Composition of leaf, stem bark and root bark oils from *Isolona cooperi* investigated by GC/RI, GC/MS and ¹³C-NMR spectroscopy. *Phytochem. Anal.*, 2005, **16**, 357-363.
118. Bradesi P., Tomi F., Casanova J., Costa J., Bernardini A.F., Chemical composition of *Myrtle* essential oil from Corsica (France), *J. Essent. Oil Res.*, 1997, **9**, 283-288.
119. Mariotti J.P., Tomi F., Casanova J., Costa J., Bernardini A.F., Composition of the essential oil of *Cistus ladaniferus* L. cultivated in Corsica (France), *Flav. Fragr. J.*, 1997, **12**, 147-151.
120. Mariotti J.P., Costa J., Bianchini A., Bernardini A.F., Casanova J., Composition

Bibliographie

and variability of the essential oil of *Stachys glutinosa* L. from Corsica, *Flav. Fragr. J.*, 1997, **12**, 205-209.

121. Filippini M.H., Tomi F., Casanova J., Composition of the leaf oil of *Ferula arrigonii* Bocchieri, *Flav. Fragr. J.*, 2000, **15**, 195-198.

122. Ferrari B., Tomi F., Casanova J., Composition and chemical variability of *Ferula communis* essential oil from Corsica, *Flav. Fragr. J.*, 2005, **20**, 180-185.

123. Pintore G., Usai M., Bradesi P., Juliano C., Boatto G., Tomi F., Chessa M., Cerri R., Casanova J., Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica, *Flav. Fragr. J.*, 2002, **17**, 15-19.

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

125. Usai M., Atzei A., Pintore G., Casanova J., Composition and Variability of Essential Oil of Sardinian *Thymus herba-barona* Loisel., *Flav. Fragr. J.*, 2003, **18**, 21-25.

126. Bousmaha L., Atik Bekkara F., Tomi F., Casanova J., Advances in the chemical composition of *Lavandula dentata* L. essential oil from Algeria, *J. Essent. Oil Res.*, 2005, **17**, 292-295.

127. Bousmaha-Marroki L, Atik-Bekkara F, Tomi F, Casanova J, Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. ssp. *eu-ciliatus* Maire from Algeria, *J. Essent. Oil Res.*, 2007, **19**, 490-493.

128. Bekhechi C., Atik Bekkara F., Abdelouahid D.E., Tomi F., Casanova J., Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. from Algeria. *J. Essent. Oil Res.*, 2007, **19**, 594-596.

129. Castola V., Bighelli A., Casanova J., Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica, *Biochem. Syst. Ecol.*, 2000, **28**, 79-88.

130. Mecherara-Idjeri S, Hassani A, Castola V, Casanova J., Composition and chemical variability of the essential oil from *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Algeria Part I: Leaf oil. *J. Essent. Oil Res.*, sous presse.

131. Mecherara-Idjeri S, Hassani A, Castola V, Casanova J., Composition and chemical variability of the essential oil from *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Algeria Part II: fruit oil. *J. Essent. Oil Res.*, sous presse.

132. Kanko C., Koukoua G., N'Guessan Y.T., Composition and intraspecific

Bibliographie

variability of the leaf oil of *Lippia multiflora* Mold. from Ivory Coast, *J. Essent. Oil Res.*, 1999, **11**, 153-158.

133. Tomi F., Casanova J., Nianga M., Identification of the components of the seed Oil of *Xylopiya aethiopica* from Guinea using ¹³C-NMR spectroscopy, *J. Essent. Oil Res.*, 1996, **8**, 429-431.

134. Ayédoun M.A., Sohouloué D.K., Menut C., Lamaty G., Molangui T., Casanova J., Tomi F., Aromatic plants of tropical west Africa. VI. α -oxobisabolene as main constituent of the leaf essential oil of *Commiphora africana* (A. Rich.) Engl. from Benin, *J. Essent. Oil Res.*, 1998, **10**, 105-107.

135. Martins A.P., Salgueiro L., Vila R., Tomi F., Cañigüeral S., Casanova J., Proença da Cunha A., Adzet T., Composition of the essential oils of *Ocimum canum*, *O. gratissimum* and *O. minimum*, *Planta Med.*, 1999, **65**, 187-189.

136. Muselli A., Hoi T.M., Cu L.D., Moi L.D., Bessière J.M., Bighelli A., Casanova J., Composition of the essential oil of *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr. (Araliaceae) from Vietnam, *Flav. Fragr. J.*, 1999, **14**, 41-44.

137. Muselli A., Bighelli A., Hoi T.M., Thao N.T.P, Thai T.H., Casanova J., Dihydroperyraldehydes from *Enhydra fluctuans* Lour essential oil, *Flav. Fragr. J.*, 2000, **15**, 299-302.

138. Tam N.T., Thuam D.T., Bighelli A., Castola V., Muselli A., Richome P., Casanova J., *Baeckea frutescens* leaf oil from Viêt-Nam : Composition and chemical variability, *Flav. Fragr. J.*, 2004, **19**, 217-220.

139. Dung N.X., Khiên P.V., Nhuân D.D., Hoi T.M, Ban N.K., Leclercq P.A., Muselli A., Bighelli A., Casanova J., Composition of the seed oil of *Hibiscus abelmoschus* L. (Malvaceae) growing in Vietnam, *J. Essent. Oil Res.*, 1999, **11**, 447-452.

140. Tam N.T., An H.L., Bighelli A., Casanova J., Identification of the Components of *Illicium griffithii* Hook. F. et Thoms. Essential oil from vietnam using carbon-13 NMR spectroscopy, *J. Essent. Oil Res.*, 1998, **10**, 433-435.

141. Tam N.T., An H.L., Bighelli A., Muselli A., Casanova J., Advances in the chemical composition of essential oils from *Illicium griffithii* Hook. F. et Thoms. from Vietnam, *J. Essent. Oil Res.*, 2005, **17**, 79-81.

142. Bekhechi C, Atik Bekkara F, Abdelouahid DE, Tomi F, Casanova J., Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. from Algeria., *J. Essent. Oil Res.*, 2007, **19**, 594-596.

Bibliographie

143. Mundina M., Vila R., Tomi F., Ciccio J.F. Ibañez C., Adzet T., Casanova J., Cañigüeral S., Essential oil composition from leaves and fruits of three *Hedyosmum* species from Costa Rica, *Flav. Fragr. J.*, 2000, **15**, 201-205.
144. Bradesi P., Tomi F., Terriaga I., Casanova J., Identification of Dihydrocarvéol Stereoisomers and their Acetates using Carbon-13 NMR Spectroscopy. *Spectrosc. Lett.*, 1994, **27**, 921-933.
145. Bradesi P., Tomi F., Casanova J., Carbon-13 NMR study of farnesol, farnesyl acetate and farnesal stereoisomers: chemical shift assignment using lanthanide induced shifts, *Canadian J. Appl. Spectrosc.*, 1995, **40**, 76-81.
146. Hoi T.M., Moi L.D., Muselli A., Bighelli A., Casanova J., 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*, 1997, n° spécial, 633-637.
147. Blanc M-C., 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, 2003.
148. Baldovini N., Tomi F., Casanova J., Identification and Quantitative Determination NMR of Furanodiene, a Heat-sensitive Compound, in Essential Oils by ¹³C-NMR, *Phytochem. Anal.*, 2001, **12**, 58-63.
149. Cavalli J.F., Tomi F., Bernardini A.F., Casanova J., 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.*, 2004, **15**, 275-279.
150. Rezzi S., Bighelli A., Castola V., Casanova J., Direct Identification and Quantitative Determination of Acidic and Neutral Diterpenes Using ¹³C-NMR Spectroscopy. Application to the Analysis of Oleoresin of *Pinus nigra*, *Appl. Spectrosc.*, 2002, **56**, 312-317.
151. Blanc M.C., Muselli A., Bradesi P., Casanova J., Chemical Composition and Variability of the Essential Oil of *Inula graveolens* (L.) from Corsica, *Flav. Fragr. J.*, 2004, **19**, 314-319.
152. Blanc M.C., Bradesi P., Casanova J., Quantitative Determination of Eudesman-Type Acids from *Dittrichia viscosa* sp. *viscosa* Essential Oil using ¹³C-NMR Spectroscopy. *Phytochem. Anal.*, 2005, **16**, 150-154.

Bibliographie

153. Baldovini N., Ristorcelli D., Tomi F., Casanova J., Intraspecific variability of the essential oil of *Calamintha nepeta* from Corsica (France), *Flav. Fragr. J.*, 2000, **15**, 50-54.
154. Mariotti J.P., Tomi F., Casanova J., Costa J., Bernardini A.F., Composition of the Essential Oil of *Cistus ladaniferus* L. Cultivated in Corsica (France), *Flav. Fragr. J.*, 1997, **12**, 147-151.
155. Rezzi S., Cavaleiro C., Bighelli A., Salgueiro L., Proença da Cunha A., Casanova J., Intraspecific Chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* subsp. *turbinata* from Corsica, *Biochem. Syst. Ecol.*, 2001, **29**, 179-188.
156. Boti J.B., Bighelli A., Cavaleiro C., Salgueiro L., Casanova J., Chemical variability of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* berry and leaf oils from Corsica, analysed by combination of GC, GC/MS and ¹³C-NMR, *Flav. Fragr. J.*, 2006, **21**, 268-273.
157. Ristorcelli D., Tomi F., Casanova J., ¹³C NMR as a tool for identification and enantiomeric differentiation of major terpenes exemplified by the essential oil of *Lavandula stoechas*, *Flav. Fragr. J.*, 1998, **13**, 154-158.
158. Rezzi S., Bighelli A., Mouillot D., Casanova J., Chemical variability of the needle essential oil of *Pinus nigra* subsp. *laricio* from Corsica, *Flav. Fragr. J.*, 2001, **16**, 379-383.
159. Ottavioli J., Bighelli A., Casanova J., Diterpene-Rich Needle Oil of *Pinus pinaster* Ait. from Corsica. *Flav. Fragr. J.*, 2008, sous presse.
160. Cavaleiro C., Rezzi S., Salgueiro L., Bighelli A., Casanova J., Proença da Cunha A., Intraspecific chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* from Portugal, *Biochem. Syst. Ecol.*, 2001, **29**, 1175-1183.
161. Salgueiro L., Vila R., Tomas X., Tomi F., Cañigueral S., Casanova J., Proença da Cunha A., Adzet T., Chemical polymorphism of the essential oil of *Thymus carnosus* from Portugal, *Phytochem.*, 1995, **38**, 391-396.
162. Salgueiro L.R., Vila R., Tomi F., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Cañigueral S., Casanova J., Proença da Cunha A., Adzet T., Variability of the essential oil of *Thymus caespititius* from Portugal, *Phytochem.*, 1997, **45**, 307-311.
163. Salgueiro L.R., Vila R., Tomi F., Tomas X., Cañigueral S., Casanova J., Proença da Cunha A., Adzet T., Composition and intraspecific variability of the essential oil of *Thymus camphoratus*, *Phytochem.*, 1997, **45**, 1177-1183.
164. Lesueur D., Bighelli A., Nguyen Thi Tam, Nguyen Viet Than, Pham thi Kim Dung and Casanova J., Composition and chemical variability of the essential oils of

Bibliographie

three *Elsholtzia* species from Vietnam: *E. blanda*, *E. penduliflora* and *E. winitiana*., *Nat. Prod. Commun.*, 2007, **2**, 857-861.

165. N'Guyen Thi Tam, Duong Thi Thuam, Bighelli A., Castola V., Muselli A., Richomme P., Casanova J., *Baekkea frutescens* leaf oil from Vietnam: composition and chemical variability, *Flav. Frag. J.*, 2004, **19**, 217-220.

166. Bousmaha L., Boti J.B., Bekkara F.A., Castola V., Casanova J., Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Lavandula dentata* L. from Algeria, *Flav. Fragr. J.*, 2006, **21**, 368-372.

167. Lota M.L., de Rocca Serra D., Tomi F., Casanova J., Chemical variability of peel and leaf essential oils of mandarins from *Citrus reticulata* Blanco, *Biochem. Syst. Ecol.*, 2000, **28**, 61-78.

168. Lota M.L., de Rocca Serra D., Tomi F., Casanova J., chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins, *Biochem. Syst. Ecol.*, 2001, **29**, 77-104.

169. Lota M.L., de Rocca Serra D., Jacquemond C., Tomi F., Casanova J., Chemical variability of peel and leaf essential oils of sour orange, *Flav. Fragr. J.*, 2001, **16**, 89-96.

170. Lota M.L., de Rocca Serra D., Tomi F., Jacquemond C., Casanova J., Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 796-805.

171. Castola V., Bighelli A., Casanova J., Direct Qualitative and Quantitative Analysis of Triterpenes using ¹³C NMR Spectroscopy Exemplified by Dichloromethanic Extracts of Cork, *Appl. Spectro.*, 1999, **53**, 344-350.

172. Castola V., Bighelli A., Rezzi S., Melloni G., Gladiali S., Desjobert J.M., Casanova J., Composition and chemical variability of the triterpene fraction of dichloromethane extracts of cork, *Ind. Crops Prod.*, 2002, **15**, 15-22.

173. Castola V., Marongiu B., Bighelli A., Floris C., Lai A., Casanova J., Extractives of Cork (*Quercus suber* L.): Chemical composition of dichloromethane and supercritical CO₂ extracts, *Ind. Crops Prod.*, 2005, **21**, 65-69.

174. Duquesnoy E, Castola V, Casanova J., Identification and quantitative determination of triterpenes in the hexane extract of *Olea europaea* L. leaves using ¹³C NMR spectroscopy. *Phytochem. Anal.*, 2007, **18**, 347-353.

175. Mazzoni V., Bradesi P., Tomi F., Casanova J., Direct qualitative and quantitative analysis of carbohydrate mixtures using ¹³C NMR spectroscopy: application to honeys, *Magn. Res. Chem.*, 1997, **35**, 81-90.

Bibliographie

176. Duquesnoy E, Castola V, Casanova J., Identification and quantitative determination of carbohydrates in ethanol extracts of two conifers using ^{13}C NMR spectroscopy, *Carbohydrate Res.*, 2008, sous presse.
177. Mazzoni V., Analyse de mélanges naturels par RMN du carbone-13 : extraits lipidiques miels et huiles essentielles, thèse de doctorat de l'Université de Corse, 1998.
178. Castola V., Bighelli A., Conti L., Scano G., Mascia S., Casanova J., Identification and quantification of anhydrosugars in biomass pyrolytic oils using carbon-13 NMR spectroscopy, *Canadian J. Anal. Sci. Spectrosc.*, 2000, **45**, 102-106.
179. Bighelli A., Tomi F., Casanova J., Computer-aided carbon-13 NMR Study of phenols contained in liquids produced by pyrolysis of biomass, *Biomass and Bioenergy*, 1994, **6**, 461-464.
180. Lesueur D, Castola V, Bighelli A, Conti L, Casanova J., Quantification of Hydroxyacetaldehyde in a Biomass Pyrolysis Liquid Using ^{13}C NMR Spectroscopy. *Spectrosc. Lett.*, 2007, **40**, 591-602.
181. Ristorcelli D., Tomi F., Casanova J., Enantiomeric differentiation of oxygenated monoterpenes by carbon-13 NMR in the presence of a chiral lanthanide shift reagent. *J. Magn. Reson. Analysis*, 1997, **3**, 40-46.
182. Vellutini M., La RMN du carbone-13, outil d'analyse: Différentiation énantiomérique d'acétates terpéniques étude phytochimique de *Peucedanum paniculatum*, plante endémique de Corse, Thèse de Doctorat de l'Université de Corse, 2005.
183. Baldovini N., Tomi F., Casanova J., Enantiomeric differentiation of bornyl acetate by carbon-13 NMR using a chiral lanthanide shift reagent, *Phytochem. Anal.*, 2003, **14**, 241-244.
184. Baldovini N., Tomi F., Casanova J., Enantiomeric differentiation of terpenic olefins by carbon-13 NMR using chiral binuclear shift reagents, *Magn. Reson. Chem.*, 2001, **39**, 621-624.
185. Derome A.E., Modern NMR Techniques for Chemistry Research, Volume 6 Pergamon Press, Oxford, 1987.
186. Mazzoni V., Tomi F., Casanova J., A daucane type sesquiterpene from *Daucus carota* seed oil, *Flav. Fragr. J.*, 1999, **14**, 268-272.
187. Cavalli J.F., Tomi F., Bernardini A.-F., Casanova J., Dihydroagarofurans: the fourth isomer isolated from *Cedrelopsis grevei* bark oil, *Magn. Reson. Chem.*, 2004, **42**, 709-711.

Bibliographie

188. Bianchini A., Tomi F., Richomme P., Bernardini A.F., Casanova J., Eudesm-5-en-11-ol from *Helichrysum italicum* essential oil, *Magn. Reson. Chem.*, 2004, **42(11)**, 983-984.
189. Vellutini M., Baldovini N., de Rocca Serra D., Tomi F., Casanova J., β -Cyclolavandulyl and β -isocyclolavandulyl esters from *Peucedanum paniculatum* L., an endemic species to Corsica. *Phytochem.*, 2005, **66**, 1956-1962.
190. Vellutini M., Tomi F., Richomme P., Casanova J., Kallisteine A and B, two new coumarins from the roots of *Peucedanum paniculatum* L, an endemic species to Corsica. *Magn. Reson. Chem.*, 2007, **45**, 355-358.
191. Castola V., Mazzoni V., Corticchiato M., Bighelli A., Casanova J., *Can. J. Hydrogen bonding effect on Carbon-13 NMR chemical shifts of naturally occurring phenols. Can. J. Anal. Science & Spectrosc.*, 1997, **42**, 90-94.
192. Bohlmann F., Zeisberg R., Klein E., ¹³C NMR spektren von monoterpenen. *Org. Magn. Reson.*, 1975, **7**, 426-432.
193. Blanc M.C., Bradesi P, Casanova J. Enantiomeric Differentiation of Acyclic Terpenes by ¹³C-NMR Spectroscopy Using a Chiral Lanthanide Shift Reagent. *Magn Reson. Chem.*, 2005, **43**, 176-179.
194. Ferrari B., Castilho P., Tomi F., Rodrigues A.I., Costa M. C., Casanova J., Direct Identification and Quantitative Determination of Costunolide and Dehydrocostuslactone in *Laurus novocanariensis* Fixed Oil using ¹³C-NMR Spectroscopy, *Phytochem. Anal.*, 2005, **16**, 104-107.
195. Marin P.D., Grayera R.J., Veitcha N.C., Kitea G.C., Harborne J.B., Acacetin glycosides as taxonomic markers in *Calamintha* and *Micromeria*., *Phytochem.*, 2001, **58**, 943-947.
196. Stuart M. (Ed), *The Encyclopedia of Herbs and Herbalism London: Orbis Publishing*, 1979, 141-283.
197. Wren R.C., Potter's New Cyclopaedia of Botanical Drugs and Preparations (re-edited and enlarged by Wren RW) Bradford, Health Science Press: Devon, 1975.
198. Gerard J., *The Herball*: London, 1597.
199. Ortiz-de-Urbina A.V., Martín M.L., Montero M.J., Carrón R., San-Roman L., Pharmacology Screening and Microbacterial Activity of the Essential Oil of *Calamintha sylvatica* subsp *ascendens*, *J. Ethnopharmacol.*, 1988, **23**, 323-328.

Bibliographie

200. Ortiz-de-Urbina AV, Martín ML, Montero MJ, Morán A, San_Roman L. Sedating and Antipyretic Activity of the Essential Oil of *Calamintha sylvatica* subsp *ascendens*, *J. Ethnopharmacology*, 1989, **25**, 165-171.
201. Hidalgo P.J., Ubera J.L., Santos J.A., La Font F., Castellanos C., Palomino A., Roman M., Essential oils in *Calamintha sylvatica* Bromf ssp *ascendens* (Jordan) PW Ball: Wild and cultivated productions and antifungal activity., *J. Essent. Oil Res.*, 2002, **14(1)**, 68-71.
202. Alan S., Kürkcüoglu M., Baser K.H.C., Composition of the Essential Oils of *Calamintha sylvatica* Bromf.subsp.sylvatica and *Calamintha sylvatica* Bromf. subsp. *Ascendens* (Jordan) P.W. Ball, 38th ISEO Graz, Austria Sept 9-12, 2007, 181.
203. Moreira J. A., Correa, A. G., Enantioselective synthesis of three stereoisomers of 5, 9-dimethylpentadecane, sex pheromone component of *Leucoptera coffeella*, from (-)-isopulegol, *Tetrahedron Asymmetry*, 2003, **14**, 3787–3795.
204. Whitesell J.K., Minton M.A., Anti-vicinal Hydrogen Interactions. A Fundamental Shift Effect in ¹³C NMR Spectroscopy, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1987, 109, 225-228.
205. da Silva K.A., Robles-Dutenhefner P. A., Sousa E.M.B., Kozhevnikova E.F., Kozhevnikov I.V., Gusevskaya E.V., Cyclization of (+)-citronellal to (-)-isopulegol catalyzed by H₃PW12O₄₀/SiO₂, *Catalysis Communication*, 2004, **(5)**, 425-429.
206. Fuchs S., Sewenig S., Mosandl A., Monoterpene biosynthesis in *Agathosma crenulata* (Buchu), *Flav. Fragr. J.*, 2001, **16**, 123–135.
207. Baser K.H.C., Kirimer N., Kurkçuoglu M., Ozek T., Essential Oil of *Cyclotrichium origanifolium* (Labill) Manden et Scheng from Turkey, *J. Essent. Oil Res.*, 1996, **8**, 569-570.
208. Turner G. W., Gershenzon J., and Croteau R. B., Development of Peltate Glandular Trichomes of Peppermint. *Plant Physiology*, 2000, **24**, 665–679.
209. McConkey M.E., Gershenzon J., Croteau R.B., Developmental Regulation of Monoterpene Biosynthesis in the Glandular Trichomes of Peppermint, *Plant Physiology*, 2000, **122**, 215–223.
210. Stanic G, Blazevic N, Brkic D, Lukac G. The composition of essential oils of *Calamintha nepeta* (L) Savi subsp *glandulosa* (Req) P W Ball and *Calamintha sylvatica* Bromf subsp *Sylvatica*. *Acta Pharm.* 1999; **49**: 107–112.
211. Kitic D, Palic R, Ristic M, Sojanovic G, Jovanovic T. The volatile constituents of *Calamintha sylvatica* Bromf subsp *Sylvatica*, *Flav. Fragr. J.* 2001; **16**: 257–258.

Bibliographie

212. Mimica-Dukic N., Couladis M., Tzakou O, Jancic R.A., Slavkovska V., Essential oil of *Calamintha sylvatica* Bromf and *Calamintha vardarensis* Silic., *J. Essent. Oil Res.*, 2004; **16(3)**: 219-222.
213. Nostro A, Cannatelli M.A., Morelli I., Cioni P.L., Bader A., Marino A., Alonzo V., Preservative properties of *Calamintha officinalis* essential oil with and without EDTA, *Lett. Appl. Microbiology*, 2002, **35**, 385–389.
214. Sarer E., Pañçali S.S., Composition of the Essential Oil from *Calamintha nepeta* (L) Savi ssp glandulosa (Req) P W Ball., *Flav. Fragr. J.*, 1998, **13**, 31-32.
215. Flamini G., Cioni P.L., Puleio R., Morelli I., Panizzi L., Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Calamintha nepeta* and its Constituent Pulegone Against Bacteria and Fungi, *Phytother. Res.*, 1999, **13**, 349–351.
216. Baser K.H.C., Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of Turkey, *Pure Appl. Chem.*, 2002, **74(4)**, 527–545.
217. Majed-Jabari T., Vatanpoor H., Rustaiyan A., Masoudi S., Monfared A., Composition of the essential oil of *Tanacetum khorassanicum* (Krasch) Parsa A new species from Iran, *J. Essent. Oil Res.*, 2002, **14 (5)**, 380-381.
218. Diab Y., Auezova L., Chebib H., Chalchat J.C., Chemical Composition of the Essential Oil of *Micromeria libanotica* Boiss, an Endemic Species of Lebanon, *J. Essent. Oil Res.*, 2005, **17 (4)**, 449-450.
219. Speijers G.J.A., WHO Food Additives Series 46: Pulegone and related substances, Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) - Monographs and Evaluations, 2001.
220. Adams T.B, Hallagan J.B., Putnam J.M., Gierke T.L., Doull J., Munro I.C., Newberne P., Portoghese P.S., Smith R.L., Wagner B.M., Weil C.S., Woods L.A., Ford R.A., The FEMA GRAS Assessment of Alicyclic Substances Used as Flavour Ingredients, *Food and Chemical Toxicology*, 1996, **34**, 763-828.
221. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in contact with Food (AFC) on a request from the Commission related to Flavouring Group Evaluation 9 (FGE09): *The EFSA Journal*, 2004, **165**, 1-51.
222. Pan S. L., Traditional herbal medicines for modern times. Bupleurum species-Scientific evaluation and clinical application. Taylor & Francis, New York, 2006.
223. Pistelli L., Cammilli A., Manunta A., Morelli I., Triterpenoid saponins and flavonoid glycosides from *Bupleurum falcatum* subsp. *Cernuum* *Phytochemistry*, 1993, **33**, 1537-1539.

Bibliographie

224. Ebata N., Nakajima K., Hayashi K., Okada M., Maruno M., Saponins from the root of *Bupleurum falcatum*, *Phytochem.*, 1996, **41**, 895-901.
225. Tan L., Zhao Y.Y., Tu G.Z., Wang B., Cai S.Q. and Zhang R.Y., Saikosaponins from roots of *Bupleurum scorzonerifolium*, *Phytochem.*, **50**, 139-142.
226. Barrero. A.F., Haidour A., Sedqui A., Mansour A.I., Rodriguez-Garcia I., Lopez A. and Munoz-Dorado M., Saikosaponins from root of *Bupleurum gibraltarium* and *Bupleurum spinosum*, *Phytochem.*, 2000, **54**, 741-745.
227. Luo S.Q., Lin L.Z., Geoffrey A.C., Saikosaponin derivatives from *Bupleurum wenchuanense*, *Phytochem.* 1993, **33**, 1197-1205.
228. Chang W.L., Chiu L.W., Lai J.H., Lin H.C., Immunosuppressive flavones and lignans from *Bupleurum scorzonerifolium*, *Phytochem.*, 2003, **64** 1375-1379.
229. González A.G., Esttvez-Reyes R., Mato C., Estévez-Braun A. M., Three lignans from *Bupleurum salicifolium*, *Phytochem.*, 1990, **29**, 1981-1983.
230. Estévez-Braun A., Estévez-Reyes R., Gonzalez A.G., Structural elucidation and conformational analysis of new lignan butenolides from the leaves of *Bupleurum salicifolium*, *Tetrahedron*, 1994, **50**, 5203-5210.
231. Zhang T. T., Zhou J.S., Wang Q., Flavonoids from aerial part of *Bupleurum chinense* DC. *Biochem. Syst. Ecol.*, 2007, **35**, 801-804.
232. Pan S. L., Shun Q. S., Bo Q. M., and Bao X. S., The Coloured Atlas of Medicinal Plant from Genus *Bupleurum* in China, 2002 Shanghai Sci. Tech. Doc. Publishing House, Shanghai, China.
233. Massanet G. M., Guerra F. M., Jorge Z. D., Casavázquez L. G., Phenylpropanoids from *Bupleurum fruticosum*, *Phytochem.*, 1997, **44**, 173-177.
234. Pistelli L., Bilia A. R., Bertoli A., Morelli I., Marsili A., Phenylpropanoids from *Bupleurum fruticosum*. *J. Nat. Prod.*, 1995, **58**, 112-116.
235. Yang Y. J., Xiang B. R., Liang X., An D. K., Yuan C. Q., Cao R., Pen J. H., Sheng L.S. Analyses on components of essential oils in genus *Bupleurum*, *Zhong Cao Yao*, 1993, **24**, 173-192.
236. Peyron L., Roubeau M., Sur une huile essentielle de *Bupleurum fruticosum* L., *Plant medicin. Phytoter.*, 1970, **4**, 172-175.
237. Manunta A., Tirillini B., Fraternali D., Secretory Tissues and Essential Oil Composition of *Bupleurum fruticosum* L., *J. Essent. Oil Res.*, 1992, **4**, 461-466.

Bibliographie

238. Velasco-Negueruela A., Pérez-Alonso M. J., Pála-Paúl J., Camacho A., Fernández Ocaná A. M., Fernández López C., Alterejos J., García Vallejo M. C., Chemical Composition of the Essential Oils from the Aerial Parts of *Bupleurum gibraltarium* lam., *J. Essent. Oil Res.*, 1998, **10**, 9-19.
239. Dugo G., Trozzi A., Verzera A., Rapisarda A., Essential oils from leaves of typical Mediterranean plants, Note I, *Bupleurum fruticosum*, *Essenze. Derivati Agrumari*, 2002, **70**, 201-204.
240. Manunta A., *Bupleurum fruticosum* L. (famille umbelliferae) arbuste intéressant de la flore du Maroc septentrional. 1^{er} colloque Intern. Plantes Aromatiques et Médicinales du Maroc (Actes), 271-284, Rabat (1984).
241. Picci V., Atzei A., Manunta A., About the content in essential oils in the officinal species of Sardinia. The essential oils in the Umbelliferae of Sardiniae. 1^o. Morphosystematic and Chemical Notes on *Bupleurum fruticosum* Linnaeus. *Rivista Ital. EPPOS*, 1974, **56**, Ed. Europea n^o2, 239-244.
242. Lorente I., Ocete M. A., Zarzuelo A., Cabo M. M., Jimenez J., Bioactivity of the Essential Oil of *Bupleurum fruticosum*. *J. Nat. Prod.*, 1989, **52**, 267-272.
243. Pistelli L., Bilia A. R., Marsili A., De Tommasi N., Manunta A., Triterpenoids Saponins from *Bupleurum fruticosum*, *J. Nat. Prod.*, 1993, **56**, 240-244.
244. Guinea M. C., Parellada J., Lacaille-Dubois M. A., Wagner H., Biologically Active Triterpène Saponins from *Bupleurum fruticosum*, *Planta Med.*, 1994, **60**, 163-167.
245. Francesconi L., Sernagiotto E., Bupleurol. L'alcool de l'essenza di *Bupleurum fruticosum*. *Atti R. Acc. Lincei*, 1913, **22**, I : 34-40.
246. Manunta A., Morelli I., Pizzi V., L'huile essentielle du *Bupleurum fruticosum* L. *Plantes Medicin. Phytoth.*, 1987, **21**, 20-25.
247. Bertoli A., Pistelli L., Morelli I., Fraternali D., Giamperi L., Ricci D., Volatile constituents of micropropagated plants of *Bupleurem fruticosum* L., *Plant Science*, 2004, **167**, 807-810.
248. Giamperi L., Ricci D., Fraternali D., Manunta A., Tabacchi R., The Essential Oil from *Bupleurum fruticosum* L. of the Cirenaica Region of Eastern Libya and the Problem of Bupleurol, *J. Essent. Oil Res.*, 1998, **10**, 369-374
249. Lota M. L. Les huiles essentielles d'agrumes : caractérisation par RMN du carbone-13 CPG/IK et CPG/SM, thèse de doctorat de l'Université de Corse, 2002.

Bibliographie

250. Gonny M., Bradesi P., Casanova J., Identification of the components of the essential oil from wild Corsican *Daucus carota* L. using ^{13}C -NMR spectroscopy, *Flav. Fragr. J.*, 2004, **19**, 424-433.
251. Muselli A. Contribution de la RMN du carbone-13 à l'analyse d'huiles essentielles de Corse et du Viêt-Nam, Thèse de Doctorat de l'Université de Corse, 2005.
252. Hesse M., Meier H., Zeeh B., Méthodes spectroscopiques pour la chimie organique, Paris, Masson, 1997, 108-109.
253. Colonna P., La chimie verte, TEC & DOC Lavoisier, Clamecy, 2006, p365.
254. Surburg H., Panten J., Common Fragrance and Flavor Materials, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006,
255. Ganzler K., Salgo A., Valko K., A novel sample preparation method for chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1986, **371**, 299-306.
256. Lucchesi M.E., Chemat F., Smadja J., Solvent Free Microwave Extraction: An Innovative Tool for Rapid Extraction of Essential Oil from Aromatic Herbs and Spices, *J. Microwave Power Electromagnetic Energy*, 2004, **39**. 135-139.
257. Lucchesi M. E., Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles, Thèse de l'Université de la Réunion, 2005.
258. Lucchesi M.E., Chemat F., Smadja J., Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1043**, 323-327.
259. Lucchesi M.E., Smadja J., Bradshaw S., Louw W., Chemat F., Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L.: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil, *J. food engineering*, 2007, **79**, 1079-1086.
260. Wang Z.M., Ding L., Li T.C., Zhou X., Wang L. Zhang H.Q., Liu L., Li Y., Liu Z.H. Wang H.J., Zeng H., He H., Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cyminum* L. and *Zanthoxylum bungeanum* Maxim., *J. Chromatogr. A*, 2006, **1102**, 11-17.
261. Phutdhawong W., Kawaree R., Sanjaiya S., Sengpracha W., Buddhasukh D., Microwave-Assisted Isolation of Essential oil of *Cinnamomum iners* Reinw. ex Bl.: Comparison with Conventional Hydrodistillation, *Molecules*, 2007, **12**, 868-877.
262. Bendahou M., Muselli A., Grignon-Dubois M., Benyoucef M., Desjobert J.M., Bernardini A.F., Costa J., Antimicrobial activity and chemical composition of

Bibliographie

Origanum glandulosum Desf. Essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation, *Food Chem.*, 2008, **106**, 132-139.

263. Gamisans J., Marzocchi J-F., La Flore endémique de la Corse. Edisud, Aix-en-Provence, 1996.

264. Gamisans J., La végétation de la Corse. Edisud, Aix-en-Provence 1991.

265. Gamisans J., Jeanmonod D., Catalogue des plantes vasculaires de la Corse, Conservatoire et jardin botaniques Ville de Genève, Jeanmonod D., Burdet H.M.éditeurs,1993, 184

266. Sutour S., Bradesi P., de Rocca-Serra D., Casanova J., Tomi F., Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* (Rep.) Greuter, *Flav. Fragr. J.*, 2008, **23** (2), 107-114.

267. Ferrari B., La RMN du carbone-13, outil d'analyse : des mélanges naturels : caractérisation d'huiles végétales, d'huiles essentielles et d'extraits aux solvants, Thèse de Doctorat de l'Université de Corse, 2003.

268. Brunke E.J., Hammerschmidt F.J., Schmaus G., L'huile essentielle de *Santolina chamaecyparissus* L., *Revista Italiana EPPOS*, 1992, **4**, 151-167

269. Poli F., Bonsignore L., Loy G., Sacchetti G., Ballero M., Comparison between the essential oils of *Santolina insularis* (Genn. Ex Fiori) Arrigoni and *Santolina Corsica* Jord. et Fourr. from the island of Sardinia, *J. Ethnopharmacol.*, 1997, **56**, 201-208.

270. Derbesy M., Touche J., Zola A., 7^{ème} Journées internationales des huiles essentielles, septembre 1988, Digne les Bains

271. Derbesy M., Touche J., Zola A., The essential oil of *Santolina chamaecyparissus* L., *J. Essent. Oil Res.*, 1989, **1**, 269-275

272. Garg S.N., Gupta D., Mehta V.K., Kumar S., Volatile constituents of the essential oil of *Santolina chamaecyparissus* Linn. From the southern hills of India, *J. Essent. Oil Res.*, 2001, **13**, 234-235

273. Aboutabl A., Hammerschmidt F.J., Elazzouny A.A., The essential oil of *Santolina chamaecyparissus* L., *Sci. Pharm.*, 1987, **55**, 267-271

274. Lawrence B.M., Progress in essential oil research, *Perfum. Flavor.*, 1991, **16**,3, 43-77

275. Demirici B., Özek T., Baser K.H.C., Chemical composition of *Santolina chamaecyparissus* L. essential oil, *J. Essent. Oil Res.*, 2000, **12**, 625-627

Bibliographie

276. Brunke E.J., Hammerschmidt F.J., Schmaus G., L'huile essentielle de *Santolina chamaecyparissus* L., *Rivista Italiana EPPOS*, 1992, **4**, 151-167
277. Perez Alonso M.J., Velasco Neguervela A., Essential oil components of *Santolina chamaecyparissus* L., *Flav. Fragr. J.*, 1992, **7**, 34-42
278. Lawrence B.M., Progress in essential oils, *Perfum. Flavor*, 1997, **22**, 78-82
279. Villar A., Giner R.M., Rios J.L., Chemical composition of *Santolina chamaecyparissus* ssp. *squarrosa* essential oil, *J. Nat. Prod.*, 1986, **49**, 1143-1144
280. Cherchi G., Deidda D., De Gioannis B., Marongiu B., Pompei R., Porcedda S., Extraction of *Santolina insularis* essential oil by supercritical carbon dioxide : influence of some process parameters and biological activity, *Flav. Fragr. J.*, 2001, **16**, 35-43
281. Flamini G., Bertoli A., Taglioli V., Cioni P.L., Morelli I., Composition of the essential oil of *Santolina ligustica*, *J. Essent. Oil Res.*, 1999, **11**, 6-8
282. Palà-Paül J., Perez-Alonso M.J., Velasco-Negueruela A., Palà-Paül R., Sanz J., Conejero Fco., Seasonal variation in chemical constituents of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. *rosmarinifolia*, *Biochem. Syst. Ecol.*, 2001, **29**, 663-672
283. Perez-Alonso M.J., et Velasco-Negueruela A., The essential oil of four *Santolina* species, *Flav. Fragr. J.*, 1988, **3**, 37-42.
284. Rossi P.G., Panighi J., Luciani A., de Rocca Serra D., Maury J., Gonny M., Muselli A., Bolla J.M., Berti L., Antibacterial action of essential oils from Corsica, *J. Essent. Oil Res.*, 2007, **19**, 176-182.
285. Ferrari B., Tomi F., Richomme P., Casanova J., Two new irregular sesquiterpenes aldehydes from *Santolina corsica* essential oil, *Magn. Res. Chem.*, 2004, **43**, 73-74.
286. Bohlmann F., Fritz U., Neue Iyratolester aus *Chrysanthemum coronarium*, *Phytochem.*, 1979, **18**, 1888-1889
287. Ferreira M.J.P., Emerenciano V.P., Linia G.A.R., Romoff P., Macari P.A.T., Rodrigues G.V., ¹³C NMR spectroscopy of monoterpenoids, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 1998, **33**, 153-206
288. Epstein W.W., Gaudioso L.A., Volatile oil constituents of *sagebrush*, *Phytochem.*, 1984, **10**, 2257-2262
289. Luo S.D., Ning B.M., Hu W.Y., Xie J.L., Studies on peroxides of *Artemisia lamcea*., 1991, *J. Nat. Prod.* **54**, 573-575.

ANNEXE

Annexes

Annexes

Annexes

Annexes

Annexes

Annexes

Annexes

Annexes

Annexes

Annexes

Annexes

Annexes

Annexes

Annexes

Annexes

Annexes

Annexes

Annexes

Annexes

Annexes

Annexes

Annexes

Annexes

Annexes

Annexe 1 : variations des déplacements chimiques des carbones du linalol observées en présence d'un dérivé phénolique.

| n°C | linalol 0,5 mol.L ⁻¹ | 2-éthyl phénol | 3-éthyl phénol | 4-éthyl phénol | 3,4- méthylph énol | 3,5- méthyl phénol | 3- méthoxy phénol | carvacrol | thymol | Δδ m | ET |
|-----|------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------|--------|-------|------|
| C2 | 145,05 | -0,37 | -0,46 | -0,44 | -0,37 | -0,46 | -0,52 | -0,33 | -0,32 | -0,41 | 0,07 |
| C7 | 131,92 | 0,15 | 0,15 | 0,18 | 0,11 | 0,14 | 0,17 | 0,09 | 0,10 | 0,14 | 0,03 |
| C6 | 124,34 | -0,09 | -0,10 | -0,11 | -0,08 | -0,09 | -0,14 | -0,07 | -0,05 | -0,09 | 0,03 |
| C1 | 111,69 | 0,31 | 0,38 | 0,36 | 0,30 | 0,37 | 0,43 | 0,29 | 0,27 | 0,34 | 0,05 |
| C3 | 73,48 | 0,63 | 0,73 | 0,71 | 0,59 | 0,72 | 0,80 | 0,54 | 0,57 | 0,66 | 0,09 |
| C4 | 42,06 | -0,10 | -0,09 | -0,10 | -0,08 | -0,10 | -0,11 | -0,05 | -0,07 | -0,09 | 0,02 |
| C10 | 27,85 | -0,26 | -0,33 | -0,29 | -0,28 | -0,35 | -0,40 | -0,26 | -0,24 | -0,30 | 0,05 |
| C8 | 25,71 | -0,01 | -0,02 | -0,01 | -0,01 | -0,02 | -0,02 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,01 |
| C5 | 22,81 | 0,03 | 0,04 | 0,03 | 0,02 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,01 |
| C9 | 17,70 | -0,01 | -0,01 | 0,00 | 0,01 | -0,01 | -0,02 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,01 |

Annexe 2 : variations des déplacements chimiques des carbones du linalol en présence d'une cétone

| n°C | linalol 0,5 mol.L ⁻¹ | menthone | pulégone | camphre | fenchone | verbénone | Δδ m | ET |
|-----|------------------------------------|----------|----------|---------|----------|-----------|-------|------|
| C2 | 145,05 | 0,07 | 0,07 | 0,10 | 0,09 | 0,13 | 0,09 | 0,02 |
| C7 | 131,92 | -0,19 | -0,13 | -0,24 | -0,20 | -0,32 | -0,22 | 0,07 |
| C6 | 124,34 | 0,11 | 0,12 | 0,12 | 0,10 | 0,15 | 0,12 | 0,02 |
| C1 | 111,69 | -0,05 | -0,09 | -0,09 | -0,07 | -0,12 | -0,08 | 0,03 |
| C3 | 73,48 | -0,08 | -0,18 | -0,18 | -0,14 | -0,24 | -0,16 | 0,06 |
| C4 | 42,06 | 0,10 | 0,07 | 0,10 | 0,09 | 0,11 | 0,09 | 0,02 |
| C10 | 27,85 | -0,05 | -0,07 | -0,04 | -0,02 | -0,08 | -0,05 | 0,02 |
| C8 | 25,71 | -0,02 | 0,00 | -0,02 | -0,02 | -0,03 | -0,02 | 0,01 |
| C5 | 22,81 | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | 0,00 | 0,01 |
| C9 | 17,70 | -0,03 | -0,03 | -0,03 | -0,03 | -0,04 | -0,03 | 0,00 |

Annexe 3 : variations des déplacements chimiques des carbones du linalol en présence d'un acétate.

| n°C | linalol 0,5 mol.L ⁻¹ | acétate de géranyle | acétate de citronellyle | acétate de néo- menthyle | acétate d' α-terpinyle | acétate de bornyle | Δδ m | ET |
|-----|------------------------------------|------------------------|----------------------------|--------------------------------|---------------------------|-----------------------|-------|------|
| C2 | 145,05 | 0,07 | 0,07 | 0,07 | 0,08 | 0,04 | 0,07 | 0,02 |
| C7 | 131,92 | -0,13 | -0,17 | -0,18 | -0,21 | -0,15 | -0,17 | 0,03 |
| C6 | 124,34 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,12 | 0,07 | 0,10 | 0,02 |
| C1 | 111,69 | -0,05 | -0,06 | -0,06 | -0,07 | -0,05 | -0,06 | 0,01 |
| C3 | 73,48 | -0,11 | -0,13 | -0,14 | -0,16 | -0,12 | -0,13 | 0,02 |
| C4 | 42,06 | 0,07 | 0,07 | 0,07 | 0,08 | 0,04 | 0,07 | 0,02 |
| C10 | 27,85 | -0,01 | -0,03 | -0,03 | -0,04 | -0,03 | -0,03 | 0,01 |
| C8 | 25,71 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C5 | 22,81 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | -0,01 | 0,01 | 0,01 |
| C9 | 17,70 | -0,01 | -0,02 | -0,02 | -0,02 | -0,02 | -0,02 | 0,00 |

Annexe 4 : variations des déplacements chimiques des carbones du linalol en présence d'un aldéhyde.

| n°C | linalol 0,5 mol.L ⁻¹ | néral/géranial | perillaldéhyde | myrténal | 2-vanilline | cuminaldéhyde | Δδ m | ET |
|-----|------------------------------------|----------------|----------------|----------|-------------|---------------|-------|------|
| C2 | 145,05 | 0,06 | 0,04 | 0,08 | 0,09 | 0,04 | 0,06 | 0,02 |
| C7 | 131,92 | -0,19 | -0,19 | -0,22 | -0,16 | -0,14 | -0,18 | 0,03 |
| C6 | 124,34 | 0,10 | 0,09 | 0,10 | 0,09 | 0,08 | 0,09 | 0,01 |
| C1 | 111,69 | -0,05 | -0,05 | -0,08 | -0,06 | -0,04 | -0,06 | 0,02 |
| C3 | 73,48 | -0,12 | -0,12 | -0,14 | -0,11 | -0,08 | -0,11 | 0,02 |
| C4 | 42,06 | 0,07 | 0,06 | 0,08 | 0,08 | 0,05 | 0,07 | 0,01 |
| C10 | 27,85 | -0,06 | -0,07 | -0,04 | -0,04 | -0,03 | -0,05 | 0,02 |
| C8 | 25,71 | 0,00 | 0,00 | -0,03 | -0,02 | 0,00 | -0,01 | 0,01 |
| C5 | 22,81 | 0,00 | -0,01 | -0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,01 |
| C9 | 17,70 | -0,02 | -0,02 | -0,03 | -0,03 | -0,02 | -0,02 | 0,01 |

Annexe 5 variations des déplacements chimiques des carbones du linalol en présence d'un oxyde.

| n°C | linalol 0,5 mol.L ⁻¹ | 1,8-cinéole | oxyde d'α- pinène | Oxyde de β-pinène | cis-époxyde de limonène | trans- époxyde de limonène | Δδ m | ET |
|-----|------------------------------------|-------------|----------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------------|-------|------|
| C2 | 145,05 | 0,04 | 0,03 | 0,06 | 0,04 | 0,03 | 0,04 | 0,01 |
| C7 | 131,92 | -0,13 | -0,17 | -0,22 | -0,17 | -0,15 | -0,17 | 0,03 |
| C6 | 124,34 | 0,06 | 0,06 | 0,09 | 0,07 | 0,06 | 0,07 | 0,01 |
| C1 | 111,69 | -0,02 | -0,06 | -0,08 | -0,05 | -0,04 | -0,05 | 0,02 |
| C3 | 73,48 | -0,08 | -0,13 | -0,18 | -0,12 | -0,10 | -0,12 | 0,04 |
| C4 | 42,06 | 0,05 | 0,04 | 0,06 | 0,05 | 0,04 | 0,05 | 0,01 |
| C10 | 27,85 | -0,01 | -0,03 | -0,06 | -0,04 | -0,05 | -0,04 | 0,02 |
| C8 | 25,71 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C5 | 22,81 | 0,00 | -0,02 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,01 |
| C9 | 17,70 | -0,01 | -0,02 | -0,02 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,01 |

Annexe 6 variations moyennes des déplacements chimiques des carbones du linalol observées en présence d'un dérivé alcool

| n°C | linalol 0,5 mol.L ⁻¹ | menthol | bornéol | fenchol | nérol | α-terpinéol | terpinèn-4-ol | Δδ m | ET |
|-----|------------------------------------|---------|---------|---------|-------|-------------|---------------|-------|------|
| C2 | 145,05 | 0,03 | 0,01 | 0,02 | 0,03 | 0,00 | 0,07 | 0,03 | 0,02 |
| C7 | 131,92 | -0,10 | -0,10 | -0,12 | -0,15 | -0,16 | -0,18 | -0,13 | 0,03 |
| C6 | 124,34 | 0,06 | 0,04 | 0,04 | 0,09 | 0,06 | 0,10 | 0,06 | 0,03 |
| C1 | 111,69 | -0,02 | 0,00 | -0,01 | -0,01 | 0,00 | -0,04 | -0,01 | 0,02 |
| C3 | 73,48 | -0,06 | -0,04 | -0,06 | -0,08 | -0,07 | -0,13 | -0,07 | 0,03 |
| C4 | 42,06 | 0,04 | 0,03 | 0,03 | 0,07 | 0,04 | 0,06 | 0,04 | 0,02 |
| C10 | 27,85 | -0,06 | -0,07 | -0,07 | -0,12 | -0,15 | -0,09 | -0,09 | 0,04 |
| C8 | 25,71 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C5 | 22,81 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,01 |
| C9 | 17,70 | 0,00 | -0,01 | -0,01 | -0,02 | -0,02 | -0,01 | -0,01 | 0,01 |

Annexe 7 : variations des déplacements chimiques des carbones du (*E*)-nérolidols observées en présence d'un dérivé phénolique.

| n°C | <i>E</i> -nérolidol 0,5 mol.L ⁻¹ * | thymol | carvacrol | 3-isopropyl phénol | 4-éthyl phénol | 3,5- diméthyl phénol | Δδ m | ET |
|-----|--|--------|-----------|-----------------------|-------------------|----------------------------|-------|------|
| C2 | 145,06 | -0,35 | -0,30 | -0,41 | -0,61 | -0,52 | -0,44 | 0,13 |
| C7 | 135,54 | 0,13 | 0,07 | 0,13 | 0,21 | 0,16 | 0,14 | 0,05 |
| C11 | 131,41 | 0,03 | -0,01 | 0,02 | 0,05 | 0,04 | 0,03 | 0,02 |
| C6 | 124,26 | -0,12 | -0,10 | -0,14 | -0,19 | -0,16 | -0,14 | 0,03 |
| C10 | 124,24 | 0,02 | 0,04 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 |
| C1 | 111,69 | 0,28 | 0,25 | 0,33 | 0,49 | 0,40 | 0,35 | 0,10 |
| C3 | 73,52 | 0,60 | 0,49 | 0,64 | 0,90 | 0,79 | 0,68 | 0,16 |
| C4 | 42,05 | -0,09 | -0,04 | -0,07 | -0,15 | -0,12 | -0,09 | 0,04 |
| C8 | 39,71 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | -0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,01 |
| C13 | 27,86 | -0,24 | -0,24 | -0,28 | -0,39 | -0,37 | -0,30 | 0,07 |
| C9 | 26,65 | -0,02 | 0,00 | -0,01 | -0,02 | -0,02 | -0,01 | 0,01 |
| C12 | 25,71 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C5 | 22,73 | -0,01 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,02 | 0,02 |
| C15 | 17,69 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,00 |
| C14 | 16,02 | -0,01 | -0,02 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,00 |

*concentration du nérolidol (mélange de 2 isomère) = 0,5 mol.L⁻¹, (l'isomère E/Z=60/40)

Annexe 8 : variations des déplacements chimiques des carbones du (Z)-nérolidol observées en présence d'un dérivé phénolique.

| n°C | Z-nérolidol 0,5 mol.L ⁻¹ * | thymol | carvacrol | 3-isopropyl phénol | 4-éthyl phénol | 3,5- diméthyl phénol | Δδ m | ET |
|-----|--|--------|-----------|-----------------------|-------------------|----------------------------|-------|------|
| C2 | 145,03 | -0,35 | -0,30 | -0,40 | -0,58 | -0,52 | -0,43 | 0,12 |
| C7 | 135,59 | 0,11 | 0,05 | 0,11 | 0,16 | 0,14 | 0,11 | 0,04 |
| C11 | 131,58 | 0,11 | -0,02 | 0,00 | 0,03 | 0,02 | 0,03 | 0,05 |
| C6 | 125,02 | -0,09 | -0,06 | -0,10 | -0,16 | -0,13 | -0,11 | 0,04 |
| C10 | 124,28 | -0,01 | 0,01 | 0,00 | -0,03 | 0,00 | -0,01 | 0,02 |
| C1 | 111,72 | 0,29 | 0,26 | 0,34 | 0,46 | 0,41 | 0,35 | 0,08 |
| C3 | 73,42 | 0,59 | 0,48 | 0,63 | 0,94 | 0,78 | 0,68 | 0,18 |
| C4 | 42,37 | -0,10 | -0,05 | -0,08 | -0,15 | -0,13 | -0,10 | 0,04 |
| C8 | 31,94 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | -0,01 | 0,00 | 0,01 |
| C13 | 27,80 | -0,25 | -0,24 | -0,29 | -0,40 | -0,38 | -0,31 | 0,07 |
| C9 | 26,55 | -0,02 | -0,01 | -0,02 | -0,03 | -0,02 | -0,02 | 0,01 |
| C12 | 25,75 | 0,00 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,00 |
| C5 | 23,40 | 0,00 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,00 |
| C15 | 22,55 | 0,03 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,03 | 0,04 | 0,01 |
| C14 | 17,64 | -0,02 | -0,02 | -0,01 | -0,01 | -0,02 | -0,02 | 0,01 |

*concentration du nerolidol (mélange de 2 isomère) = 0,5 mol.L⁻¹, (l'isomère E/Z=60/40)

Annexe 9 : variations des déplacements chimiques des carbones du (6E,10E)-géranyllinalol observées en présence d'un dérivé phénolique

| n°C | géranyllinalol 0,5 mol.L ⁻¹ * | thymol | carvacrol | 3-isopropyl phénol | 4-éthyl phénol | 3,5- diméthyl phénol | Δδ m | ET |
|-----|---|--------|-----------|-----------------------|-------------------|----------------------------|-------|------|
| C2 | 145,07 | -0,34 | -0,29 | -0,47 | -0,56 | -0,52 | -0,44 | 0,12 |
| C7 | 135,52 | 0,13 | 0,12 | 0,16 | 0,18 | 0,13 | 0,14 | 0,03 |
| C11 | 135,00 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,04 | 0,03 | 0,03 | 0,01 |
| C15 | 131,21 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,03 | 0,02 | 0,01 | 0,01 |
| C14 | 124,40 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,00 |
| C6 | 124,24 | -0,10 | -0,10 | -0,12 | -0,12 | -0,12 | -0,11 | 0,01 |
| C10 | 124,12 | 0,00 | 0,01 | -0,02 | -0,03 | -0,03 | -0,01 | 0,02 |
| C1 | 111,67 | 0,27 | 0,25 | 0,39 | 0,45 | 0,41 | 0,35 | 0,09 |
| C3 | 73,46 | 0,58 | 0,50 | 0,75 | 0,87 | 0,81 | 0,70 | 0,16 |
| C4 | 42,09 | -0,10 | -0,06 | -0,09 | -0,14 | -0,13 | -0,10 | 0,03 |
| C8 | 39,73 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C12 | 39,71 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C17 | 27,87 | -0,24 | -0,21 | -0,33 | -0,38 | -0,39 | -0,31 | 0,08 |
| C13 | 26,76 | -0,01 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,01 |
| C9 | 26,56 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C16 | 25,71 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C5 | 22,72 | 0,00 | 0,02 | 0,00 | 0,03 | 0,03 | 0,02 | 0,02 |
| C20 | 17,69 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C18 | 16,03 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C19 | 16,01 | 0,00 | -0,01 | 0,00 | -0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,01 |

*concentration du geranyllinalol (mélange de 4 isomère) = 0,5 mol.L⁻¹, l'isomère (6E,10E)-géranyllinalol présente environ 40% du mélange

Annexe 10 : variations des déplacements chimiques des carbones du (*E*)-nérolidol observées en présence d'une cétone

| n°C | <i>E</i> -nérolidol 0,5 mol.L ⁻¹ * | verbénone | camphre | fenchone | pulégone | carvone | Δδ m | ET |
|-----|--|-----------|---------|----------|----------|---------|-------|------|
| C2 | 145,06 | 0,08 | 0,04 | 0,03 | 0,05 | 0,07 | 0,05 | 0,02 |
| C7 | 135,54 | -0,26 | -0,15 | -0,15 | -0,18 | -0,13 | -0,17 | 0,05 |
| C11 | 131,41 | -0,14 | -0,09 | -0,09 | -0,10 | -0,10 | -0,10 | 0,02 |
| C6 | 124,26 | 0,09 | 0,03 | 0,03 | 0,05 | 0,07 | 0,05 | 0,03 |
| C10 | 124,24 | 0,04 | 0,02 | 0,03 | 0,04 | 0,05 | 0,04 | 0,01 |
| C1 | 111,69 | -0,12 | -0,07 | -0,06 | -0,07 | -0,08 | -0,08 | 0,02 |
| C3 | 73,52 | -0,24 | -0,14 | -0,13 | -0,13 | -0,16 | -0,16 | 0,05 |
| C4 | 42,05 | 0,07 | 0,03 | 0,04 | 0,06 | 0,06 | 0,05 | 0,02 |
| C8 | 39,71 | -0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,01 |
| C13 | 27,86 | -0,07 | -0,04 | -0,03 | -0,06 | -0,04 | -0,05 | 0,02 |
| C9 | 26,65 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,01 |
| C12 | 25,71 | -0,01 | 0,00 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,00 |
| C5 | 22,73 | -0,02 | -0,01 | -0,01 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | 0,01 |
| C15 | 17,69 | -0,02 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,00 |
| C14 | 16,02 | -0,03 | -0,02 | -0,02 | -0,02 | -0,02 | -0,02 | 0,00 |

*concentration du nérolidol (mélange de 2 isomère) = 0,5 mol.L⁻¹, (l'isomère E/Z=60/40)

Annexe 11: variations des déplacements chimiques des carbones du (Z)-nérolidol observées en présence d'une cétone

| Carbones | Z-nérolidol 0,5 mol.L ⁻¹ * | verbénone | camphre | fenchone | pulégone | carvone | $\Delta\delta$ m | ET |
|----------|--|-----------|---------|----------|----------|---------|------------------|------|
| C2 | 145,03 | 0,08 | 0,04 | 0,03 | 0,05 | 0,07 | 0,05 | 0,02 |
| C7 | 135,59 | -0,26 | -0,15 | -0,14 | -0,18 | -0,23 | -0,19 | 0,05 |
| C11 | 131,58 | -0,14 | -0,09 | -0,09 | -0,11 | -0,10 | -0,11 | 0,02 |
| C6 | 125,02 | 0,12 | 0,06 | 0,06 | 0,09 | 0,09 | 0,08 | 0,03 |
| C10 | 124,28 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,04 | 0,03 | 0,02 | 0,01 |
| C1 | 111,72 | -0,11 | -0,07 | -0,06 | -0,06 | -0,07 | -0,07 | 0,02 |
| C3 | 73,42 | -0,23 | -0,14 | -0,12 | -0,13 | -0,15 | -0,15 | 0,04 |
| C4 | 42,37 | 0,06 | 0,03 | 0,03 | 0,05 | 0,06 | 0,05 | 0,02 |
| C8 | 31,94 | -0,03 | -0,02 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,02 | 0,01 |
| C13 | 27,80 | -0,06 | -0,03 | -0,03 | -0,05 | -0,03 | -0,04 | 0,01 |
| C9 | 26,55 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,01 |
| C12 | 25,75 | -0,01 | 0,00 | -0,01 | -0,01 | 0,00 | -0,01 | 0,01 |
| C5 | 23,40 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C15 | 22,55 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | 0,01 |
| C14 | 17,64 | -0,02 | -0,01 | -0,01 | -0,02 | -0,01 | -0,01 | 0,01 |

*concentration du nérolidol (mélange de 2 isomère) = 0,5 mol.L⁻¹, (l'isomère E/Z=60/40)

Annexe 12 : variations des déplacements chimiques des carbones du (6E,10E)-géranyllinalol observées en présence d'une cétone

| n°C | géranyllinalol 0,5 mol.L ⁻¹ | verbénone | camphre | fenchone | pulégone | carvone | Δδ m | ET |
|-----|---|-----------|---------|----------|----------|---------|-------|------|
| C2 | 145,07 | 0,07 | 0,03 | 0,03 | 0,05 | 0,06 | 0,05 | 0,02 |
| C7 | 135,52 | -0,27 | -0,13 | -0,20 | -0,20 | -0,12 | -0,18 | 0,06 |
| C11 | 135,00 | -0,12 | -0,06 | -0,10 | -0,09 | -0,08 | -0,09 | 0,02 |
| C15 | 131,21 | -0,13 | -0,07 | -0,11 | -0,10 | -0,09 | -0,10 | 0,02 |
| C14 | 124,40 | -0,01 | -0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,01 |
| C6 | 124,24 | 0,12 | 0,13 | 0,08 | 0,10 | 0,09 | 0,10 | 0,02 |
| C10 | 124,12 | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,02 | 0,00 | 0,01 | 0,01 |
| C1 | 111,67 | -0,10 | -0,06 | -0,06 | -0,07 | -0,07 | -0,07 | 0,02 |
| C3 | 73,46 | -0,22 | -0,11 | -0,14 | -0,15 | -0,15 | -0,15 | 0,04 |
| C4 | 42,09 | 0,06 | 0,02 | 0,03 | 0,05 | 0,05 | 0,04 | 0,02 |
| C8 | 39,73 | -0,02 | -0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | 0,01 |
| C12 | 39,71 | -0,01 | -0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,01 |
| C17 | 27,87 | -0,08 | -0,03 | -0,09 | -0,06 | -0,06 | -0,06 | 0,02 |
| C13 | 26,76 | -0,03 | -0,02 | -0,02 | -0,01 | -0,01 | -0,02 | 0,01 |
| C9 | 26,56 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | 0,01 |
| C16 | 25,71 | -0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C5 | 22,72 | -0,02 | -0,01 | -0,01 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | 0,01 |
| C20 | 17,69 | -0,02 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,00 |
| C18 | 16,03 | -0,04 | -0,03 | -0,03 | -0,03 | -0,03 | -0,03 | 0,00 |
| C19 | 16,01 | -0,02 | -0,05 | -0,05 | -0,05 | -0,05 | -0,04 | 0,01 |

*concentration du géranyllinalol (mélange de 4 isomère) = 0,5 mol.L⁻¹, l'isomère (6E,10E)-géranyllinalol présente environ 40% du mélange

Annexe 13 : variations des déplacements chimiques des carbones du (*E*)-nérolidol observées en présence d'un alcool

| n°C | <i>E</i> -nérolidol 0,5 mol.L ⁻¹ | fenchol | perillylalcool | terpinen-4- ol | bornéol | menthol | Δδ m | ET |
|-----|--|---------|----------------|-------------------|---------|---------|-------|------|
| C2 | 145,06 | 0,01 | -0,02 | 0,05 | 0,01 | 0,03 | 0,02 | 0,03 |
| C7 | 135,54 | -0,11 | -0,11 | -0,12 | -0,13 | -0,11 | -0,12 | 0,01 |
| C11 | 131,41 | -0,07 | -0,05 | -0,07 | -0,08 | -0,06 | -0,07 | 0,01 |
| C6 | 124,26 | 0,00 | 0,02 | 0,03 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 |
| C10 | 124,24 | 0,02 | 0,03 | 0,05 | 0,03 | 0,04 | 0,03 | 0,01 |
| C1 | 111,69 | -0,02 | -0,01 | -0,04 | -0,02 | -0,03 | -0,02 | 0,01 |
| C3 | 73,52 | -0,08 | -0,06 | -0,10 | -0,08 | -0,08 | -0,08 | 0,01 |
| C4 | 42,05 | 0,02 | 0,04 | 0,05 | 0,03 | 0,04 | 0,04 | 0,01 |
| C8 | 39,71 | 0,00 | 0,01 | 0,02 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| C13 | 27,86 | -0,07 | -0,15 | -0,08 | -0,09 | -0,08 | -0,09 | 0,03 |
| C9 | 26,65 | -0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,01 |
| C12 | 25,71 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C5 | 22,73 | -0,01 | -0,01 | 0,01 | -0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,01 |
| C15 | 17,69 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,00 |
| C14 | 16,02 | -0,01 | -0,02 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,00 |

*concentration du nérolidol (mélange de 2 isomère) = 0,5 mol.L⁻¹, (l'isomère E/Z=60/40)

Annexe 14 : variations des déplacements chimiques des carbones du (Z)-nérolidol observées en présence d'un alcool

| n°C | Z-nérolidol 0,5 mol.L ⁻¹ | fenchol | perillylalcool | terpinen-4- ol | bornéol | menthol | Δδ m | ET |
|-----|--|---------|----------------|-------------------|---------|---------|-------|------|
| C2 | 145,03 | 0,01 | -0,03 | 0,05 | 0,00 | 0,03 | 0,01 | 0,03 |
| C7 | 135,59 | -0,10 | -0,11 | -0,11 | -0,12 | -0,11 | -0,11 | 0,01 |
| C11 | 131,58 | -0,07 | -0,05 | -0,06 | -0,08 | -0,06 | -0,06 | 0,01 |
| C6 | 125,02 | 0,03 | 0,05 | 0,06 | 0,04 | 0,05 | 0,05 | 0,01 |
| C10 | 124,28 | 0,01 | 0,02 | 0,03 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 |
| C1 | 111,72 | -0,02 | 0,00 | -0,04 | -0,02 | -0,03 | -0,02 | 0,01 |
| C3 | 73,42 | -0,07 | -0,05 | -0,10 | -0,07 | -0,07 | -0,07 | 0,02 |
| C4 | 42,37 | 0,01 | 0,03 | 0,04 | 0,02 | 0,03 | 0,03 | 0,01 |
| C8 | 31,94 | -0,01 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,01 |
| C13 | 27,80 | -0,07 | -0,14 | -0,08 | -0,09 | -0,08 | -0,09 | 0,03 |
| C9 | 26,55 | -0,01 | 0,00 | 0,01 | -0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,01 |
| C12 | 25,75 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C5 | 23,40 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C15 | 22,55 | -0,01 | 0,00 | 0,01 | -0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,01 |
| C14 | 17,64 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,00 |

*concentration du nérolidol (mélange de 2 isomère) = 0,5 mol.L⁻¹, (l'isomère E/Z=60/40)

Annexe 15 : variations des déplacements chimiques des carbones du (6E ,10E)- géranyllinalol observées en présence d'un alcool

| n°C | (6E, 10 E) geranyllinalol* | fenchol | perillylalcool | terpinen-4- ol | bornéol | menthol | $\Delta\delta$ m | ET |
|-----|-------------------------------|---------|----------------|-------------------|---------|---------|------------------|------|
| C2 | 145,07 | 0,00 | -0,04 | 0,04 | 0,00 | 0,02 | 0,00 | 0,03 |
| C7 | 135,52 | -0,12 | -0,16 | -0,10 | -0,09 | -0,13 | -0,12 | 0,03 |
| C11 | 135,00 | -0,06 | -0,06 | -0,04 | -0,05 | -0,06 | -0,05 | 0,01 |
| C15 | 131,21 | -0,07 | -0,06 | -0,05 | -0,05 | -0,06 | -0,06 | 0,01 |
| C14 | 124,40 | 0,00 | 0,02 | 0,02 | 0,00 | -0,01 | 0,01 | 0,01 |
| C6 | 124,24 | 0,03 | 0,06 | 0,05 | 0,03 | 0,05 | 0,04 | 0,01 |
| C10 | 124,12 | 0,00 | 0,03 | 0,02 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| C1 | 111,67 | -0,01 | 0,00 | -0,02 | -0,01 | -0,02 | -0,01 | 0,01 |
| C3 | 73,46 | -0,07 | -0,07 | -0,06 | -0,05 | -0,08 | -0,07 | 0,01 |
| C4 | 42,09 | 0,01 | 0,04 | 0,03 | 0,01 | 0,03 | 0,02 | 0,01 |
| C8 | 39,73 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| C12 | 39,71 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| C17 | 27,87 | -0,09 | -0,20 | -0,10 | -0,09 | -0,10 | -0,12 | 0,05 |
| C13 | 26,76 | -0,01 | -0,01 | 0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,01 |
| C9 | 26,56 | -0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,01 |
| C16 | 25,71 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C5 | 22,72 | -0,01 | 0,00 | 0,01 | -0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,01 |
| C20 | 17,69 | -0,01 | -0,01 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | -0,01 | 0,01 |
| C18 | 16,03 | -0,01 | -0,02 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,00 |
| C19 | 16,01 | -0,01 | -0,01 | 0,00 | -0,01 | 0,00 | -0,01 | 0,01 |

*concentration du géranyllinalol (mélange de 4 isomère) = 0,5 mol.L⁻¹, l'isomère (6E,10E)-géranyllinalol présente environ 40% du mélange

Annexe 16 : variations des déplacements chimiques des carbones du citronellol observées en présence d'un dérivé phénolique

| n°C | citronellol 0,5 mol.L ⁻¹ | carvacrol | thymol | 3-isopropyl phénol | 4-éthyl phénol | 3,5-diméthyl phénol | Δδ m | ET |
|-----|--|-----------|--------|-----------------------|-------------------|------------------------|-------|------|
| C7 | 131,27 | -0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | -0,03 | 0,00 | 0,02 |
| C6 | 124,73 | 0,00 | -0,02 | -0,03 | -0,01 | 0,01 | -0,01 | 0,02 |
| C1 | 61,12 | 0,05 | 0,12 | 0,14 | 0,13 | 0,06 | 0,10 | 0,04 |
| C2 | 39,89 | -0,19 | -0,17 | -0,26 | -0,27 | -0,25 | -0,23 | 0,04 |
| C4 | 37,24 | -0,02 | -0,03 | -0,05 | -0,05 | -0,03 | -0,04 | 0,01 |
| C3 | 29,18 | 0,03 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,03 | 0,02 | 0,01 |
| C8 | 25,73 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,02 | -0,01 | 0,00 |
| C5 | 25,47 | -0,01 | -0,01 | -0,03 | -0,02 | -0,01 | -0,02 | 0,01 |
| C10 | 19,52 | -0,04 | -0,03 | -0,05 | -0,05 | -0,05 | -0,04 | 0,01 |
| C9 | 17,65 | -0,02 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,02 | -0,01 | 0,01 |

Annexe 17 : variations des déplacements chimiques des carbones du tetrahydrogéraniol observées en présence d'un dérivé phénolique.

| n°C | tetrahydrogéraniol 0,5 mol.L ⁻¹ | carvacrol | thymol | 3-isopropyl phénol | 4-éthyl phénol | 3,5-diméthyl phénol | Δδ m | ET |
|-----|---|-----------|--------|-----------------------|-------------------|------------------------|-------|------|
| C1 | 61,16 | 0,10 | 0,15 | 0,16 | 0,16 | 0,20 | 0,15 | 0,04 |
| C2 | 39,98 | -0,18 | -0,20 | -0,24 | -0,26 | -0,24 | -0,22 | 0,03 |
| C6 | 39,28 | -0,01 | -0,01 | -0,02 | -0,02 | -0,02 | -0,02 | 0,01 |
| C4 | 37,40 | -0,02 | -0,02 | -0,04 | -0,05 | -0,04 | -0,03 | 0,01 |
| C3 | 29,53 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | -0,01 | 0,00 | 0,01 |
| C7 | 27,99 | -0,01 | -0,01 | -0,02 | 0,00 | -0,01 | -0,01 | 0,01 |
| C5 | 24,71 | -0,01 | -0,01 | -0,03 | -0,02 | -0,02 | -0,02 | 0,01 |
| C8 | 22,72 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,00 |
| C9 | 22,61 | 0,00 | -0,01 | -0,01 | 0,00 | -0,01 | -0,01 | 0,01 |
| C10 | 19,65 | -0,05 | -0,06 | -0,06 | -0,07 | -0,07 | -0,06 | 0,01 |

Annexe 22 : variations des déplacements chimiques des carbones du géraniol observées en présence d'un dérivé phénolique.

| n°C | géraniol* | carvacrol | thymol | 3-isopropyl phénol | 4-éthyl phénol | 3,5-diméthyl phénol | $\Delta\delta$ m | ET |
|-----|-----------|-----------|--------|-----------------------|-------------------|------------------------|------------------|------|
| C1 | 191,33 | 0,60 | 0,70 | 0,85 | 0,84 | 0,83 | 0,76 | 0,10 |
| C3 | 163,91 | 1,22 | 1,42 | 1,76 | 1,75 | 1,71 | 1,57 | 0,22 |
| C7 | 132,91 | 0,05 | 0,06 | 0,09 | 0,08 | 0,08 | 0,07 | 0,01 |
| C2 | 127,43 | -0,12 | -0,14 | -0,17 | -0,17 | -0,17 | -0,15 | 0,02 |
| C6 | 122,59 | -0,05 | -0,06 | -0,10 | -0,08 | -0,07 | -0,07 | 0,02 |
| C4 | 40,62 | 0,05 | 0,06 | 0,08 | 0,07 | 0,08 | 0,07 | 0,01 |
| C5 | 25,75 | -0,01 | -0,02 | -0,02 | -0,02 | -0,02 | -0,02 | 0,00 |
| C8 | 25,67 | -0,01 | -0,04 | -0,02 | -0,02 | -0,02 | -0,02 | 0,01 |
| C9 | 17,73 | -0,01 | -0,02 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,00 |
| C10 | 17,59 | 0,04 | 0,05 | 0,09 | 0,08 | 0,07 | 0,07 | 0,02 |

*concentration du citral (mélange de néral et géraniol)= 0,5 mol.L⁻¹ (néral/géraniol=40/60)

Annexe 23 : variations des déplacements chimiques des carbones du néral observées en présence d'un dérivé phénolique

| n°C | néral* | thymol | carvacrol | 3-isopropyl phénol | 4-éthyl phénol | 3,5-diméthyl phénol | $\Delta\delta$ m | ET |
|-----|--------|--------|-----------|-----------------------|-------------------|------------------------|------------------|------|
| C1 | 190,82 | 0,69 | 0,59 | 0,85 | 0,84 | 0,82 | 0,76 | 0,10 |
| C3 | 163,87 | 1,36 | 1,18 | 1,72 | 1,70 | 1,66 | 1,52 | 0,22 |
| C7 | 133,70 | 0,13 | 0,11 | 0,18 | 0,17 | 0,16 | 0,15 | 0,03 |
| C2 | 128,67 | -0,14 | -0,12 | -0,18 | -0,18 | -0,18 | -0,16 | 0,03 |
| C6 | 122,29 | -0,09 | -0,08 | -0,13 | -0,11 | -0,11 | -0,10 | 0,02 |
| C4 | 32,59 | 0,05 | 0,04 | 0,07 | 0,07 | 0,06 | 0,06 | 0,01 |
| C5 | 27,06 | -0,04 | -0,03 | -0,05 | -0,05 | -0,04 | -0,04 | 0,01 |
| C8 | 25,66 | -0,03 | -0,02 | -0,03 | -0,03 | -0,02 | -0,03 | 0,00 |
| C10 | 25,08 | 0,07 | 0,05 | 0,10 | 0,09 | 0,09 | 0,08 | 0,02 |
| C9 | 17,73 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

*concentration du citral (mélange de néral et géraniol)= 0,5 mol.L⁻¹ (néral/géraniol=40/60)

Annexe 24 : variations des déplacements chimiques des carbones du géraniol observées en présence d'un alcool

| n°C | géraniol* | linalol | bornéol | géraniol | α-terpinéol | Δδ m | ET |
|-----|-----------|---------|---------|----------|-------------|-------|------|
| C1 | 191,33 | 0,02 | 0,06 | 0,07 | 0,02 | 0,04 | 0,03 |
| C3 | 163,91 | 0,08 | 0,15 | 0,18 | 0,09 | 0,13 | 0,05 |
| C7 | 132,91 | -0,02 | -0,02 | 0,00 | -0,03 | -0,02 | 0,01 |
| C2 | 127,43 | -0,01 | -0,03 | -0,01 | -0,02 | -0,02 | 0,01 |
| C6 | 122,59 | 0,01 | -0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| C4 | 40,62 | 0,01 | 0,01 | 0,03 | 0,01 | 0,02 | 0,01 |
| C5 | 25,75 | 0,00 | -0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,00 | 0,01 |
| C8 | 25,67 | 0,00 | -0,01 | -0,02 | -0,01 | -0,01 | 0,01 |
| C9 | 17,73 | -0,01 | 0,00 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,01 |
| C10 | 17,59 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,00 |

*concentration du citral (mélange de néral et géraniol)= 0,5 mol.L⁻¹ (néral/géraniol=40/60)

Annexe 25 : variations des déplacements chimiques des carbones du néral observées en présence d'un alcool

| n°C | néral* | linalol | bornéol | géraniol | α-terpinéol | Δδ m | ET |
|-----|--------|---------|---------|----------|-------------|-------|------|
| C1 | 190,82 | 0,02 | 0,05 | 0,07 | 0,01 | 0,04 | 0,03 |
| C3 | 163,87 | 0,08 | 0,14 | 0,17 | 0,09 | 0,12 | 0,04 |
| C7 | 133,70 | -0,02 | -0,02 | 0,00 | -0,02 | -0,01 | 0,01 |
| C2 | 128,67 | -0,01 | -0,03 | -0,02 | -0,02 | -0,02 | 0,01 |
| C6 | 122,29 | 0,00 | -0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,00 | 0,02 |
| C4 | 32,59 | 0,00 | -0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,01 |
| C5 | 27,06 | 0,00 | -0,02 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,01 |
| C8 | 25,66 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,00 |
| C10 | 25,08 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | 0,00 | 0,00 |
| C9 | 17,73 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

*concentration du citral (mélange de néral et géraniol)= 0,5 mol.L⁻¹ (néral/géraniol=40/60)

Annexe 26 : variations des déplacements chimiques des carbones du géranial observées en présence d'un acétate.

| n°C | géranial* | acétate de linalyle | acétate de bornyle | acétate de geranyle | acétate de terpényle | $\Delta\delta$ m | ET |
|-----|-----------|---------------------|--------------------|---------------------|----------------------|------------------|------|
| C1 | 191,33 | -0,10 | -0,11 | -0,11 | -0,14 | -0,12 | 0,02 |
| C3 | 163,91 | -0,13 | -0,19 | -0,20 | -0,20 | -0,18 | 0,03 |
| C7 | 132,91 | -0,05 | -0,06 | -0,05 | -0,05 | -0,05 | 0,01 |
| C2 | 127,43 | 0,01 | 0,00 | 0,03 | 0,03 | 0,02 | 0,01 |
| C6 | 122,59 | 0,04 | 0,03 | 0,07 | 0,07 | 0,05 | 0,02 |
| C4 | 40,62 | 0,01 | -0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 |
| C5 | 25,75 | 0,01 | 0,00 | 0,03 | 0,03 | 0,02 | 0,02 |
| C8 | 25,67 | 0,00 | -0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,02 |
| C9 | 17,73 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | 0,00 |
| C10 | 17,59 | -0,02 | -0,04 | -0,03 | -0,03 | -0,03 | 0,01 |

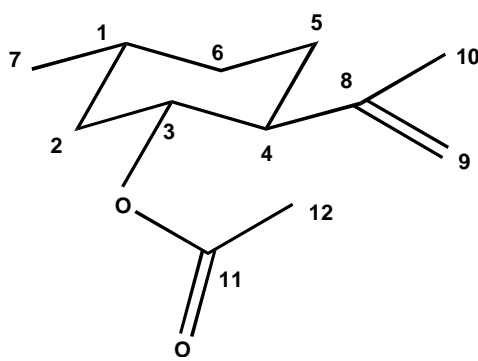
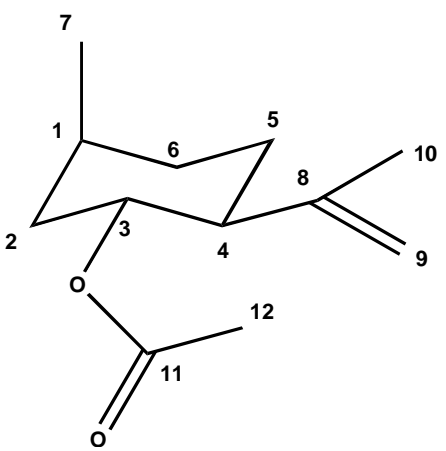
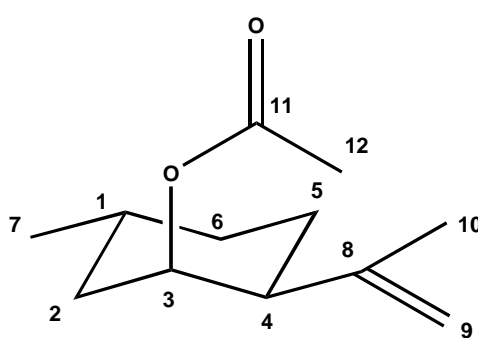
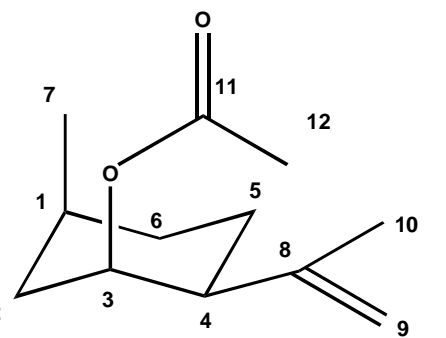
*concentration du citral (mélange de néral et géranial)= 0,5 mol.L⁻¹ (néral/géranial=40/60)

Annexe 27 : variations des déplacements chimiques des carbones du néral observées en présence d'un acétate.

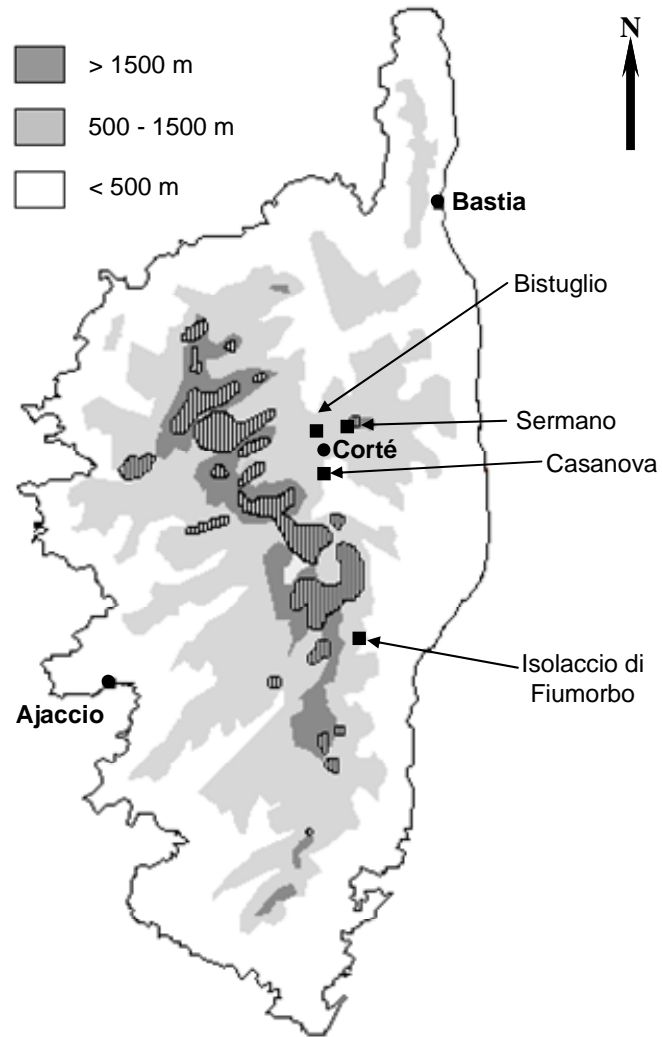
| n°C | néral* | acétate de linalyle | acétate de bornyle | acétate de géranyle | acétate de terpényle | $\Delta\delta$ m | ET |
|-----|--------|---------------------|--------------------|---------------------|----------------------|------------------|------|
| C1 | 190,82 | -0,10 | -0,15 | -0,14 | -0,15 | -0,14 | 0,02 |
| C3 | 163,87 | -0,13 | -0,09 | -0,20 | -0,19 | -0,15 | 0,05 |
| C7 | 133,70 | -0,05 | -0,06 | -0,05 | -0,07 | -0,06 | 0,01 |
| C2 | 128,67 | 0,01 | 0,00 | 0,03 | 0,02 | 0,02 | 0,01 |
| C6 | 122,29 | 0,04 | 0,03 | 0,06 | 0,05 | 0,05 | 0,01 |
| C4 | 32,59 | -0,01 | -0,02 | 0,00 | -0,01 | -0,01 | 0,01 |
| C5 | 27,06 | 0,00 | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| C8 | 25,66 | 0,00 | 0,00 | -0,01 | -0,01 | 0,00 | 0,01 |
| C10 | 25,08 | -0,01 | -0,03 | -0,02 | -0,03 | -0,02 | 0,01 |
| C9 | 17,73 | -0,01 | -0,01 | 0,00 | -0,01 | -0,01 | 0,01 |

*concentration du citral (mélange de néral et géranial)= 0,5 mol.L⁻¹ (néral/géranial=40/60).

Annexe 28: structures et données RMN ^{13}C des 4 isomères de l'acétate d'isopulégyle

|  <p style="text-align: center;">l'acétate d'isopulégyle</p> | | | | |  <p style="text-align: center;">l'acétate d'iso-isopulégyle</p> | | | | |
|--|-------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------------|--|--|--|--|--|
|  <p style="text-align: center;">l'acétate de néo-isopulégyle</p> | | | | |  <p style="text-align: center;">l'acétate de néoiso-isopulégyle</p> | | | | |
| n° C | l'acétate d'isopulégyle | l'acétate de néoisopulégyle | l'acétate d'isoisopulégyle | l'acétate de néoisoisopulégyle | | | | | |
| C-1 | 31,34 | 26,60 | 27,98 | 28,10 | | | | | |
| C-2 | 40,41 | 39,24 | 36,82 | 35,62 | | | | | |
| C-3 | 73,51 | 70,40 | 70,52 | 72,20 | | | | | |
| C-4 | 50,66 | 46,79 | 50,06 | 45,48 | | | | | |
| C-5 | 30,34 | 24,98 | 25,02 | 22,64 | | | | | |
| C-6 | 34,07 | 34,56 | 30,54 | 30,65 | | | | | |
| C-7 | 21,98 | 22,41 | 18,88 | 20,87 | | | | | |
| C-8 | 146,21 | 146,28 | 145,96 | 145,65 | | | | | |
| C-9 | 111,60 | 110,52 | 111,60 | 111,67 | | | | | |
| C-10 | 19,48 | 22,11 | 20,13 | 23,15 | | | | | |
| C-11 | 170,56 | 170,54 | 170,47 | 170,58 | | | | | |
| C-12 | 21,12 | 21,10 | 21,21 | 21,35 | | | | | |

Annexe 29 : échantillonnage de *S. corsica*



Annexe 30 : composition chimique des 33 échantillons d'huile essentielle de *S. corsica* de Corse.

| | Composé/Echantillon | Ir A | Ir P | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
|----|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1 | (Z)-hex-3-en-1-ol | 832 | 1384 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | tr | 0,4 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | - | 0,1 | tr | 0,1 | 0,1 |
| 2 | (E)-hex-2-en-1-ol | 842 | 1406 | tr | tr | 0,1 | tr | tr | 0,1 | 0,2 | 0,1 | tr | tr | 0,1 | - | 0,1 | tr | tr | tr |
| 3 | hexanol-1 | 845 | 1349 | tr | 0,1 | 0,1 | tr | tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | tr | tr | 0,1 | - | tr | tr | 0,1 | 0,1 |
| 4 | santolinatriène | 901 | 1030 | 42,9 | 29,0 | 27,1 | 26,6 | 25,3 | 25,0 | 22,4 | 22,4 | 22,2 | 20,0 | 18,5 | 18,4 | 18,0 | 18,0 | 17,9 | 17,9 |
| 5 | α -thujène | 923 | 1027 | tr | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | tr | tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | tr | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 |
| 6 | benzaldéhyde | 929 | 1529 | tr | tr | 0,1 | tr | 0,1 | tr | tr | 0,1 | tr | 0,1 | tr | tr | tr | 0,1 | - | 0,1 |
| 7 | α -pinène | 931 | 1025 | 0,2 | 0,4 | 0,5 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,6 | 0,5 |
| 8 | camphène | 943 | 1070 | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr |
| 9 | sabinène | 965 | 1124 | 3,0 | 7,2 | 4,0 | 3,1 | 2,2 | 1,9 | 3,9 | 3,8 | 3,1 | 2,2 | 5,2 | 3,5 | 3,2 | 4,7 | 3,4 | 3,2 |
| 10 | β -pinène | 970 | 1113 | 2,7 | 6,3 | 3,6 | 5,1 | 2,0 | 1,9 | 3,7 | 3,8 | 3,3 | 2,4 | 5,4 | 4,2 | 3,8 | 5,0 | 4,6 | 4,1 |
| 11 | déhydro-1,8-cinéole | 979 | 1191 | tr | tr | tr | tr | 0,1 | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr |
| 12 | myrcène | 982 | 1166 | 7,1 | 6,1 | 7,5 | 19,8 | 18,7 | 28,7 | 14,7 | 13,3 | 25,1 | 18,9 | 14,6 | 15,0 | 34,1 | 16,4 | 12,9 | 6,5 |
| 13 | yomogi alcool | 984 | 1400 | tr | 0,2 | 3,7 | tr | tr | tr | 0,1 | tr | tr | tr | tr | tr | tr | 0,5 | tr | tr |
| 14 | 3-carène | 1005 | 1152 | - | - | - | - | tr | - | tr | - | - | tr | - | - | - | tr | - | - |
| 15 | para-cymène | 1011 | 1265 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,4 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 0,2 |
| 16 | isolyratone | 1014 | 1368 | 2,3 | 1,3 | 1,6 | 0,6 | 1,5 | 1,8 | 1,7 | 1,6 | 1,3 | 0,9 | 1,1 | 0,8 | 1,2 | 1,0 | 2,1 | 2,0 |
| 17 | limonène * | 1021 | 1203 | 0,5 | 1,5 | 1,0 | 1,1 | 0,9 | 0,4 | 1,1 | 2,3 | 1,3 | 0,8 | 1,2 | 1,0 | 0,8 | 1,2 | 1,1 | 3,6 |
| 18 | β -phellandrène*# | 1021 | 1214 | 8,7 | 21,2 | 12,1 | 18,9 | 6,3 | 3,3 | 11,8 | 14,3 | 11,7 | 6,9 | 19,7 | 15,9 | 13,3 | 18,8 | 12,9 | 13,0 |
| 19 | 1,8-cinéole*# | 1021 | 1214 | tr | 4,9 | 8,0 | tr | 8,0 | 6,6 | 5,8 | 0,2 | 2,6 | 6,9 | 5,0 | 2,6 | 1,9 | 2,3 | 12,9 | 6,5 |
| 20 | santolina alcool | 1026 | 1402 | tr | tr | tr | tr | tr | 0,1 | 0,1 | tr | tr | tr | tr | tr | 0,1 | tr | tr | tr |
| 21 | (Z)- β -ocimène | 1029 | 1251 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | tr | 0,1 | - | tr | 0,1 | 0,1 | tr | 0,1 | tr | tr | tr | tr | tr |
| 22 | artémisia cétone* | 1042 | 1349 | tr | 0,1 | 2,0 | tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | tr | 1,2 | 0,1 | 0,4 | 0,1 | 0,5 | 0,1 | 0,1 |
| 23 | épi-isolyratol D1 | 1042 | 1518 | 2,5 | 1,7 | 2,6 | 1,0 | 2,1 | 2 | 2,2 | 2,6 | 1,7 | 1,0 | 1,2 | 1,5 | 1,2 | 1,1 | 1,9 | 3,0 |
| 24 | γ -terpinène | 1048 | 1247 | 0,2 | 0,6 | 0,6 | 0,9 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,5 | 0,4 | 0,6 | 0,4 | 0,5 | 0,6 | 0,9 | 0,8 |
| 25 | isolyratol D2 | 1052 | 1557 | 5,5 | 3,5 | 5,4 | 2,3 | 4,5 | 4,6 | 5,0 | 5,4 | 3,7 | 2,3 | 2,6 | 3,6 | 2,8 | 2,7 | 4,3 | 6,4 |
| 26 | artémisia alcool | 1067 | 1510 | 0,3 | 0,1 | 2,4 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | tr | 0,2 | 0,1 | 0,3 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,6 | 0,1 | 0,1 |
| 27 | terpinolène | 1078 | 1285 | 0,4 | 0,5 | 1,2 | 1 | 1,1 | 0,5 | 0,3 | 1,1 | 2,0 | 0,7 | 1,3 | 1,4 | 0,5 | 3,2 | 1,9 | 0,3 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|--|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 28 | linalol | 1084 | 1545 | 0,6 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | - | 0,2 | - | 0,2 | 0,3 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,3 |
| 29 | lyratal | 1097 | 1505 | 1,7 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | 0,5 | 0,7 | 0,8 | 0,7 | 0,3 | 0,8 | 0,3 | 0,6 | 0,1 | 0,5 | 0,4 | 1,2 |
| 30 | lyratol | 1138 | 1784 | 6,6 | 3,6 | 1,5 | 3,1 | 5,5 | 7,8 | 10,3 | 9,6 | 2,9 | 10,1 | 3,6 | 7,1 | 0,3 | 5,8 | 2,3 | 11,8 |
| 31 | <i>trans</i> chrysanthémyle alcool | 1141 | 1677 | 0,1 | 0,1 | tr | tr | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | tr | 0,1 | tr | - |
| 32 | <i>cis</i> chrysanthémyle alcool | 1146 | 1660 | tr | tr | tr | tr | 0,1 | 0,1 | tr | tr | tr | 0,1 | 0,1 | - | tr | tr | tr | - |
| 33 | lavandulol | 1149 | 1674 | 0,4 | 0,1 | 0,3 | 0,2 | 0,5 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,1 | 0,4 | 0,1 | 0,1 |
| 34 | cryptone | 1155 | 1673 | tr | tr | tr | 0,1 | 0,2 | tr | tr | tr | tr | 0,1 | tr | 0,2 | tr | tr | - | 0,2 |
| 35 | terpinène-4-ol | 1162 | 1600 | 0,6 | 1,5 | 1,6 | 2,3 | 1,2 | 0,9 | 1,3 | 0,9 | 1,5 | 1,2 | 1,7 | 1,9 | 1,2 | 1,5 | 2,7 | 2,7 |
| 36 | α -terpinéol | 1172 | 1698 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | 0,1 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,2 | 0,2 | 0,4 | 0,3 |
| 37 | estragole | 1174 | 1670 | tr | tr | tr | 0,2 | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | 0,1 | tr |
| 38 | acétate de lyratyle | 1250 | 1647 | 0,7 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,6 | 0,4 | 0,2 | 0,7 | 0,2 | 0,5 | 0,1 | 0,3 | 0,1 | 0,9 |
| 39 | 7- α -silpherfol-5-ène | 1327 | 1426 | tr | 0,1 | 0,1 | tr | 0,1 | tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| 40 | butyrate de lyratyle | 1425 | 1785 | 0,3 | tr | tr | tr | 0,1 | 0,1 | tr | 0,1 | tr | 0,1 | tr | 0,1 | tr | 0,1 | 0,2 | 0,2 |
| 41 | alloaromadendrène | 1460 | 1645 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,4 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,2 |
| 42 | α -curcumène | 1470 | 1769 | tr | tr | tr | 0,3 | tr | 0,1 | 0,1 | tr | 0,1 | 0,1 | tr | 2,1 | 0,3 | tr | 0,2 | tr |
| 43 | γ -curcumène | 1472 | 1682 | 0,3 | 0,1 | 0,2 | 0,8 | 0,7 | 0,4 | 0,3 | 0,5 | 0,4 | 1,2 | 0,5 | 1,3 | 1,5 | 0,5 | 0,8 | 0,6 |
| 44 | isovalérate de lyratyle | 1478 | 1806 | tr | - | tr | tr | 0,1 | 0,1 | tr | 0,1 | tr | 0,1 | tr | 0,4 | 0,2 | tr | 0,1 | - |
| 45 | bicyclo germacrène | 1492 | 1734 | 0,1 | tr | tr | tr | 0,1 | tr | 0,1 | 0,1 | tr | 0,2 | 0,1 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,1 |
| 46 | (<i>E</i>)-nérolidol | 1545 | 2038 | tr | tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | - | 0,1 | 0,1 | 0,1 | tr |
| 47 | spathuléol | 1572 | 2115 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 1,0 | 0,3 | 0,1 | 0,3 | 0,2 |
| 48 | oxyde de caryophyllène | 1580 | 1984 | tr | tr | - | tr | - | tr | - | tr | 0,1 | 0,1 | tr | tr | 0,1 | tr | 0,1 | tr |
| 49 | (2 <i>Z</i> ,7 <i>E</i>) 3,9-diméthyl-6-isopropyl-décatrien-2,7,9-ai* | 1639 | 2150 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,7 | 0,2 | 0,1 | 0,3 | 0,5 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,6 | 0,5 | 0,3 | tr |
| 50 | (2 <i>E</i> ,7 <i>E</i>) 3,9-diméthyl-6-isopropyl-décatrien-2,7,9-ai* | 1639 | 2155 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,4 | 0,1 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,8 | 0,2 | 0,4 | 0,1 | 0,1 |
| | total (%) | | | 88,8 | 92,2 | 89,4 | 90 | 90 | 90,3 | 89,4 | 86,9 | 87,2 | 83,1 | 87 | 88,4 | 88,2 | 88,5 | 87,5 | 87,6 |
| | rendement % | | | 0,29 | 0,62 | 0,37 | 0,38 | 0,29 | 0,30 | 0,44 | 0,24 | 0,31 | 0,67 | 0,39 | 0,30 | 0,25 | 0,97 | 0,32 | 0,20 |

^a Ordre d'éluion et pourcentages des composés donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les noms sont suivis d'un astérisque. *: pourcentage sur colonne polaire ; #: pourcentages calculés avec les intensités des signaux des carbones (RMN-¹³C), Ir A, Ir P : indices de rétention sur colonne apolaire et polaire ; tous les constituants sont identifiés par CPG ; l'écriture en gras les constituants identifiés par la RMN du carbone-13 ; , tr. ≤ 0,05% ;

| | Composés/Echantillon | Ir A | Ir P | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 |
|----|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1 | (Z)-hex-3-en-1-ol | 832 | 1384 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | tr | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | tr | 0,2 |
| 2 | (E)-hex-2-en-1-ol | 842 | 1406 | 0,1 | tr | 0,1 | tr | 0,1 | 0,1 | tr | tr | 0,1 | 0,1 | tr | 0,1 | tr | tr | tr | tr | 0,1 |
| 3 | hexanol-1 | 845 | 1349 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | tr | 0,1 | tr | tr | tr | tr | 0,1 | tr | 0,1 | tr | tr | tr | 0,1 | tr |
| 4 | santolinatriène | 901 | 1030 | 17,4 | 16,9 | 16,6 | 15,8 | 14,8 | 14,7 | 14,3 | 14,3 | 14,3 | 13,7 | 13,7 | 13,5 | 12 | 10,5 | 10,1 | 9,6 | 9,3 |
| 5 | α -thujène | 923 | 1027 | tr | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | tr | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,2 |
| 6 | benzaldéhyde | 929 | 1529 | tr | - | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | 0,1 | tr |
| 7 | α -pinène | 931 | 1025 | 0,6 | 0,4 | 0,5 | 0,4 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,2 | 0,5 |
| 8 | camphène | 943 | 1070 | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr |
| 9 | sabinène | 965 | 1124 | 3,2 | 3,1 | 6,4 | 4,9 | 2,7 | 1,9 | 1,4 | 2,2 | 3,7 | 3,3 | 3,5 | 2,6 | 4,1 | 3,4 | 3,3 | 2,5 | 5,3 |
| 10 | β -pinène | 970 | 1113 | 3,4 | 4,6 | 6,5 | 6,0 | 4,1 | 2,3 | 1,6 | 3,7 | 4,1 | 3,5 | 5,4 | 3,5 | 6,2 | 5,0 | 4,7 | 3,3 | 7,1 |
| 11 | déhydro-1,8-cinéole | 979 | 1191 | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr |
| 12 | myrcène | 982 | 1166 | 24,5 | 16,5 | 9,5 | 22,3 | 25,8 | 12,6 | 37,1 | 24,5 | 17,1 | 23,9 | 21,9 | 34,6 | 12,4 | 18,2 | 20,0 | 24,1 | 11,9 |
| 13 | yomogi alcool | 984 | 1400 | tr | tr | tr | - | tr | tr | tr | tr | - | tr | 0,1 | 0,2 | tr | tr | 0,1 | 1,8 | tr |
| 14 | 3-carène | 1005 | 1152 | - | - | - | - | tr | tr | - | tr | - | tr | - | tr | - | tr | tr | - | - |
| 15 | para-cymène | 1011 | 1265 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | tr | 0,1 | 0,1 | 0,4 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,4 | 0,5 | 0,1 | 0,1 |
| 16 | isolyratone | 1014 | 1368 | 1,7 | 1,3 | 1,1 | 0,9 | 1,3 | 2 | 1,5 | 0,4 | 1,6 | 1,9 | 0,6 | 1,0 | 1,0 | 0,4 | 0,4 | 0,5 | 1,0 |
| 17 | limonène * | 1021 | 1203 | 1,3 | 1,1 | 1,4 | 1,3 | 1,2 | 0,7 | 0,5 | 1,2 | 1,3 | 1,2 | 1,4 | 1,5 | 1,4 | 1,3 | 1,3 | 2 | 1,6 |
| 18 | β -phellandrène*# | 1021 | 1214 | 11,6 | 17,6 | 23,1 | 21,4 | 16,1 | 10 | 5,1 | 13,0 | 16,7 | 13,0 | 19,6 | 11,7 | 21,6 | 16,4 | 15,9 | 11,9 | 26,9 |
| 19 | 1,8-cinéole*# | 1021 | 1214 | 1,6 | 2,2 | 5,7 | 3,1 | 0,8 | 0,5 | 5,1 | 2,2 | 0,2 | 4,3 | 1,3 | 2 | 2,4 | 4,1 | 3,9 | 0,3 | 4,5 |
| 20 | santolina alcool | 1026 | 1402 | tr | tr | tr | tr | tr | 0,1 | tr | 0,1 | tr | tr | tr | tr | - | tr | tr | tr | tr |
| 21 | (Z)- β -ocimène | 1029 | 1251 | tr | tr | tr | tr | tr | 0,1 | tr | 0,1 | 0,1 | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr |
| 22 | artémisia cétone* | 1042 | 1349 | tr | 0,1 | 0,1 | tr | 0,1 | 0,1 | tr | 0,2 | 0,1 | 0,1 | tr | 0,1 | tr | 4,3 | 4,5 | 18,4 | 0,1 |
| 23 | épi-isolyratol D1 | 1042 | 1518 | 1,6 | 1,6 | 1,5 | 1,3 | 1,5 | 1,7 | 1,5 | 1,0 | 1,6 | 1,6 | 0,9 | 1,3 | 1,3 | 0,8 | 0,7 | - | 1,0 |
| 24 | γ -terpinène | 1048 | 1247 | 0,4 | 0,7 | 0,7 | 0,9 | 0,6 | 0,4 | 0,4 | 0,6 | 0,4 | 0,4 | 0,9 | 0,5 | 0,8 | 0,8 | 0,7 | 0,5 | 1,0 |
| 25 | isolyratol D2 | 1052 | 1557 | 3,5 | 3,6 | 3,3 | 2,9 | 3,4 | 4,2 | 3,4 | 2,0 | 4 | 4,1 | 2,1 | 2,8 | 3,1 | 2,0 | 2,0 | 1,6 | 2,6 |
| 26 | artémisia alcool | 1067 | 1510 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | tr | tr | 0,1 | 0,1 | 0,4 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,6 | 0,6 | 1,2 | 0 |
| 27 | terpinolène | 1078 | 1285 | 0,5 | 1,1 | 0,4 | 0,3 | 0,8 | 1,0 | 0,3 | 1,4 | 1,0 | 3,0 | 0,7 | 1,0 | 0,7 | 4,0 | 4,0 | 0,6 | 0,7 |
| 28 | linalol | 1084 | 1545 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,3 |
| 29 | lyratal | 1097 | 1505 | 0,8 | 0,4 | 0,8 | 0,3 | 0,3 | 0,9 | 0,8 | 0,2 | 0,3 | 0,5 | 0,7 | 0,5 | 0,6 | 0,9 | 1 | 0,8 | 0,3 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|--|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 30 | lyratol | 1138 | 1784 | 9,9 | 7,6 | 9,1 | 4,2 | 3,8 | 14,4 | 10,1 | 2,7 | 3,2 | 5,3 | 8,5 | 6,1 | 6,6 | 6,6 | 6,8 | 7,1 | 4,5 |
| 31 | <i>trans</i> chrysanthémyle alcool | 1141 | 1677 | 0,1 | 0,1 | - | - | - | 0,1 | - | 0,1 | 0 | 0,1 | tr | tr | - | 0,1 | 0,1 | tr | 0,1 |
| 32 | <i>cis</i> chrysanthémyle alcool | 1146 | 1660 | tr | tr | - | - | - | tr | - | tr | tr | tr | tr | tr | - | 0,1 | 0,1 | - | tr |
| 33 | lavandulol | 1149 | 1674 | 0,4 | 0,1 | 0,1 | tr | 0,1 | 0,3 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | tr | 0,2 |
| 34 | cryptone | 1155 | 1673 | 0,1 | tr | 0,1 | - | tr | 0,1 | 0,1 | - | tr | tr | 0,1 | 0,1 | tr | 0,3 | 0,4 | 0,1 | tr |
| 35 | terpinèn-4-ol | 1162 | 1600 | 1,2 | 2,1 | 1,8 | 2,4 | 1,7 | 1,2 | 1,1 | 1,9 | 1,6 | 1,3 | 2,4 | 1,4 | 2,1 | 2,2 | 2,2 | 1,7 | 2,8 |
| 36 | α -terpinéol | 1172 | 1698 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 2,3 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,4 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,1 | 0,4 |
| 37 | estragole | 1174 | 1670 | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | 0,1 | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr |
| 38 | acétate de lyratyle | 1250 | 1647 | 0,8 | 0,8 | 0,9 | 0,3 | 0,4 | 1,9 | 0,7 | 0,4 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,6 | 0,5 | 0,5 | 0,7 | 0,5 |
| 39 | 7- α -silpherfol-5-ene | 1327 | 1426 | 0,1 | 0,1 | tr | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| 40 | butyrate de lyratyle | 1425 | 1785 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | tr | 0,1 | 0,3 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | tr | 0,1 | tr | tr | tr | 0,1 |
| 41 | alloaromadendrène | 1460 | 1645 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 0,5 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,2 |
| 42 | α -curcumène | 1470 | 1769 | tr | 0,1 | tr | 0,1 | 0,6 | tr | 0,1 | 1,1 | 0,6 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 1,0 | 0,6 | 0,7 | tr | 0,1 |
| 43 | γ -curcumène | 1472 | 1682 | 0,4 | 1,3 | 0,2 | 0,2 | 2,2 | 2,1 | 0,8 | 4,7 | 2,4 | 0,7 | 1,1 | 1,0 | 4,5 | 1,4 | 1,2 | 0,5 | 1,1 |
| 44 | isovalérate de lyratyle | 1478 | 1806 | 0,1 | 0,1 | - | tr | tr | 0,1 | 0,1 | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr |
| 45 | bicyclo germacrène | 1492 | 1734 | 0,1 | 0,2 | tr | 0,1 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,6 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,4 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,5 |
| 46 | (<i>E</i>)-nérolidol | 1545 | 2038 | 0,1 | 0,1 | tr | 0,1 | 0,1 | 0,3 | tr | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | tr | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,4 |
| 47 | spatulénol | 1572 | 2115 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,4 | 0,2 | 0,4 | 0,3 | 0,2 | 0,1 | tr | 0,4 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 0,2 |
| 48 | oxyde de caryophyllène | 1580 | 1984 | tr | tr | tr | tr | tr | 0,1 | tr | 0,1 | 0,1 | - | tr | tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | tr | 0,1 |
| 49 | (2 <i>Z</i> ,7 <i>E</i>) 3,9-diméthyl-6-isopropyl-décatrien-2,7,9-al* | 1639 | 2150 | 0,8 | 0,5 | 0,1 | 0,2 | 0,6 | 1,0 | 0,4 | 0,5 | 0,9 | 0,4 | 0,4 | 0,2 | 0,6 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,4 |
| 50 | (2 <i>E</i> ,7 <i>E</i>) 3,9-diméthyl-6-isopropyl-décatrien-2,7,9-al* | 1639 | 2155 | 0,4 | 0,4 | 0,1 | 0,1 | 0,4 | 0,8 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,4 | 0,1 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,1 | 0,4 |
| | total (%) | | | 87,8 | 86,3 | 91,7 | 92,7 | 85,9 | 78,6 | 88,8 | 82,8 | 79,1 | 85,8 | 88,4 | 88,2 | 86,1 | 88,1 | 89,1 | 91,4 | 86,8 |
| | rendement % | | | 0,47 | 0,30 | 0,40 | 0,40 | 0,50 | 0,12 | 0,40 | 0,33 | 0,30 | 0,23 | 0,34 | 0,34 | 0,31 | 0,30 | 0,30 | 0,31 | 0,27 |

^a Ordre d'éluion et pourcentages des composés donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les noms sont suivis d'un astérisque. *: pourcentage sur colonne polaire ; #: pourcentages calculés avec les intensités des signaux des carbones (RMN-¹³C), Ir A, Ir P : indices de rétention sur colonne apolaire et polaire ; tous les constituants sont identifiés par CPG ; l'écriture en gras les constituants identifiés par la RMN du carbone-13 ; , tr. $\leq 0,05\%$;

Bistuglio (n°s 2, 3, 5-11, 14-17, 19, 20, 23, 24, 28, 32, prélevés en juin 2005), Casanova (n°s 1, 4, 27 prélevés en juin 2005), Sermano (n°s 12, 13, 18, 21-22, 25-26, 29, 33, prélevés en juin 2006), Isolaccio di Fiumorbo (n°s 30-31 prélevés en juillet 2005).

RÉSUMÉ

Deux objectifs étroitement liés sont poursuivis dans ce travail. Tout d'abord contribuer au développement de la RMN du carbone 13 en tant qu'outil d'analyse des mélanges complexes naturels et en particulier des huiles essentielles. Parallèlement, contribuer 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 qui en sont extraites et en essayant d'établir les relations entre la nature des constituants et les propriétés des plantes (activité biologique).

Nous avons réalisé des mélanges binaires de mono, sesqui- et diterpènes oxygénés qui montrent que les liaisons hydrogène intermoléculaires sont responsables des variations de déplacements chimiques des carbones dans le spectre du mélange par rapport aux valeurs des composés purs. Par ailleurs, il est probable que d'autres liaisons faibles (Van der Waals) sont aussi impliquées dans l'existence de variations des déplacements chimiques de certains carbones.

Nous avons ainsi utilisé la méthode d'analyse des huiles essentielles par RMN du carbone-13, mise au point et développée au sein de notre équipe pour étudier la composition chimique de trois huiles essentielles de plantes insulaires : *Clinopodium ascendens* de l'île et de Madère, *Bupleurum fruticosum* et *Santolina corsica* de Corse.

- L'huile essentielle de *Clinopodium ascendens* a montré une grande richesse en composés menthaniques substitués en C3 (cis-et trans-isopulégones, néoiso-isopulégol).

- L'huile essentielle de buplèvre de Corse, *Bupleurum fruticosum* a fait l'objet d'une étude détaillée afin de mieux cerner l'influence de paramètres importants pour sa production (variabilité chimique, état physiologique du végétal, différents organes du végétal, mode d'obtention de l'huile essentielle, étude de l'hydrolat).

- La présence de nombreux monoterpènes irréguliers a été mise en évidence dans l'huile essentielle de *Santolina corsica* et l'activité antimicrobienne de cette huile essentielle est liée à la présence d'un monoterpène irrégulier : le lyratol.

DISCIPLINE

Chimie Organique et Analytique

MOTS CLÉS

Analyse des mélanges complexes naturels, RMN du carbone 13, huiles essentielles, monoterpènes irréguliers, extraction par micro-ondes, *Clinopodium ascendens*, *Bupleurum fruticosum*, *Santolina corsica*

ABSTRACT

This study has two objectives, firstly, to develop an analytical method for complex natural mixtures based on using ^{13}C NMR spectroscopy without preliminary isolation of components. On the other hand, it contribute to the valuation of the biomass considered as a source of natural products with strong added value, especially in the domain of Plant Perfume Aromatic and Medicine in Corsica by characterising the essential oil, describing a possible chemical variability and by testing their biological activity

We carried out a study of the influence of hydrogen bonding effect on ^{13}C NMR chemical shift of the molecule terpenic like linalol in the melanges binaries with the oxygenated compounds. We find the different behaviour of the hydrogen bonding cause with the phenolic compound and the other oxygenated compound. Otherwise, our results also suggested the presents of other bond intermolecular like van del wals.

The analysis of the chemical composition of the essential oil of three plant insulaire grow wild, *Clinopodium ascendens* of Maderia Island, *Bupleurum fruticosum* and *Santolina corsica* of Corsica, with the method developed in our laboratory based on the computer aided analysis of the ^{13}C NMR spectrum of the essential oil, on combination of GC-MS and GC with retention index.

- The essential oil of *Clinopodium ascendens* of Maderia Island was dominated by C_3 oxygenated *p*-menthane derivatives: cis-isopulegone(75.2%), pulegone(6.9%), neoiso-isopulegol (6.0%) and trans-isopulegone (4.5%).
 - As part of our on-going work on the characterization of aromatic plants inslaris, through the composition of their essential oil, we got interested by *Bupleurum fruticosum*, growing wild in Corsica. The seasonal variation, the different aerial part, the intraspecific variability of the essential oil; even though the essential oil extract by microwave were studied, we showed that the homogeneity of β -phellandrene like the content majorities.
 - The chemical composition of *Santolina Corsica* essential oil was dominated by monoterpene hydrocarbons myrcene(34.6%), santolina triene (13.5%), β -phellandrene(11.7%). Beside the main composition, we noted the occurrence of irregular mono and sesquiterpenes. Antibacterial activity was tested against six bacteria strains. Lyratol was identified as main responsive of the antibacterial activity.
-

DOMAIN

Analytical and Organic Chemistry

KEYWORDS

PPAM – Natural complex mixtures – Essential oils– ^{13}C NMR – Solvant free extraction microwave – irregular monoterpenes– *Clinopodium ascendens*, *Bupleurum fruticosum*, *Santolina corsica*
