



**HAL**  
open science

# CONTRIBUTION CHIMIQUE A LA DEFINITION DE LA QUALITE: EXEMPLES DES SPIRITUEUX DE MYRTE (MYRTUS COMMUNIS L.) ET DE CEDRAT (CITRUS MEDICA L.) DE CORSE

Nicolas Venturini

► **To cite this version:**

Nicolas Venturini. CONTRIBUTION CHIMIQUE A LA DEFINITION DE LA QUALITE: EXEM-  
PLES DES SPIRITUEUX DE MYRTE (MYRTUS COMMUNIS L.) ET DE CEDRAT (CITRUS  
MEDICA L.) DE CORSE. Chimie organique. Université Pascal Paoli, 2012. Français. NNT: .  
tel-00796388

**HAL Id: tel-00796388**

**<https://theses.hal.science/tel-00796388>**

Submitted on 4 Mar 2013

**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**  
**ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT ET SOCIETE**  
**UMR CNRS 6134 (SPE)**



**Thèse présentée pour l'obtention du grade de**  
**DOCTEUR EN CHIMIE**  
**Mention : CHIMIE ORGANIQUE ET ANALYTIQUE**  
**Soutenue publiquement par**  
**NICOLAS VENTURINI**  
le 26 Novembre 2012

---

**CONTRIBUTION CHIMIQUE A LA DEFINITION DE LA QUALITE :**  
**EXEMPLES DES SPIRITUEUX DE MYRTE (*MYRTUS COMMUNIS* L.)**  
**ET DE CEDRAT (*CITRUS MEDICA* L.) DE CORSE**

---

**Directeur(s) :**

M Jean Costa, Professeur, Université de Corse  
M Julien Paolini, Dr-HDR, Université de Corse

**Rapporteurs :**

M Boufeldja Tabti, Professeur, Université de Tlemcen (Algérie)  
M Mauro Marchetti, Directeur de recherche, CNR de Sassari (Italie)

**Jury**

Mme Mariana Usai, Professeure, Faculté de Pharmacie (Sassari, Italie)  
M Mauro Marchetti, Directeur de recherche, CNR de Sassari (Italie)  
M Antoine-François Bernardini, Professeur, Université de Corse  
M Boufeldja Tabti, Professeur, Université de Tlemcen (Algérie)  
M Julien Paolini, Dr-HDR, Université de Corse  
M François Luro, CR, Dr-HDR, INRA de Corse

*In memoria di babbu...*

## Avant-propos

---

Ce travail a été réalisé sous la direction du Professeur Jean COSTA et du Docteur Julien PAOLINI, Maître de Conférences HDR, au sein du Laboratoire « Chimie des Produits Naturels », relevant du Projet structurant « Ressources Naturelles » faisant partie intégrante de l'UMR 6134 « Sciences pour l'Environnement » CNRS / Université de Corse Pascal Paoli.

Je tiens à exprimer au Professeur Jean COSTA mes remerciements les plus sincères pour l'infinie patience et la disponibilité qu'il a témoigné à mon égard tout au long de la préparation de cette thèse. Sa direction rigoureuse, sa vision scientifique, ses judicieuses directives, ses encouragements énergisants lors des dynamiques séances hebdomadaires de travail ont permis le bon déroulement et l'aboutissement de ce travail de thèse. Je le remercie, aussi, de s'être soucié de mon devenir.

Je remercie sincèrement le Docteur Julien PAOLINI, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour son dévouement exemplaire et son encadrement sans faille que pour ses recommandations et avis judicieux durant nos séances de travail.

Je suis très sensible à l'honneur que me font le Docteur Mauro MARCHETTI Directeur de Recherche (CNR Sassari, Italie) et le Professeur Boufeldja TABTI (Université de Tlemcen, Algérie) en acceptant d'être les rapporteurs de ce travail. Je suis très heureux de bénéficier de leurs observations et je tiens à leur exprimer ma sincère reconnaissance pour cette marque d'intérêt.

Je suis honoré que la Professeure Mariana USAI (Faculté de Pharmacie, Sassari, Italie), partenaire de longue date de notre équipe, ait accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je veux exprimer, ici, ma respectueuse gratitude au Professeur Antoine-François BERNARDINI, ancien directeur et fondateur du laboratoire de « Chimie des Produits Naturels », pour avoir bien voulu participer à ce jury et pour m'avoir chaleureusement accueilli au laboratoire.

Mes remerciements sont également adressés à François LURO (Chargé de Recherche à l'INRA) pour sa collaboration sur le volet génétique de ces travaux mais aussi pour avoir accepté de juger cette thèse dans sa globalité.

Je remercie chaleureusement la Professeure Jacqueline SMADJA (Université de St-Denis de la Réunion) pour sa coopération concernant les analyses du pouvoir antioxydant des liqueurs.

Que Franck CURK (Ingénieur) trouve ici ma grande reconnaissance pour son aide précieuse et ses conseils avisés. Je lui souhaite plein succès dans l'entreprise de son doctorat.

Je suis très reconnaissant à Stefanu VENTURINI (Gérant, SARL Mavela) pour le partenariat que nous avons établi entre la Société Mavela et l'Université mais aussi pour le soutien qu'il m'a apporté tout au long de cette thèse.

Je veux exprimer ma gratitude à la Collectivité Territoriale de Corse (CTC) pour avoir financé cette thèse à travers l'Agence de Développement Economique de la Corse (ADEC).

Le moment est venu de saluer tous les protagonistes de l'équipe CPN, coupables du sérieux et de la bonne humeur qui caractérisent notre laboratoire.

Un grand merci à Toussaint BARBONI (Maître de Conférences) pour les conseils et les encouragements qu'il m'a prodigué depuis le Master.

Je salue Alain MUSELLI (MCF-HDR) et Pierre TOMI (MCF) pour les échanges constructifs et passionnés que nous avons eu autour de la chimie et du football.

Je remercie également Jean-Marie DESJOBERT (Ingénieur) et son « Padawan » Franck RENUCCI (Technicien) pour leur aide technique en chromatographie et en spectrométrie de masse si précieuse dans l'avancée de ces travaux, mais aussi pour leur esprit positif et l'ambiance qu'ils savent faire régner au laboratoire.

Je tiens également à saluer mes condisciples Yin YANG, Florent DARRIET, Nassim DJABOU, Stéphane ANDREANI, Grégory CRISTOFARI et Louis-Felix NOTHIAS pour les bons moments que nous avons passés ensemble et qui rythment la vie du laboratoire.

Toute ma gratitude va enfin à ma mère, mon frère Laurent et ma compagne Livia pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de mes études et, notamment, durant cette thèse.

# Sommaire

---

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Partie A : Les méthodes d'analyses des composés volatils et phénoliques ....</b>	<b>4</b>
<b>I. Les méthodes de préparation .....</b>	<b>4</b>
I.1. Préparation des huiles essentielles .....	5
I.1.1. Hydrodistillation.....	5
I.1.2. Distillation à vapeur saturée et l'hydrodiffusion.....	6
I.1.3. Expression ou pressage à froid.....	6
I.1.4. Enfleurage .....	7
I.2. Extraction de la fraction volatile dans l'espace de tête .....	7
I.2.1. Micro-extraction sur phase solide .....	7
I.2.2. Désorption thermique automatique .....	10
I.3. Les extraits.....	12
I.3.1. Extraction liquide-liquide et Macération .....	12
I.3.2. Extraction au Soxhlet.....	12
I.3.3. Extraction par Likens-Nickerson.....	14
I.3.4. Extraction au CO <sub>2</sub> supercritique.....	14
I.3.5. Extraction par micro-ondes.....	15
I.3.6. Extraction par ultra-sons.....	16
<b>II. Les méthodes de séparation, d'identification et de quantification.....</b>	<b>16</b>
II.1. Cas des composés volatils .....	17
II.1.1. Chromatographie en Phase Gazeuse .....	17
II.1.2. Chromatographie en Phase Gazeuse / Spectrométrie de Masse .....	18
II.2. Cas des composés phénoliques.....	22
II.2.1. Chromatographie Liquide Haute-Performance.....	22
II.2.2. Chromatographie Liquide Haute-Performance / Spectrométrie de Masse ....	24
<b>III. Méthodologie d'analyse du laboratoire .....</b>	<b>27</b>
III.1. Application aux composés volatils .....	27
III.2. Application aux composés phénoliques.....	31

<b>IV. Fragmentations des composés phénoliques en spectrométrie de masse .....</b>	<b>35</b>
IV.1. Les aglycones .....	35
IV.1.1. Les flavonols .....	37
a) <i>Les flavonols hydroxylés</i> .....	38
b) <i>Les flavonols méthoxylés</i> .....	42
IV.1.2. Les flavones.....	45
a) <i>Les flavones non méthoxylées</i> .....	48
b) <i>Les flavones méthoxylées déprotonables</i> .....	50
c) <i>Les flavones méthoxylées non déprotonables</i> .....	53
IV.1.3. Les isoflavones .....	57
IV.1.4. Les flavan-3-ols .....	60
IV.1.5. Les flavanones .....	62
IV.2. Les flavonoïdes glycosylés .....	66
IV.2.1. Nomenclature .....	66
IV.2.2. Détermination de la nature de la liaison sucre-aglycone .....	68
IV.2.3. Détermination de la nature de(s) substituant(s) glycoside(s) .....	70
IV.2.4. Détermination de la nature des liaisons interglycosidiques .....	71
IV.2.5. Etude des fragmentations de composés standards .....	73
a) <i>Etude des flavanoïdes O-monoglycosylés</i> .....	73
b) <i>Etude des flavanoïdes O-diglycosylés</i> .....	75
c) <i>Etude des flavanoïdes di-O-glycosylés et di-C,O-glycosylés</i> .....	77

## **Partie B : Valorisation et qualification des végétaux et des spiritueux ..... 79**

<b>I. Le myrte.....</b>	<b>80</b>
I.1. Bibliographie.....	81
I.1.1. Botanique et ethnobotanique.....	81
I.1.2. Composition chimique .....	83
a) <i>Les composés volatils</i> .....	83
b) <i>Les composés phénoliques</i> .....	85
I.2. Caractérisation chimique des baies de myrte de Corse et des spiritueux .....	89
I.2.1. Variabilité intraspécifique de la composition volatile des baies .....	89
a) <i>Etude des huiles essentielles</i> .....	90
b) <i>Etude de la fraction volatile par MEPS</i> .....	94
I.2.2. Fraction volatile des spiritueux .....	96
I.2.3. Variabilité intraspécifique de la composition phénolique des baies .....	101
I.2.4. Fraction phénolique des liqueurs.....	104

I.2.5. Phénols totaux et activités antioxydantes des liqueurs .....	106
<b>II. Le cédrat .....</b>	<b>109</b>
II.1. Bibliographie .....	109
II.1.1. Botanique et Ethnobotanique .....	109
II.1.2. Composition chimique.....	111
a) <i>Les composés volatils</i> .....	111
b) <i>Les composés phénoliques</i> .....	113
II.2. Diversité moléculaire des cédratiers .....	114
II.2.1. Les feuilles : approche chimio-génétique de 24 variétés.....	114
a) <i>Caractéristiques génétiques</i> .....	115
b) <i>Composition chimique des huiles essentielles de feuilles</i> .....	120
II.2.2. Les fruits : approche chimio-taxonomique de 17 variétés.....	127
a) <i>Caractéristiques morphologiques des cédrats</i> .....	127
b) <i>Compositions volatile et phénolique des zestes</i> .....	128
c) <i>Compositions volatile et phénolique des albédos et des jus</i> .....	138
II.2.3. Synthèse.....	151
II.3. Procédés de fabrication et de conservation des liqueurs de cédrat de Corse .....	154
II.3.1. Maturité des fruits .....	155
a) <i>Détermination du degré de maturité</i> .....	156
b) <i>Composition volatile du zeste au cours de la maturation des fruits</i> .....	159
c) <i>Composition phénolique du zeste au cours de la maturation des fruits</i> ..	162
II.3.2. Elaboration et conservation des liqueurs .....	164
a) <i>Composition volatile</i> .....	165
b) <i>Composition phénolique</i> .....	170
 <b>Conclusion .....</b>	 <b>175</b>
 <b>Partie expérimentale .....</b>	 <b>178</b>
 <b>Références.....</b>	 <b>190</b>
 <b>Annexes .....</b>	 <b>217</b>
<b>I. Tests statistiques .....</b>	<b>217</b>
<b>II. Compositions chimiques des macérations et des liqueurs de cédrat de Corse .....</b>	<b>218</b>



# Introduction

---

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Chimie des Produits Naturels (CPN) de l'Université de Corse. Il s'inscrit dans le cadre du projet structurant « Ressources Naturelles » (RN) de l'UMR CNRS 6134 (Sciences Pour l'Environnement). Le projet RN rassemble diverses compétences liées essentiellement au domaine de la chimie et de la biochimie et s'inscrit dans le cadre de la qualité, de la caractérisation et de la valorisation des substances naturelles végétales avec un intérêt particulier pour celles qui sont spécifiques aux milieux méditerranéens, notamment issus d'écosystèmes insulaires.

L'accès à des données complètes et fiables constitue un premier objectif scientifique car les productions issues des végétaux se présentent, quasiment toujours, sous forme de mélanges complexes de molécules appartenant à diverses familles chimiques : terpènes, phénylpropanoïdes, alcaloïdes, flavonoïdes, caroténoïdes, coumarines, sucres, lipides... A titre d'exemple, les huiles essentielles et les extraits d'une plante aromatique ou encore les arômes d'une denrée alimentaire sont constitués de dizaines, voire de centaines de molécules ayant souvent des squelettes analogues et présentes à des concentrations parfois extrêmement faibles.

L'UR INRA 110 GEQA (Génétique et Ecophysiologie de la Qualité des Agrumes), a étroitement collaboré à ces études de doctorat fortement multidisciplinaires (Taxonomie, Génétique) ; en cela ma préparation de thèse s'inscrit, également, dans le cadre de la Fédération de Recherche FR CNRS 3041 (Environnement et Société) de l'Université de Corse. L'UR GEQA est spécialisée dans l'étude de la diversité des agrumes et de leurs mécanismes évolutifs, mais aussi sur l'effet des facteurs environnementaux sur les critères de qualités des fruits.

Mes travaux ont également été menés en étroites relations de partenariat avec un professionnel du secteur des spiritueux - la Société Mavela (Aleria, Haute-Corse) - qui souhaitait définir la composition chimique de ses produits afin de réaliser des contrôles de qualité et d'optimiser les processus de fabrication.

La Corse est riche en plantes aromatiques et médicinales susceptibles d'être utilisées dans différents domaines (agroalimentaire, parfumerie, pharmacie, cosmétique) pour leurs propriétés organoleptiques, odorantes et/ou thérapeutiques. Ces plantes aromatiques sont à l'origine de produits à forte valeur ajoutée (huiles essentielles, arômes, extraits, etc.). Elles sont aussi valorisées - avec ou sans transformation préalable - sous forme de multiples produits agro-alimentaires typiques (fruits, miels, confiseries, etc.).

La filière des spiritueux (liqueur et eau de vie) représente une part non négligeable de l'économie insulaire puisque, annuellement, il se vend environ 500.000 bouteilles pour un chiffre d'affaire compris entre 7 et 8 millions d'euros. Les propriétés organoleptiques (odeur, couleur, astringence) de ces boissons alcoolisées sont notamment imputables aux composés chimiques présents dans ces matrices. La flaveur de ces produits provient essentiellement des composés volatils et phénoliques ; ceux-ci sont présents pendant tout le développement du fruit et contribuent à la qualité gustative et olfactive recherchée par les consommateurs.

Dans ces travaux de doctorat, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux spiritueux (liqueur et eau de vie) produits à partir de deux fruits identitaires méditerranéens : le myrte commun (*Myrtus communis* L.) et le cédrat de Corse (*Citrus medica* L. var. *corsican*). L'étude de la composition chimique des fruits permet de répondre à plusieurs problématiques qui se posent aux industriels de la filière et dont les préoccupations sont : (i) de connaître les spécificités chimiques de leurs produits pouvant conduire à une certification d'origine ; (ii) de connaître le degré de maturité des fruits afin de déterminer la période optimale de récolte ; (iii) de normaliser la qualité des liqueurs en vue de pouvoir proposer un produit aux qualités organoleptiques constantes.

La caractérisation de ces agro-ressources, le contrôle de leur qualité tout autant que la mise en évidence d'une éventuelle typicité régionale nécessite la mise en œuvre des méthodes de préparation et d'analyses performantes. Dans ce travail de thèse, nous avons développé deux volets complémentaires :

- Une partie fondamentale (**Partie A**), sur la base d'une étude bibliographique, aborde les méthodes de préparation des échantillons et les méthodes d'analyse des composés volatils et phénoliques. Nous présentons les avantages et inconvénients des principales techniques d'extractions et d'analyses conventionnelles actuellement utilisées. Nous poursuivons avec la

mise en place, au laboratoire CPN, d'une méthodologie d'analyse des composés phénoliques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Enfin, nous avons réalisé une étude mécanistique des fragmentations en spectrométrie de masse de plusieurs flavonoïdes. La constitution de ce corpus par le rassemblement de données éparses dans la littérature devrait faciliter l'identification de composés absents de notre bibliothèque.

- Une partie appliquée (**Partie B**) porte sur la caractérisation des compositions volatile et phénolique des fruits et des spiritueux de myrte et de cédrat.

Nous avons débuté le premier chapitre de cette partie par un état des connaissances sur les aspects botanique, ethnobotanique et chimique du myrte commun (*Myrtus communis* L.). Puis, nous avons exposé les résultats relatifs à la variabilité chimique de cette espèce à partir d'un échantillonnage réalisé sur l'ensemble de la Corse. Nous nous sommes intéressés à la composition de l'huile essentielle, à celle de la fraction volatile concentrée dans l'espace de tête et à la composition phénolique. De la même façon, nous avons, ensuite, caractérisé les liqueurs et eaux-de-vie commerciales. Enfin, nous avons examiné l'héritabilité des caractères chimiques depuis le fruit vers les produits dérivés.

Le second chapitre traite des cédrats (*Citrus medica* L.) avec, tout d'abord, un exposé sur la taxonomie et les utilisations traditionnelles de ces fruits. Nous proposons, ensuite, une étude comparée entre la diversité génétique, phénotypique et chimique des feuilles de variétés de cédratiers cultivés à la station agronomique INRA de San Giuliano (Haute-Corse). Nous poursuivons par l'étude de la composition en volatils et en polyphénols des zestes, de l'albédo et de la pulpe de ces mêmes variétés. Ce chapitre se termine par l'étude des liqueurs élaborées à partir du cédrat de Corse (*Citrus medica* L. var. *corsican*) avec, d'une part, un suivi des compositions chimiques (volatile et phénolique) durant le développement (maturation) du fruit, et d'autre part, une étude sur les procédés de fabrication et de conservation des liqueurs commerciales.

En fin de manuscrit, la partie expérimentale reprend la préparation des huiles essentielles, des extraits aux solvants et des spiritueux ainsi que les conditions expérimentales mises en œuvre pour l'analyse de ces matrices.

## **Partie A :**

### **Les méthodes d'analyses des composés volatils et phénoliques**

---

La fraction volatile, les huiles essentielles et les extraits aux solvants d'un végétal sont des mélanges complexes constitués de dizaines, voire de centaines de molécules présentes à des concentrations parfois extrêmement faibles. La valorisation de ces mélanges passe obligatoirement par une étape de caractérisation de la composition chimique, ce qui nécessite des techniques analytiques fiables et efficaces [Joulain, 1994].

#### **I. Les méthodes de préparation**

Dans ce contexte, il apparaît que l'étape de préparation de l'échantillon est au moins aussi fondamentale que celle de l'identification proprement dite des constituants [Muñoz-Olivas, 2004; Marriott et coll., 2001; Augusto et coll., 2003]. Ces méthodes de préparation ont fait l'objet de nombreux articles et revues qui décrivent les potentialités et les limites des procédés mis en œuvre pour l'étude des métabolites secondaires issus de plantes ou de produits agroalimentaires [Jimenez-Carmona et coll., 1999 ; Kataoka et coll., 2000 ; Sides et coll., 2000 ; Wilkes et coll., 2000 ; Lang et Wai, 2001 ; Augusto et Valente, 2002 ; Buldini et coll., 2002 ; Diaz-Maroto et coll., 2002 ; Pillonel et coll., 2002 ; Lucchesi et coll., 2004a ; Mendiola et coll., 2007 ; Pourmortazavi et Hajimirsadeghi, 2007 ; Ridgway et coll., 2007].

Il apparaît, notamment, que les procédures de préparation des échantillons doivent être adaptées à la nature des constituants étudiés et à celle de la matrice support. Les composés volatils et phénoliques sont généralement extraits des plantes ou des produits agroalimentaires issus de leur transformation (confitures, boissons alcoolisées, compléments nutritifs, etc.) par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger, par distillation-extraction utilisant un appareil de type Lickens-Nickerson ou encore par extraction aux solvants avec un appareil de type Soxhlet [Sides et coll., 2000 ; Wilkes et coll., 2000 ; Buldini et coll., 2002 ; Ridgway et coll., 2007]. De nombreuses techniques d'extraction, plus respectueuses de l'environnement, telles l'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique et l'extraction assistée par micro-ondes ou par ultrasons ont été développées dans le but de limiter le temps d'extraction, la consommation en

solvants et en énergie, d'augmenter le rendement et d'améliorer la qualité des produits en limitant les altérations thermiques et hydrolytiques [Jimenez-Carmona et coll., 1999 ; Diaz-Maroto et coll., 2002 ; Lucchesi et coll., 2004a ; Mendiola et coll., 2007 ; Pourmortazavi et Hajimirsadeghi, 2007].

Au cours de ces 20 dernières années, les techniques de pré-concentration en « espace de tête » - plus fréquemment désignées par le vocable anglo-saxon « headspace » (HS) - ont connu un développement important coïncidant avec le succès toujours croissant que connaissent les techniques d'extractions « vertes » c'est à dire sans solvant [Bicchi et coll., 2008a].

## **I.1. Préparation des huiles essentielles**

### **I.1.1. Hydrodistillation**

L'hydrodistillation (HD) est la méthode la plus couramment employée pour l'extraction d'une huile essentielle [Meyer-Warnod, 1984] ; dans son principe, elle correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau ; l'ensemble est ensuite porté à ébullition, à pression atmosphérique (figure 1). Sous l'effet de la chaleur, les molécules odorantes contenues dans les glandes sécrétrices des végétaux sont libérées sous forme d'un mélange azéotropique. Bien que la plupart des constituants aient des températures d'ébullition supérieures à 100°C, ils sont entraînés mécaniquement avec la vapeur d'eau. Le refroidissement par condensation conduit à la séparation du mélange eau-huile essentielle par décantation. Le système « Clevenger », préconisé par la pharmacopée européenne [Pharmacopée Européenne, 1997], permet le recyclage de la phase aqueuse du distillat dans le bouilleur par cohobage [Clevenger, 1928]. Ainsi, l'eau et les molécules volatiles sont séparées, par leurs différences de densité, dans l'essencier en une phase aqueuse (hydrolat) et une phase organique surnageante (huile essentielle). La durée d'hydrodistillation, de trois à six heures en fonction de la matière végétale à traiter, peut avoir une influence sur le rendement en huile essentielle et sur sa composition chimique.

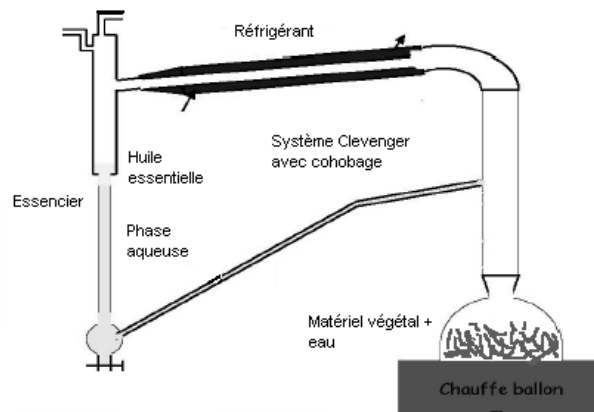


Figure 1 : Hydrodistillation à l'aide d'un système de type Clevenger

### I.1.2. Distillation à vapeur saturée et l'hydrodiffusion

Le principe de la distillation à vapeur saturée est analogue à l'hydrodistillation. Toutefois, le matériel végétal n'est pas en contact direct avec l'eau ; il est placé sur une grille perforée au-dessus de la base de l'alambic. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau qui traverse le végétal ; ils sont ensuite séparés par décantation du distillat refroidi. L'hydrodiffusion consiste à faire passer un flux généralement descendant de vapeur d'eau à très faible pression à travers la masse végétale. Ces techniques sont usuellement employées par les industriels pour la production d'huiles essentielles et d'hydrolats à grande échelle. Les compositions chimiques des produits peuvent être sensiblement différentes en fonction des méthodes utilisées [ICS – UNIDO, 2008].

### I.1.3. Expression ou pressage à froid

Le procédé est utilisé uniquement pour l'obtention des huiles essentielles contenues dans les zestes d'agrumes [Dugo et Di Giacomo, 2002]. Il s'agit d'un processus physique dans lequel les glandes à huile essentielle de la peau du fruit sont percées, broyées ou concassées mécaniquement afin de libérer l'essence. Cette méthode est économiquement plus rentable que l'hydrodistillation et permet d'éviter d'éventuelles dégradations thermiques.

#### I.1.4. Enfleurage

Cette méthode est réservée aux huiles essentielles à forte valeur ajoutée ; elle est notamment utilisée avec les fleurs telles le jasmin ou la tubéreuse qui continuent à produire des métabolites secondaires après la cueillette. Le procédé à froid consiste à absorber le parfum de ces fleurs en utilisant un corps gras à haut pouvoir d'absorption. Pendant la période de récolte (qui dure plusieurs semaines), les pétales de fleurs fraîchement cueillis sont étalés sur de la graisse et remplacés toutes les 24 heures par les pétales de fleurs nouvellement cueillies. Le corps gras, non renouvelé au cours du processus, est saturé en essence florale et l'huile essentielle est ensuite extraite de la graisse par de l'éthanol [Clarke, 2008].

### **I.2. Extraction de la fraction volatile dans l'espace de tête**

#### I.2.1. Micro-extraction sur phase solide

La micro-extraction sur phase solide (MEPS) est une méthode d'extraction sans solvant développée par Arthur et Pawliszyn [1990] par pré-concentration des composés de matrices solides ou liquides [Burgot et Pellerin, 2003]; d'origines alimentaire [Cannac-Artega, 2001 ; Bianchi et coll., 2005], environnementale ou biologique [Bicchi et coll., 2008a ; Paolini et coll., 2008a].

L'instrument de la MEPS se présente sous la forme d'un ensemble seringue-aiguille ; les composés sont extraits par adsorption sur une fibre de silice fondue (1 à 2 cm de longueur) revêtue d'un polymère (7 à 100  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) qui fait office de phase stationnaire. [Matich et coll., 1996] (Figure 2).

La fibre est soit introduite directement dans l'échantillon, on parle de MEPS par immersion directe (DI-MEPS), soit exposée dans l'espace de tête (HS-MEPS). Certains travaux [Calle Garcia et coll., 1998 ; Kataoka et coll., 2000] montrent que la méthode DI-MEPS est plus sensible que la HS-MEPS. Cependant, les chromatogrammes obtenus à partir de la seconde méthode présentent une meilleure résolution que ceux résultant de la première [Paliyath et coll., 1997 ; Augusto et coll., 2000 ; Riu-Aumatell et coll., 2004 ; Pellati et coll., 2005]. En outre, l'efficacité de chacune des deux techniques dépend de la nature de la matrice

et de sa composition [Kataoka et coll., 2000]. L'extraction par immersion directe est, en général, plus adaptée pour les matrices liquides alors que l'espace de tête convient mieux aux matrices solides ou semi-liquides tels les miels [Yang et coll., 2012]. Dans ce cas, le mode HS permet de protéger le revêtement d'éventuelles interférences avec des molécules parasites [Kataoka et coll., 2000].

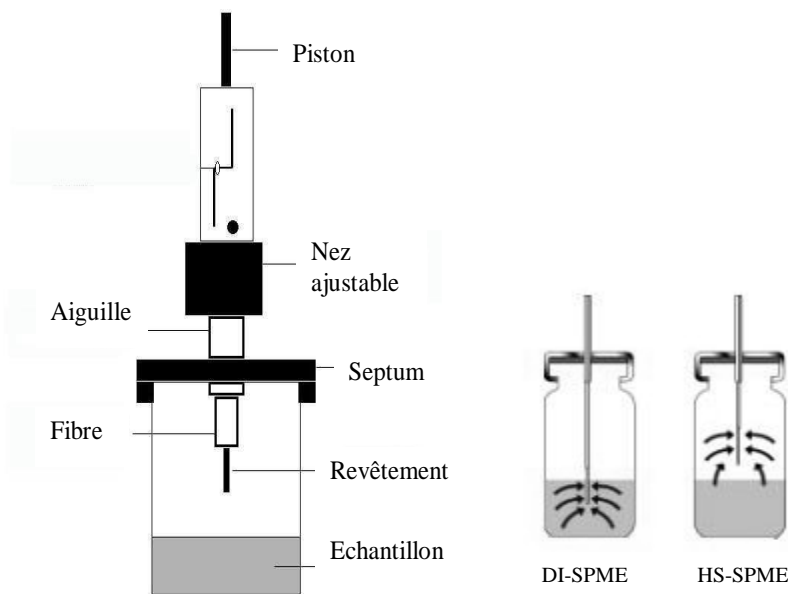


Figure 2: MEPS - Système d'échantillonnage et phénomènes d'adsorption.

Dans le cas de l'exposition de la fibre dans l'espace de tête, la première étape de la séquence est de déplacer l'équilibre matrice / phase vapeur vers l'espace de tête. Pour cela, la matrice est chauffée en vase clos. Les paramètres sont le ratio volume de la matrice / volume de la fiole, le temps et la température d'équilibre. La seconde étape est l'extraction proprement dite des molécules volatiles contenues dans l'espace de tête par exposition de la fibre à l'aide de la fibre contenue dans la seringue.

Cette technique permet l'accumulation statique ou dynamique de composés volatils sur des polymères qui opèrent par adsorption. Ainsi, pour l'étude des composés volatils des matrices végétales, plusieurs procédés de prélèvement dans l'headspace ont été développés [Bicchi et coll., 2000a, 2004, 2005, 2007 ; Segal et coll., 2000 ; Theis et coll., 2001 ; Musshoff et coll., 2002 ; Wang et coll., 2002 ; Ishikawa et coll., 2004 ; Liu et coll., 2004 ; Besharati-Seidani et coll., 2006].



Le phénomène d'adsorption (ou de partage) mis en jeu ne correspond pas à une extraction par épuisement mais implique (i) en mode « immersion directe », un simple équilibre entre les substances de la matrice liquide et le revêtement de la fibre et qui dépend du coefficient de distribution entre les deux phases et (ii) en mode « exposition dans l'espace de tête », un double équilibre, l'un entre la matrice solide ou liquide et sa phase vapeur et l'autre entre la phase vapeur et le revêtement de la fibre. Le premier équilibre dépend des coefficients de distribution des molécules entre la matrice et l'espace de tête, tandis que le second dépend des coefficients de distribution entre l'espace de tête et l'absorbant [Penalver et coll., 1999]. Pour chaque constituant, une relation a pu être établie entre la quantité adsorbée sur un polymère donné et la concentration initiale dans la matrice [Pawliszyn, 1997].

Lorsque la fibre est exposée dans l'espace de tête, les composés sont extraits par volatilité décroissante. L'augmentation de la température déplace les équilibre vers l'espace de tête en augmentant la constante de l'équilibre matrice/HS et en diminuant celle de l'équilibre espace de tête/fibre ; les composés sont adsorbés par le polymère en moindre quantité [Penalver et coll., 1999]. Il s'agit donc de trouver le bon compromis. A titre d'exemple, nous pouvons citer les travaux menés au laboratoire, quant à l'influence de la température sur l'extraction sélective des familles de composés présents dans les parties aériennes d'*Adenostyles briquetii* [Paolini et coll., 2008b]. Par ailleurs, la présence d'un système d'agitation de la matrice accélère l'obtention de l'équilibre en renouvelant l'interface entre la phase stationnaire et la matrice (immersion directe) ou la phase gazeuse (espace de tête) [Burgot et Pellerin, 2003] ; le temps d'extraction est alors dix fois plus court qu'en l'absence d'agitation [Al, 1997].

Aujourd'hui, il existe une trentaine de revêtements différents pour les fibres [5<sup>th</sup> Edition solid phase microextraction application guide, 2006] dont les plus courants sont : - le polydiméthylsiloxane (PDMS) et le polyacrylate (PA) pour ce qui est des polymères liquides, - le divinylbenzène (DVB) et le carbowax (CW) pour les polymères poreux et enfin - les polymères très poreux du type carboxen (CAR) dont la capacité de rétention est très élevée. Les fibres peuvent être composées d'un, de deux ou de trois polymères ; on parlera respectivement de fibre simple, -double ou -triple. Les matrices complexes requièrent souvent l'utilisation de polymères liquides - car le partage est ici un procédé non compétitif, non affecté par la présence d'impuretés - associés à des polymères poreux dont le procédé

d'adsorption mis en jeu est susceptible de donner lieu à des phénomènes de compétition au niveau des sites de fixation entre substances interférentes [Burgot et Pellerin, 2003]. De nombreux travaux ont été réalisés afin de déterminer le type de fibre le plus performant pour l'extraction des composés volatils de plantes aromatiques et médicinales [Al, 1997 ; Vichi et coll., 2003 ; 5<sup>th</sup> Edition solid phase, 2006].

Ces dix dernières années, la MEPS a été mise en œuvre avec succès en combinaison avec des méthodes d'analyses conventionnelles telle la chromatographie en phase gazeuse (CPG) associée à un détecteur à ionisation de flamme (DIF) ou couplée en ligne à la spectrométrie de masse (CPG/SM). De récents travaux décrivent les conditions opératoires les mieux adaptées pour l'analyse des constituants volatils dans les PPAM, les hydrolats, les fruits et les jus de fruits [Paliyath et coll., 1997 ; Augusto et coll., 2000 ; Riu-Aumatell et coll., 2004 ; Pellati et coll., 2005 ; Paolini et coll., 2008a, 2008b ; Barboni, 2009].

Bicchi et coll. [2000b] ont étudié l'influence de la nature du polymère sur le profil chromatographique de la fraction volatile de quatre espèces végétales. Les résultats indiquent que le meilleur rendement d'extraction est obtenu avec les fibres triples : une phase liquide, le PDMS pour les composés les moins polaires et deux phases solides poreuses, le CAR et le DVB pour les composés les plus polaires. Les fibres triples permettent l'extraction de composés volatils sur une large gamme s'étendant de C<sub>3</sub> à C<sub>20</sub>. Par ailleurs, plusieurs études ont montré que la fibre la plus performante pour l'analyse des composés volatils de l'huile d'olive est également à revêtement triple DVB/CAR/PDMS [Vichi et coll., 2003, 2005, 2006 ; Cavalli et coll., 2003, 2004 ; Kalua et coll., 2006,]. Enfin, nous signalerons les travaux menés au laboratoire sur la comparaison des profils chromatographiques de neuf hydrolats obtenus par extraction liquide-liquide, d'une part, et ceux obtenus par MEPS avec cinq types de fibres, d'autre part. L'utilisation d'une fibre triple (DVB/CAR/PDMS) s'avère être une méthode alternative intéressante à l'extraction liquide-liquide car elle se fait en l'absence de solvant et permet une adsorption homogène des différentes familles de composés et un gain important en temps d'analyse [Paolini et coll., 2008a].

### I.2.2. Désorption thermique automatique

La technique de désorption thermique automatique (DTA) est une méthode très utilisée en industrie agroalimentaire pour l'analyse des arômes de viandes [Cannac-Arteaga,

2001] et de fruits [Blanch et coll., 1991 ; Rosillo et coll., 1999 ; Bianchi et coll., 2005 ; Mamede et Pastore, 2006], ainsi que dans le domaine de l'environnement pour l'étude des polluants de l'air [Burger et coll., 1991] et des composés organiques volatils (COV) [Noij et coll., 1987]. Le procédé « purge and trap » (P&T) est le plus couramment employé pour l'extraction des composés de la matrice et le prélèvement dans l'espace de tête (figure 3). L'extraction dynamique par P&T-DTA permet souvent l'identification de constituants qui ne sont pas rapportés par extraction liquide-liquide ou en mode statique (MEPS) [Paolini et coll., 2008a].

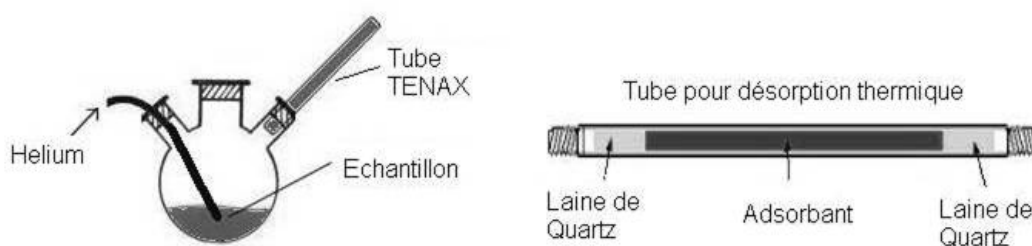


Figure 3 : DTA - Système d'extraction « purge & trap » (P&T) et d'un tube adsorbant de type Tenax (TA).

Il existe de nombreuses autres méthodes de prélèvements d'air : pompage sur des tubes adsorbants ou par un système « on line », prélèvement au moyen de sacs ou de canister, etc. Dans tous les cas, le choix de la technique d'échantillonnage est principalement régi par l'objectif de l'analyse. Le système DTA permet l'analyse des molécules prélevées sur des tubes adsorbants constitués le plus souvent de polymères organiques [Núñez et coll., 1987 ; Grob, 1973]. Parmi eux, les Tenax (polymères d'oxyde de 2,6-diphényle) sont les adsorbants les plus utilisés pour l'analyse de l'air car ils sont thermiquement stables jusqu'à 350°C environ. Ils sont hydrophobes et possèdent une performance de piégeage élevée pour une large gamme de composés. Le principe de la DTA est une désorption à deux étapes. Le premier consiste à désorber les molécules préalablement piégées dans les tubes adsorbants. Ces derniers sont chauffés au moyen d'un four thermique afin de permettre la libération des molécules. Le tube est en permanence balayé par un gaz vecteur inerte (He) qui transporte les substances vers le cryopiège « cold trap » refroidi par effet Peltier et rempli de phase adsorbante. Le second étage consiste à désorber les molécules cryofocalisées dans le piège par chauffage rapide. Le gaz vecteur transporte les molécules ainsi libérées en tête de colonne

chromatographique [Kolb, 1999]. Ce système à deux étages confère une bonne résolution aux chromatogrammes et limite les phénomènes de coélutions pouvant être rencontrés lors d'une désorption classique.

### **I.3. Les extraits**

#### **I.3.1. Extraction liquide-liquide et Macération**

Il s'agit des méthodes les plus simples à mettre en œuvre pour l'extraction des métabolites secondaires contenus dans une matrice liquide ou solide. Elles sont basées sur l'utilisation de solvants seuls ou en combinaison choisis en fonction de la famille de composés à extraire. Les solvants les plus couramment utilisés sont le pentane, l'hexane, l'oxyde de diéthyle, l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane, le méthanol, l'éthanol et l'eau. En outre, une matrice peut subir plusieurs extractions successives en utilisant des solvants de plus en plus polaires afin d'obtenir des mélanges enrichis en molécules d'intérêt. Toutefois, ces méthodes présentent de nombreux inconvénients telle la perte de certains analytes pendant la concentration de l'échantillon ou encore les problèmes écologiques liés à l'élimination et au traitement des solvants [Ibañez et coll., 1998]. Ces techniques ont été optimisées, notamment, pour l'analyse des composés non volatils (polyphénols, sucres, cires) dans les fruits et légumes [Macleod et de Troconis, 1982 ; Kok et coll., 1987] qu'ils soient comestibles (banane, orange, papaye, brocoli, carotte, pomme de terre,...) [Faller et Fialho, 2010] ou non (baies de genévrier, glands) [Hayouni et coll., 2007]. Les travaux publiés par Justesen et coll. [1998], par Escarpa et Gonzalez [1998] et par Careri et coll., [2001] préconisent l'utilisation du méthanol comme solvant d'extraction des composés phénoliques des végétaux. Ces méthodes d'extraction ont également été appliquées au laboratoire pour la caractérisation chimique d'eaux florales [Paolini et coll., 2008a]. Enfin, ces procédés interviennent dans la fabrication et le contrôle de la qualité des spiritueux [Tuberoso et coll., 2006].

#### **I.3.2. Extraction au Soxhlet**

L'appareillage Soxhlet permet l'extraction aux solvants « en continu » d'espèces chimiques contenues dans une matrice solide. L'échantillon, placé dans une cartouche poreuse à l'intérieur de l'extracteur, est traversé par les vapeurs de solvant. Celles-ci passent du ballon

chauffé au tube adducteur puis se condensent dans le réfrigérant. Le condensat s'accumule dans le corps de l'extracteur (figure 4) jusqu'à atteindre le sommet du siphon, entraînant alors le retour du liquide dans le ballon. Au fil des cycles, le solvant s'enrichit en substances extraites jusqu'à épuisement de l'échantillon en substances d'intérêt. Par comparaison avec les macérations classiques, cette technique permet de réduire le temps d'extraction, d'une part, et requiert nettement moins de solvant et d'échantillon pour une efficacité d'extraction supérieure, d'autre part [Luque de Castro et Priego-Capote, 2010 ; Bimakr et coll., 2011].

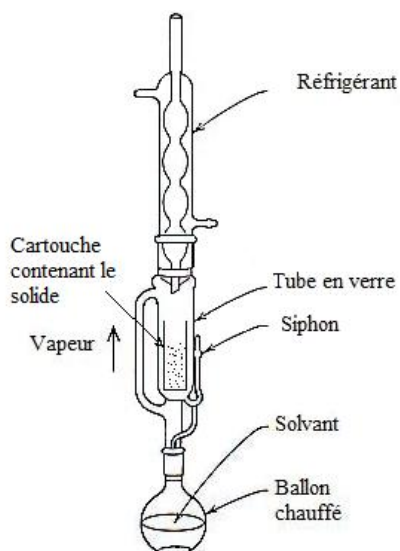


Figure 4 : schéma d'un extracteur de Soxhlet

De par la diversité des familles chimiques pouvant être extraites, ce procédé offre de nombreuses applications dans le domaine de l'agroalimentaire [Jadhav et coll., 2009] et comme le montre, aussi, les travaux de Bimakr et coll. [2011] portant sur l'étude des flavonoïdes dans les feuilles de menthe verte (*Mentha spicata* L.). Cette méthode est également utilisée pour l'extraction de certains polluants tels les pesticides ou les polychlorobiphényles (PCB) présents dans les aliments (haricot, porc, agneau, poisson, etc.) [Beyer et Biziuk, 2008]. Des systèmes d'extraction aux solvants sous pression ont été développés et automatisés (ASE : Automatised Solvent Extraction) [Luque de Castro et Priego-Capote, 2010] afin d'offrir aux utilisateurs des méthodes plus efficaces, plus rapides et moins consommatrices en solvants.

### I.3.3. Extraction par Likens-Nickerson

Le mode d'extraction Likens-Nickerson [1964] est basé sur une utilisation combinée de l'hydrodistillation et de l'extraction aux solvants (figure 5). Cette technique est généralement utilisée en agroalimentaire pour l'extraction des parfums et arômes contenus dans des échantillons solides (fruits, légumes, graines, etc.) [Núñez et coll., 1984 ; Sinyinda et Gramshaw, 1998] ou liquides (miels, vins, liqueurs, etc.) [Bouseta et Collin, 1995 ; Bosch-Fusté et coll., 2007]. Sur de telles matrices, elle permet d'obtenir des rendements d'extraction en volatils bien supérieurs à ceux de l'hydrodistillation [Bosch-Fusté et coll., 2007].

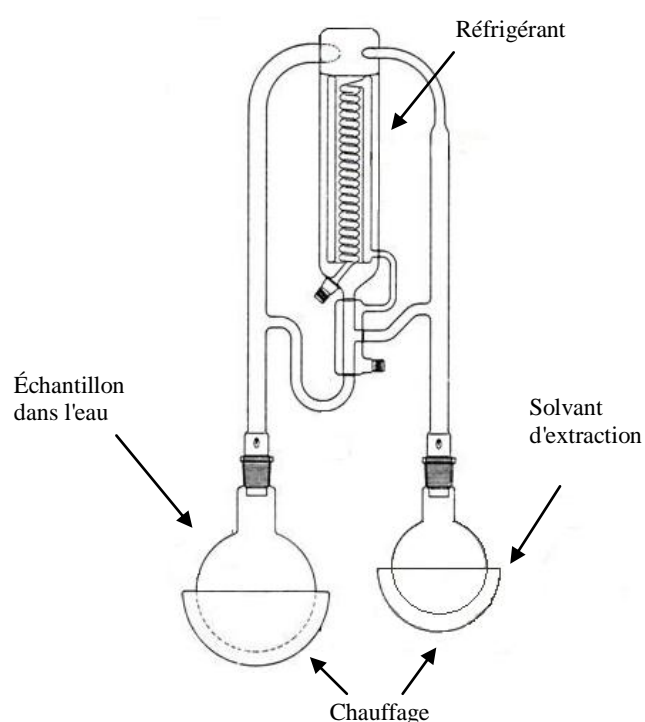


Figure 5 : Schéma d'un système d'extraction Likens-Nickerson

### I.3.4. Extraction au CO<sub>2</sub> supercritique

L'extraction aux fluides supercritiques possède des caractéristiques (vitesse de diffusion élevée et viscosité faible) qui en font une méthode de choix pour l'extraction des molécules d'intérêt : hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), polychlorobiphényles (PCB), pesticides, caroténoïdes, flavonoïdes et terpènes [Mukhopadhyay, 2000]. Avec les techniques d'extraction à la vapeur d'eau, cette méthode est l'une des rares technologies compatible avec le cahier des charges de l'agriculture biologique pour l'obtention des huiles

essentielles. Contrairement aux solvants organiques, les fluides supercritiques présentent l'avantage de ne laisser aucun résidu dans l'extrait et dans la matière première. L'utilisation d'un gaz inerte, non toxique, insipide et inodore tel que le CO<sub>2</sub> permet une extraction à température ambiante (30°C), à l'abri de l'oxygène, minimisant les risques de dégradations thermiques et les risques d'oxydation. De plus, le fluide est recyclé à l'état gazeux en fin d'extraction, ce qui permet de concevoir des processus respectueux de l'environnement. A titre d'exemple, ce procédé a été utilisé dans l'industrie agroalimentaire pour extraire les arômes de pommes, de poires, d'oranges et de café [Sugisawa, 1981].

### I.3.5. Extraction par micro-ondes

L'utilisation des fours à micro-ondes, avec ou sans solvant, a été appliquée à l'extraction des métabolites secondaires dans le milieu des années quatre-vingts [Lane et Jenkins, 1984 ; Ganzler et coll., 1986]. Les micro-ondes interagissent simultanément et sélectivement par rotation dipolaire et conduction ionique avec les molécules présentes dans les tissus végétaux entraînant un échauffement localisé suivi d'une expansion puis d'une rupture des membranes cellulaires [Vian et coll., 2008 ; Bousbia et coll., 2009]. D'une manière générale, par rapport aux modes d'extraction classiques, les avantages de cette méthode sont la rapidité et l'atténuation des risques d'altération thermique. Elle a été mise en œuvre par Viot et coll. [2008] pour l'extraction de graisses contenues dans divers aliments telles des viandes, des viennoiseries et des graines. Aujourd'hui, différentes techniques sont disponibles [Stashenko et coll., 2004 ; Lucchesi, 2005] notamment : - l'extraction assistée par micro-ondes (MAE : Microwave Assisted Extraction) [Ganzler et coll., 1986 ; Paré et coll., 1990 ; Letellier et coll., 1999] présentant un intérêt particulier pour l'extraction des composés non volatils et thermosensibles par des solvants de faible constante diélectrique ; - l'hydrodistillation assistée par micro-ondes sous vide pulsé (VMHD : Vacuum Microwave HydroDistillation) [Mengal et Mompon, 1996] plus rapide que l'hydrodistillation pour un rendement similaire en composés volatils ; - l'extraction par micro-ondes sans ajout de solvants organiques (SFME : Solvant Free Microwave Extraction) [Chemat et coll., 2004a] qui s'avère être une combinaison entre un chauffage par micro-ondes et une distillation à sec sous pression atmosphérique. Les principaux avantages résident dans la faible durée d'extraction (15-30 minutes) et dans le caractère respectueux de l'environnement (pas de solvant, faible consommation d'eau) [Lucchesi et coll., 2004b].

### I.3.6. Extraction par ultra-sons

Le principe de l'extraction assistée par ultra-sons est analogue à celui d'une extraction aux solvants ; toutefois, les vibrations provoquées par les ultrasons permettent d'extraire plus rapidement les constituants. Les applications de cette méthode sont nombreuses ; nous pouvons citer les travaux de Cuoco et coll. [2009] qui ont extrait les anthraquinones dans les racines de Garance (*Rubia tinctorum*) ou ceux de Lee et Lin [2007] qui ont comparé les rendements de l'extraction aux ultrasons et aux solvants des isoflavones des racines de *Radix puerariae*. Avec un temps d'extraction plus court et une consommation en énergie plus faible, cette méthode permet d'obtenir de meilleurs rendements que les extractions classiques aux solvants (avec et sans pression). Cette technique a également été appliquée par Chemat et coll. pour isoler les composés volatils des graines de Carvi (*Carum carvi*) [2004b] ; selon eux, ce procédé est plus sélectif (taux de matière grasse réduit) et plus rapide que l'extraction par Soxhlet.

## II. Les méthodes de séparation, d'identification et de quantification

Les professionnels tels les parfumeurs, les firmes pharmaceutiques, -agroalimentaires, ou -de cosmétiques souhaitent connaître les structures et les concentrations des principes actifs dans les mélanges complexes. En effet, ces analyses sont aujourd'hui nécessaires pour :

- le respect des normes internationales et des limitations en vigueur (i.e. pour les composés susceptibles d'être allergènes : thujones, pulégones, etc.) ;
- l'étude de l'activité biologique des huiles essentielles et des extraits [Bicchi et coll., 2008b] ;
- ou encore, - le suivi et le contrôle de la qualité des produits.

L'analyse d'un mélange complexe s'effectue classiquement par le couplage « en ligne » d'une technique chromatographique, la chromatographie en phase gazeuse CPG (« Gas Chromatography » GC) pour la fraction légère et la chromatographie liquide à haute performance CLHP (« High Performance Liquid Chromatography » HPLC) pour la fraction lourde, avec une technique d'identification spectrale, généralement la spectrométrie de masse SM (« Mass Spectrometry » MS) [Joulain, 1994 ; Marriott et coll., 2001]. En routine, l'analyse se fait sur l'huile essentielle globale ou l'extrait brut. Dès lors que se présentent des



difficultés d'identification pour certains constituants, la procédure nécessite un fractionnement de l'échantillon, qui peut se poursuivre jusqu'à la purification du composé par des techniques chromatographiques préparatives. L'objectif étant d'aboutir à son étude structurale par les techniques spectroscopiques usuelles notamment la Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN-<sup>1</sup>H) et du carbone-13 (RMN-<sup>13</sup>C).

## **II.1. Cas des composés volatils**

### **II.1.1. Chromatographie en Phase Gazeuse**

La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition [Arpino et coll., 1995]. Cette technique de séparation permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. Les progrès technologiques réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs ont contribué à rendre la CPG incontournable pour l'analyse des composés volatils [Mastovská et Lehotay, 2003].

La CPG associée à un détecteur à ionisation de flamme (CPG-DIF) permet une analyse quantitative sur la base de l'aire de chaque pic chromatographique par rapport à l'aire totale des signaux et une analyse qualitative sur la base des temps de rétention. Ces derniers, bien que spécifiques d'un composé, ont tendance à varier d'une analyse à l'autre en fonction des conditions expérimentales et, notamment, du fait du vieillissement des colonnes. Ainsi, pour une colonne donnée, chaque composé est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) [Kováts, 1965] ou en programmation de température (indices de rétention) [Van den Dool et Kratz, 1963]. Cependant, une reproductibilité parfaite des indices de rétention est difficile à obtenir et ne peut être observée que sur des chromatogrammes réalisés sur une période courte avec des conditions expérimentales rigoureusement identiques.

Les nombreux cas de coélution tendent à montrer que la comparaison des indices de rétention et même la méthode des surcharges ne suffisent pas à identifier formellement un composé. Le développement de la CPG multidimensionnelle a permis de surmonter certaines difficultés rencontrées dans l'analyse des composés volatils [Marriott et coll., 2000, 2001]. La

CPG bidimensionnelle (CPG/CPG), mettant en ligne deux colonnes capillaires, permet la séparation, l'identification et la quantification de composés minoritaires pouvant coéluer avec des composés présents en abondance plus forte. L'échantillon est injecté dans une pré-colonne, puis les composés coéluant sont transférés dans une deuxième colonne pour être séparés [Mondello et coll., 2002, 2005 ; Shellie et coll., 2002 ; Mateus et coll., 2010]. Par ailleurs, l'utilisation des phases stationnaires chirales (colonne de cyclodextrines) en CPG bidimensionnelle a permis de différencier des monoterpènes énantiomériques dans un mélange complexe [Mondello et coll., 2006]. Il est à noter que la détermination de la distribution des énantiomères est régulièrement utilisée en agroalimentaire pour la détection d'adultérations dans les arômes [Casabianca et coll., 1995, 1998].

En outre, les concentrations des constituants d'un mélange peuvent varier significativement en fonction des méthodes mises en œuvre pour la quantification : abondance relative, abondance normalisée, courbe de calibration ou encore utilisation de facteurs de réponses. A titre d'exemple, l'étude de l'huile essentielle de *Tarhomonanthus camphoratus* L. [Costa et coll., 2008] montre une variation importante des teneurs en composés hydrocarbonés et oxygénés lors de la comparaison des résultats obtenus en pourcentages relatifs et par étalonnage interne.

## II.1.2. Chromatographie en Phase Gazeuse / Spectrométrie de Masse

La chromatographie en phase gazeuse couplée en ligne à un spectromètre de masse (CPG/SM) a été mise au point dans les années 1950. L'apparition des colonnes capillaires dans les années 1980 a conduit à un développement rapide des appareils de CPG/SM dans les laboratoires de recherche [McLafferty et Michnowicz, 1992]. Depuis, cette méthode de couplage n'a cessé d'évoluer et a trouvé de nombreuses applications dans les domaines de l'agroalimentaire (aliments, eau), des produits pétroliers (carburants, matières synthétiques), des produits naturels (parfumerie, cosmétique, médecine), etc.

Les constructeurs proposent plusieurs types d'analyseurs de masse ; les plus usités pour l'analyse des volatils sont le quadripôle et le piège à ions (« ion trap ») [McLafferty et Tureček, 1993 ; De Hoffmann et Stroobant, 1999]. Les analyseurs quadripolaires linéaires sont, cependant, les plus répandus (figure 6) ; ils sont constitués de quatre barres cylindriques

soumises deux à deux à un potentiel composé d'une tension continue  $U$  et d'une tension alternative  $V\cos(\omega t)$ . La modification du rapport  $U/V$  au cours du temps permet le passage des ions de masses croissantes (rapport masse/charge  $m/z$ ) entre les barres selon une trajectoire sinusoïdale. Ce réglage des tensions permet de donner une trajectoire stable aux ions pour qu'ils traversent le quadripôle ou une trajectoire instable afin qu'ils percutent les barres et soient détruits.

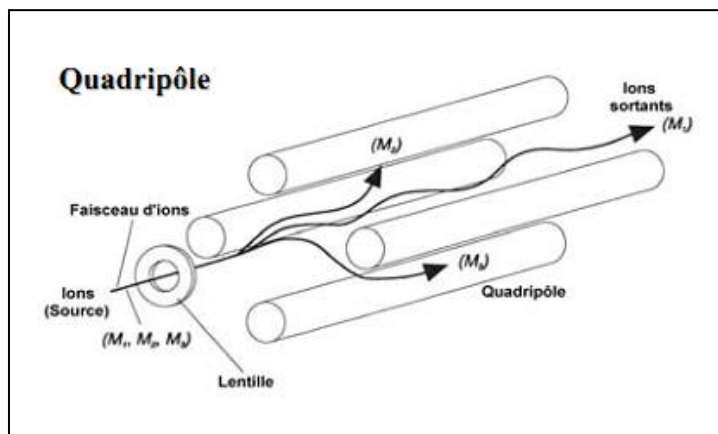


Figure 6 : Principe de fonctionnement d'un quadripôle

Par la suite, les channeltrons (multiplicateurs d'électrons) et les photomultiplicateurs (figure 7), qui sont les détecteurs les plus courants, convertissent le faisceau d'ions et l'amplifient en signaux électriques utilisables par l'ordinateur. Les signaux sont visualisés sous forme de pics d'intensité variable et rangés sur une échelle de rapport masse/charge ( $m/z$ ). Le mode d'acquisition des données « SCAN » permet de réaliser un balayage sur une gamme de masses prédéterminée conduisant à un chromatogramme reconstitué. Ce processus rend possible l'analyse qualitative de chaque composé. Toutefois, ce mode d'acquisition ne permet pas la quantification des composés analysés ; il est préférable d'utiliser le mode « SIM » (Selected Ion Monitoring) qui offre un gain important en sensibilité et qui est basé sur la sélection d'un nombre réduit d'ions pour chaque constituant.

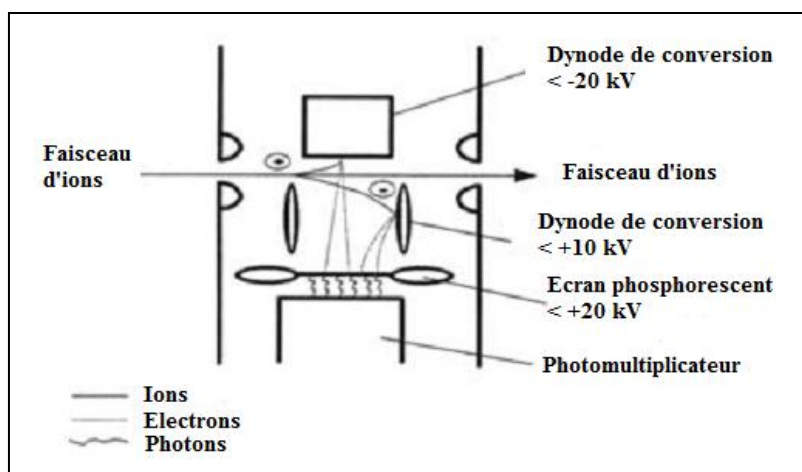


Figure 7 : Principe de fonctionnement d'un photomultiplicateur

Il existe deux modes principaux d'ionisation en spectrométrie de masse : l'ionisation par impact électronique (IE) et l'ionisation chimique (IC). Dans ce dernier cas, nous distinguons l'ionisation chimique positive (ICP) et l'ionisation chimique négative (ICN). La méthode d'ionisation par impact électronique est la plus couramment utilisée (figure 8) ; l'ionisation des substances se fait par bombardement à l'aide d'un faisceau d'électrons d'énergie de 70 eV provenant d'un filament chauffé. Les fragments ioniques positifs obtenus, dont éventuellement l'ion moléculaire, forment un spectre de masse caractéristique pour chaque composé. Parmi le nombre très important de publications de travaux ayant recours à cette méthode, nous distinguerons ceux de Weyersthal et coll. [1988, 1998] portant sur la composition chimique des huiles essentielles de ciste et de genévrier.

Cette méthode d'ionisation est utilisée de façon systématique dans notre laboratoire pour l'analyse des composés volatils [Paolini et coll., 2005, 2007a, 2007b, 2008b]. Quel que soit l'appareillage utilisé, le principal avantage de l'impact électronique réside dans la bonne reproductibilité des spectres de masse, ce qui permet l'utilisation raisonnée de bibliothèques commerciales spécifiques à un domaine de recherche [Adams, 1995 ; Joulain et König, 1998] ou plus généralistes [Mc Lafferty et Stauffer, 2007 ; Nist, 2008]. Les principales difficultés rencontrées dans l'analyse en SM-IE sont dues à la similitude des spectres pour des composés de structures proches ou à la faible intensité, voire l'absence, du pic moléculaire sur le spectre de masse [Coleman et coll., 1989 ; Schultze et coll., 1992 ; Joulain et Laurent, 1989].

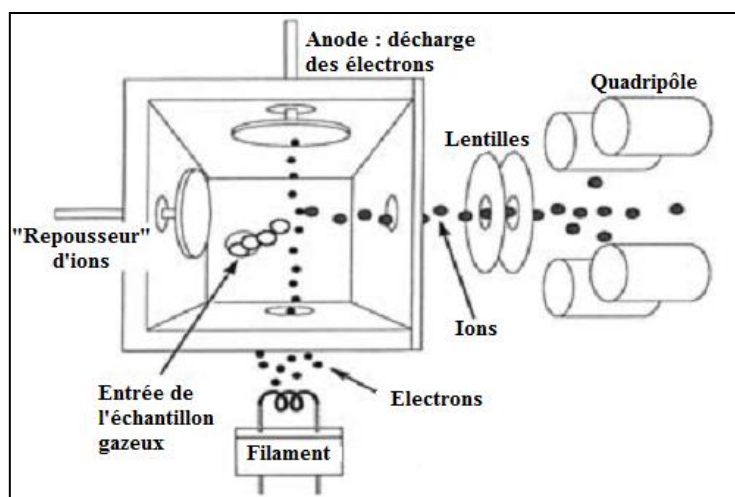


Figure 8 : Principe de fonctionnement d'une source à ionisation par impact électronique

Le mode de l'ionisation chimique (IC) consiste, dans un premier temps, à ioniser un gaz réactif (i.e. méthane, isobutane ou ammoniac) par impact électronique pour donner des ions radicalaires qui réagissent ensuite avec les molécules de gaz réactif par le biais de collisions produisant le gaz réactif ionisé appelé « plasma d'ionisation » et composé majoritairement d'ions protonés. Ceux-ci, d'énergie moindre que les électrons qui leur ont donné naissance, réagissent avec la substance à analyser selon des réactions de types ions-molécules provoquant peu de fragmentations [Arpino, 1982 ; Harrison, 1992].

L'IC permet de résoudre certains des problèmes analytiques rencontrés avec l'IE en fournissant des informations structurales. Pour la caractérisation d'huiles essentielles de plantes de la famille des Asteraceae, notre laboratoire a fait appel à l'ionisation chimique positive et négative afin d'identifier les esters dérivés d'alcools monoterpéniques (nérol, lavandulol, bornéol, thymol, dehydrothymol) [Paolini et coll., 2005, 2007a; 2007b] et différencier des stéréoisomères d'esters de chrysanthényle [Darriet et coll., 2009]. Les analyses apportent systématiquement des précisions sur la masse de la molécule analysée et souvent, des indications sur la structure du composé. Toutefois, de nombreuses études ont mis en évidence l'influence des paramètres expérimentaux - notamment le gaz réactant, la température et la pression dans la source d'ionisation - sur les résultats d'une analyse en IC [Bruins et coll., 1987 ; Vernin et Lageot, 1992]. En conséquence, il convient d'être prudent, en particulier lors de la comparaison de spectres enregistrés dans des conditions expérimentales différentes.

Les nombreuses difficultés rencontrées lors de l'analyse de mélanges complexes ont conduit, à la mise au point de la spectrométrie de masse multidimensionnelle à double ou à triple analyseur (SM<sup>2</sup> ou SM<sup>3</sup>) [Yost et Enke, 1979 ; Cambon, 1989]. Cette technique couplée à la CPG, a connu un développement rapide ces dernières années. Le principe consiste à sélectionner un ion issu de la première fragmentation afin de le fragmenter de nouveau. Les fragments de l'ion secondaire constituent, alors, le deuxième spectre de masse qui diffère selon l'origine de l'ion primaire. Souvent, le premier spectromètre de masse du couplage fonctionne en mode IC et le(s) suivant(s) en mode IE. Cette méthode a été appliquée pour l'étude mécanistique des fragmentations de la khusimone [Cazaussus et coll., 1988] et pour différencier les quatre isomères du dihydrocarvéol à partir des fragments caractéristiques induits par la stéréochimie de la molécule (position axiale ou équatoriale des groupements hydroxyle et méthyle) [Decouzon et coll., 1990]. Cette technique a également été utilisée pour détecter et quantifier 38 pesticides présents à l'état de trace dans divers aliments (citron, raisin, concombre, sucre et farine de blé) [Paya et coll., 2007 ; Sinha et coll., 2011].

## **II.2. Cas des composés phénoliques**

### **II.2.1. Chromatographie Liquide Haute-Performance**

La chromatographie liquide haute-performance (CLHP) est une puissante technique de séparation utilisée pour l'identification, la quantification et/ou la purification (chromatographie semi-préparative ou préparative) des composés dans un mélange. Ce dernier est mis en solution dans la phase mobile (solvants) puis est injecté sous haute pression en tête de la colonne (tube en acier inoxydable contenant la phase stationnaire) [Neue, 1997 ; Dong, 2006 ; Snyder et coll., 2009]. Il existe plusieurs types de phases stationnaires mettant en jeu des mécanismes de rétention variés : chromatographie d'adsorption, -de partage, -d'échange d'ions, -d'exclusion, etc. La chromatographie de partage est la technique la plus couramment utilisée ; la phase stationnaire est typiquement composée de micro particules de silice greffée avec divers motifs organiques. Deux types de chromatographie de partage peuvent être distingués : l'un est dit en phase normale "normal phase chromatography", les molécules greffées sur la silice sont des groupements polaires tels -NH<sub>2</sub> ou -CN ; l'autre est dit en phase inverse "reversed phase chromatography", les greffons apolaires sont composés principalement de chaînes hydrocarbonées (-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub> ou -C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>). Dans le premier cas, la phase

mobile est généralement apolaire et non aqueuse (hexane pur ou en mélange avec une faible proportion de méthanol ou d'acétonitrile) ; les phénomènes d'adsorption croissent avec la polarité des analytes entraînant une augmentation des temps d'élution. Dans le second cas, la phase mobile est polaire et aqueuse ; les temps de rétention diminuent avec la polarité des analytes [Rosset et coll., 1991] et peuvent être ajustés en utilisant un gradient d'élution combinant l'eau et un solvant organique (notamment le méthanol et l'acétonitrile) comme phase mobile. Cette dernière méthode s'est considérablement développée depuis les années 70 au détriment de la phase normale du fait d'une meilleure reproductibilité des temps de rétention. Ceux-ci, spécifiques de chaque constituant, sont fortement dépendants de la nature de la phase stationnaire, de la composition de la phase mobile et des conditions opératoires (débit, pression et température). A l'instar de la CPG, les molécules sont identifiées en sortie de colonne grâce à un détecteur spectrophotométrique ou spectrométrique ; il enregistre un signal qui est ensuite transformé par l'ordinateur en un chromatogramme [Rosset et coll., 1991].

L'association de la station de CLHP avec un détecteur à barrettes diode (Diode Array Detector, DAD) permet une analyse qualitative d'un mélange par l'enregistrement des spectres UV des constituants individualisés, d'une part et permet une analyse quantitative sur la base de l'aire de chaque pic chromatographique rapportée sur une courbe d'étalonnage externe, d'autre part.

La polyvalence de la CLHP en termes de cibles d'étude (pesticides, polluants, sucres, acides aminés, composés thermosensibles, etc.) est à l'origine de l'essor de cette technique dans divers secteurs d'activités. Ses multiples atouts (rapidité d'analyse, sensibilité, résolution) en font aujourd'hui la méthode de référence pour l'analyse chimique des produits agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques.

De nombreux articles [Merken et Beecher, 2000 ; Huck et coll., 2001 ; de Souza et coll., 2002 ; Calabro et coll., 2004 ; Caristi et coll., 2006 ; de Lourdes Mata Bilbao et coll., 2006 ; Hoffmann-Ribani et coll., 2009] et revues [Molnar-Perl et Füzfai, 2005 ; de Rijke et coll., 2006 ; Valls et coll., 2009] décrivent les protocoles expérimentaux (type de colonne, solvant, gradient) pouvant être envisagés pour la séparation par CLHP des composés phénoliques présents dans les fruits [Shui et Leong, 2002 ; Belajová et Suhaj, 2004;]. A titre d'exemple, Agócs et coll. [2007] ont comparé les résultats obtenus en phase inverse avec

deux types de colonnes (C18 et C30) sur la composition en caroténoïdes du zeste et de la pulpe de plusieurs espèces d'agrumes : orange (*Citrus sinensis*), mandarine (*C. reticulata*), clémentine (*C. clementina*), kumquat (*Fortunella*), pamplemousse (*C. maxima*) et citron (*C. limon*). En phase normale avec une colonne chirale, Caccamese et Chillemi [2010] ont mesuré l'abondance de deux énantiomères de la naringine dans l'albédo des pomélos (*C. grandis*).

## II.2.2. Chromatographie Liquide à Haute Performance / Spectrométrie de Masse

Les premiers couplages CLHP/SM ont été mis en œuvre en 1973 par Shulten et Beckey [1973] en utilisant un spectromètre de masse par désorption de champ dont les multiples inconvénients – notamment ceux liés à la préparation de l'échantillon – en ont restreint l'utilisation. L'une des avancées majeures a été le développement de l'ionisation chimique directe [Hunt et coll., 1977] ; avec cette technique, l'échantillon déposé sur un émetteur chauffé est placé directement dans le gaz réactant. Les ions générés sont désorbés et accélérés jusqu'au spectromètre de masse.

Au début des années 1980, deux nouvelles techniques ont été introduites : le bombardement rapide d'atomes (ou Fast Atom Bombardment FAB) [Barber et coll., 1981a, 1981b] et l'émission secondaire induite par des ions (Liquid Secondary Ionisation LSI) [Aberth et Burlingame, 1984]. Une extension de ces méthodes a été développée par l'intermédiaire du bombardement rapide d'atomes en flux continu (Continuous Flow - Fast Atom Bombardment CF-FAB) [Ito et coll., 1985, 1986 ; Caprioli et coll., 1986 ; Caprioli 1990]. Dans ces trois types d'ionisation, l'échantillon dissous dans un solvant à haut point d'ébullition est bombardé par des ions césium à des énergies de 8 à 30 keV (LSI) ou par des atomes d'argon ou de xénon à haute énergie (FAB et CF-FAB).

En parallèle à ces développements, d'autres techniques d'ionisation ont été introduites ; les plus remarquables sont le ThermoSpray (TSP) [Blakley et Vestal, 1983] d'une part, et les méthodes d'ionisation à pression atmosphérique, d'autre part. Parmi celles-ci, il faut distinguer l'électrospray (ElectroSpray Ionisation ESI) [Whitehouse et coll., 1985 ; Fenn et coll., 1989] et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation APCI) [Horning et coll., 1974].



La méthode ESI est mise en œuvre à pression atmosphérique et à température ambiante (figure 9). L'échantillon en solution est introduit dans la source du spectromètre de masse au moyen d'un pousse-seringue ou d'une CLHP. L'analyte traverse une aiguille métallique portée à un potentiel de plusieurs kilovolts (typiquement 3 à 5 kV). Il en résulte la formation de gouttelettes mono- ou poly-chargées, qui conduisent, par désolvatation, à des ions en phase gazeuse qui sont ensuite transmis dans le quadripôle.

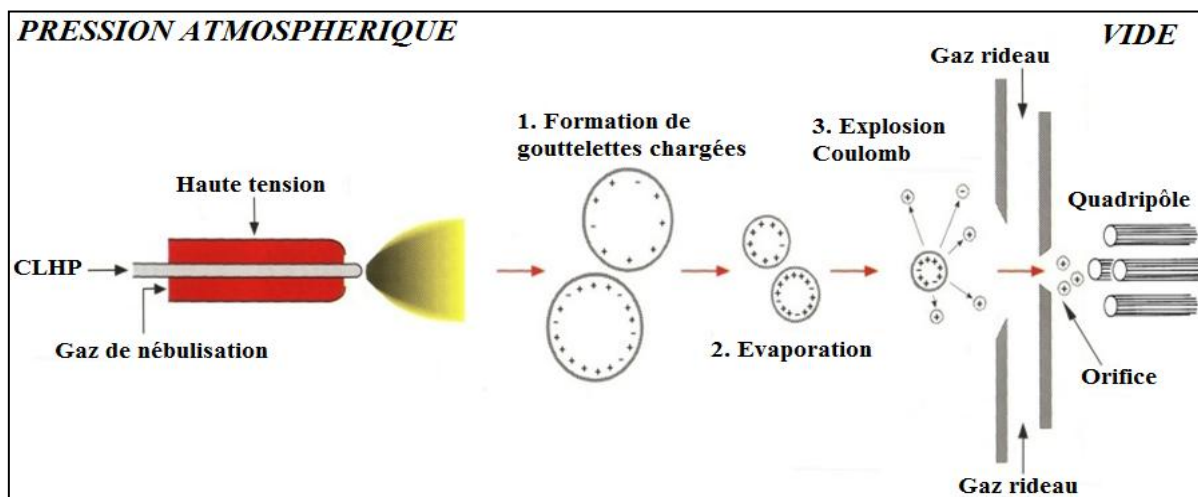


Figure 9 : Principe de fonctionnement d'une source électrospray (ESI)

L'APCI est réalisée à pression atmosphérique dans une fourchette de température allant de 300 à 500°C (figure 10). L'échantillon est introduit dans la source à l'aide d'un capillaire dont l'extrémité débouche dans un vaporisateur. L'échantillon est alors évaporé et mis en mélange avec le gaz nébuliseur qui va le transporter jusqu'à une aiguille corona. Une tension est appliquée à cette aiguille (généralement entre  $\pm 3000$  et  $\pm 5000$  V) provoquant une décharge de quelques  $\mu\text{A}$  qui ionise l'air ambiant et crée un plasma autour de la pointe de l'aiguille. Les molécules contenues dans l'échantillon réagissent alors avec les ions radicalaires du plasma, ce qui conduit à leur ionisation.

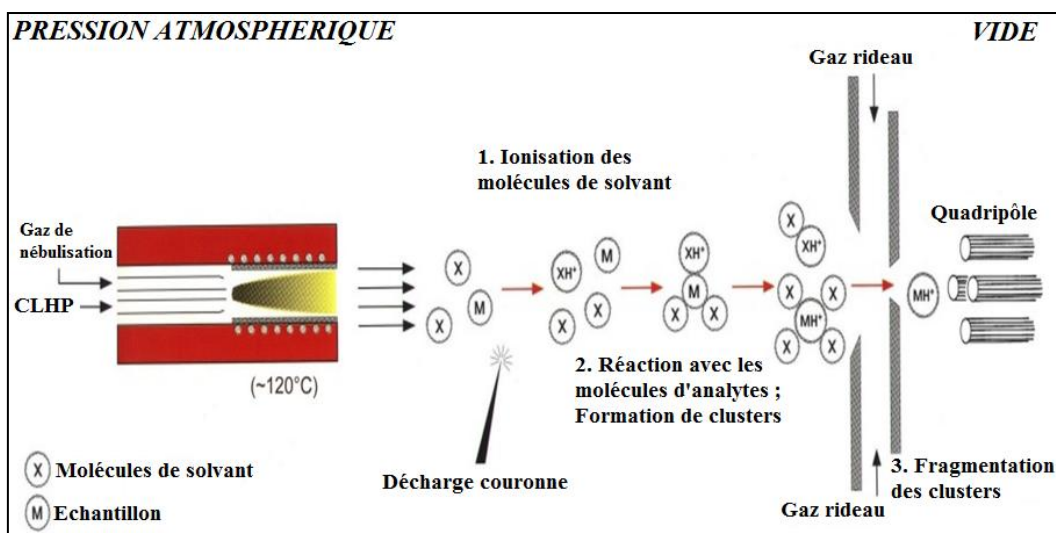


Figure 10 : Principe de fonctionnement de l'Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique

Ces deux modes d'ionisation sont actuellement les plus utilisés en raison de la diversité des métabolites pouvant être détectés. Ces techniques douces génèrent des ions avec un faible excès d'énergie interne. Par rapport aux autres méthodes, l'information sur la masse moléculaire des constituants est donc préservée. De plus, elles permettent la détection d'ions positifs et négatifs ainsi que l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem (SM/SM). Cette dernière permet souvent d'obtenir des informations structurales grâce aux dissociations induites par collision (Collision-Induced Dissociation CID) d'ions préalablement sélectionnés dans le spectromètre. Cette stratégie est souvent mise en œuvre pour l'analyse des composés phénoliques ; les chemins de fragmentation des métabolites secondaires étant généralement analogues à ceux des différentes techniques d'ionisation. Cependant, les intensités relatives des ions peuvent être fortement affectées selon l'appareillage utilisée [de Rijke et coll., 2003 ; March et coll., 2007].

Carini et coll., [2001] ont eu recours au couplage CLHP/SM en mode ionisation chimique positive et négative pour la détermination des polyphénols dans des extraits d'*Helichrysum stoechas*. Par ailleurs, Baldi et coll. [1995] ont utilisé le couplage de CLHP/DAD (détecteur à barrette d'iode) et le couplage CLHP/SM (TSP) pour la caractérisation de composés phénoliques présents dans les zestes de citron (*Citrus limon*) ; l'association des spectres UV-visible et des spectres de masse a ainsi permis l'identification de coumarines, de flavones -O et -C glycosylées, de flavonols et de flavanones. De manière analogue, Ruberto et coll. [2007] ont identifié et quantifié les composés phénoliques (17 anthocyanes et 11 flavonols) présents dans les baies de raisin (*Vitis vinifera*) de différentes

variétés (*Nero d'Avola*, *Nerello Mascalese*, *Nerello Cappuccio*, *Frappato* et *Carbernet Sauvignon*) cultivées en Sicile. En outre, Pikulski et Brodbelt [2003] ont déterminé la position du sucre sur l'aglycone en étudiant les spectres de masse ESI de flavonoïdes glycosylés. Enfin, Waridel et coll. [2001] ont différencié des flavones 6-C et 8-C glycosylées (vitexine, isovitexine, orientine et isoorientine) en ionisation positive et négative.

### **III. Méthodologie d'analyse du laboratoire**

Au laboratoire de Chimie des Produits Naturels au sein duquel ces travaux de thèse ont été menés, l'analyse des échantillons a été réalisée par les techniques d'analyses dites conventionnelles car faisant référence sur le marché. Nous avons ainsi fait appel (i) à la chromatographie en phase gazeuse associée à la détection par ionisation de flamme (CPG-DIF) et à la CPG couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM), pour la fraction légère et (ii) à la chromatographie liquide haute performance associée à la détection par barrette de diodes (CLHP-DAD) et/ou couplée à la spectrométrie de masse (CLHP/SM), pour la fraction lourde.

#### **III.1. Application aux composés volatils**

Les composés volatils sont préalablement extraits par hydrodistillation (huile essentielle) ou pré-concentrés par Micro-Extraction en Phase Solide (MEPS). Cette dernière méthode nécessite une étape d'optimisation des paramètres d'extraction basée sur la somme des aires de pics en CPG-DIF. Les conditions d'extraction étant fixées, l'analyse de chaque échantillon est effectuée en triple afin de s'assurer de la répétabilité des résultats de l'analyse.

Dans les deux cas, la méthodologie d'analyse est basée sur l'utilisation conjointe de la CPG-DIF et de la CPG/SM (figure 11). La CPG-DIF permet le calcul des indices de rétention sur colonne polaire et apolaire ainsi que la quantification relative des composés. Le couplage en ligne CPG/SM permet d'obtenir le spectre de masse des composés individualisés.

Ces sept dernières années, le laboratoire CPN a réalisé une soixantaine de publications ayant trait à la valorisation de la fraction légère des Plantes à Parfums Aromatiques et Médicinales (PPAM) à travers la production et la caractérisation chimique des huiles essentielles qui en sont extraites ou à travers l'analyse directe de la fraction volatile. Ces recherches constituent la thématique historique et le cœur de compétences du laboratoire.

La bibliothèque de références « Arômes » créée il y a une quinzaine d'années à partir de standards commercialement disponibles et sans cesse enrichie par des molécules parfaitement identifiées, isolées par fractionnement d'huiles essentielles, d'extraits ou encore obtenues par hémisynthèse, compte, aujourd'hui, plus de 900 composés référencés par leur spectre de masse et leurs indices de rétention (polaire / apolaire). Une identification sans ambiguïté se fait par comparaison informatisée des données d'un constituant du mélange analysé avec celles des composés de référence de notre bibliothèque (figure 11).

Dans le cas de composés absents de la bibliothèque « Arômes » nous procédons à des analyses complémentaires (figure 12). Si une structure est proposée par les bibliothèques commerciales spécifiques (Adams, Joulain) avec une note de concordance au moins égale à 95% et que les notes des autres structures proposées sont nettement inférieures, alors, nous pouvons raisonnablement conclure quant à l'identification.

Si ces conditions ne sont pas satisfaites, l'identification est réputée seulement « probable » et il convient de procéder à des analyses complémentaires. Pour cela nous avons recours à la spectrométrie de masse en mode IC (positive et négative) et à la RMN du carbone-13. Dans la perspective d'une étude structurale, nous pouvons, selon le cas, purifier le composé par fractionnement du mélange complexe ou tenter de le préparer par hémisynthèse (figure 12).

Dans la suite de notre travail, les compositions en volatils des baies de myrte, des feuilles de cédratiers et des cédrats (zeste, albédo, jus) ainsi que celles des liqueurs et eaux de vie correspondantes ont été caractérisées selon la méthodologie présentée en figure 11.

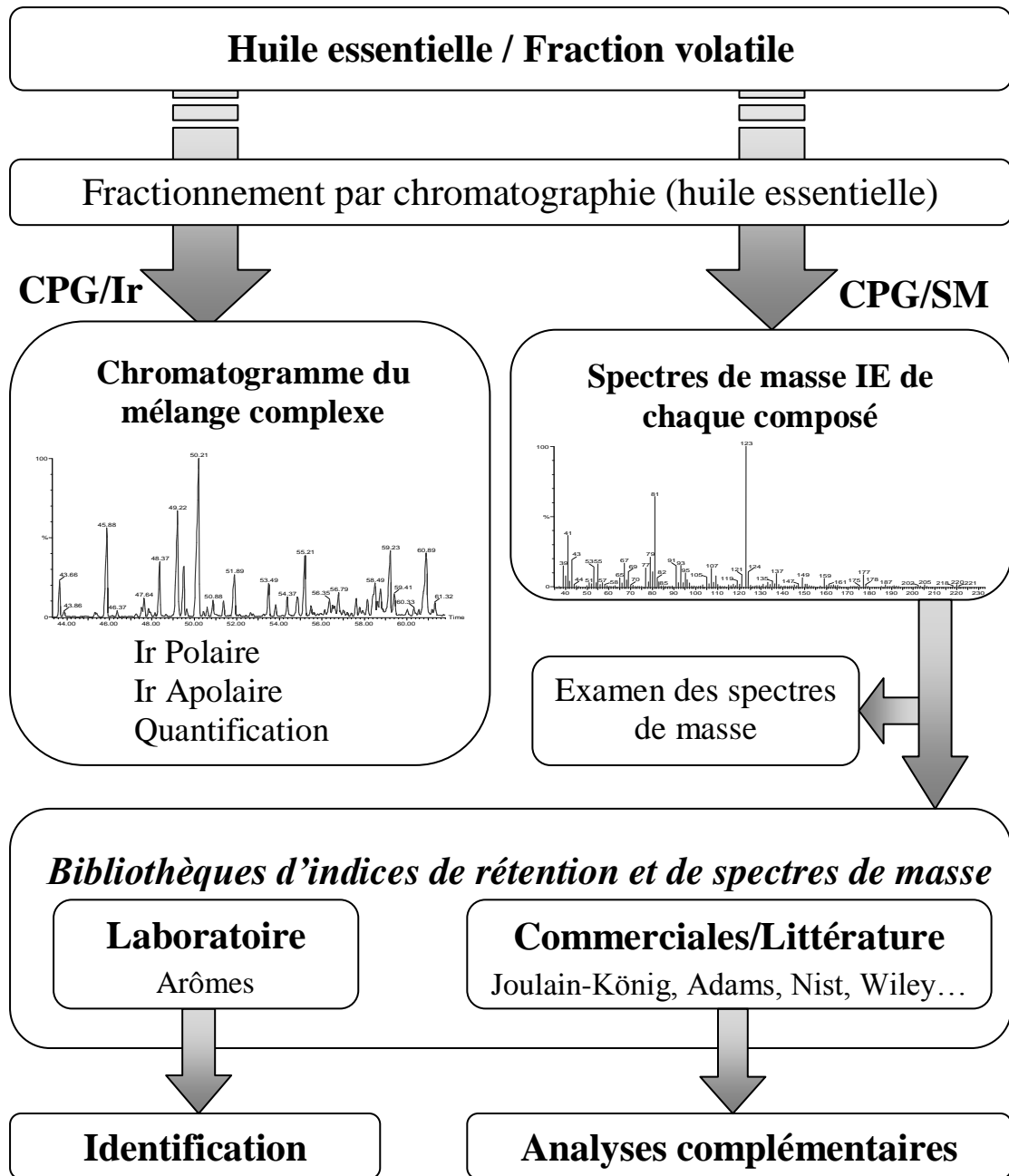


Figure 11 : Identification des constituants volatils d'une PPAM par CPG et CPG/SM.

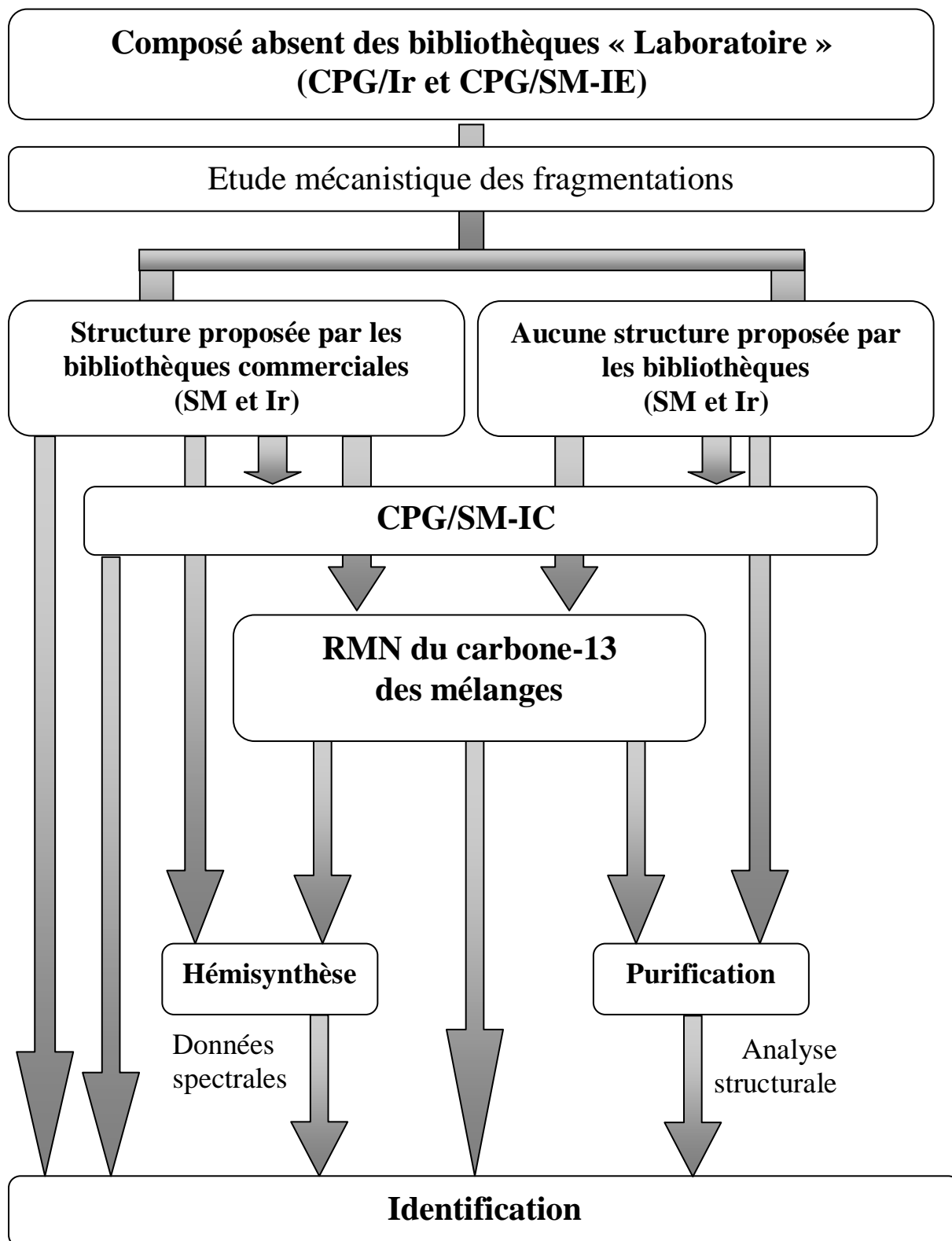


Figure 12 : Méthodes d'analyses complémentaires des constituants d'une huile essentielle

### III.2. Application aux composés phénoliques

L'analyse qualitative et quantitative des composés phénoliques dans des mélanges complexes nécessite un appareillage mettant en œuvre différents couplages tel le couplage chromatographie liquide - spectrométrie de masse ou l'association avec une détection par UV.

Pour les analyses concernant le myrte, nous avons eu recours à la CLHP-DAD en parallèle de la CLHP/SM. Par la suite, pour les analyses ayant trait au cédrat nous n'avons fait appel qu'au couplage CLHP/SM.

A fin d'études fondamentales et appliquées, nous avons procédé à la caractérisation des composés phénoliques présents dans les extraits végétaux et les produits agro-alimentaires. Nos travaux correspondant à cette problématique constituent une originalité méthodologique significative par rapport aux autres thèses jusque là préparées au laboratoire CPN. Dans cette optique, le laboratoire s'est doté d'un dispositif de couplage en chromatographie liquide. La méthodologie d'analyse choisie est basée sur l'utilisation du couplage CLHP-SM/SM permettant d'obtenir les temps de rétention et les spectres de masse des composés. Ces données sont destinées à être comparées à celles des références contenues dans des bibliothèques élaborées au laboratoire ou trouvées dans la littérature ; à notre connaissance et contrairement aux composés volatils, il n'existe pas de bibliothèques commerciales pour les composés phénoliques.

L'un des objectifs de ce travail de thèse est, donc, de développer la méthodologie d'analyse brièvement exposée *supra* avec, en préalable, la construction d'une bibliothèque de références spécifique au couplage CLHP-SM/SM pour l'analyse des composés phénoliques. La probabilité d'identification d'un constituant est plus élevée si elle est effectuée par analogie avec les spectres de masse contenus dans une bibliothèque propre au laboratoire et adaptée au domaine d'investigation que par comparaison avec les données de la littérature.

A partir de molécules disponibles dans le commerce (Extrasynthèse et Aldrich, France), nous avons donc commencé la construction de la bibliothèque spectrale qui, au moment où ces travaux de thèse s'achevaient, comptait une centaine de spectres de masse. En l'occurrence ceux de 22 acides phénoliques, de 49 flavonoïdes aglycones (flavone, flavonol, flavanone, flavan-3-ol, isoflavone, dihydroflavonol) et de 24 flavonoïdes glycosylés. Une

quarantaine de ces composés de références ont été sélectionnés sur la base de notre recherche bibliographique quant aux composés phénoliques présents dans les genres *Myrtus* [Montoro et coll., 2006a] et *Citrus* [Gattuso et coll., 2007 ; Wang et coll., 2008]. Après achat de 210 nouveaux standards judicieusement choisis (Extrasynthèse), la bibliothèque compte, aujourd'hui, plus de 300 références utiles.

La bibliothèque a été élaborée à partir de spectres de masse enregistrés dans les mêmes conditions opératoires que celles utilisées pour l'analyse des mélanges complexes, assurant ainsi une fiabilité accrue dans l'identification. Pour cela, nous avons réalisé une première série d'analyses de chaque standard en spectrométrie de masse (ionisation *ESI* négative ou positive) afin de déterminer les conditions optimales de réponse de l'ion moléculaire en mode *EMS* (Enhanced MS Scan : scan des ions dans une gamme de masse déterminée en utilisant la trappe à ions) en fonction des paramètres suivants : la tension d'orifice (Declustering Potential DP), la tension d'entrée (Entrance Potential EP) et la tension de sortie du quadripôle (Cell Exit Potential CXP). Ensuite, nous avons procédé à la fragmentation de l'ion moléculaire en mode *EPI* (Enhanced Product Ion Scan :  $MS^2$  et utilisation de la trappe à ions). A cet effet, nous avons fait varier l'énergie de collision (Collision Energy CE) appliquée à l'ion moléculaire afin d'enregistrer, dans notre bibliothèque, cinq spectres de masse différents par composé standard. Nous avons ainsi déterminé l'ion fragment le plus abondant qui permet d'obtenir le signal de la transition « ion précurseur (en général, l'ion moléculaire) / ion fragment » autrement dit de la transition ion parent / ion enfant. Cette transition est ensuite optimisée en fonction de l'énergie de collision dans le mode *MRM* (Multiple Reaction Monitoring).

Enfin, le mode *MRM* associé au mode *EPI* permet l'identification des constituants dans les extraits végétaux. En effet, la détection de la transition d'un composé (mode *MRM*) entraîne la fragmentation de l'ion moléculaire (mode *EPI*) permettant d'obtenir le spectre de masse. Ce dernier est ensuite comparé à ceux des standards contenus dans la bibliothèque du laboratoire. Par ailleurs, le mode *MRM* est utilisé pour la quantification des constituants du mélange à l'aide de courbes étalons préalablement établies. L'analyse quantitative des constituants du mélange est réalisée par étalonnage externe ; pour chacun des composés standards, nous avons établi une courbe d'étalonnage par CLHP-SM/SM à partir de la méthode des régressions linéaires au sens des moindres carrés en reportant les concentrations



massiques en fonction de l'aire du pic. La figure 13 schématise la méthodologie d'analyse que nous venons de résumer.

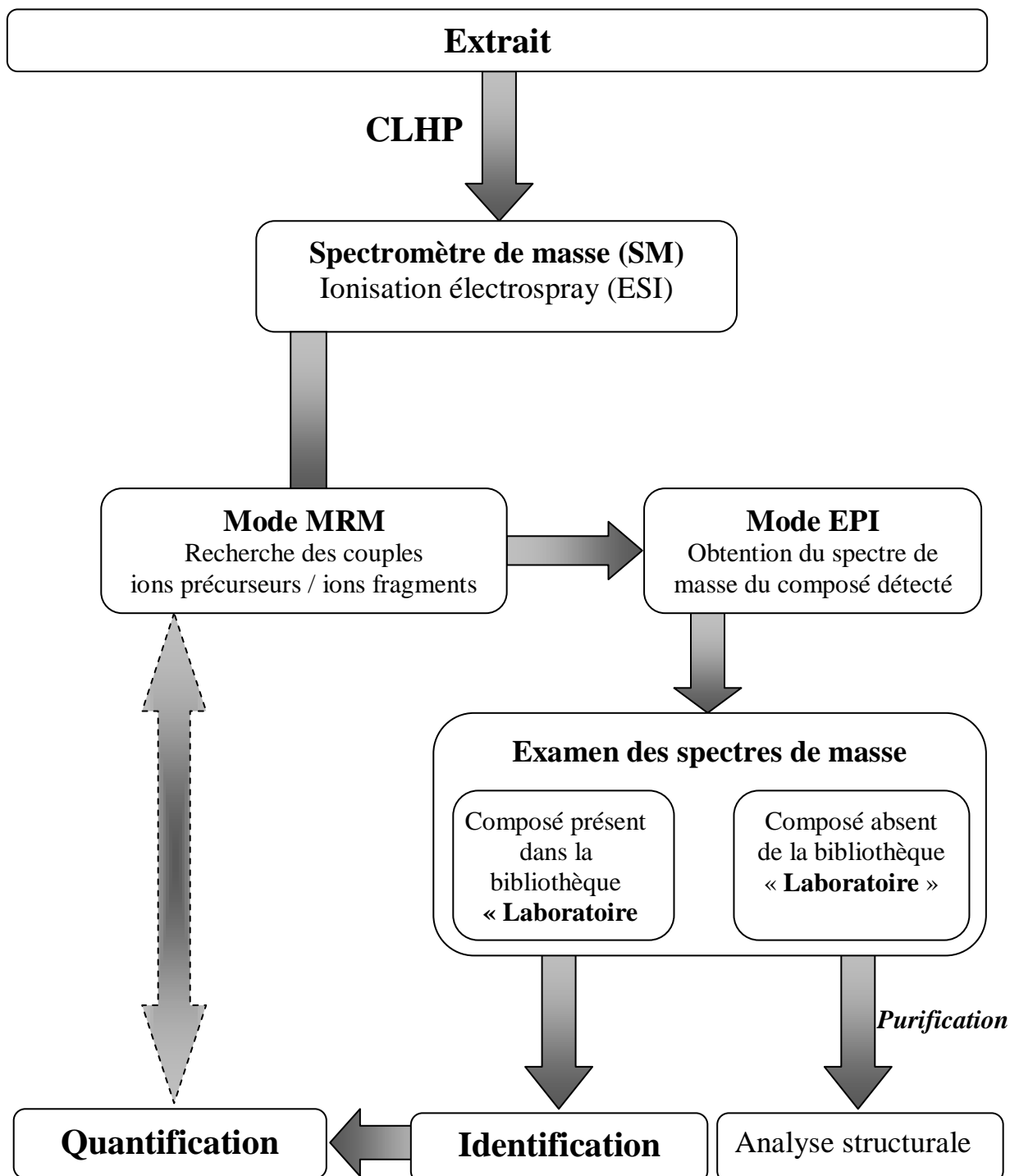


Figure 13 : Caractérisation de la composition chimique d'un extrait par CLHP-SM/SM.

Dans le chapitre suivant nous avons procédé à l'étude mécanistique des fragmentations des composés phénoliques présents dans la bibliothèque du laboratoire. Comme indiqué précédemment, les constituants ont été sélectionnés comme apparaissant fréquemment dans la bibliographie des genres *Myrtus* et *Citrus*, mais également en fonction de leur disponibilité en standards commerciaux.

Afin de valider nos conditions expérimentales et de déceler d'éventuelles distorsions, nous avons comparé les spectres des standards obtenus par nos propres analyses avec ceux décrits dans la littérature.

A notre connaissance, il n'existe pas de « mise au point » ou « revue » regroupant les fragmentations des composés phénoliques. En rassemblant dans un même corpus l'ensemble des informations disséminées dans la littérature, sur le sujet, nous avons voulu constituer un outil permettant de mieux comprendre ces voies de fragmentation et d'en déduire, sinon des règles, du moins les enseignements utiles pouvant être appliqués dans le cas de composés absents de notre bibliothèque.

L'ultime recours pour l'identification d'un constituant inconnu est la purification par des techniques chromatographiques préparatives afin d'aboutir à son élucidation structurale par les méthodes spectroscopiques usuelles : résonance magnétique nucléaire (RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C, RMN-2D), spectrométrie de masse, infra-rouge, etc.

## IV- Fragmentation des composés phénoliques en spectrométrie de masse

### IV.1. Les aglycones

Le squelette de base des flavonoïdes et son numérotage sont rappelés à la figure 14 (Mabry et Markham [1975]).

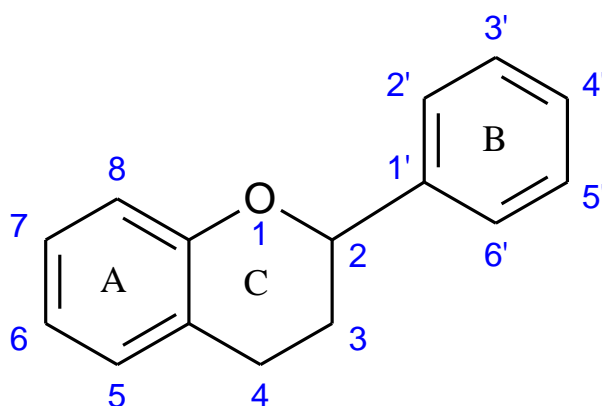


Figure 14 : numérotation du squelette de base des flavonoïdes

Les premières investigations sur les flavonoïdes, et en particulier sur les aglycones, ont été réalisées à l'aide de techniques classiques de spectrométrie de masse en mode IE [Mabry et Markham, 1975 ; Hedin et Phillips, 1992]. Par cette technique particulièrement énergétique, les ions formés présentent un excès d'énergie interne induisant une fragmentation importante. Celle-ci peut conduire à la disparition de l'ion moléculaire  $M^{+\bullet}$  et donc à la perte d'information sur la masse moléculaire. Les ions issus des premières fragmentations de l'ion  $M^{+\bullet}$  peuvent également être affectés par cet excès d'énergie et se fragmenter à leur tour de façon importante. L'ion  $M^{+\bullet}$  et les ions issus des premières fragmentations sont ceux qui portent la plus grande quantité d'information structurale. Leur perte est donc dommageable pour l'identification structurale de l'aglycone analysé. De plus, l'impact électronique (IE) est fortement dépendant de la volatilité des molécules analysées. Des limitations importantes sont donc rencontrées pour les composés phénoliques et pour les dérivés glycosylés.

Les investigations en impact électronique sur les aglycones ont néanmoins permis des avancées majeures en termes d'analyse structurale. Les fragmentations les plus informatives résultent essentiellement des mécanismes de type Retro Diels et Alder appliqués au cycle C (figure 15). Les fragments obtenus contenant le cycle A ou B permettent de déterminer le nombre et le type de substituant portés par ces cycles.

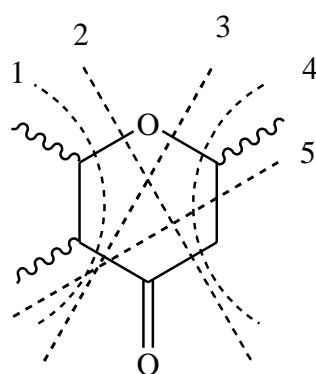


Figure 15 : Possibilités de fragmentations sur le cycle C

Pour les aglycones, les fragments sont désignés par une lettre en fonction du cycle qu'ils contiennent (A ou B). La charge de l'ion observé est spécifiée en exposant. Les liaisons C-C (0-4) qui ont été fragmentées sur le cycle C, pour donner naissance au fragment considéré, sont également spécifiées en exposant (figure 16).

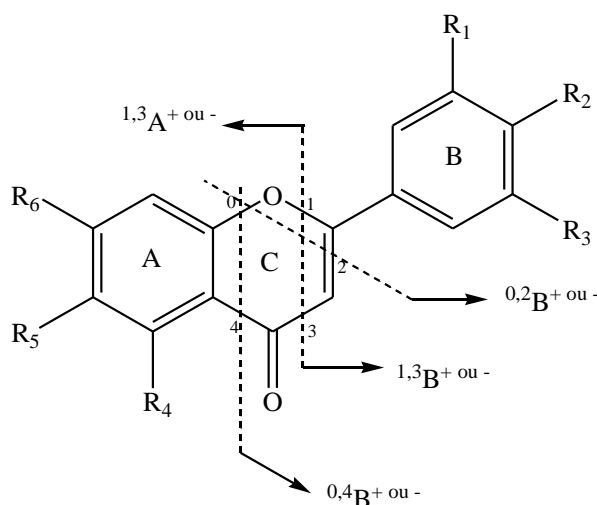


Figure 16 : Exemples de fragmentation et nomenclature associée.

Les ions  $^{i,j}A^{(+ \text{ ou } -)}$  et  $^{i,j}B^{(+ \text{ ou } -)}$  ainsi formés peuvent se fragmenter à leur tour. Ces fragmentations ultérieures correspondent généralement à des pertes de petites molécules neutres, comme par exemple,  $H_2O$ ,  $CO$ ,  $CO_2$ , etc. Les ions résultants de telles fragmentations sont notés en utilisant la notation de l'ion précurseur  $^{i,j}A^{(+ \text{ ou } -)}$  et  $^{i,j}B^{(+ \text{ ou } -)}$  suivi de la formule de la molécule perdue (exemple :  $[^{i,j}A^{(+ \text{ ou } -)} - CO]$  ou  $[^{i,j}B^{(+ \text{ ou } -)} - H_2O]$ ). Les ions formés à partir de l'ion quasi-moléculaire  $[M - H]^-$  (ou  $[M + H]^+$ ) par la perte directe d'un radical ou d'une molécule neutre ne sont pas désignés par des termes spéciaux mais par la notation classique (exemple :  $[M - H - H_2O]$ ).

#### IV.1.1. Les flavonols

Parmi les 16 flavonols sélectionnés dans notre étude, il faut distinguer deux types de substitution du squelette de base :

- les flavonols hydroxylés (Figure 17) : galangine (**1**), kaempférol (**2**), herbacétine (**3**), quercétine (**4**), myricétine (**5**), gossypétine (**6**), quercétagétine (**7**), robinétine (**8**), datiscétine (**9**) et morine (**10**) ;
- les flavonols méthoxylés (Figure 18) : géraldol (**11**), kaempféride (**12**), 6-méthoxyflavonol (**13**), retusine (**14**), casticine (**15**) et robinétine triméthyléther (**16**).

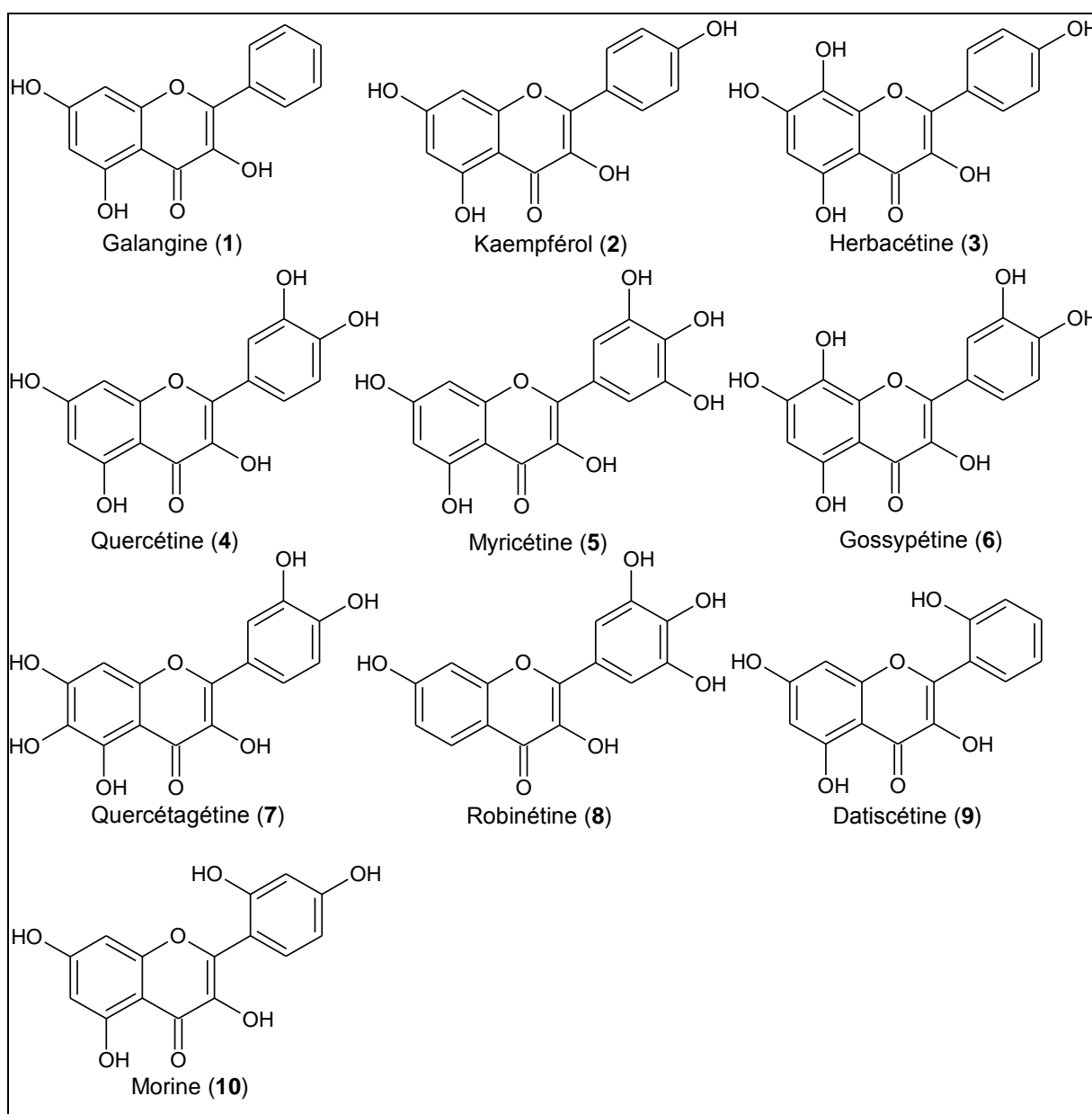


Figure 17 : Structures des flavonols hydroxylés étudiés.

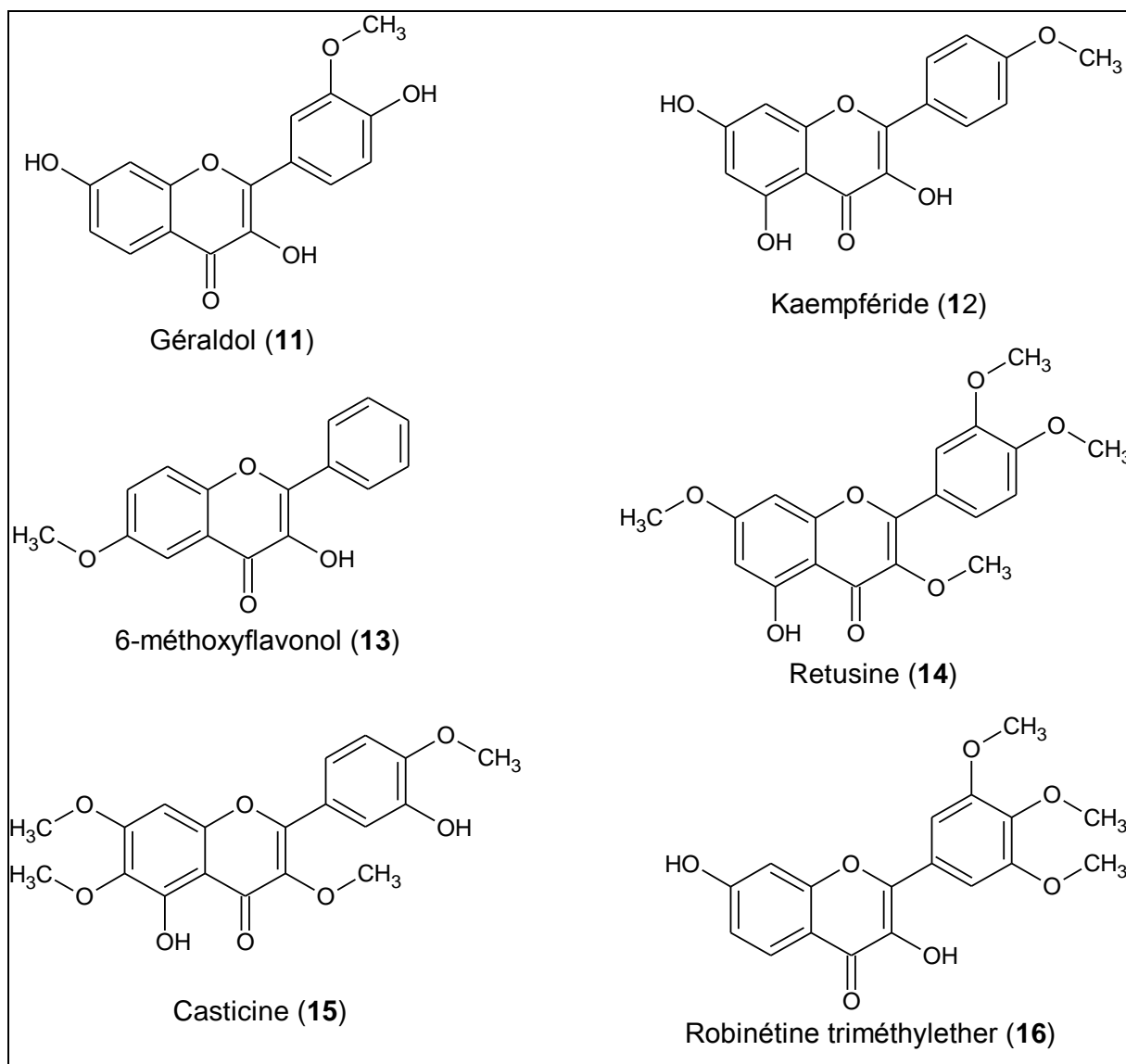


Figure 18 : Structures des flavonols méthoxylés étudiés

a) *Les flavonols hydroxylés*

D'après les données de la littérature schématisées à la figure 19 [Domon et Costello, 1988 ; Fabre et coll., 2001 ; Hughes et coll., 2001 ; de Rijke et coll., 2003 ; Cuyckens et Claeys, 2004 ; March et Miao, 2004 ; Lewars et March, 2007 ; March et coll., 2007 ; Lu et coll., 2010], les premières fragmentations des flavonols hydroxylés correspondent à des pertes de petites molécules neutres ( $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$ ) par contraction du cycle C. Sur ce dernier, la présence du groupement hydroxyle en position 3 favorise les pertes successives de  $\text{CO}$  et  $\text{CO}_2$ . Les fragmentations les plus informatives pour ce type de molécules impliquent des

mécanismes de type Retro Diels Alder (RDA) entre les liaisons 1 et 2 du cycle C. Le réarrangement RDA conduit notamment à l'ion  $^{1,2}A^-$  qui peut subir une perte de CO pour donner l'ion  $[^{1,2}A^- - CO]^-$ . Ce dernier présente une structure comparable à celle de l'ion  $^{1,3}A^-$  également obtenu par des mécanismes RDA. Les deux ions formés ( $[^{1,2}A^- - CO]^-$  et  $^{1,3}A^-$ ) peuvent conduire à un ion commun par perte d'une molécule de  $CO_2$ . Couramment observée chez les aglycones, la perte de cétène à partir du cycle A est peu fréquente avec les flavonols hydroxylés [Fabre et coll., 2001]. Les réactions peuvent également conduire à des ions de type  $^{1,3}B^-$  et/ou  $^{1,2}B^-$ .

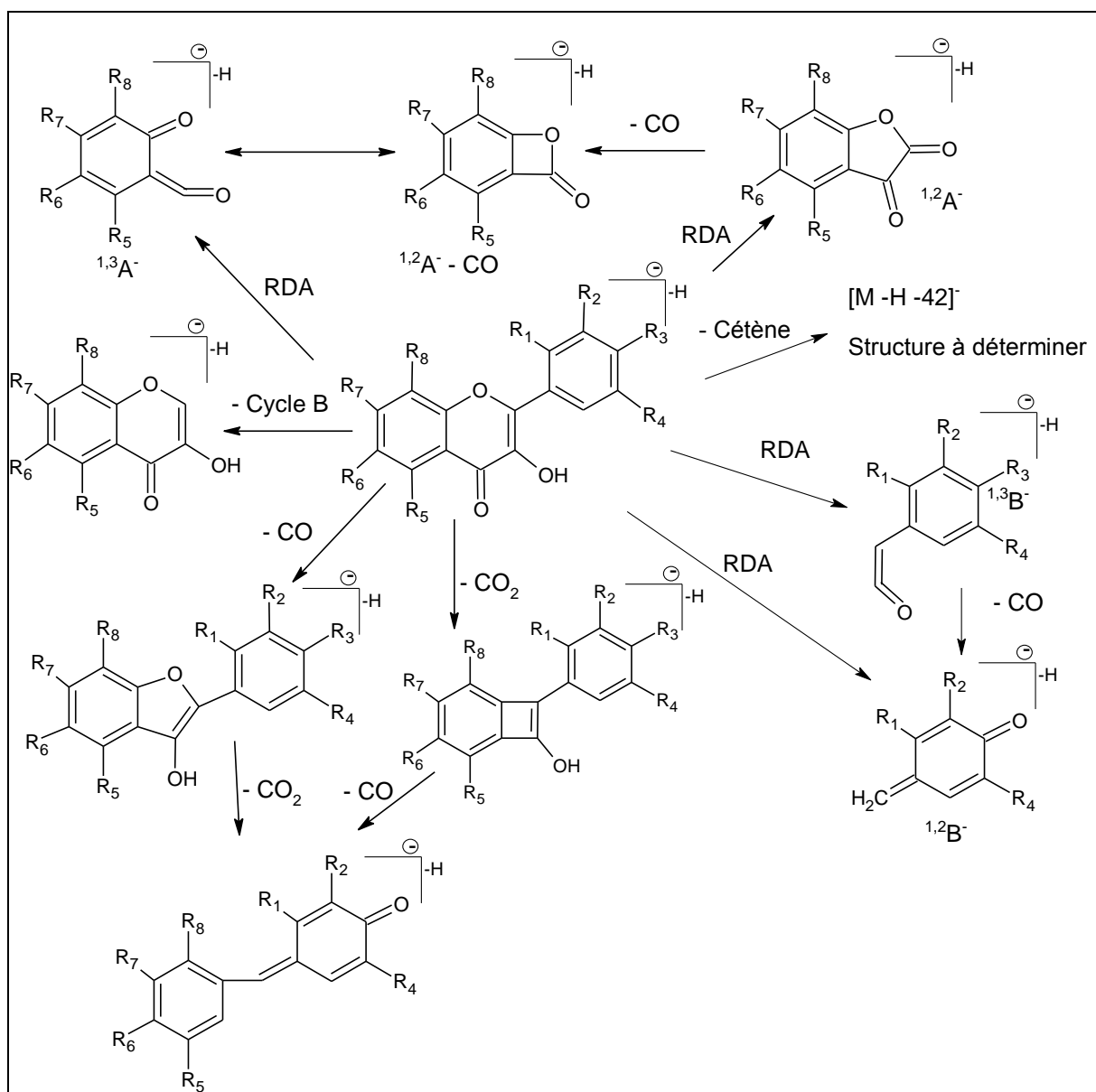


Figure 19 : Mécanismes de fragmentation des flavonols hydroxylés [Fabre et coll., 2001 ; Hughes et coll., 2001 ; Cuyckens et Claeys, 2004 ; March et Miao, 2004 ; Lewars et March, 2007 ; Lu et coll., 2010]

Parmi les flavonols hydroxylés étudiés, trois molécules **1**, **2** et **3** sont particulièrement difficiles à fragmenter par SM/SM-ESI (mode négatif) puisqu'elles présentent des spectres de masse avec un pic de base correspondant à l'ion quasi-moléculaire  $[M - H]^-$  et des ions fragments de faible intensité. Leur cycle B est dépourvu de fonction (galangine **1**) ou mono-hydroxylé en 4' (kaempférol **2** et herbacétine **3**). Aussi, nous constatons que les fragments issus de réarrangement RDA (ions  $^{1,3}A^-$  et dérivés) sont également observés en faible intensité sur les spectres de masse des composés monohydroxylés [Justesen, 2000]. Les principales fragmentations sont reprises dans le tableau 1.

Pour ce qui est des flavonols poly-hydroxylés sur le cycle B, nous notons que les ions issus de mécanismes RDA (impliquant les liaisons 1 et 2 du cycle C) sont particulièrement intenses. A titre d'exemple, nous avons constaté que les mécanismes correspondant à la perte de petites molécules neutres (CO et CO<sub>2</sub>) à partir de l'ion quasi-moléculaire  $[M - H]^-$  ne sont pas favorisés dans le cas de la quercétine **4** (ions à  $m/z$  273 et  $m/z$  229, respectivement). A l'inverse, les ions à  $m/z$  151 sont pic de base des spectres ; ils correspondent aux ions  $[^{1,3}A^-]$  et/ou  $[^{1,2}A^- - CO]$  issus de fragmentations de type RDA. Par perte de CO<sub>2</sub>, ces derniers conduisent aux ions à  $m/z$  107 observés en forte abondance sur le spectre de masse de la quercétine **4** (tableau 1). Nous remarquons également la présence d'ions relativement intenses à  $m/z$  121 correspondant aux fragments  $[^{1,3}B^- - CO]$  issus également de mécanismes RDA. De façon analogue, les spectres de masse de la myricétine **5**, de la gossypétine **6** et de la quercétagétine **7** présentent tous des pics de base ( $m/z$  179,  $m/z$  167 et  $m/z$  123, respectivement) correspondant à des ions impliquant le cycle A (mécanismes de type RDA). La robinétine **8** est le seul composé mono-hydroxylé sur le cycle A ; ainsi, son spectre de masse se singularise par un pic de base  $[^{1,3}B^- - CO]$  à  $m/z$  137. Enfin, les spectres de masse de la datiscétine **9** et de la morine **10** se différencient de ceux des autres composés hydroxylés par un pic de base correspondant aux ions  $^{1,3}B^-$  ( $m/z$  133 et  $m/z$  179, respectivement). Cette particularité peut s'expliquer par la présence d'un groupement hydroxyle en 2' sur le cycle B de ces constituants.

La littérature (figure 19) décrit, également, des ions correspondant aux mécanismes de perte d'un cétène  $[M - H - \text{cétène}]^-$ , d'une molécule d'eau  $[M - H - H_2O]^-$  ou du cycle B  $[M - H - \text{Cycle B}]^-$  à partir de l'ion quasi-moléculaire ; toutefois, ces fragments sont absents ou faiblement représentés sur les spectres de masse des composés étudiés.



Tableau 1 : Récapitulatif des ions ( $m/z$ ) observés pour les flavonols hydroxylés en mode ESI négatif

Ions fragments	Galangine	Kaempférol	Herbacétine	Quercétine	Myricétine	Gossypétine	Quercétagétine	Robinéine	Datiscétine	Morine
[M - H] <sup>-</sup>	<b>269 (100)</b>	<b>285 (100)</b>	<b>301 (100)</b>	301 (15)	317 (29)	317 (20)	317 (45)	301 (10)	285 (35)	301 (20)
[M - H - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	225 (5)	-	257 (1)	-	273 (2)	273 (5)	273 (1)	257 (1)	-	257 (6)
[M - H - CO - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	197 (20)	213 (8)	229 (17)	229 (4)	-	245 (16)	245 (1)	229 (2)	213 (6)	229 (15)
[M - H - cétène] <sup>-</sup>	227 (15)	243 (4)	-	-	-	-	-	-	-	-
[M - H - CO] <sup>-</sup>	211 (50)	-	-	273 (5)	289 (18)	289 (2)	289 (1)	273 (2)	257 (1)	273 (10)
[M - H - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	-	267 (2)	283 (6)	-	299 (3)	299 (11)	299 (4)	283 (3)	267 (10)	283 (13)
<sup>1,2</sup> A <sup>-</sup>	179 (4)	-	195 (2)	179 (15)	<b>179 (100)</b>	195 (33)	195 (1)	163 (12)	179 (3)	-
<sup>1,2</sup> A <sup>-</sup> - CO / <sup>1,3</sup> A <sup>-</sup>	151 (4)	151 (5)	167 (7)	<b>151 (100)</b>	151 (35)	<b>167 (100)</b>	167 (33)	135 (65)	151 (35)	151 (70)
<sup>1,2</sup> A <sup>-</sup> - CO - CO <sub>2</sub> / <sup>1,3</sup> A <sup>-</sup> - CO <sub>2</sub>	107 (5)	107 (3)	123 (5)	107 (65)	107 (9)	123 (25)	<b>123 (100)</b>	91 (23)	107 (12)	107 (45)
<sup>1,3</sup> B <sup>-</sup>	117 (15)	133 (8)	133 (10)	149 (10)	165 (8)	149 (18)	149 (11)	165 (15)	<b>133 (100)</b>	<b>149 (100)</b>
<sup>1,3</sup> B <sup>-</sup> - CO	-	-	-	121 (65)	137 (35)	121 (25)	121 (19)	<b>137 (100)</b>	-	121 (10)
[M - H - Cycle B] <sup>-</sup>	-	-	-	193 (2)	-	-	209 (2)	-	-	193 (2)

Les ions en gras correspondent au pic de base.

L'abondance relative (%) de chaque ion est indiquée entre parenthèse.

b) *Les flavonols méthoxylés*

D'après Fabre et coll. [2001] et Cuykens et Claeys [2004], la principale fragmentation des flavonols méthoxylés est la perte d'un ou plusieurs radicaux méthyle ( $\text{CH}_3^\bullet$ ) à partir des ions quasi-moléculaires  $[\text{M} - \text{H}]^-$  (figure 20). L'ion  $[\text{M} - \text{H} - \text{CH}_3]^-$  formé correspond généralement au pic de base du spectre de masse. Comme dans le cas des flavonols hydroxylés, la perte de molécules neutres de faibles poids moléculaires ( $\text{CO}$  et  $\text{CO}_2$ ) par contraction du cycle C est également rapportée dans la littérature [Fabre et coll., 2001 ; Lewars et March, 2007 ; Zhao et coll., 2007] ; elle est favorisée par la présence d'un groupement hydroxyle sur le cycle C. Ici encore, les fragmentations les plus caractéristiques sont issues d'un mécanisme de réarrangement de type Retro Diels Alder (RDA) entre les liaisons 1 et 3 du cycle C pour donner les ions  $^{1,3}\text{A}^-$  et  $^{1,3}\text{B}^-$  ; ces ions pouvant, à leur tour, se fragmenter par perte d'un ou plusieurs radicaux méthyle.

Pour les deux flavonols mono-méthoxylés sur le cycle B (géraldol **11** et kaempféride **12**), les fragmentations observées sont conformes aux données de la littérature ; le pic de base ( $m/z$  284) correspond à la perte d'un radical méthyle à partir de l'ion quasi-moléculaire (tableau 2). Les autres ions caractéristiques sont les fragments  $^{1,3}\text{A}^-$  et  $^{1,3}\text{B}^- - \text{CH}_3$  issus de RDA ; ils sont toutefois moins intenses que dans le cas des flavonols poly-hydroxylés non méthoxylés (**5-10**). En revanche, la perte de petites molécules neutres semble plus favorisée avec les composés méthoxylés (**11-16**) qu'avec les composés hydroxylés (**1-10**). C'est notamment le cas pour le 6-méthoxyflavonol **13**, mono-méthoxylé sur le cycle A, dont le pic de base à  $m/z$  195 correspond à un fragment issu des pertes successives de  $\text{CO}$  et de  $\text{CO}_2$ . Les autres fragments observés sur ce spectre de masse résultent exclusivement de la perte de petites molécules neutres et/ou de radical  $\text{CH}_3^\bullet$  et donc, nous ne rapportons pas de fragmentations provenant de mécanismes de type RDA pour ce composé. Des observations analogues sont faites pour les composés poly-méthoxylés (retusine **14**, casticine **15** et robinétine triméthylether **16**) ; les ions observés sur les spectres de masse de ces derniers sont principalement issus de la perte d'un ou plusieurs radicaux  $\text{CH}_3^\bullet$  ou de petites molécules neutres ( $\text{CO}$  et  $\text{CO}_2$ ). Le seul fragment résultant d'une Retro Diels-Alder présente une abondance de seulement 3% sur le spectre de la robinétine triméthylether **16**. Ainsi, les spectres de masses des composés poly-méthoxylés **14-16** présentent des mécanismes de fragmentations analogues avec des ions intenses qui correspondent aux fragments  $[\text{M} - \text{H} - 2\text{CH}_3]^-$  et  $[\text{M} - \text{H} - 2\text{CH}_3 - \text{CO}]^-$ .



Tableau 2 : Récapitulatif des ions ( $m/z$ ) observés pour les flavonols méthoxylés en mode ESI négatif

Ions fragments	Géraldol	Kaempféride	6-Méthoxyflavonol	Retusine	Casticine	Robinéine triméthyléther
[M - H] <sup>-</sup>	299 (10)	299 (12)	267 (40)	357 (37)	373 (28)	343 (6)
[M - H - CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	<b>284 (100)</b>	<b>284 (100)</b>	252 (11)	342 (15)	358 (19)	328 (20)
[M - H - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	255 (20)	255 (7)	223 (29)	-	-	299 (7)
[M - H - CO] <sup>-</sup>	-	-	239 (1)	-	-	315 (1)
[M - H - CO - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	227 (21)	227 (8)	<b>195 (100)</b>	285 (1)	301 (2)	271 (2)
[M - H - CH <sub>3</sub> - CO] <sup>-</sup>	256 (6)	256 (1)	224 (24)	314 (2)	330 (1)	300 (2)
<sup>1,2</sup> A <sup>-</sup>	-	-	-	-	-	-
<sup>1,2</sup> A <sup>-</sup> - CO / <sup>1,3</sup> A <sup>-</sup>	135 (30)	151 (15)	-	-	-	135 (3)
<sup>1,3</sup> B <sup>-</sup>	-	-	-	-	-	-
<sup>1,2</sup> A <sup>-</sup> - CO - CO <sub>2</sub> / <sup>1,3</sup> A <sup>-</sup> - CO <sub>2</sub>	91 (11)	107 (10)	-	-	-	-
<sup>1,3</sup> B <sup>-</sup> - CO	135 (30)	119 (1)	-	-	-	-
<sup>1,3</sup> B <sup>-</sup> - CH <sub>3</sub>	143 (34)	132 (6)	-	-	-	-
[M - H - 2CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	-	-	-	327 (19)	<b>343 (100)</b>	<b>313 (100)</b>
[M - H - 2CH <sub>3</sub> - CO] <sup>-</sup>	-	-	-	<b>299 (100)</b>	315 (57)	285 (48)
[M - H - 3 CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	-	-	-	312 (1)	328 (19)	270 (27)
[M - H - 3CH <sub>3</sub> - CO] <sup>-</sup>	-	-	-	284 (12)	300 (23)	-

Les ions en gras correspondent au pic de base.

L'abondance relative (%) de chaque ion est indiquée entre parenthèse.

#### IV.1.2. Les flavones

Pour les 18 flavones analysées, nous distinguons trois types de structures :

- les flavones non méthoxylées (Figure 21) : chrysrine **17**, baicaléine **18**, lutéoline **19**, apigénine **20**, scutellaréine **21** et tricétine **22** ;

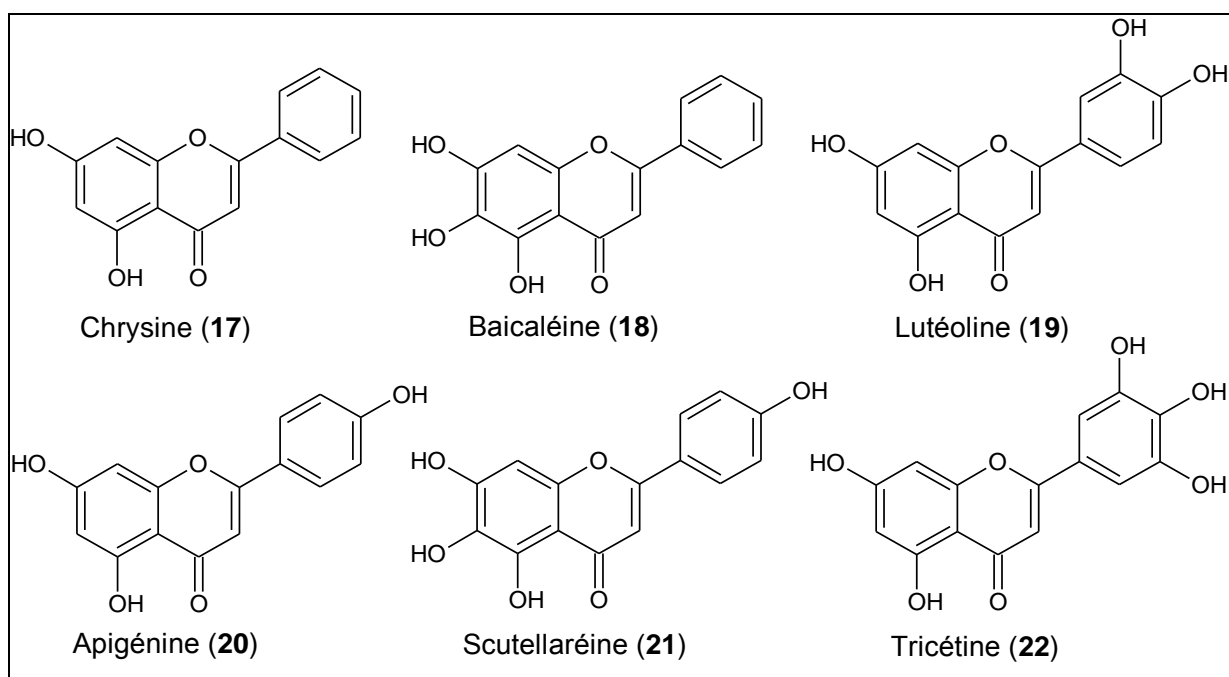


Figure 21 : Structures des flavones non méthoxylées

- les flavones méthoxylées déprotonables (Figure 22) : chrysoériol **23**, diosmétine **24**, acacétine **25**, oroxyline A **26**, wogonine **27**, eupatorine **28** et eupatorine-5-méthylether **29** ;

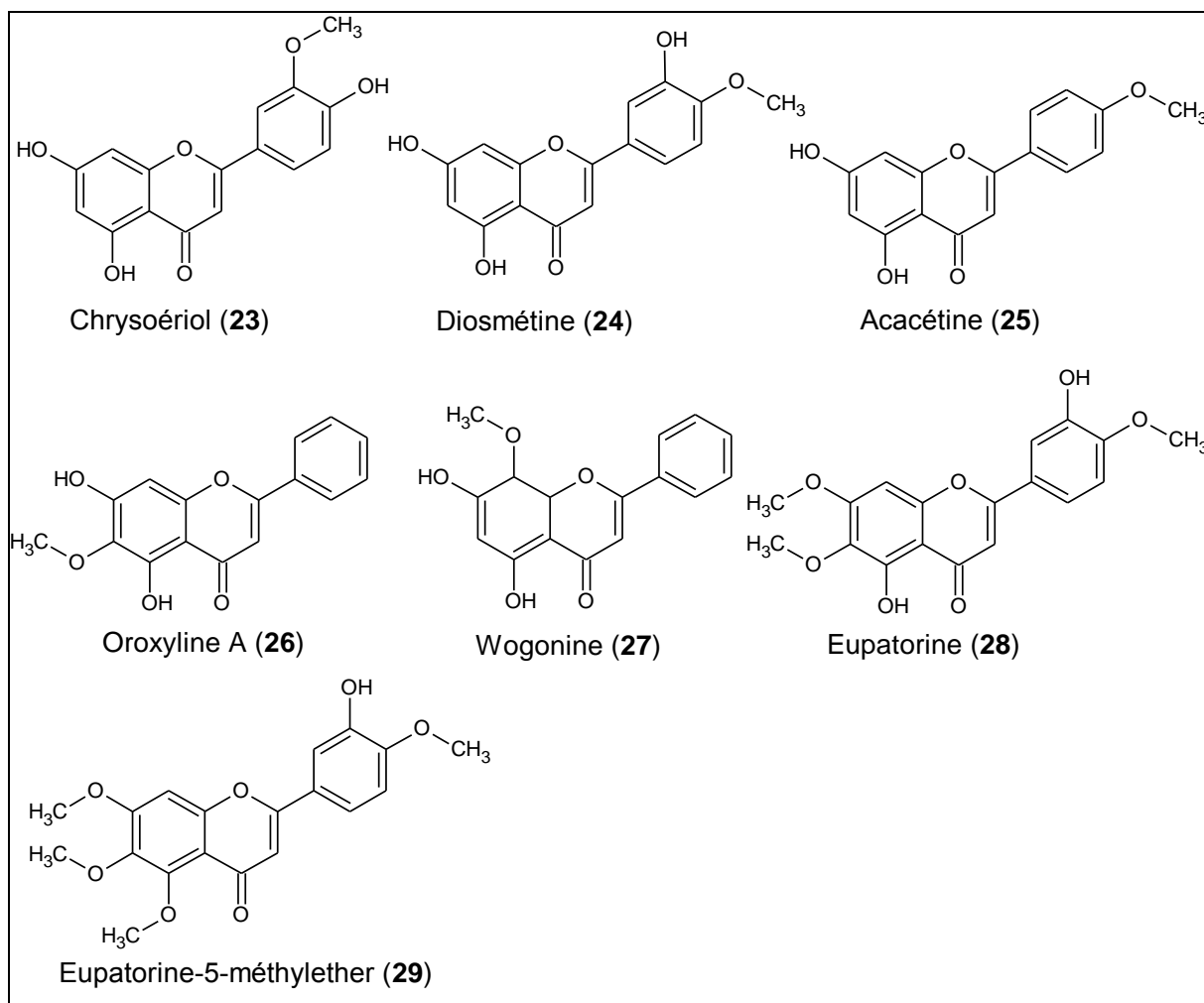


Figure 22 : Structures des flavones méthoxylées déprotonables

- les flavones méthoxylées non déprotonables (Figure 23) : sinensétine **30**, nobilétine **31**, tangerétine **32**, scutellaréine tetraméthylether **33**, 3',4'-diméthoxyflavone **34**.

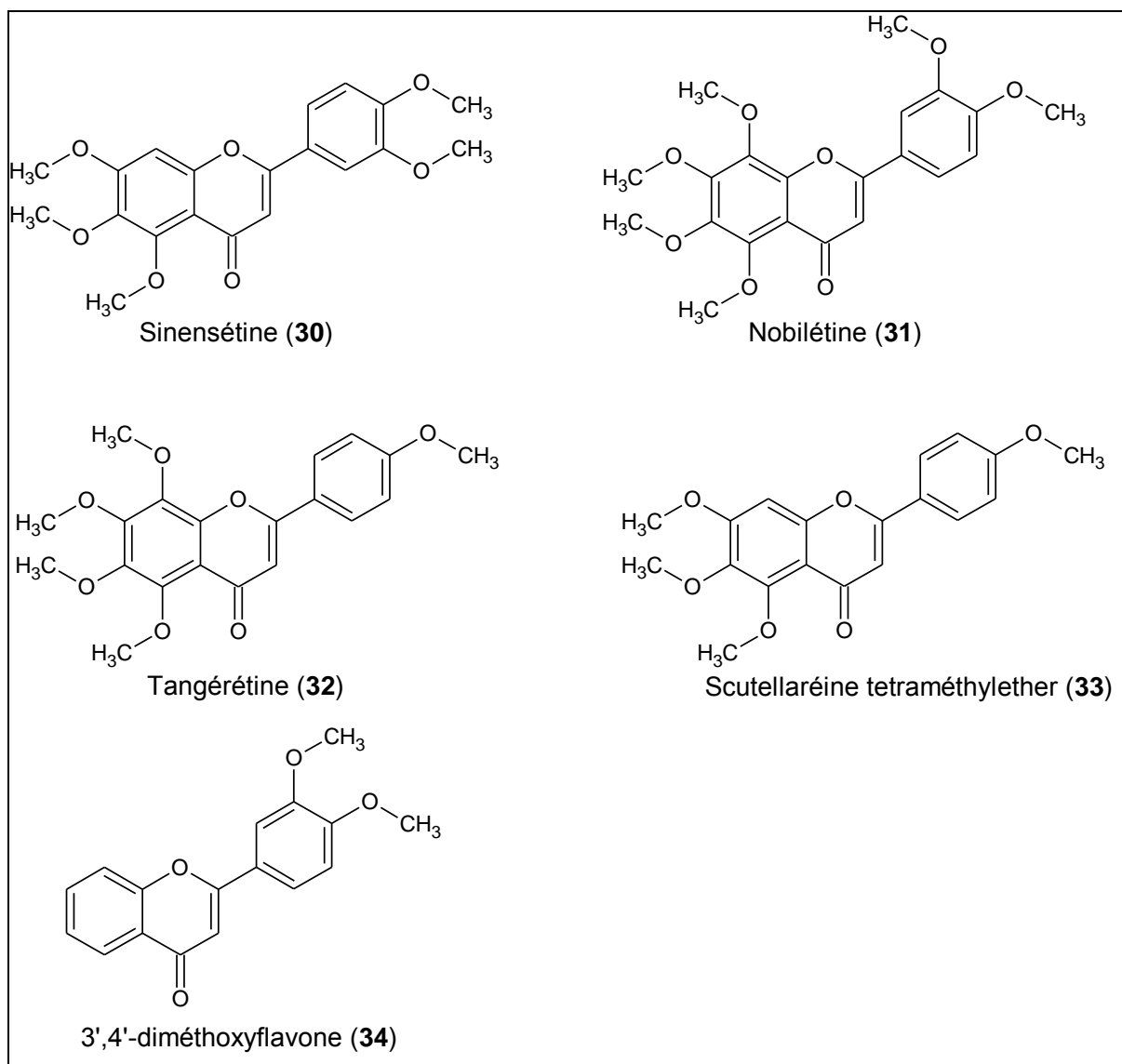


Figure 23 : Structures des flavones méthoxylées non déprotonables

a) *Les flavones non méthoxylés*

Selon Fabre et coll. [2001] et Wu et coll. [2004], les premières fragmentations des flavones non méthoxylés (figure 24) correspondent à des pertes de molécules neutres (CO et CO<sub>2</sub>) par contraction du cycle C. Les spectres de masse sont également marqués par des ions intenses correspondant à la perte de cétène (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O) ; cette perte est généralement attribuée à un réarrangement impliquant les cycles C et B. Le processus de fragmentation met en jeu le groupement hydroxyle en position 4' sur le cycle B [Ma et coll., 1997]. En effet, les fragments correspondant à la libération de cétènes sont absents des molécules non hydroxylés en 4' [Fabre et coll., 2001]. Consécutivement à la perte de cétène, une perte de CO<sub>2</sub> impliquant une contraction du cycle A est parfois observée. Il convient de souligner une fragmentation caractéristique des composés β-dihydroxylés sur le cycle A, à savoir la perte d'un fragment C<sub>3</sub>O<sub>2</sub> à partir des ions quasi-moléculaires. Cette fragmentation est généralement suivie par la perte de cétène à partir du cycle C. Nous notons également la présence des ions [M - H - H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> typiques des flavonoïdes aglycones possédant deux groupements hydroxyles vicinaux [Wu et coll., 2004]. Les fragmentations impliquant des mécanismes de type Retro Diels-Alder (RDA) conduisent aux ions <sup>1,3</sup>B<sup>-</sup> et/ou <sup>1,3</sup>A<sup>-</sup> ; ces derniers peuvent ensuite perdre une molécule de CO<sub>2</sub> [Fabre et coll., 2001].

Les spectres de masse obtenus pour les six flavones non méthoxylés (**17-22**) (tableau 3) sont en accord avec ceux décrits dans la littérature. Les ions [M - H]<sup>-</sup>, [M - H - CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, [M - H - CO - CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> et <sup>1,3</sup>A<sup>-</sup> sont toujours observés. La chryisine **17** et la baicaléine **18** ont un pic de base correspondant à l'ion quasi-moléculaire [M - H]<sup>-</sup> qui semble être stabilisé par l'absence de groupement hydroxyle sur le cycle B. La présence d'un ou plusieurs groupements hydroxyles sur le cycle B semble favoriser les mécanismes de RDA ; les quatre autres molécules (lutéoline **19**, apigénine **20**, scutellaréine **21** et tricétine **22**) ont un pic de base de type <sup>1,3</sup>B<sup>-</sup> (ions à *m/z* 133, 117, 117 et 149, respectivement). En outre, les spectres de masse des six composés **17-22** présentent les ions [M - H - C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> issus de la perte de cétène ; celle-ci est généralement suivie par la perte d'une molécule de CO<sub>2</sub> conduisant aux ions [M - H - C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O - CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>. Enfin, les 4 constituants (chryisine **17**, lutéoline **19**, apigénine **20**, et tricétine **22**) ayant une configuration β-dihydroxylés sur le cycle A présentent des ions caractéristiques [M - H - C<sub>3</sub>O<sub>2</sub> - C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> correspondant à la perte du fragment C<sub>3</sub>O<sub>2</sub> suivi de celle de cétène à partir des ions quasi-moléculaires. Ces fragments ne sont pas observés sur



les spectres de masse des composés tri-hydroxylés sur le cycle A : baicaléine **18** et scutellaréine **21**.

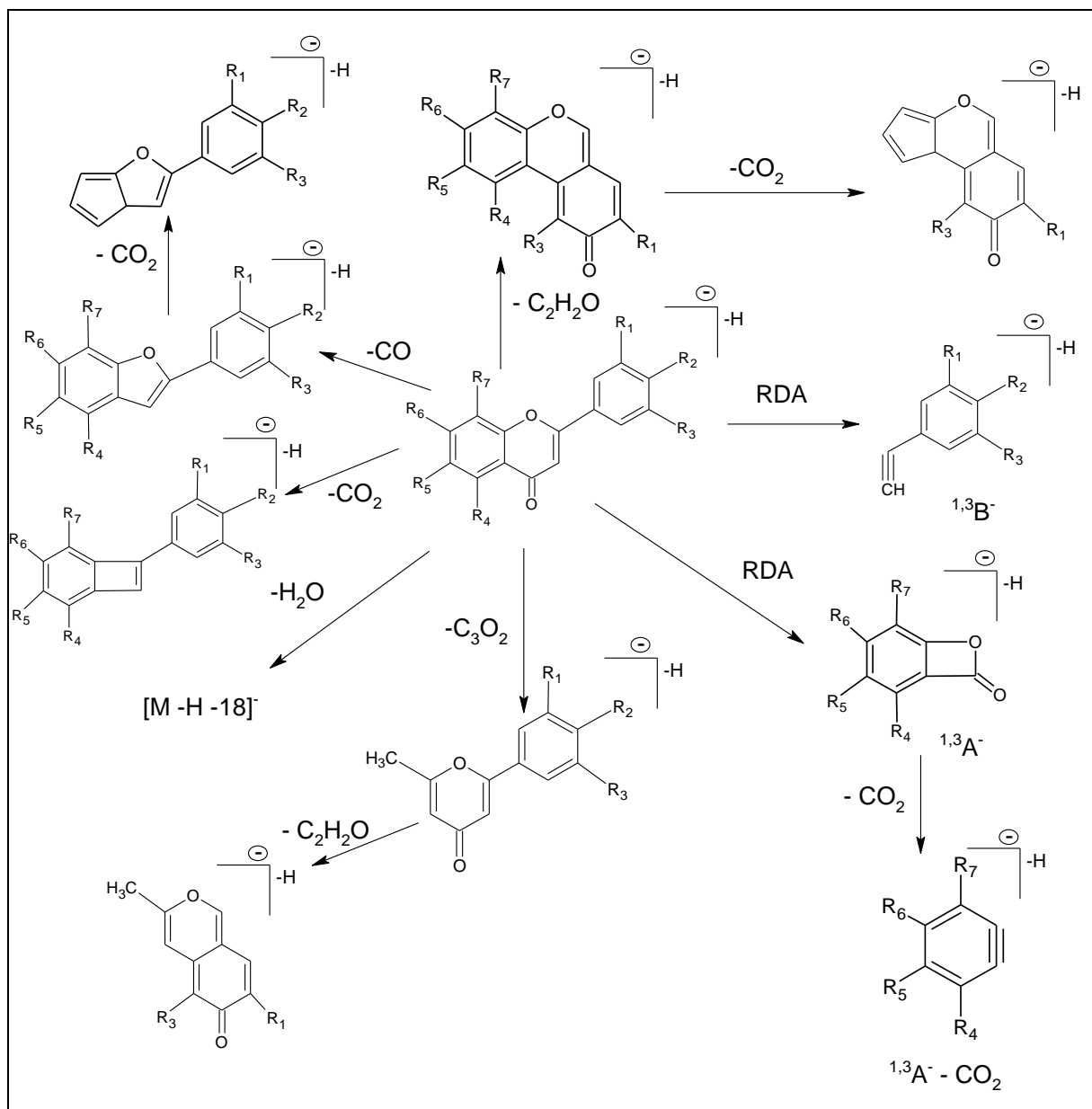


Figure 24 : Mécanismes de fragmentation des flavones non méthoxylés

Tableau 3 : Récapitulatif des ions ( $m/z$ ) observés pour les flavones non méthoxylées en mode ESI négatif

Ions fragments	Chryisine	Baicaléine	Lutéoline	Apigénine	Tricétine	Scutellaréine
[M - H] <sup>-</sup>	<b>253 (100)</b>	<b>269 (100)</b>	285 (7)	269 (15)	301 (87)	285 (60)
[M - H - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	-	251 (7)	267 (5)	-	283 (4)	267 (12)
[M - H - CO] <sup>-</sup>	225 (4)	241 (15)	257 (4)	-	273 (3)	257 (6)
[M - H - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	209 (19)	225 (3)	241 (8)	225 (6)	257 (4)	241 (6)
[M - H - CO - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	181 (10)	197 (12)	213 (8)	197 (3)	229 (4)	213 (10)
[M - H - C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	211 (6)	-	243 (1)	227 (8)	259 (3)	243 (2)
[M - H - C <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	-	-	-	201 (4)	233 (6)	217 (2)
[M - H - C <sub>3</sub> O <sub>2</sub> - C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	143 (31)	-	175 (5)	159 (8)	191 (17)	-
[M - H - C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	-	183 (1)	199 (3)	183 (5)	215 (12)	199 (4)
<sup>1,3</sup> A <sup>-</sup>	151 (5)	167 (16)	151 (6)	151 (10)	151 (20)	167 (16)
<sup>1,3</sup> A <sup>-</sup> - CO <sub>2</sub>	-	123 (3)	107 (7)	107 (9)	107 (7)	123 (5)
<sup>1,3</sup> B <sup>-</sup>	101 (5)	-	<b>133 (100)</b>	<b>117 (100)</b>	<b>149 (100)</b>	<b>117 (100)</b>

Les ions en gras correspondent au pic de base.

L'abondance relative (%) de chaque ion est indiquée entre parenthèse.

#### b) Les flavones méthoxylées déprotonables

Les flavones méthoxylées déprotonables conduisent préférentiellement à une fragmentation correspondant à la perte d'un radical CH<sub>3</sub><sup>•</sup> à partir des ions quasi-moléculaires déprotonés [M - H - CH<sub>3</sub>]<sup>-</sup> (figure 25) [Justesen, 2001]. En général, la perte d'un radical méthyle à partir d'un anion (flavone déprotonée) est caractéristique de ces molécules car l'obtention d'ion à nombre pair d'électrons est énergétiquement défavorisée en spectrométrie de masse [Elgamal et coll., 1986 ; Berahia et coll., 1994 ; Stevens et coll., 1999 ; Huck et coll., 2000]. Les ions [M - H - CH<sub>3</sub>]<sup>-</sup> sont souvent pics de base des spectres de masse des flavones méthoxylées sur les cycles A et/ou B [Justesen, 2000]. Les analyses réalisées en SM<sup>3</sup> ont permis de proposer des fragmentations pour ces ions ; il a été distingué deux types de fragments : - les ions résultant de la perte de petites molécules neutres (CO) [Justesen, 2001 ; Wu et coll., 2004] ou de radicaux (CHO<sup>•</sup>) [Berahia et coll., 1994 ; Justesen, 2001 ; Wu et coll., 2004] ; - les ions résultant de réarrangements de type Retro Diels-Alder (<sup>1,3</sup>A<sup>-</sup>, <sup>1,4</sup>A<sup>-</sup>, <sup>1,3</sup>A<sup>-</sup> - CO<sub>2</sub>) [Fabre et coll., 2001 ; Justesen, 2001 ; Wu et coll., 2004].



Tableau 4 : Récapitulatif des ions ( $m/z$ ) observés pour les flavones méthoxylées déprotonables en mode ESI négatif

Ions fragments	Chrysoériol	Diosmétine	Acacétine	Oroxyline A	Wogonine	Eupatorine	Eupatorine-5-méthylether
[M - H] <sup>-</sup>	299 (30)	299 (12)	283 (14)	283 (28)	283 (14)	343 (20)	357 (20)
[M - H - CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	<b>284 (100)</b>	<b>284 (100)</b>	<b>268 (100)</b>	<b>268 (100)</b>	<b>268 (100)</b>	<b>328 (100)</b>	<b>342 (100)</b>
[M - H - CH <sub>3</sub> - CO] <sup>-</sup>	256 (20)	256 (7)	240 (5)	240 (4)	240 (3)	299 (1)	-
[M - H - CH <sub>3</sub> - CHO] <sup>-</sup>	255 (3)	255 (4)	239 (5)	239 (7)	239 (6)	299 (1)	-
[M - H - CH <sub>3</sub> - CO - CHO] <sup>-</sup>	227 (6)	227 (6)	211 (7)	211 (5)	211 (3)	-	-
<sup>1,3</sup> A <sup>-</sup>	151 (5)	151 (6)	151 (6)	-	-	-	-
<sup>1,3</sup> A <sup>-</sup> - CO <sub>2</sub>	107 (2)	107 (3)	107 (5)	-	-	-	-
<sup>1,3</sup> A <sup>-</sup> - CH <sub>3</sub>	-	-	-	166 (6)	166 (4)	-	-
<sup>1,4</sup> A <sup>-</sup>	-	-	-	-	-	-	-
[M - H - 2CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	-	-	-	-	-	313 (53)	327 (46)
[M - H - 2CH <sub>3</sub> - CO] <sup>-</sup>	-	-	-	-	-	285 (14)	299 (12)
[M - H - 3CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	-	-	-	-	-	298 (21)	312 (28)
[M - H - 3CH <sub>3</sub> - CO] <sup>-</sup>	-	-	-	-	-	270 (8)	264 (6)
[M - H - 4CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	-	-	-	-	-	-	297 (14)
[M - H - 4CH <sub>3</sub> - CO] <sup>-</sup>	-	-	-	-	-	-	269 (5)

Les ions en gras correspondent au pic de base.

L'abondance relative (%) de chaque ion est indiquée entre parenthèse.

c) *Les flavones méthoxylées non déprotonables*

La bibliographie relative aux flavones polyméthoxylées non déprotonables rapporte uniquement les spectres de masse en mode positif [Elgamal et coll., 1986 ; Berahia et coll., 1994 ; Stevens et coll., 1999 ; Huck et coll., 2000 ; Justesen, 2000, 2001 ]. Les principaux chemins de fragmentation des ions quasi-moléculaires  $[M + H]^+$  sont représentés à la figure 26. Il s'agit notamment de : - la dissociation des flavones protonées via la perte d'un ou plusieurs radicaux méthyle conduisant aux cations de type  $[M + H - CH_3]^+$ ,  $[M + H - 2CH_3]^+$  ; - l'élimination de différentes molécules neutres tels que  $CH_4$ ,  $CO$ ,  $CO_2$  et  $H_2O$  conduisant aux ions  $[M + H - CH_4]^+$ ;  $[M + H - H_2O - CH_3]^+$  ;  $[M + H - CO_2]^+$ , etc. Par ailleurs, la littérature souligne également l'absence de fragments issus de réaction de Retro Diels-Alder. En outre, Wang et Zhang. [2009] rapportent une fragmentation caractéristique des composés polyméthoxylés sur le cycle B (généralement di-méthoxylés en 3', 4') ; il s'agit de la perte d'une molécule de méthane à partir des molécules protonées. Les auteurs indiquent également que la formation de l'ion  $[M + H - CO - H_2O - CH_3]^+$  est liée à la présence combinée de groupements méthoxy en position 5 et 6 (ou 6 et 7) sur le cycle A. Enfin, ces récents travaux établissent des mécanismes de fragmentation plus « réalistes » (Figure 27) que ceux rapportés initialement par Zhou et coll. [2007] et Del Rio et coll. [1998] à savoir la formation de tri- et tétra-radicaux (Figure 26).

Parmi les cinq composés étudiés, quatre flavones polyméthoxylées non déprotonables (sinensétine **30**, nobilétine **31**, tangérétine **32** et scutellaréine tetraméthylether **33**) ont un pic de base correspondant à la perte de deux radicaux méthyle  $[M + H - 2CH_3]^+$  sur les spectres obtenus en mode positif (tableau 5). Comme indiqué précédemment, les autres fragments observés correspondent aux molécules protonées et aux pertes de petites molécules neutres. Parmi les plus intenses, nous pouvons citer les ions  $[M + H - CH_3]^+$ ,  $[M + H - CO - H_2O - CH_3]^+$ ,  $[M + H - CO_2]^+$  et  $[M + H - CO - H_2O]^+$ . Il apparaît, également, que ces fragments sont plus favorisés pour les composés tri-méthoxylés sur le cycle A (sinensétine **30** et scutellaréine tetraméthylether **33**) que pour les composés tétra-méthoxylés (nobilétine **31** et tangérétine **32**). La structure de la 3',4'-diméthoxyflavone (**34**) diffère de celles des quatre autres flavones méthoxylées **29-32** puisqu'elle ne possède aucune fonction sur le cycle A. Cette particularité conduit à l'observation d'un pic de base correspondant au fragment  $[M + H - CH_4]^+$  (ion à  $m/z$  267).

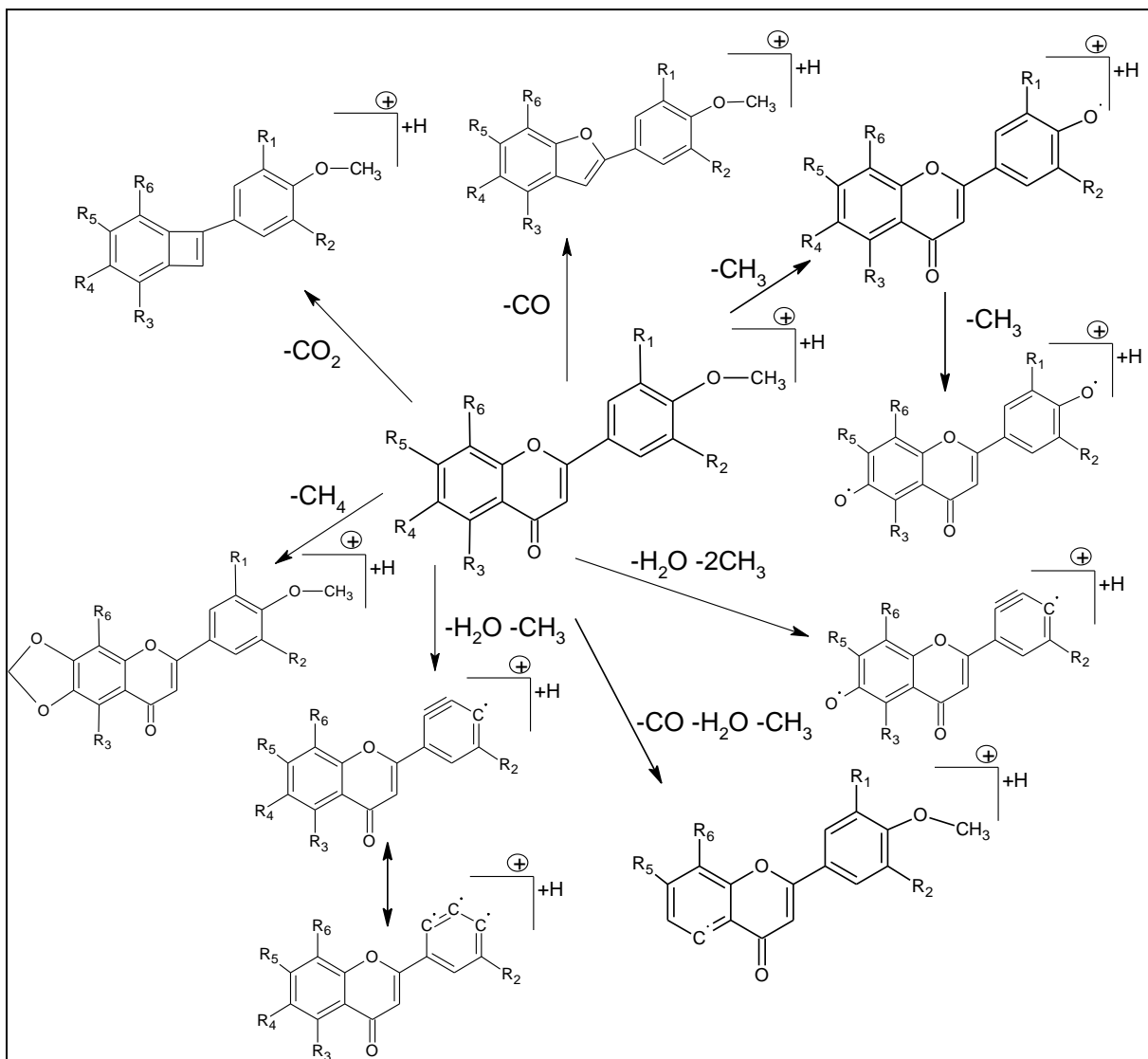


Figure 26 : Mécanismes de fragmentation des flavones méthoxylées non déprotonables [Del Rio et coll., 1998 ; Zhou et coll., 2007]

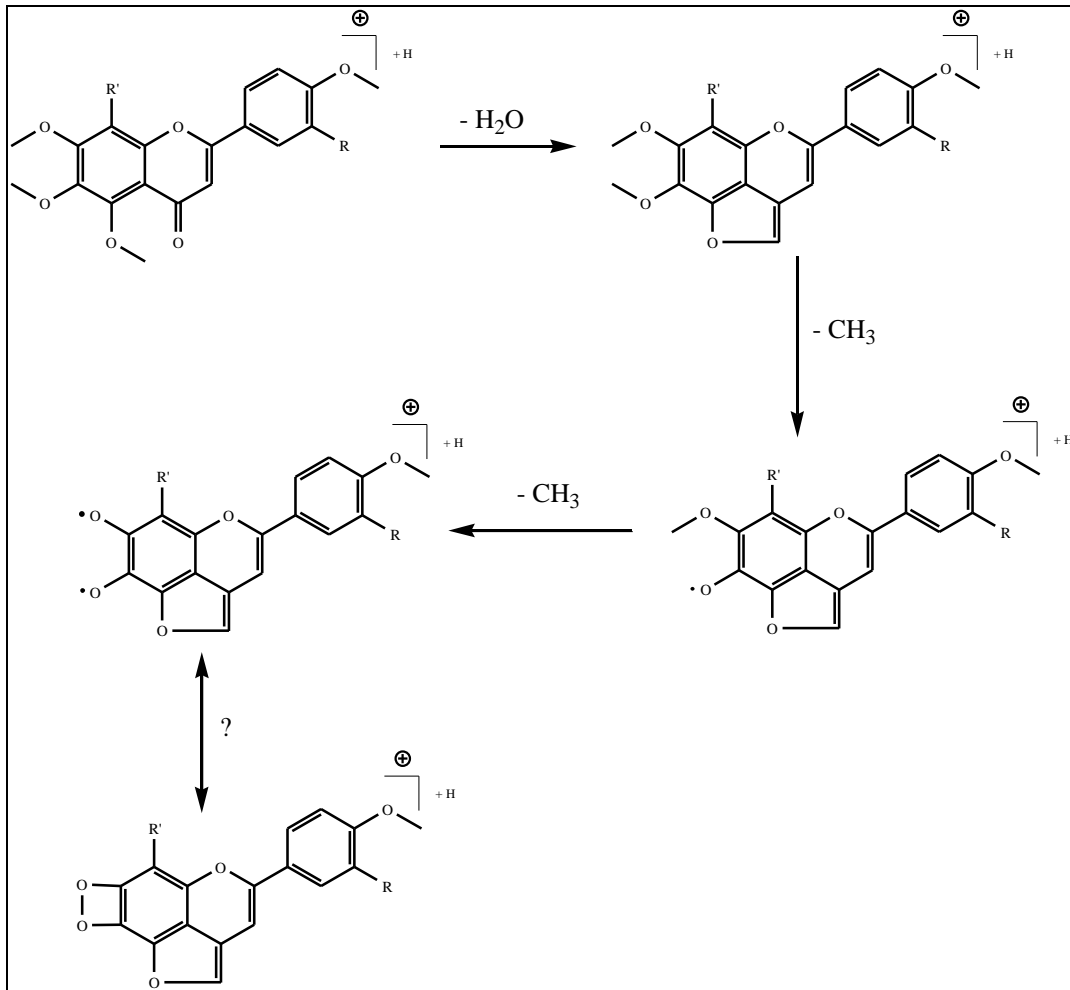


Figure 27 : Mécanisme de fragmentation des flavones méthoxylées non déprotonables proposé par Wang et Zhang [2009]

Tableau 5 : Récapitulatif des ions ( $m/z$ ) observés pour les flavones méthoxylées non déprotonables en mode ESI positif

Ions fragments	Sinensétine	Nobilétine	Tangérétine	Scutellaréine tetraméthylether	3',4'-diméthoxyflavone
$[M + H]^+$	373 (50)	403 (30)	373 (19)	343 (20)	283 (15)
$[M + H - H_2O]^+$	-	-	-	325 (46)	265 (10)
$[M + H - CH_3]^+$	358 (15)	388 (15)	358 (18)	328 (15)	268 (10)
$[M + H - 2CH_3]^+$	<b>343 (100)</b>	<b>373 (100)</b>	<b>343 (100)</b>	<b>313 (100)</b>	253 (1)
$[M + H - CO_2]^+$	329 (45)	359 (4)	329 (3)	299 (54)	-
$[M + H - CO]^+$	-	-	-	-	-
$[M + H - CH_4]^+$	357 (38)	387 (3)	357 (2)	327 (35)	<b>267 (100)</b>
$[M + H - H_2O - CH_3]^+$	340 (16)	-	-	310 (16)	-
$[M + H - CO - H_2O - CH_3]^+$	312 (54)	342 (3)	312 (4)	282 (60)	222 (15)
$[M + H - H_2O - 2CH_3]^+$	325 (10)	355 (14)	325 (15)	295 (2)	-
$[M + H - 3CH_3]^+$	328 (10)	358 (15)	328 (19)	-	-
$[M + H - CO - H_2O]^+$	327 (35)	357 (7)	327 (4)	297 (17)	-

Les ions en gras correspondent au pic de base.

L'abondance relative (%) de chaque ion est indiquée entre parenthèse.



### IV.1.3. Les isoflavones

Les isoflavones analysées sont au nombre de quatre (figure 28) :

- une isoflavone non méthoxylée : daidzéine **35** ;
- trois isoflavones méthoxylées : glycitéine **36**, prunétine **37** et biochanine A **38**.

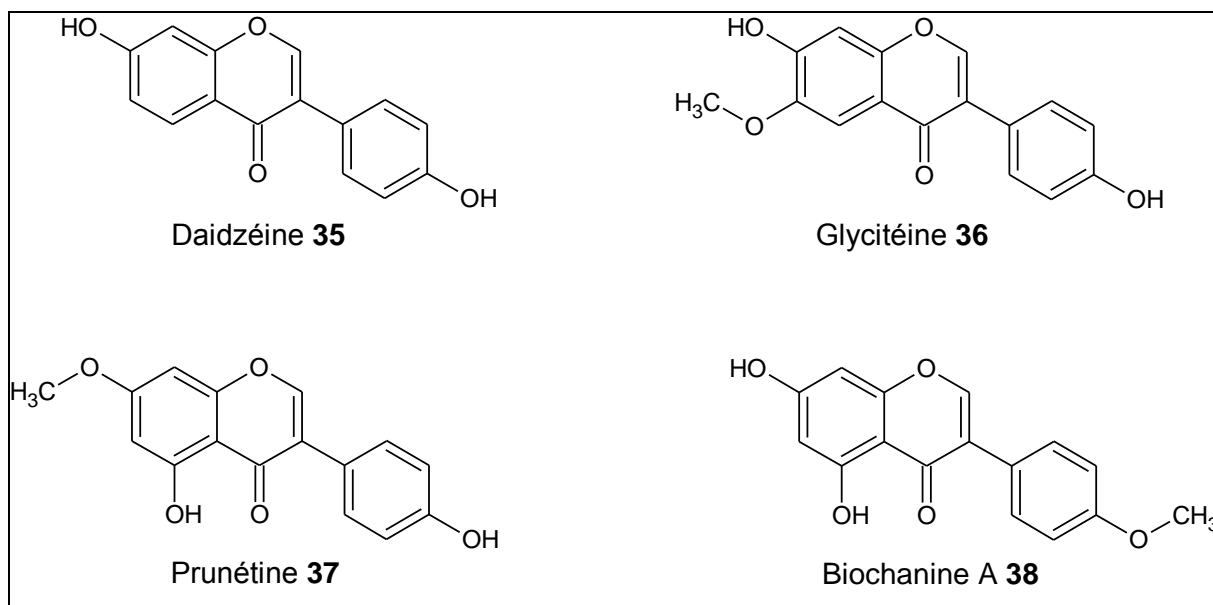


Figure 28 : Structure des isoflavones étudiées

Les isoflavones méthoxylées vont perdre préférentiellement un radical méthyle pour donner l'ion  $[M - H - CH_3]^-$  qui généralement correspond au pic de base du spectre. Ensuite les isoflavones, qu'elles soient méthoxylées ou non, suivent les mêmes chemins de fragmentation (figure 29). Ces composés perdent un radical formyle  $CHO^\bullet$  [Fabre et coll., 2001 ; Klejdus et coll., 2001 ; March et coll., 2004]. Il s'agit d'une fragmentation remarquable car cette perte n'est décrite dans la littérature que dans le cas des flavones méthoxylés déprotonables. Le fragment obtenu peut subir deux pertes successives de CO. En revanche la littérature ne rapporte pas de perte de petites molécules neutres (CO et CO<sub>2</sub>). Ce constat résulte directement de la structure des isoflavones pour qui le cycle B est en position 3 du cycle C (et non en position 2 comme pour les autres flavonoïdes). Enfin, la littérature montre que les isoflavones se fragmentent également via des réactions de Retro Diels-Alder. Les fragments observés sont issus de rupture de type  $^{0,3}B^-$ ,  $^{0,4}B^-$ ,  $^{1,3}B^-$  et  $^{1,3}A^-$ .

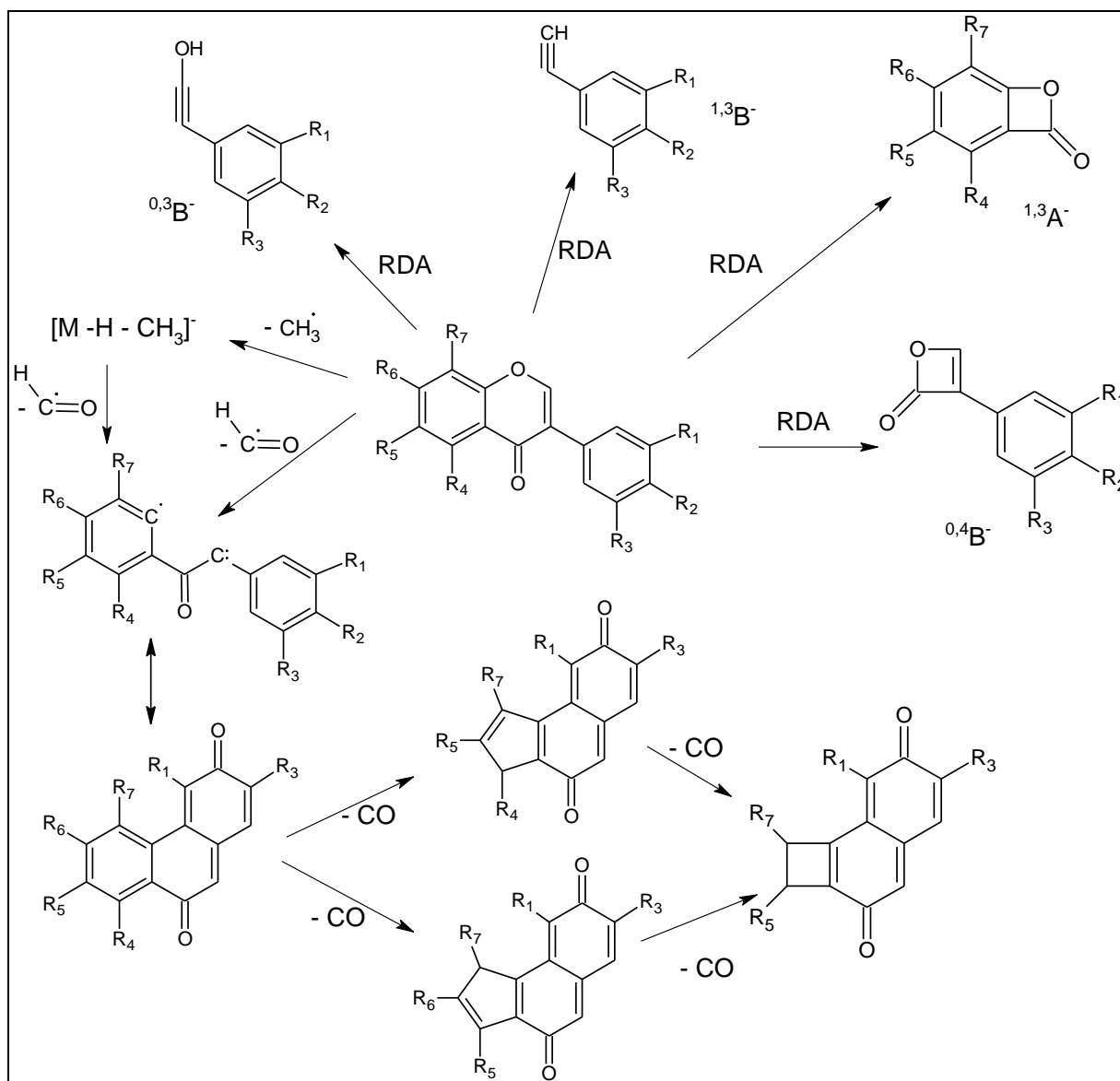


Figure 29 : Mécanismes de fragmentation des isoflavones

Les analyses réalisées au laboratoire (tableau 6) sont en accord avec les données de la littérature. Nous constatons que les fragmentations de la daidzéine **35** (isoflavone non méthoxylée) se démarquent de celles des isoflavones méthoxylées **36-38**. Il apparaît également que la daidzéine **35** est une molécule difficile à fragmenter comme en témoigne son pic de base qui correspond à l'ion quasi-moléculaire. Les fragments obtenus à partir de ce dernier sont de nature variée puisque nous observons des fragments issus : - de réactions de type Retro Diels-Alder ( $^{1,3}A^-$ ,  $^{1,3}B^-$  et  $^{0,3}B^-$ ) ; - la perte du radical CHO ; - et enfin, la perte de petites molécules neutres conduisant à  $[M - H - CO_2]^-$ ,  $[M - H - CO]^-$  et  $[M - H - CO - CO_2]^-$ . Ces petites molécules neutres ne sont pas rapportées dans la littérature. Concernant les trois

isoflavones méthoxylées **36-38**, nous constatons que l'ion  $[M - H - CH_3]^-$  correspond à chaque fois au pic de base. Nous remarquons également que la glycitéine **36** et la prunétine **37** ont des spectres de masse analogues se différenciant uniquement par l'abondance des ions (exemple des ions à  $m/z$  240 et 239). La biochanine A **38** méthoxylée sur le cycle B se démarque des deux composés précédents méthoxylés sur le cycle A par la présence d'un fragment  $[M - H - CO_2]^-$  relativement intense (35%). Cet ion - observé également sur le spectre de masse de la daidzéine **35** - semble caractéristique des isoflavones non-méthoxylés sur le cycle A.

Tableau 6 : Récapitulatif des ions ( $m/z$ ) observés pour les isoflavones en mode ESI négatif

Ions fragments	Daidzéine	Glycitéine	Prunétine	Biochanine A
$[M - H]^-$	<b>253 (100)</b>	283 (35)	283 (33)	283 (30)
$[M - H - CH_3]^-$	-	<b>268 (100)</b>	<b>268 (100)</b>	<b>268 (100)</b>
$[M - H - CO_2]^-$	209 (39)	-	-	239 (35)
$[M - H - CO]^-$	225 (27)	-	-	-
$[M - H - CO - CO_2]^-$	181 (10)	-	-	-
$[M - H - CH_3 - CO]^-$	-	240 (44)	240 (8)	240 (13)
$[M - H - CH_3 - CO_2 - CO]^-$	-	196 (7)	196 (2)	196 (5)
$[M - H - CHO]^-$	224 (65)	-	-	-
$[M - H - CHO - CO]^-$	196 (32)	-	-	-
$[M - H - CHO - 2CO]^-$	-	-	-	-
$[M - H - CH_3 - CHO]^-$	-	239 (4)	239 (15)	239 (35)
$[M - H - CH_3 - CHO - CO]^-$	-	211 (4)	211 (7)	211 (26)
$^{1,3}A^-$	135 (30)	-	-	151 (1)
$^{1,3}B^-$	117 (14)	-	-	-
$^{1,3}A^- - CO_2$	91 (49)	-	-	-
$^{0,3}B^-$	133 (60)	-	-	-
$^{0,3}B^- - CH_3$	-	-	-	132 (15)
$^{0,4}B^-$	-	-	-	-

Les ions en gras correspondent au pic de base.

L'abondance relative (%) de chaque ion est indiquée entre parenthèse.

#### IV.1.4. Les flavan-3-ols

Nous avons étudié les mécanismes de fragmentation de trois flavan-3-ols : catéchine **39**, épicatechine **40** et épigallocatechine **41** (Figure 30).

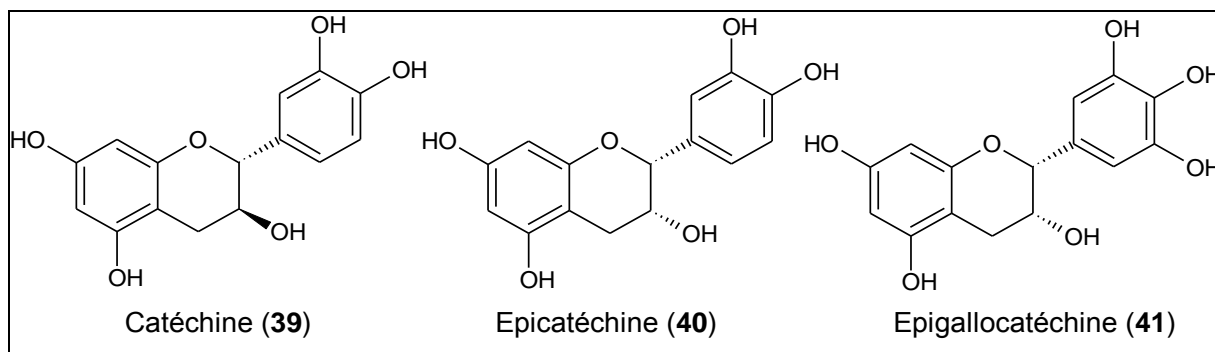
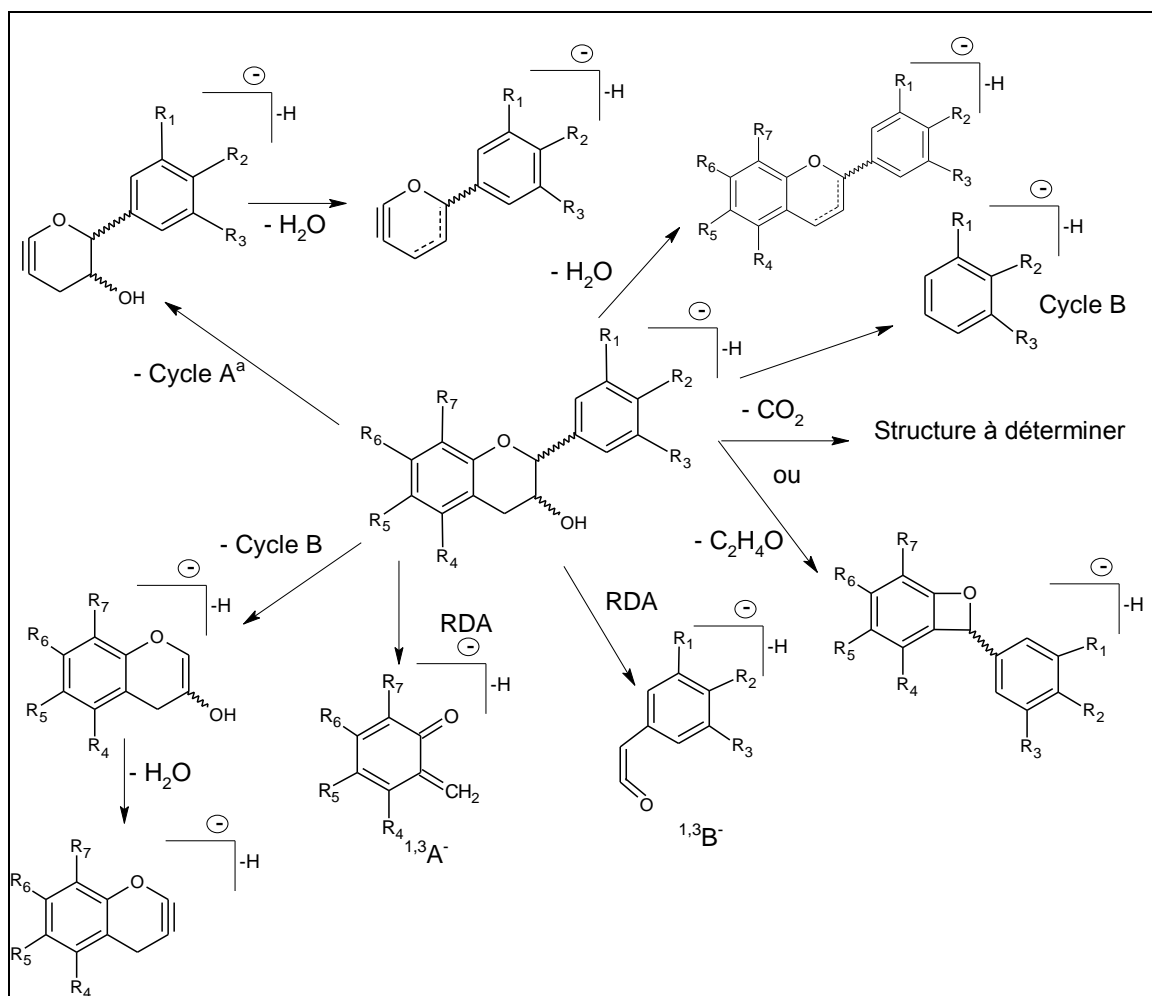


Figure 30 : structures des catéchines étudiées

D'après la littérature [Perez-Magarino et coll., 1999 ; Cren-Olivé et coll., 2000 ; Miketova et coll., 2000 ; Stöggel et coll., 2004 ; Benavides et coll., 2006], les fragments les plus courants proviennent de la perte d'un des cycles (A ou B) suivi de l'élimination d'une molécule d'eau ; il s'agit des ions  $[M - H - \text{Cycle A} - \text{H}_2\text{O}]^-$  et  $[M - H - \text{Cycle B} - \text{H}_2\text{O}]^-$  (figure 31). La perte directe de petites molécules neutres n'est pas favorisée par la structure des flavan-3-ols. En revanche, les réactions de type Retro Diels-Alder sont fréquentes et conduisent à des ions abondants de type  $^{1,3}\text{A}^-$  et  $^{1,3}\text{B}^-$ . En outre, la littérature indique deux voies possibles pour l'obtention des ions  $[M - H - 44]^-$  ; la perte de  $\text{CO}_2$  et celle de  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ .

Les spectres de masse des trois flavan-3-ols **39-41** se caractérisent par un pic de base correspondant aux ions  $[\text{Cycle B} - \text{H}]^-$  (tableau 7). Nous remarquons que cette fragmentation est favorisée lorsque le cycle B est dihydroxylé (**39** et **41**) ; ainsi, les ions quasi-moléculaires  $[M - \text{H}]^-$  sont moins intenses sur les spectres de la catéchine **39** et de l'épicatechine **40** que sur celui de l'épigallocatechine **41**. Il convient également de souligner que la différenciation des deux stéréoisomères **39** et **40** est difficile sur la seule base de la spectrométrie de masse en raison de la similitude des spectres.



<sup>a</sup> La structure est déduite à partir de fragmentations en mode positif

Figure 31 : Mécanismes de fragmentation des flavan-3-ols

Tableau 7 : Récapitulatif des ions ( $m/z$ ) observés pour les flavan-3-ols en mode ESI négatif

Ions fragments	(+)-Catéchine	(-)-Epicatéchine	(-)-Epigallocatechine
$[M - H]^-$	289 (15)	289 (11)	305 (51)
$[M - H - H_2O]^-$	271 (8)	271 (3)	287 (1)
$[M - H - CO_2]^- / [M - H - C_2H_4O]^-$	245 (15)	245 (14)	261 (9)
$[M - H - \text{Cycle B}]^-$	179 (4)	179 (7)	179 (20)
$[M - H - \text{Cycle A}]^-$	205 (16)	205 (18)	221 (12)
$[M - H - \text{Cycle B} - H_2O]^-$	161 (15)	161 (22)	161 (4)
$[M - H - \text{Cycle A} - H_2O]^-$	187 (18)	187 (15)	203 (4)
$^{1,3}A^-$	137 (29)	137 (30)	137 (30)
$[\text{Cycle B} - H]^-$	<b>109 (100)</b>	<b>109 (100)</b>	<b>125 (100)</b>
$^{1,3}B^-$	149 (20)	149 (20)	165 (23)

Les ions en gras correspondent au pic de base.

L'abondance relative (%) de chaque ion est indiquée entre parenthèse.

#### IV.1.5. Les flavanones

Parmi les sept flavanones analysées, nous distinguons deux types de substitutions :

- les flavanones méthoxylées (Figure 32) : hespérétine **42**, isosakuranétine **43**, sakuranétine **44** et bavachinine **45** ;
- les flavanones non méthoxylées (Figure 32) : naringénine **46**, liquiritigénine **47** et pinocembrine **48**.

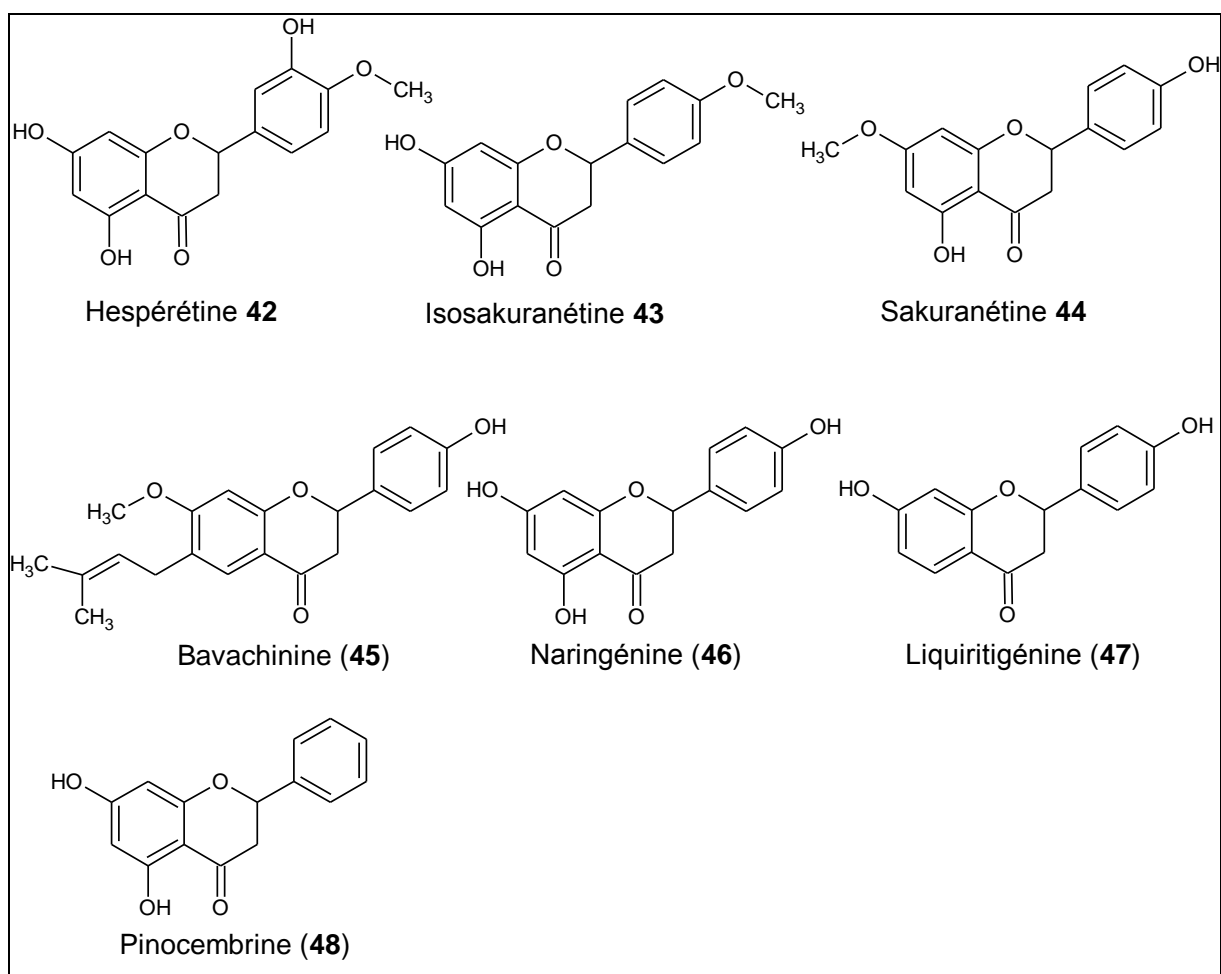


Figure 32 : Structure des flavanones étudiées.

Les mécanismes de fragmentation des flavanones (figure 33) [Weintraub et coll., 1995 ; Fabre et coll., 2001 ; Hughes et coll., 2001 ; Nikolic et Van Breemen, 2004 ; Tsimogiannis et coll., 2007 ; Xu et coll., 2009] dépendent fortement de la présence d'un substituant méthoxy ; ce dernier entraîne une fragmentation spécifique par perte du radical méthyle pour former un radical anion stable. Les spectres des flavanones méthoxylées sont

riches en fragments dérivés de l'ion  $[M - H - CH_3]^-$ . Les pertes de molécules neutres déjà observées sur les autres types de flavonoïdes se produisent à partir des cycles A (perte de  $C_3O_2$ ) et C (perte de  $CO$ ,  $CO_2$ ,  $C_2H_2O$ ). Dans ce contexte, il apparaît que la liaison oxygène/carbone dans le radical méthoxy est extrêmement active et les réactions de type Retro Diels-Alder sont défavorisées dans le processus de fragmentation. A contrario, les fragmentations issues du mécanisme Retro Diels-Alder sont prédominantes pour les flavanones non méthoxylées et conduisent à des ions de forte intensité de type  $[M - H - Cycle B]^-$ ,  $^{0,4}B^-$ ,  $^{1,3}A^-$  et  $^{1,4}B^-$ .

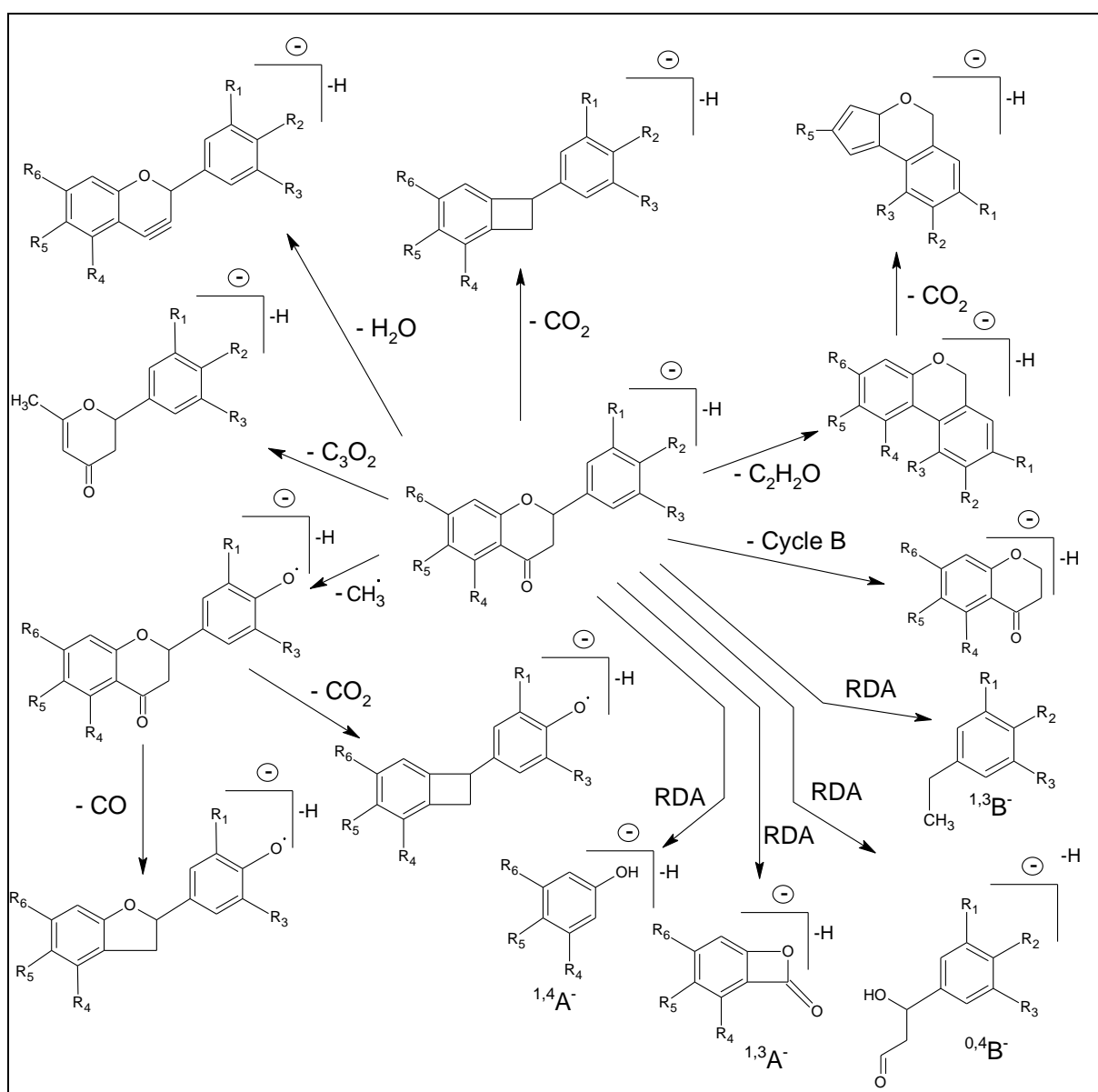


Figure 33 : Mécanismes de fragmentation des flavanones

Les analyses réalisées au laboratoire sont en accord avec les données de la littérature (tableau 8). Les flavanones méthoxylées (hespérétine **42**, isosakuranétine **43** et sakuranétine **44**) ont un pic de base  $[M - H - CH_3]^-$  correspondant à la perte d'un radical  $CH_3^\bullet$  à partir de l'ion quasi-moléculaire  $[M - H]^-$ . Les principaux fragments observés sont issus de la perte de petites molécules neutres ( $CO$ ,  $CO_2$ ,  $C_3O_2$ ) à partir de cet ion  $[M - H - CH_3]^-$ . Nos résultats confirment également la faible intensité des ions résultant d'une Retro Diels-Alder avec ces constituants. Le spectre de masse de la bavachinine **45** diffère fortement de ceux des trois composés précédents puisque seuls deux fragments sont observés : l'ion quasi-moléculaire  $[M - H]^-$  et l'ion  $^{1,3}B^-$  (pic de base). Cette particularité est imputable à la présence d'un groupement isoprène en position 6 du cycle A.

Concernant les flavanones non méthoxylées, les fragmentations de la naringénine **46** et de la liquiritigénine **47** sont comparables par la présence d'un pic de base correspondant à l'ion  $^{1,3}B^-$  et de multiples fragments résultant de réactions de Retro Diels-Alder ( $^{1,3}A^-$  et  $^{1,3}A^-CO_2$ ). Il est à noter que les ions provenant de la perte de molécules neutres sont absents ou présents en très faible intensité sur les spectres. Enfin, la pinocembrine **48** se différencie par un pic de base correspondant à l'ion quasi-moléculaire. A l'inverse des autres flavanones, cette molécule **48** ne présente pas un processus de fragmentation privilégié ; les ions abondants correspondent aussi bien à la perte de petites molécules neutres ( $C_2H_2O$  et  $C_3O_2$ ) qu'à des mécanismes de type Retro Diels-Alder ( $^{1,3}A^-$ ).



Tableau 8 : Récapitulatif des ions ( $m/z$ ) observés pour les flavanones en mode ESI négatif

Ions fragments	Hespérétine	Isosakuranétine	Sakuranétine	Bavachinine	Naringénine	Liquiritigénine	Pinoembrine
[M -H] <sup>-</sup>	301 (12)	285 (37)	285 (30)	337 (25)	271 (3)	255 (15)	<b>255 (100)</b>
[M -H -H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	283 (1)	-	267 (1)	-	-	-	-
[M -H -CO] <sup>-</sup>	-	-	-	-	-	-	227 (9)
[M -H -CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	257 (7)	-	-	-	-	-	211 (21)
[M -H -CO -CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	-	-	-	-	-	-	183 (14)
[M -H -C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	-	243 (10)	-	-	-	-	213 (69)
[M -H -C <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	-	217 (1)	-	-	-	-	187 (20)
[M -H -C <sub>3</sub> O <sub>2</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	-	175 (7)	-	-	161 (3)	-	145 (53)
[M -H -C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O -CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	215 (6)	199 (1)	-	-	185 (2)	-	169 (27)
[M -H -CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	<b>286 (100)</b>	<b>270 (100)</b>	<b>270 (100)</b>	-	-	-	-
[M -H -CH <sub>3</sub> -CO] <sup>-</sup>	258 (12)	242 (6)	242 (2)	-	-	-	-
[M -H -CH <sub>3</sub> -CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	242 (24)	226 (19)	226 (47)	-	-	-	-
[M -H -CH <sub>3</sub> -CO <sub>2</sub> -CO] <sup>-</sup>	214 (16)	198 (21)	198 (25)	-	-	-	-
[M -H -CH <sub>3</sub> -C <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	218 (11)	202 (33)	202 (9)	-	-	-	-
<sup>1,3</sup> A <sup>-</sup>	151 (9)	151 (32)	165 (45)	-	151 (36)	135 (43)	151 (55)
<sup>1,3</sup> A <sup>-</sup> -CO <sub>2</sub>	107 (13)	-	121 (4)	-	107 (30)	-	107 (20)
<sup>1,3</sup> A <sup>-</sup> -CH <sub>3</sub>	-	-	150 (6)	-	-	-	-
<sup>1,4</sup> A <sup>-</sup>	125 (5)	-	-	-	-	-	-
<sup>0,4</sup> B <sup>-</sup>	-	-	165 (7)	-	165 (3)	-	-
<sup>0,4</sup> B <sup>-</sup> -CH <sub>3</sub>	-	164 (7)	-	-	-	-	-
<sup>0,4</sup> B <sup>-</sup> -CH <sub>3</sub> -CO	-	136 (1)	-	-	-	-	-
<sup>1,3</sup> B <sup>-</sup>	-	-	119 (3)	<b>119 (100)</b>	<b>119 (100)</b>	<b>119 (100)</b>	-
<sup>1,3</sup> B <sup>-</sup> -CH <sub>3</sub>	136 (4)	-	-	-	-	-	-

Les ions en gras correspondent au pic de base.

L'abondance relative (%) de chaque ion est indiquée entre parenthèse.

## IV.2. Les flavonoïdes glycosylés

Dans les végétaux, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme de dérivés glycosylés. Il en existe deux types : les *O*-glycosides (liés à l'aglycone par une liaison carbone-oxygène) et les *C*-glycosides (liés à l'aglycone par une liaison carbone-carbone). Les sucres les plus courants sont dérivés du glucose et du rhamnose. Les arabinoses, xyloses et les acides glucuroniques sont moins fréquemment rencontrés [Cuyckens et Claeys, 2004 ; Vukics et Guttman, 2010]. Par ailleurs, Cuyckens et coll. [2000] ont mis en évidence des positions de glycosylation préférentielles en fonction de la nature de l'aglycone (Figure 34).

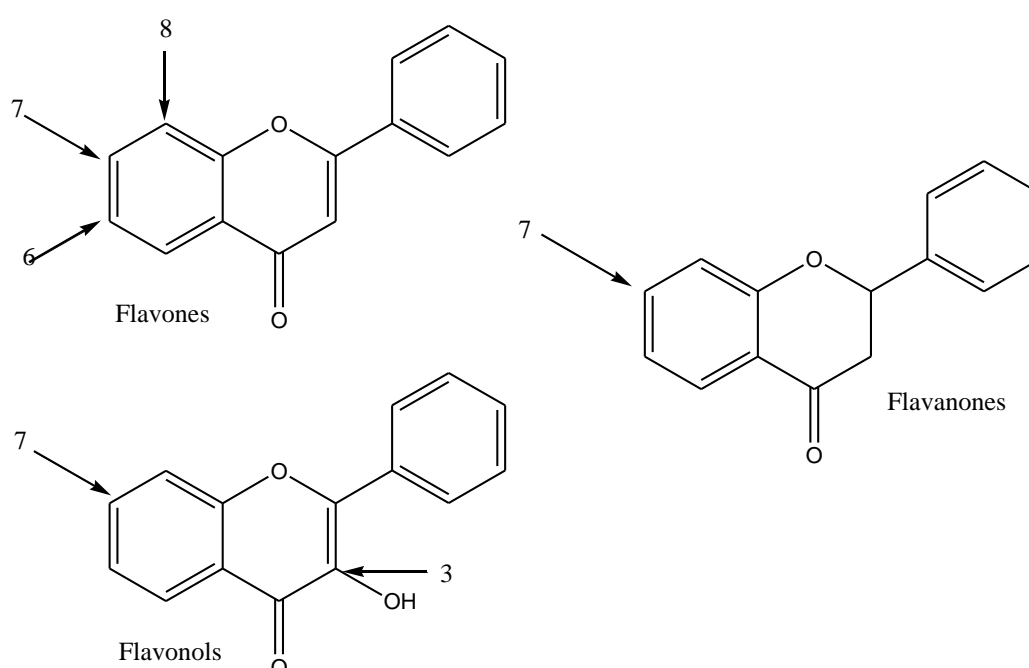


Figure 34 : Positions préférentielles pour la glycosylation en fonction de la nature des aglycones [Cuyckens et coll., 2000]

### IV.2.1. Nomenclature

La nomenclature de fragmentation des flavonoïdes glycosylés a été définie à partir des travaux sur les sucres en spectrométrie de masse [Domon et Costello, 1988]. Ainsi, la bibliographie [Ma et coll., 1997 ; Cuyckens et Claeys, 2004] décrit les principales règles de nomenclature à appliquer avec les dérivés glycosylés (Figure 35).

*Pour les ions issus de l'aglycone :*

- les ions sont nommés par les lettres X, Y et Z. « X » est affecté à l'ion ayant subi une fragmentation sur le cycle saccharidique. « Y » et « Z » sont attribués lorsque la fragmentation se situe au niveau de la liaison interglycosidique ;
- aux lettres définies ci-dessus s'associe un indice (*j*) qui représente le numéro associé à la liaison interglycosidique rompue et décomptée à partir de l'aglycone ; la liaison qui lie l'aglycone au sucre porte le numéro 0. Les lettres X, Y et Z peuvent, également, être affectées d'un exposant dans le cas où la molécule possède au moins deux sucres positionnés différemment sur l'aglycone ; les exposants indiquent, alors, la position du sucre qui a été perdu [Stobiecki, 2000]. Dans le cas où la chaîne glycosidique est liée à l'aglycone par une liaison C-C, la numérotation commence sur le C-glycosyle. La notation des ions Y<sub>0</sub> ou Z<sub>0</sub> formés signifie que la fragmentation se produit au niveau de la liaison C-C ou C-O liant l'aglycone au premier sucre.

*Pour les ions issus de fragments glycosidiques.*

- les ions sont désignés par les lettres A, B, C. Les ions de types A correspondent à des ions issus de fragmentations sur le cycle carbohydate. Les ions de types B et C correspondent à des fragmentations sur les liaisons interglycosidiques ;
- Aux lettres définies ci-dessus s'associent un indice (*i*) qui représente le numéro de la liaison interglycosique rompue. Cet indice est toujours supérieur ou égal à 1, et est affecté aux liaisons interglycosidiques, comptées à partir du sucre terminal.
- aux identifiants décrits ci-dessus, s'ajoutent également deux exposants (*k,l ; notés avant les lettres*) qui indiquent les liaisons rompues sur le cycle carbohydate. Ces deux exposants concernent donc les ions A et X, puisque seuls ces derniers caractérisent une fragmentation sur le cycle saccharidique.

Nota : Les ions de type A peuvent être facilement confondus avec ceux désignant les fragments des aglycones (voir IV.1.). Il faut noter que les ions issus des aglycones ne portent pas d'indices (ou l'indice 0) alors que les ions désignant des fragments issus d'un sucre portent un indice supérieur ou égal à 1.

L'ensemble de cette nomenclature est schématisée par la figure 35.

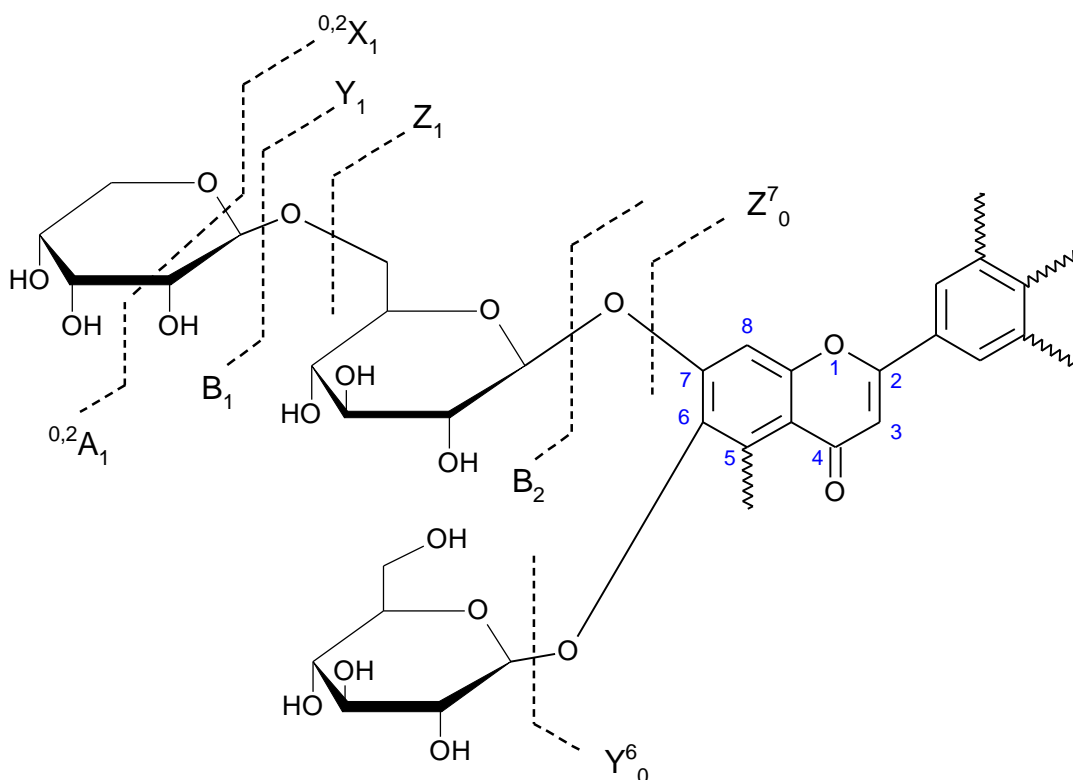


Figure 35 : Schéma de la nomenclature de fragmentation des flavonoïdes glycosylés.

Nous avons procédé à l'étude mécanistique des flavonoïdes glycosylés répertoriés dans notre base de données. Dans le cas de composés absents de notre bibliothèque, les informations collectées nous permettront de [Cuyckens et Claeys, 2004 ; Vukics et Guttman, 2010]: - déterminer la nature de l'aglycone et du (des) sucre(s) ; - de préciser le type de liaisons entre l'aglycone et le sucre (*O*-glycosides, *C*-glycosides, *O,C*-diglycosides) ainsi que la position de ces liaisons sur le squelette aglycone. Il faut noter que les fragmentations observées sont différentes selon le mode utilisé (positif ou négatif) en spectrométrie de masse. Pour notre part, nous avons choisi de privilégier le mode négatif.

#### IV.2.2. Détermination de la nature de la liaison sucre-aglycone

En général, les spectres en mode négatif présentent des ions quasi-moléculaires  $[M - H]^-$  ; ces anions se fragmentent par perte de(s) substituant(s) glycosidique(s) entraînant la formation d'ions intenses qui correspondent à l'aglycone [Cuykens et coll., 2000 ; Cuyckens et Claeys, 2004 ; Vukics et Guttman 2010]. La différence entre ces deux types de fragments (quasi-moléculaire et aglycone) permet souvent de déterminer la masse du substituant glycosidique. En revanche, le(s) substituant(s) glycosyle(s) ne produisent pas d'ions intacts

qui puissent donner lieu à une interprétation univoque. La littérature indique, également, que la différenciation entre les différents types de dérivés glycosylés (*O*-glycosides, *C*-glycosides et *O,C*-diglycosides) est rendue possible par l'étude des fragmentations [Ferrerres et coll., 2007].

Les spectres des flavonoïdes *O*-substitués sont remarquables par la présence de deux ions :  $Y_0^-$  et  $[Y_0 - H]^\bullet$ . Ces ions sont formés par un réarrangement avec transfert d'hydrogène pour  $Y_0^-$  et par un clivage homolytique de la liaison acétal interglycosidique pour  $[Y_0 - H]^\bullet$  [Hvattum et Ekeberg, 2003 ; Davis et Brodbelt, 2008]. Il convient de souligner que la présence simultanée de ces deux ions sur les spectres de masse est caractéristique des flavones et flavonols. Il semble qu'une fonction cétone  $\alpha$ - $\beta$  insaturée sur le cycle C soit indispensable pour générer des radicaux anions stables. L'abondance de ces derniers dépend fortement de la nature du sucre et de sa position sur l'aglycone (cf Partie A IV.2.4). Le rapport d'intensité  $[Y_0 - H]^\bullet / Y_0^-$  admet une dépendance vis-à-vis du niveau d'hydroxylation de l'aglycone :

- Pour les flavonols *O*-glycosylés en position 3, ce rapport augmente avec le nombre de groupes hydroxyle sur le cycle B [Hvattum et Ekeberg, 2003]. Cependant, cette observation n'est qu'une tendance et des contre-exemples ont pu être relevés [Davis et Brodbelt, 2008].
- Pour les flavonols *O*-glycosylés en position 7, le radical anion est généralement de très faible intensité. Cependant, la formation de  $[Y_0 - H]^\bullet$  est favorisée par la présence d'une structure diphenol (ortho ou para) sur le cycle B.
- Pour les flavones *O*-glycosylées en position 7, la probabilité de formation du radical anion diminue avec l'augmentation du nombre d'hydroxyles sur le cycle B. Enfin, la présence de substituants méthoxy défavorise, voire, inhibe la formation de  $[Y_0 - H]^\bullet$ .

Concernant les flavonoïdes *C*-glycosylés, la *C*-glycosylation se produit sur le cycle A en position 6 ou 8. La fragmentation de la liaison C-C entre l'aglycone et le sucre n'est pas favorisée ; l'information structurale obtenue en spectrométrie de masse est donc limitée avec ces constituants [Vukics et Guttman, 2010]. Aussi, les réactions de déshydratation sont fréquentes et les principales fragmentations se produisent sur les cycles saccharidiques.

Enfin, la fragmentation des flavonoïdes *O,C*-diglycosylés en spectrométrie de masse (avec une énergie de collision faible à modérée) entraîne l'apparition de deux types d'ions

caractéristiques : - le premier Y correspond à la perte du sucre lié à l'aglycone par une liaison C-O ; - le second  $^{ij}X$  issu de la fragmentation du sucre lié à l'aglycone par une liaison C-C.

#### IV.2.3. Détermination de la nature de(s) substituant(s) glycoside(s)

D'après la littérature [Cuyckens et coll., 2000 ; Cuyckens et Claeys, 2004 ; Vukics et Guttman, 2010], la nature du sucre peut être déterminée par la perte d'une molécule neutre liée à la fragmentation de la chaîne saccharidique (Figure 36). En effet, le défaut de masse entre les ions « précurseurs » (quasi-moléculaires) et les ions « produits » (type X, Y ou Z) permet de déterminer la structure du substituant glycosyle : hexose, désoxyhexose ou pentose (tableau 9).

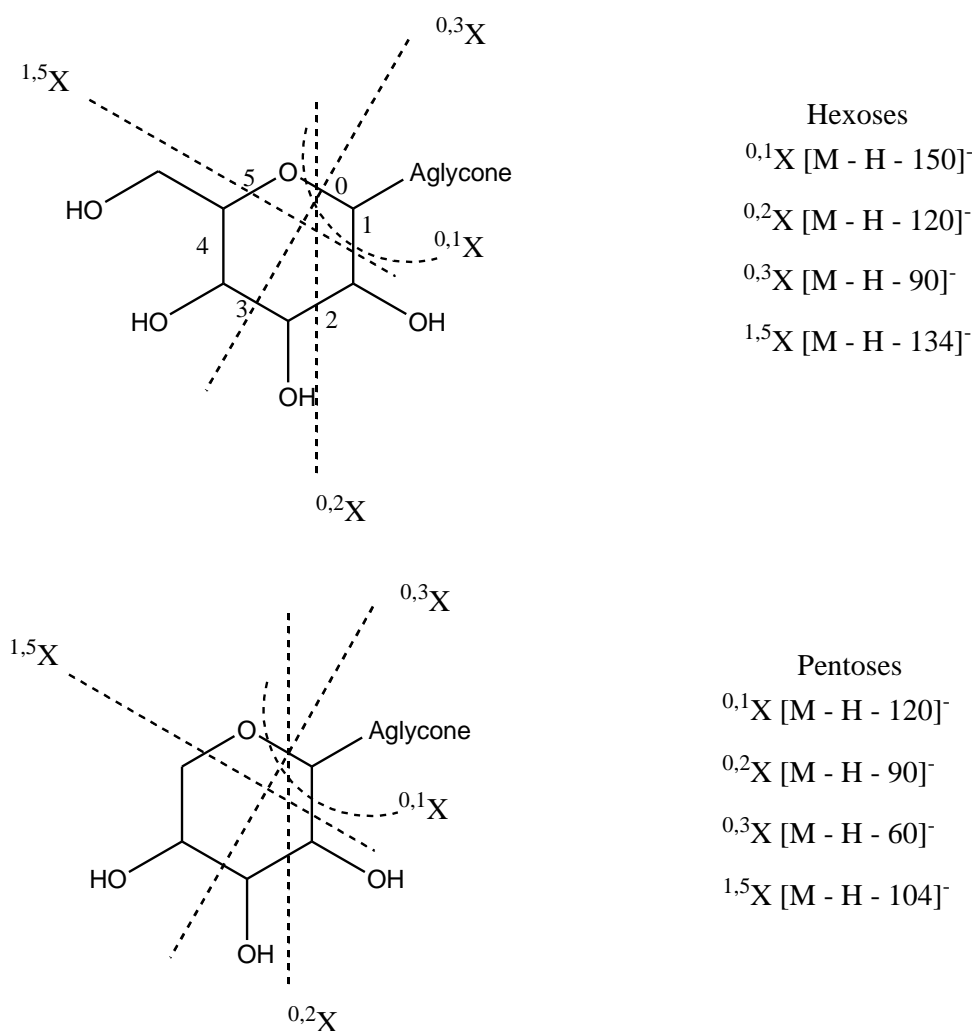


Figure 36 : Schéma de fragmentation de la chaîne saccharidique

Tableau 9: Défaut de masse entre ions « précurseurs » et « produits » en fonction de la nature du sucre et du type de liaison aglycone-sucre.

	<i>O</i> -glycosides		<i>C</i> -glycosides			
	Y <sub>i</sub>	Z <sub>i</sub>	<sup>0,1</sup> X	<sup>0,2</sup> X	<sup>0,3</sup> X	<sup>1,5</sup> X
Hexoses	162	180	150	120	90	134
Désoxyhexoses	146	164	134	104	74	120
Pentoses	132	150	120	90	60	104

La majorité des flavonoïdes glycosylés sont monoglycosylés ou diglycosylés. Dans le cas des dérivés diglycosylés, quatre isomères peuvent être distingués : les di-*O*-glycosylés, les di-*C,O*-glycosylés, les *O*-diglycosylés et les *C,O*-diglycosylés [Ferrerres et coll., 2004, 2007 ; Ablajan et coll., 2006]. Ces isomères peuvent généralement être différenciés par rapport à l'abondance de certains ions caractéristiques. Les facteurs de différenciation sont résumés dans le tableau 10. Néanmoins, la détermination de la séquence d'enchaînement des sucres n'est pas aisée en spectrométrie de masse car des fragmentations non attendues peuvent se produire. A titre d'exemple, le spectre de masse de la rutine présente un ion désigné par Y\* correspondant à la perte unique du groupement glycosyle lié directement à l'aglycone [Li et Claeys, 1994 ; Ma et coll., 2000;].

Tableau 10: Abondance relative des ions fragments en fonction de la liaison aglycone-sucre

	Y <sub>1</sub> <sup>-</sup>	Y <sub>0</sub> <sup>-</sup>	Z <sub>1</sub> <sup>-</sup>	[Y <sub>1</sub> - H] <sup>•</sup>	[Y <sub>0</sub> - 2H] <sup>-</sup>	[Y <sub>0</sub> - H] <sup>•</sup>
di- <i>O</i> -glycosylé	100%	≈ 20-30%		Présent	Présent	
di- <i>C,O</i> -glycosylé		100%		Présent		
<i>O</i> -diglycosylé	Intensité faible	100%				Présent
<i>C,O</i> -diglycosylé		< 10%	100%			

#### IV.2.4. Détermination de la nature des liaisons interglycosidiques

Avec les dérivés d'oligosaccharides, plusieurs types de liaisons interglycosidiques sont possibles entre la position 1 d'un sucre et les positions 2, 3, 4 et 6 du sucre suivant ; toutefois, les liaisons interglycosidiques 1→2 et 1→6 sont favorisées [Ma et coll., 2001]. A titre d'exemple, les structures de deux flavonoïdes isomères (narirutine et naringine) se différenciant uniquement par la nature de la liaison interglycosidique (α1→6 et α1→2, respectivement) sont présentées sur la figure 37.

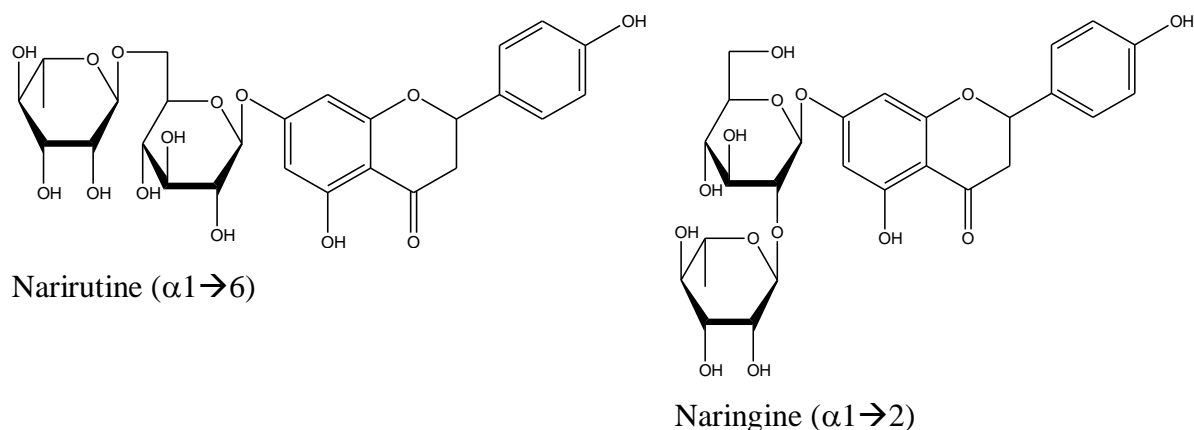


Figure 37 : Structures de la narirutine et de la naringine

La détermination de la nature de ces liaisons interglycosidiques est problématique en spectrométrie de masse. En effet, les expériences menées en mode positif ont mis en évidence des résultats contradictoires en fonction des paramètres d'ionisation utilisés [Ma et coll., 2001 ; Cuyckens et coll., 2001]. En mode négatif, les études récentes [Cuyckens et coll., 2001 ; Vukics et Guttman, 2010] présentent des résultats plus prometteurs ; notamment, au niveau de la fragmentation de la liaison aglycone-sucre qui donnent lieu aux ions  $Y_0^-$  (pic de base). Cette fragmentation se produit avec transfert de proton à partir de l'hydroxyle en position 2 sur le sucre. Dans le cas de dérivés  $\alpha 1 \rightarrow 6$ , cette fragmentation est favorisée et devient prépondérante par rapport aux autres. Dans le cas de dérivés  $\alpha 1 \rightarrow 2$ , il n'y a pas de proton disponible en position 2 et l'ion  $Y_0^-$  se forme beaucoup plus difficilement. D'autres fragmentations ne sont donc plus défavorisées et les spectres des dérivés  $\alpha 1 \rightarrow 2$  sont beaucoup plus riches que ceux des dérivés  $\alpha 1 \rightarrow 6$  [Cuyckens et coll., 2001]. Par exemple, les ions  $Y_1^-$  sont plus abondants dans le cas de liaisons  $1 \rightarrow 2$  que dans celui de liaisons  $1 \rightarrow 6$ . Néanmoins, le rapport d'intensité  $Y_0^-/Y_1^-$  n'est pas toujours déterminant [Cuyckens et coll., 2000]. Les ions les plus informatifs sont ceux qui impliquent la fragmentation des cycles saccharidiques. En effet, les publications les plus récentes [Cuyckens et Claeys, 2004] signalent la présence d'un ion abondant  $^{0,2}X_0^-$  pour les isomères  $\alpha 1 \rightarrow 2$ , alors qu'il est de faible intensité pour les isomères  $\alpha 1 \rightarrow 6$ . Ce fragment  $^{0,2}X_0^-$  est donc caractéristique des isomères  $\alpha 1 \rightarrow 2$  et peut être utilisé comme ion « diagnostic ».



#### IV.2.5. Etude des fragmentations de composés standards

Dans ce qui suit, nous rapportons nos travaux sur les fragmentations de 22 flavonoïdes glycosylés, de structures aglycones diverses, se répartissant en (tableau 11) :

- six composés *O*-monoglycosylés en position 3 (flavonol **49-52**), en position 7 (flavanone **53**) ou en position 6' (dihydrochalcone **54**) ;
- treize composés *O*-diglycosylés (hexose-désoxyhexose) en position 7 (flavanone **55-62**, flavonol **65** flavone **66**, dihydrochalcone **67**) ou en position 3 (flavonol **63-64**) et ayant des liaisons interglycosidiques  $\alpha(1\rightarrow6)$  ou  $\alpha(1\rightarrow2)$  ;
- deux flavones di-glucoside 3',7-*O* (lutéoline-3',7-di-*O*-glucoside **68**) et 6-C et 7-*O* (saponarine **69**) ;
- un flavonol particulier (robinine **70**) obtenu par une glycosylation : 3-*O*-diglycoside (hexose-désoxyhexose  $\alpha(1\rightarrow6)$ ) et 7-*O*-monoglycosyde (désoxyhexose).

##### a) Etude des flavonoïdes *O*-monoglycosylés

Les spectres de masse des six flavonoïdes *O*-monoglycosylés (**49-54**) sont très informatifs ; comme le montrent les fragmentations caractéristiques rapportées au tableau 12 :

- Les quatre flavonols (quercitrine **49**, isoquercitrine **50**, hyperoside **51** et myricitrine **52**) conduisent à un pic de base correspondant à l'ion  $[Y_0 - H]^-$  et à des ions intenses  $Y_0^-$ . Ces résultats sont conformes à ceux de la littérature, la masse du sucre est déduite de ces spectres par différence entre les ions quasi-moléculaires et les ions  $Y_0^-$  (fragment aglycone). Pour l'isoquercitrine **50** et l'hyperoside **51**, nous remarquons des fragmentations du groupement saccharidique (hexose) qui conduisent à des ions  $^{0,2}X_0^-$  de faible intensité. Ces ions sont absents des spectres des deux autres flavonols *O*-monoglycosylés (quercitrine **49**, myricitrine **52**) ; ceci est probablement dû à la présence d'un sucre de type désoxyhexose.
- La flavanone (flavanomaréine **53**) et la dihydrochalcone (phloridzine **54**) se différencient nettement des flavonols par l'absence des ions  $[Y_0 - H]^-$  ; le pic de base étant l'ion  $Y_0^-$ . La flavanomaréine **53** se singularise également par un nouveau fragment  $Z_0^-$  à  $m/z$  269.

Tableau 11 : Caractéristiques structurales des composés standards étudiés

n°	Composés	Type de squelette flavonique	Type d'aglycone	Type de sucre	Sucre et liaison sucre-aglycone	Liaison interglycosidique
49	Quercitrine	Flavonol	Quercétine	désoxyhexose	3-O-rhamnoside	-
50	Isoquercitrine	Flavonol	Quercétine	hexose	3-O-glucoside	-
51	Hyperoside	Flavonol	Quercétine	hexose	3-O-galactoside	-
52	Myricitrine	Flavonol	Myricétine	désoxyhexose	3-O-rhamnoside	-
53	Flavanomaréine	Flavanone	Isookanine	hexose	7-O-glucoside	-
54	Phloridzine	Dihydrochalcone	Phlorétine	hexose	6'-O-glucoside	-
55	Narirutine	Flavanone	Naringénine	Hexose- désoxyhexose	7-O-rutinoside <sup>a</sup>	$\alpha(1\rightarrow6)$
56	Naringine	Flavanone	Naringénine	Hexose- désoxyhexose	7-O-néohespéridoside <sup>b</sup>	$\alpha(1\rightarrow2)$
57	Hespéridine	Flavanone	Hespéretine	Hexose- désoxyhexose	7-O-rutinoside <sup>a</sup>	$\alpha(1\rightarrow6)$
58	Néohespéridine	Flavanone	Hespéretine	Hexose- désoxyhexose	7-O-néohespéridoside <sup>b</sup>	$\alpha(1\rightarrow2)$
59	Eriocitrine	Flavanone	Eriodictyol	Hexose- désoxyhexose	7-O-rutinoside <sup>a</sup>	$\alpha(1\rightarrow6)$
60	Neoériocitrine	Flavanone	Eriodictyol	Hexose- désoxyhexose	7-O-néohespéridoside <sup>b</sup>	$\alpha(1\rightarrow2)$
61	Didymine	Flavanone	Isosakuranétine	Hexose- désoxyhexose	7-O-rutinoside <sup>a</sup>	$\alpha(1\rightarrow6)$
62	Poncirine	Flavanone	Isosakuranétine	Hexose- désoxyhexose	7-O-néohespéridoside <sup>b</sup>	$\alpha(1\rightarrow2)$
63	Rutine	Flavonol	Quercétine	Hexose- désoxyhexose	3-O-rutinoside <sup>a</sup>	$\alpha(1\rightarrow6)$
64	Daticine	Flavonol	Daticétine	Hexose- désoxyhexose	3-O-rutinoside <sup>a</sup>	$\alpha(1\rightarrow6)$
65	Kaempférol-7-O-néohespéridoside	Flavonol	Kaempférol	Hexose- désoxyhexose	7-O-néohespéridoside <sup>b</sup>	$\alpha(1\rightarrow2)$
66	Diosmine	Flavone	Diosmétine	Hexose- désoxyhexose	7-O-rutinoside <sup>a</sup>	$\alpha(1\rightarrow6)$
67	Néohespéridine dihydrochalcone	Dihydrochalcone	Hespéretine	Hexose- désoxyhexose	7-O-néohespéridoside <sup>b</sup>	$\alpha(1\rightarrow2)$
68	Lutéoline-3',7-di-O-glucoside	Flavone	Lutéoline	Hexose + hexose	3',7-di-O-glucoside	-
69	Saponarine	Flavone	Apigénine	Hexose + hexose	6-C-glucoside et 7-O-glucoside	-
70	Robinine	Flavonol	Kaempférol	Hexose-désoxyhexose + désoxyhexose	3-O-robinoside <sup>c</sup> et 7-O-rhamnoside	$\alpha(1\rightarrow6)$

<sup>a</sup> Rutinose : 6-O- $\alpha$ -L-rhamnosyl-D-glucose ;

<sup>b</sup> Néohespéridose : 2-O- $\alpha$ -L-rhamnosyl-D-glucose ;

<sup>c</sup> Robinose : 6-O- $\alpha$ -L-rhamnosyl-D-galactose.

Tableau 12 : Récapitulatif des ions ( $m/z$ ) observés pour les flavonoïdes *O*-monoglycosylés en mode ESI négatif

n°	Composés	[M - H] <sup>-</sup>	<sup>0,2</sup> X <sub>0</sub> <sup>-</sup>	[ <sup>0,2</sup> X <sub>0</sub> - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	Z <sub>0</sub> <sup>-</sup>	Y <sub>0</sub> <sup>-</sup>	[Y <sub>0</sub> - H] <sup>-</sup>
49	Quercitrine	447 (33)	-	-	-	301 (70)	<b>300 (100)</b>
50	Isoquercitrine	463 (30)	343 (1)	-	-	301 (46)	<b>300 (100)</b>
51	Hyperoside	463 (28)	343 (4)	-	-	301 (19)	<b>300 (100)</b>
52	Myricitrine	463 (35)	-	-	-	317 (22)	<b>316 (100)</b>
53	Flavanomaréine	449 (52)	-	-	269 (17)	<b>287 (100)</b>	-
54	Phloridzine	435 (37)	-	-	-	<b>273 (100)</b>	-

Les ions en gras correspondent au pic de base.

L'abondance relative (%) de chaque ion est indiquée entre parenthèse.

b) *Etude des flavonoïdes O-diglycosylés*

Ainsi qu'indiqué dans le tableau 11, les treize flavonoïdes *O*-diglycosylés (**55-67**) dont nous avons étudié les fragmentations sont constitués d'un squelette aglycone : (i) de type flavanone (**55-62**), (ii) de type flavonol (**63-65**), (iii) de type flavone (**66**) ou (iv) de type dihydrochalcone (**67**).

Les spectres de base des huit composés présentant un aglycone de type flavanone exhibent généralement un pic de base correspondant au fragment  $Y_0^-$  ; c'est typiquement le cas de **55**, **57**, **58**, **59**, **61** et **62** (tableau 13). Pour ces composés, la présence d'un substituant disaccharidique est révélée par l'observation simultanée des ions quasi-moléculaire et  $Y_0^-$ . Les autres ions observés ont des abondances relativement faibles ( $[^{0,2}X_0 - Y_1]^-$  et  $[^{0,2}X_0 - Y_1 - H_2O]^-$ ) ou n'apparaissant que pour certains composés (par exemple  $Y_1^-$  avec la naringine **56**). Cependant, nous relevons deux exceptions à ces résultats, la naringine **56** et la néoériocitrine **60** présentent des pics de base correspondants au fragment  $^{1,3}A^-$  ( $m/z$  459 dans les deux cas). Ce fragment provient d'une voie alternative décrite par Shi et coll. [Shi et coll., 2007] ; elle est imputée à une rétrocyclisation du cycle C de la partie aglycone impliquant une rupture des liaisons 1 et 3. Cette fragmentation est probablement due à la présence d'un groupement hydroxyle en position 4' du cycle B.

Les trois composés (rutine **63**, datiscine **64**, kaempférol-7-*O*-néohespéridoside **65**) ayant un aglycone de type flavonol ont également des spectres de masse avec des ions intenses de types  $[M - H]^-$  et  $Y_0^-$ . Ici encore, la masse du groupement disaccharidique est obtenue sans ambiguïté à partir de ces fragments. Ces spectres se différencient de ceux des flavanones disaccharidiques par la présence d'ions  $[Y_0 - H]^-$ . La diosmine **66**, seule flavonoïde *O*-diglycosylé étudié ayant comme aglycone une flavone, présente également l'ion  $[Y_0 - H]^-$  mais avec une intensité très faible (2%). Par ailleurs, le spectre de masse présente le fragment  $Y_0^-$  comme pic de base. Dans les quatre composés précités, nous notons la présence du fragment  $[^{0,2}X_0^- - Y_1]^-$  (en faible abondance) et l'absence des ions  $[^{0,2}X_0 - Y_1 - H_2O]^-$ . Enfin, le fragment  $Z_1^-$  est observé uniquement sur les spectres du kaempférol-7-*O*-néohespéridoside **65** et de la néohespéridine dihydrochalcone **67**. Sur le spectre de masse de cette dernière, nous retrouvons les ions préalablement observés avec les flavonols : les quasi-moléculaires, les fragments  $Y_0^-$  (pic de base) et la présence simultanée de  $^{0,2}X_0^-$  et  $[^{0,2}X_0 - Y_1 - H_2O]^-$ .

Tableau 13 : Récapitulatif des ions ( $m/z$ ) observés pour les flavonoïdes *O*-diglycosylés en mode ESI négatif

n°	Composés	[M - H] <sup>-</sup>	Y <sub>1</sub> <sup>-</sup>	Z <sub>1</sub> <sup>-</sup>	<sup>0,2</sup> X <sub>0</sub> <sup>-</sup>	[ <sup>0,2</sup> X <sub>0</sub> - Y <sub>1</sub> ] <sup>-</sup>	[ <sup>0,2</sup> X <sub>0</sub> - Y <sub>1</sub> - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	Y <sub>0</sub> <sup>-</sup>	[Y <sub>0</sub> - H] <sup>-</sup>	<sup>1,3</sup> A <sup>-</sup>
55	Narirutine	579 (15)	-	-	-	313 (2)	295 (3)	<b>271 (100)</b>	-	-
56	Naringine	579 (14)	433 (9)	-	-	313 (23)	295 (9)	271 (44)	-	<b>459 (100)</b>
57	Hespéridine	609 (40)	-	-	-	343 (4)	325 (9)	<b>301 (100)</b>	-	-
58	Néohespéridine	609 (70)	-	-	489 (6)	343 (5)	325 (7)	<b>301 (100)</b>	-	-
59	Eriocitrine	595 (31)	-	-	-	-	-	<b>287 (100)</b>	-	-
60	Néoériocitrine	595 (30)	-	-	-	-	-	287 (7)	-	<b>459 (100)</b>
61	Didymine	593(13)	-	-	-	327 (5)	309 (9)	<b>285 (100)</b>	-	-
62	Poncirine	593 (10)	-	-	473 (2)	327 (4)	309 (1)	<b>285 (100)</b>	-	-
63	Rutine	609 (91)	-	-	-	343 (3)	-	301 (61)	<b>300 (100)</b>	-
64	Daticine	593 (30)	-	-	-	327 (2)	-	<b>285 (100)</b>	284 (16)	-
65	Kaempférol-7- <i>O</i> -néohespéridoside	593 (23)	-	429 (2)	473 (2)	327 (3)	-	<b>285 (100)</b>	284 (11)	-
66	Diosmine	607 (90)	-	-	-	341 (1)	-	<b>299 (100)</b>	198 (2)	-
67	Néohespéridine dihydrochalcone	611 (55)	-	447 (3)	491 (12)	345 (3)	327 (17)	<b>303 (100)</b>	-	-

Les ions en gras correspondent au pic de base.

L'abondance relative (%) de chaque ion est indiquée entre parenthèse.

c) *Etude des flavonoïdes di-O-glycosylés et di-C,O-glycosylés*

La lutéoline-3',7-di-O-glucoside **68** possède un squelette aglycone de type flavone substitué par deux glucoses avec des liaisons aglycone-sucre de type C-O en position 7 sur le cycle A et 3' sur le cycle B. Les ions  $Y^{3_0^-}$  ou  $Y^{7_0^-}$  ( $m/z$  447) sont pic de base du spectre de la molécule et caractérisent la perte d'un des deux glucoses à partir de l'ion quasi-moléculaire (tableau 14). Par ailleurs, le fragment intense de type  $Y_0^-$  ( $m/z$  285) est caractéristique de la masse de la partie aglycone. Enfin, l'observation simultanée des ions  $[Y_0 - H]^-$  et  $[Y_0 - 2H]^-$  confirme la structure di-O-glycosylée du composé.

Tableau 14 : Récapitulatif des ions ( $m/z$ ) observés pour la lutéoline-3',7-di-O-glucoside en mode ESI négatif

n°	Composé	$[M - H]^-$	$Y_0^-$	$^{0,2}X_0$	$[^{0,2}X_0 - H_2O]^-$	$Y_0^-$	$[Y_0 - H]^-$	$[Y_0 - 2H]^-$
<b>68</b>	Lutéoline-3',7-di-O-glucoside	609 (10)	<b>447 (100)</b>	-	-	285 (65)	284 (4)	283 (1)

Les ions en gras correspondent au pic de base.

L'abondance relative (%) de chaque ion est indiquée entre parenthèse.

La saponarine **69** possède également un squelette flavone (apigénine) substitué en position 7 par un glucose (liaison aglycone-sucre de type C-O) mais à la différence de la molécule précédente la liaison entre l'aglycone et le second sucre est une liaison de type C-C (position 6). Du fait de cette liaison, la saponarine **69** présente un spectre de masse (tableau 15) plus complexe et plus informatif que le dérivé di-O-glycosylé **68**. En effet, nous ne retrouvons pas les ions  $Y^{7_0^-}$  (perte d'un glucose) comme pic de base mais des ions  $[Y^{7_0} - ^{0,2}X^6_0]^-$  issus de la perte conjuguée du sucre O-glycosylé et d'une partie du sucre C-glycosylé. Issu de ce type de fragmentation, nous remarquons également la présence d'ions abondants ( $[Y^{7_0} - ^{1,5}X^6_0]^-$  et  $[Y^{7_0} - ^{0,3}X^6_0]^-$ ) qui ne sont pas rapportés avec la lutéoline-3',7-di-O-glucoside **68**. Contrairement à cette dernière, nous observons par ailleurs des ions  $Z^{7_0^-}$  et  $[Z^{7_0} - ^{0,3}X^6_0]^-$  en faible intensité.

Tableau 15 : Récapitulatif des ions ( $m/z$ ) observés pour la saponarine en mode ESI négatif

n°	Composé	$[M - H]^-$	$Y^{7_0^-}$	$^{0,2}X^6_0$	$Z^{7_0^-}$	$[Y^{7_0} - ^{1,5}X^6_0]^-$	$[Y^{7_0} - ^{0,3}X^6_0]^-$	$[Y^{7_0} - ^{0,2}X^6_0]^-$	$[Z^{7_0} - ^{0,3}X^6_0]^-$
<b>69</b>	Saponarine	593 (42)	431 (12)	473 (8)	413 (2)	297 (65)	341 (15)	<b>311 (100)</b>	323

Les ions en gras correspondent au pic de base.

L'abondance relative (%) de chaque ion est indiquée entre parenthèse.

Comme indiqué dans le tableau 11, la robinine **70** est formée d'un squelette flavonol (kaempférol) di-*O*-glycosylé en position 7 du cycle A par un rhamnose (monosaccharide) et en position 3 du cycle C par un robinose (disaccharide : rhamnose + galactose). Le pic de base de cette molécule correspond au fragment  $Y_0^{7-}$  qui est issu de la perte du rhamnose en position 7 (tableau 16). La molécule déprotonée subit également la perte du disaccharide en position 3 (observation de l'ion  $Y_0^{3-}$ ). Nous signalons également la présence d'un ion caractéristique de la partie aglycone au travers du fragment  $[Y_0^{7-} - Y_0^{3-}]^-$ . Enfin, nous rapportons en moindre intensité la présence d'une série d'ions typiques des flavonols *O*-glycosylés ; il s'agit des fragments  $[Y_0^{7-} - Y_0^{3-} - H]^-$ ,  $[Y_0^{7-} - Y_0^{3-} - 2H]^-$  et  $[Y_0^{3-} - H]^-$ .

Tableau 16 : Récapitulatif des ions (*m/z*) observés pour la robinine en ESI mode négatif

n°	Composé	[M -H] <sup>-</sup>	$Y_0^{7-}$	$Y_0^{7-} - Y_0^{3-}$	$[Y_0^{7-} - Y_0^{3-} - H]^-$	$[Y_0^{7-} - Y_0^{3-} - 2H]^-$	$Y_0^{3-}$	$[Y_0^{3-} - H]^-$	$Y_0^{3-} - ^{0,2}X_0^{7-}$
<b>70</b>	Robinine	739 (34)	<b>593</b> <b>(100)</b>	285 (11)	284 (8)	283 (7)	431 (3)	430 (10)	327 (2)

Les ions en gras correspondent au pic de base.

L'abondance relative (%) de chaque ion est indiquée entre parenthèse.

Récemment acquise au laboratoire, la technique de spectrométrie de masse en tandem a été appliquée à l'étude de flavonoïdes connus (glycosylés ou non) afin de comprendre les mécanismes de fragmentation des composés phénoliques.

Ces travaux ont permis de valider notre méthodologie, de regrouper des règles de fragmentation qui pourront nous guider efficacement dans l'analyse de constituants non référencés dans notre bibliothèque.

Ainsi, nous avons passé en revue les fragments caractéristiques de certains squelettes aglycones voire même du type de substituant (groupement : hydroxyle ou méthoxy) qu'ils contiennent. Nous avons également vu comment les spectres de masse peuvent nous renseigner sur la nature des sucres liés à l'aglycone (mono- ou di-saccharide : hexose, désoxyhexose, pentose) mais aussi sur le type de liaison entre le sucre et l'aglycone (C-O ou C-C).

En conclusion, le regroupement en un seul corpus de toutes ces informations nous facilitera la tâche lorsque nous serons confrontés à une molécule absente de la bibliothèque. Il nous permettra *a minima* de connaître plus aisément la masse du composé, le type de squelette flavonique, le type et le nombre de substituant, le type de sucre et la nature de la liaison qui le lie à l'aglycone.

## Partie B :

### Valorisation et qualification des végétaux et des spiritueux

---

Les propriétés organoleptiques (odeur, couleur, astringence) des produits à forte valeur ajoutée (huiles essentielles, liqueurs, eaux de vie, etc.) dérivés du myrte et du cédrat sont notamment imputables aux composés volatils et phénoliques présents dans ces matrices.

Dans cette partie de thèse, par nos travaux nous souhaitons mettre en évidence une éventuelle spécificité de *Myrtus communis* L. et de *Citrus medica* L. var. *corsican* de Corse à travers l'identification de marqueurs moléculaires pouvant permettre de certifier les origines botaniques et géographiques des productions issues de ces végétaux.

Cette démarche de qualification est destinée à s'intégrer au sein d'une action plus ample qui serait la mise en place d'une Appellation d'Origine Contrôlée (AOC) ou d'une Indication Géographique Protégée (IGP). De plus, une meilleure connaissance de la composition chimique de ces fruits ainsi que des produits qui en sont dérivés nous permettra de mieux comprendre comment les composés d'intérêt sont transmis lors de la phase de fabrication qui pourra être optimisée en termes de coûts et de temps. Cette rationalisation de la procédure permettra aux industriels d'obtenir des produits dont la qualité sera maîtrisée et normée, d'une part, et d'augmenter leur production à moindre frais dans une optique de développement économique de filière, d'autre part. La réunion de ces conditions permettra aux producteurs insulaires, non seulement de mieux répondre à la demande en produits identitaires des chaînes de la grande distribution au niveau local mais aussi d'envisager une logique d'exportation.

La problématique de nos travaux vise donc à caractériser la variabilité chimique en volatils (huiles essentielles) et en composés phénoliques (extraits alcooliques) en fonction de la localisation géographique des échantillons pour le myrte et en fonction des variétés pour le cédrat.

## I. Le myrte

Nos recherches ont pour objectif : (i) d'étudier la variabilité chimique des baies de myrte afin de déceler une typicité micro-régionale à travers l'étude de plusieurs stations ; (ii) de qualifier les liqueurs et les eaux de vie élaborées en Corse et (iii) et de mettre en évidence des corrélations entre les compositions volatiles et phénoliques des baies et celles des spiritueux correspondants.

Ce chapitre débute par une étude bibliographique axée sur la botanique, les usages que l'Homme fait de cette plante et sur les propriétés biologiques réelles ou avérées du myrte, d'une part, et sur les compositions chimiques en volatils (fraction légère) et en polyphénols (fraction lourde) des parties aériennes, d'autre part. Il s'ensuit une étude sur la composition chimique de la fraction volatile des baies, des liqueurs et des eaux de vie dans un premier temps, et de la fraction phénolique des baies et des liqueurs dans un second temps.

Les baies du myrte de Corse (*Myrtus communis* L.) utilisées pour la production de liqueurs et d'eaux de vie ont été caractérisées par analyse en CPG-DIF et CPG/SM des huiles essentielles et des fractions volatiles pré-concentrées par MEPS, d'une part, et par celle en CLHP/DAD et CLHP/SM des extraits méthanoliques, d'autre part. Ces études ont été menées sur un ensemble d'échantillons représentatif de la distribution géographique des populations de myrte en Corse.

Les constituants volatils des boissons alcoolisées ont été extraits à l'aide de deux techniques, en l'occurrence par extraction liquide-liquide (ELL) et par micro-extraction en phase solide (MEPS). Les composés ont été identifiés et quantifiés selon la méthodologie mise en œuvre au laboratoire et décrite dans le chapitre précédent (cf. Partie A III.1).



## I.1. Bibliographie

### I.1.1. Botanique et ethnobotanique

Le genre *Myrtus* appartient à la famille des Myrtaceae. Originaire du bassin méditerranéen, il comprend une cinquantaine d'espèces dont certaines sont également présentes en Asie occidentale, en Amérique du sud et en Australie [Arburi, Arbre, Arbignuile - Savoirs populaires sur les plantes de Corse, 1985 ; Coste, 1937]. *Myrtus communis* L. (myrte commun) est un arbrisseau aromatique toujours vert mesurant de 1 à 3 mètres à feuilles opposées, très rapprochées, subsessiles, ovales-lancéolées aiguës, entières, coriaces, persistantes, glabres et luisantes (figure 38). En Corse, il est présent au niveau de l'horizon inférieur de l'étage de végétation mésoméditerranéen à une altitude inférieure à 200 mètres [Jeanmonod et Gamisans, 2007]. Les fleurs blanches, axillaires, solitaires, longuement pédonculées apparaissent à partir de la mi-juin. Les baies d'un noir bleuâtre sont ovoïdes (environ 5 mm de diamètre), charnues, à graines peu nombreuses et couronnées par le calice. La pleine maturité de ces fruits est atteinte au mois de novembre.



Figure 38 : Croquis d'un rameau de *Myrtus communis* L. [Coste, 1937]

Depuis la plus haute antiquité, le myrte a été utilisé en médecine traditionnelle comme antiseptique et désinfectant ; il était employé dans l'Égypte ancienne pour soigner les troubles de la peau et les infections des sinus [Bird, 2003]. En Perse, on en usait, sous la forme d'un

cataplasme chaud, pour traiter les furoncles. En Afrique du Nord, les fleurs séchées sont préconisées pour soulager l'asthme et pour traiter la variole. Enfin, les afro-américains inhalent des vapeurs chaudes de thé à base de myrte pour lutter contre les migraines causées par un rhume ou une grippe.

En raison de ses propriétés balsamiques, le myrte commun a trouvé de multiples applications dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires [Coda, 1998]. Dans certaines régions méditerranéennes, la macération des baies dans l'alcool est utilisée pour la préparation de liqueurs et de vins ou pour confectionner des eaux de vie. Elles peuvent également servir à agrémenter certains plats de viandes comme les gibiers (lièvres, sangliers). Les feuilles peuvent servir à aromatiser les préparations de viandes en sauce ou, en les faisant brûler, à parfumer les grillades.

Par ailleurs, les vertus médicinales de *Myrtus communis* L. ont été démontrées par l'étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de myrte d'Iran [Yadegarinia et coll., 2006]. Celle-ci, dont la composition chimique est dominée par l' $\alpha$ -pinène (29,1%), le limonène (21,5%), le 1,8-cinéole (17,9%) et le linalol (10,4%), montre une activité biologique sur des souches d'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*.

L'activité antioxydante des extraits méthanoliques de feuilles de myrte ont été étudiées par Gardeli et coll. [2008] qui ont mis en évidence une augmentation de cette activité en relation avec une élévation de la concentration en phénols totaux au cours du cycle végétatif (de février à août). Plus récemment, Wannes et coll. [2010] ont également mesuré les activités antioxydantes des extraits méthanoliques et des huiles essentielles de feuilles, de tiges et de fleurs. Ils constatent que, quelle que soit la partie du végétal étudiée, l'extrait au méthanol manifeste une activité bien supérieure à celle observée pour les huiles essentielles. Les auteurs ont aussi démontré que les extraits méthanoliques peuvent s'avérer plus efficaces que les antioxydants synthétiques. Enfin, Tuberoso et coll. [2010] ont signalé que le pouvoir antioxydant est plus important avec les extraits de baies à l'éthanol qu'avec ceux à l'acétate d'éthyle ou à l'eau.

## I.1.2. Composition chimique

### a) *Les composés volatils*

La composition en volatils de *Myrtus communis* L a fait l'objet de nombreuses études ; la grande majorité de celles-ci concernent l'analyse des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation des feuilles. En 1976, Lawrence [1976] a établi, pour la première fois, une composition riche en monoterpènes avec l' $\alpha$ -pinène et le 1,8-cinéole comme composés majoritaires. Les travaux successifs ont mis en évidence une variabilité de la composition chimique des huiles essentielles en fonction de l'origine géographique du myrte commun. La quasi-totalité des huiles essentielles présente une abondance élevée en 1,8-cinéole (19-45%) ; cependant, deux principaux chimiotypes ont été distingués sur la base de la présence ou non d'acétate de myrtényle :

- le premier groupe, caractérisé par des teneurs importantes en  $\alpha$ -pinène (8-36%) et en acétate de myrtényle (9-36%), comprend les huiles essentielles du Maroc [Gautier et coll., 1988 ; Boelens et Jimenez, 1991 ; Garry et Chalchat, 1992], du Portugal [Boelens et Jimenez, 1991], de France continentale [Gautier et coll., 1988], d'Albanie [Boelens et Jimenez, 1991], de Yougoslavie [Garry et Chalchat, 1992], d'Espagne [Boelens et Jimenez, 1991, 1992] et de Grèce [Gardeli et coll., 2008].
- le second groupe, marqué par de fortes abondances en 1,8-cinéole (20-40%) et en  $\alpha$ -pinène (20-45%), rassemble les huiles essentielles d'Iran [Weyerstahl et coll., 1994] et du Liban [Garry et Chalchat, 1992]. Au sein de ce groupe, nous trouvons également les huiles essentielles de Tunisie [Garry et Chalchat, 1992; Wannas et coll., 2010], de Sardaigne [Tateo et Picci, 1982] et de Corse [Bradesi et coll., 1997] qui se caractérisent par des taux élevés en  $\alpha$ -pinène (50-60%) et des teneurs plus faibles en 1,8-cinéole (20-30%).

Cependant, il convient d'être plus nuancé. Certaines huiles essentielles du Maroc [Gautier et coll., 1988] et de France [Gautier et coll., 1988] rattachées au premier groupe présentent des taux élevés en terpinène-4-ol (8-10%). De façon analogue, certaines huiles essentielles d'Espagne [Boelens et Jimenez, 1991, 1992] montrent une abondance particulièrement marquée en acétate de myrtényle (35%) et une proportion relativement faible en  $\alpha$ -pinène (8%). Enfin, les huiles essentielles de Grèce [Garry et Chalchat, 1992] se

singularisent de celles d'autres provenances par une quantité appréciable en linalol (10%) et limonène (15%).

S'agissant plus spécifiquement de la composition de l'huile essentielle de Corse [Bradesi et coll., 1997], elle est constituée de 18 composés dont les majoritaires sont l' $\alpha$ -pinène (54,3%), le 1,8-cinéole (24,7%), le limonène (5,3%), l'acétate de géranyle (1,5%) et l' $\alpha$ -terpinéol (1,3%). En outre, la composition chimique s'est révélée relativement stable au cours du cycle végétatif de juin à novembre.

En ce qui concerne les baies de *Myrtus communis* L., la bibliographie sur la composition volatile est nettement moins abondante. La première étude a été réalisée par Mazza en 1983 [1983] à partir de fruits d'origine italienne. L'auteur a identifié et quantifié par CPG-DIF et CPG/SM 16 terpènes hydrocarbonés et 38 composés oxygénés (terpéniques ou non) dans les extraits au méthanol. Les hydrocarbonés majoritaires sont l' $\alpha$ -pinène (77,1 mg/kg), le limonène (18,4 mg/kg), le p-cymène (5,7 mg/kg), le  $\delta$ -3-carène (3,9 mg/kg) et le  $\gamma$ -terpinène (3,6 mg/kg). Les constituants oxygénés les plus abondants sont le 1,8-cinéole (69,3 mg/kg), l' $\alpha$ -terpinéol (8,3 mg/kg) et le linalol (6,0 mg/kg).

Plus récemment, Flamini et coll. [2004] ont étudié la fraction volatile pré-concentrée par MEPS de baies récoltées dans deux stations italiennes. Les analyses également réalisées par CPG-DIF et CPG/SM ont permis d'identifier l' $\alpha$ -pinène (47,2% et 24,7%), le 1,8-cinéole (14,6% et 8,0%), le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène (7,9% et 14,4%) et le  $\beta$ -élémane (présent dans une seule station à 17,2%) comme composés majoritaires.

Tuberoso et coll. [2006] ont étudié la composition volatile des extraits alcooliques (éthanol) et des huiles essentielles de baies issues de dix stations réparties sur l'ensemble de la Sardaigne. En premier lieu, ils ont constaté que les profils chromatographiques obtenus après extraction et après hydrodistillation sont qualitativement similaires. Ensuite, en fonction de la localisation des échantillons, ils ont observé de fortes variations des abondances pour les composés majoritaires : limonène (3,7-44,5%),  $\alpha$ -pinène (18,2-38,9%), 1,8-cinéole (5,8-24,8%) et p-cymène (0,1-10,3%).

Enfin, Wannas et coll. [2009] ont réalisé un suivi de la composition chimique de l'huile essentielle de baies de myrte de Tunisie en fonction du stade végétatif. Pour cela, ils ont prélevé les fruits pendant 6 mois (d'août à janvier) et analysé par CPG-DIF et CPG/SM les huiles essentielles correspondantes. Ils ont identifié 47 composés, et noté que les composés majoritaires sont le 1,8-cinéole (7,3-41,0%), l'acétate de géranyle (1,8-20,5%), le linalol (0,7-18,9%) et l' $\alpha$ -pinène (1,2-12,6%) avec de fortes variations de leur teneur en fonction de la date de récolte. En août, l'huile essentielle est dominée par l'acétate de géranyle (20,5%), l' $\alpha$ -pinène (12,6%) et le  $\beta$ -caryophyllène (10,8%). Les teneurs de ces trois composés diminuent au fil des mois pour atteindre en janvier : 2,1%, 1,2% et 1,0%, respectivement. A l'inverse, les abondances du 1,8-cinéole et du linalol augmentent d'août (7,3% et 0,7%, respectivement) à janvier (34,6% et 9,5%, respectivement).

#### b) Les composés phénoliques

Les travaux rapportés dans la littérature sur les composés phénoliques de *Myrtus communis* L. concernent surtout les feuilles ; cependant, quelques uns d'entre eux concernent aussi les baies.

El-Sissi et El-Ansary [1967] ont réalisé les premières études sur les composés polyphénoliques du myrte commun à partir d'extraits à l'acétate d'éthyle, au méthanol et à l'eau de feuilles de myrte d'Egypte. Ils ont ainsi identifié cinq composés : l'acide gallique, l'acide ellagique, la myricétine, la myricitrine et le 3,6-di-galloyl-glucose.

Romani et coll. [1999] ont étudié par CLHP-DAD et CLHP/SM-ESI la composition en polyphénols des extraits à l'éthanol 70% des feuilles. L'analyse réalisée à plusieurs longueurs d'onde (254 nm, 280 nm, 310 nm, 330 nm et 360 nm) a conduit à l'identification de dix composés : l'acide gallique, l'acide caféique, l'acide ellagique, la (-) catéchine, la (-) épicatechine, la (-) épigallocatechine, la myricétine-3-*O*-galactoside, la myricétine-3-*O*-rhamnoside, la quercétine-3-*O*-galactoside et la quercétine-3-*O*-rhamnoside.

Gardeli et coll. [2008] ont réalisé l'extraction par macération au méthanol de feuilles de myrte d'origine grecque à trois périodes de l'année : février, mai et août. Ils constatent que

la concentration massique en phénols totaux varie au cours du cycle végétatif passant de 307 mg/g de plante en février, à 352 mg/g en mai et à 373 mg/g en août.

En réalisant une extraction de feuilles de myrte par un mélange eau/acétone (30:70), puis quatre extractions successives (n-hexane, acétate d'éthyle, n-butanol et eau) de cette solution, Yoshimura et coll. [2008] ont signalé pour la première fois la présence d'oenoteheine B, d'eugeniflorine D<sub>2</sub>, de tellimagrandine I, de tellimagrandine II et de myricétine-3-*O*- $\beta$ -D-xyloside dans ce substrat.

Wannes et coll. [2010] ont analysé les extraits méthanoliques obtenus séparément à partir de feuilles, de tiges et de fleurs du myrte. Ils ont identifié cinq acides phénoliques, huit flavonoïdes et un groupe de tanins hydrolysables nommés gallotanins. Globalement, les feuilles sont les organes les plus riches en composés phénoliques (11,21 mg/g de matière sèche), suivies des fleurs (6,02 mg/g) et des tiges (3,03 mg/g). Les auteurs ont également constaté que les gallotanins, particulièrement abondants dans l'extrait de feuilles (8,75 mg/g), représentent 79,4% de la masse des composés phénoliques totaux. Les acides phénoliques ne représentent que 1,40 mg/g (soit 12,5% de la masse des composés phénoliques) avec en premier lieu l'acide gallique (1,15 mg/g). Les flavonoïdes exhibent une concentration de 0,91 mg/g (soit 8,11% des composés phénoliques) avec la quercétine-3-D-*r*ahmnoside et la myricétine-3-D-galactoside comme composés majoritaires à des concentrations massiques de 0,29 et 0,23 mg/g, respectivement. En ce qui concerne les extraits de fleurs, ils ne contiennent que des gallotanins (3,50 mg/g, soit 60% des composés phénoliques) et de l'acide gallique (2,34 mg/g, soit 38,3% des composés phénoliques). Enfin, les extraits de tiges sont riches en flavonoïdes (1,86 mg/g) dont le composé majoritaire est la catéchine (1,12 mg/g) et en acides phénoliques (1,17 mg/g) avec l'acide gallique (1,02 mg/g) comme principal constituant.

Diaz et Aberger [1987] ont analysé les flavonoïdes et les acides phénoliques contenus dans les graines des baies de myrte d'Espagne. L'extraction a été effectuée par trois macérations successives dans le méthanol puis les composés ont été séparés par chromatographie préparative sur couche mince bidimensionnelle. L'analyse par spectrophotométrie UV-visible des fractions a permis l'identification de la quercétine, la patulétine, les acides ellagique et gallique.

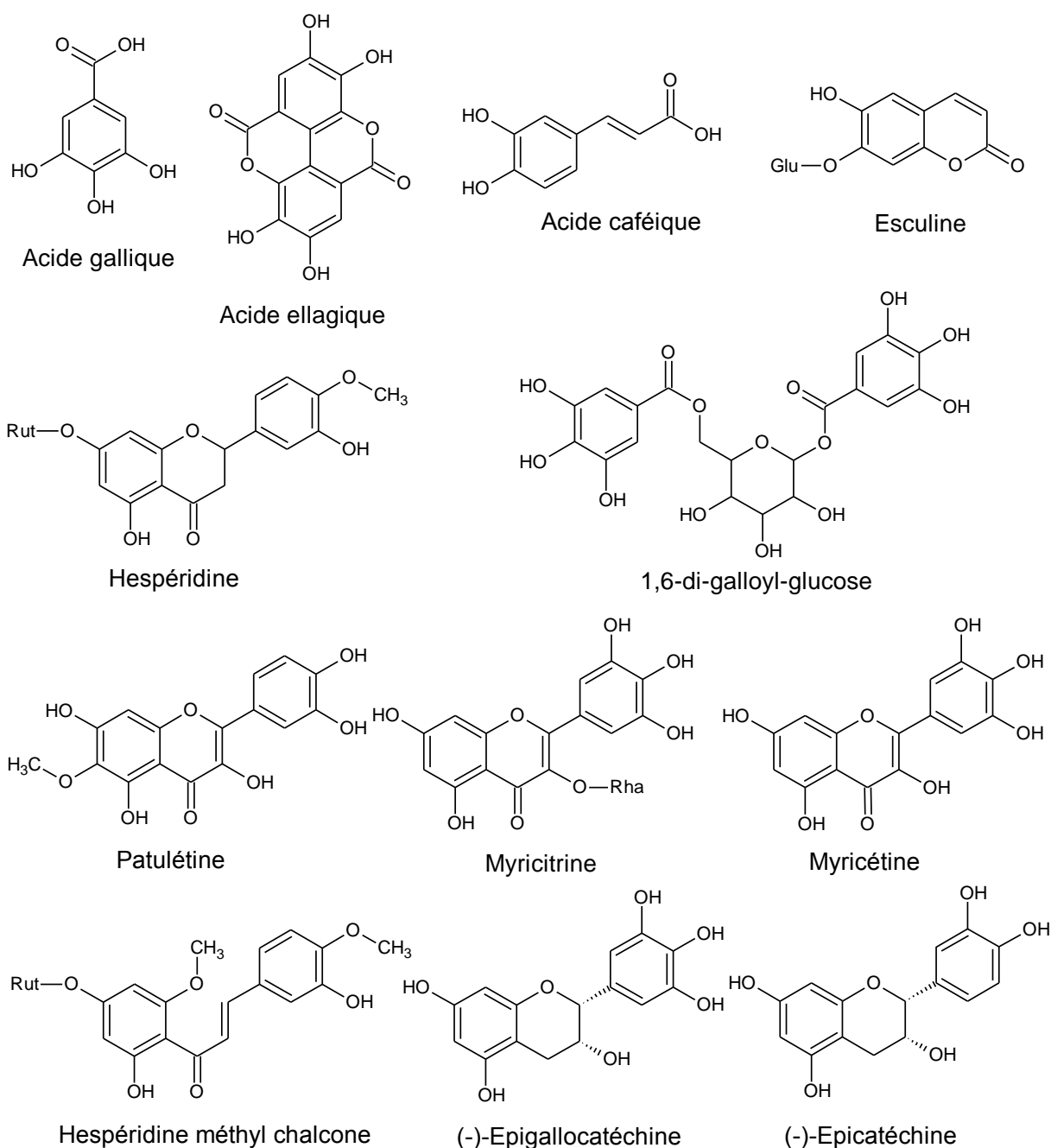
Dans les travaux de Martin et coll. [1999], les composés polyphénoliques du péricarpe des baies de myrte d'Espagne ont été extraits par macération dans un mélange méthanol/eau (60:40), séparés par chromatographie sur colonne ouverte (phase stationnaire : polyamide, éluants : méthanol puis un gradient méthanol/acétone/eau) et identifiés par RMN du carbone-13 et du proton. Les auteurs ont ainsi rapportés quatre composés dans les extraits dont trois pour la première fois dans le myrte : la myricétine, l'hésperidine, l'hésperidine méthyl chalcone et l'esculine.

Plus récemment, Montoro et coll. [2006a, 2006b] ont travaillé sur la stabilité et l'activité antioxydante des polyphénols extraits des baies du myrte. L'extraction a été effectuée par macération des baies dans l'éthanol à 70% pendant 40 jours. Par CLHP-DAD (350 nm et 520 nm) et CLHP/SM-ESI, ils ont identifié et quantifié huit anthocyanes dont trois sont des constituants majoritaires : la delphinidine-3-*O*-glucoside, la pétunidine-3-*O*-glucoside et la cyanidine-3-*O*-glucoside. À des teneurs plus faibles, ils ont également mis en évidence la présence de paéonidine-3-*O*-glucoside, de delphinidine-3-*O*-arabinoside, de pétunidine-3-*O*-arabinoside, de malvidine-3-*O*-arabinoside, et de paéonidine-3-*O*-arabinoside. Enfin, ils ont relevé la présence de six flavonoïdes dont les majoritaires sont la myricétine-3-*O*-galactoside, la myricétine-3-*O*-rhamnoside et la quercétine-3-*O*-glucoside ainsi que celle de la myricétine-3-*O*-arabinoside, la quercétine-3-*O*-rhamnoside et la myricétine à des concentrations plus faibles. Leurs travaux ont permis de suivre l'évolution mensuelle des teneurs en anthocyanes et en flavonoïdes dans les extraits conservés à l'abri de la lumière pendant une année. De la sorte, ils ont pu montrer que les concentrations en flavonoïdes restent stables alors que celles des anthocyanes diminuent rapidement à partir de quatre mois jusqu'à s'annuler après six mois de conservation.

Tuberoso et coll. [2010] ont étudié la composition chimique d'extraits obtenus par macération de baies de Sardaigne dans trois solvants : éthanol, eau et acétate d'éthyle. L'éthanol permet l'extraction d'une plus grande quantité de matière sèche (99,0 g/l), suivi par l'eau (86,3 g/l), puis par l'acétate d'éthyle (12,8 g/l). Au niveau des compositions phénoliques, trois familles de composés sont répertoriées : les acides phénoliques, les anthocyanes et les flavonoïdes. L'extrait à l'éthanol se compose de 2195,0 mg/l d'anthocyanes, de 1492,8 mg/l de flavonoïdes et de 352,2 mg/l d'acides phénoliques. L'extrait à l'acétate d'éthyle est dominé par les flavonoïdes (1389,0 mg/l) et les acides phénoliques (600,5 mg/l) alors que les anthocyanes

sont faiblement représentés (36,4 mg/l). Enfin, l'extrait à l'eau contient 195,9 mg/l d'acides phénoliques, 103,0 mg/l de flavonoïdes et 74,7 mg/l d'anthocyanes.

Les structures des principaux composés phénoliques identifiés dans les extraits de feuilles et de baies du myrte sont reprises dans la figure 39.





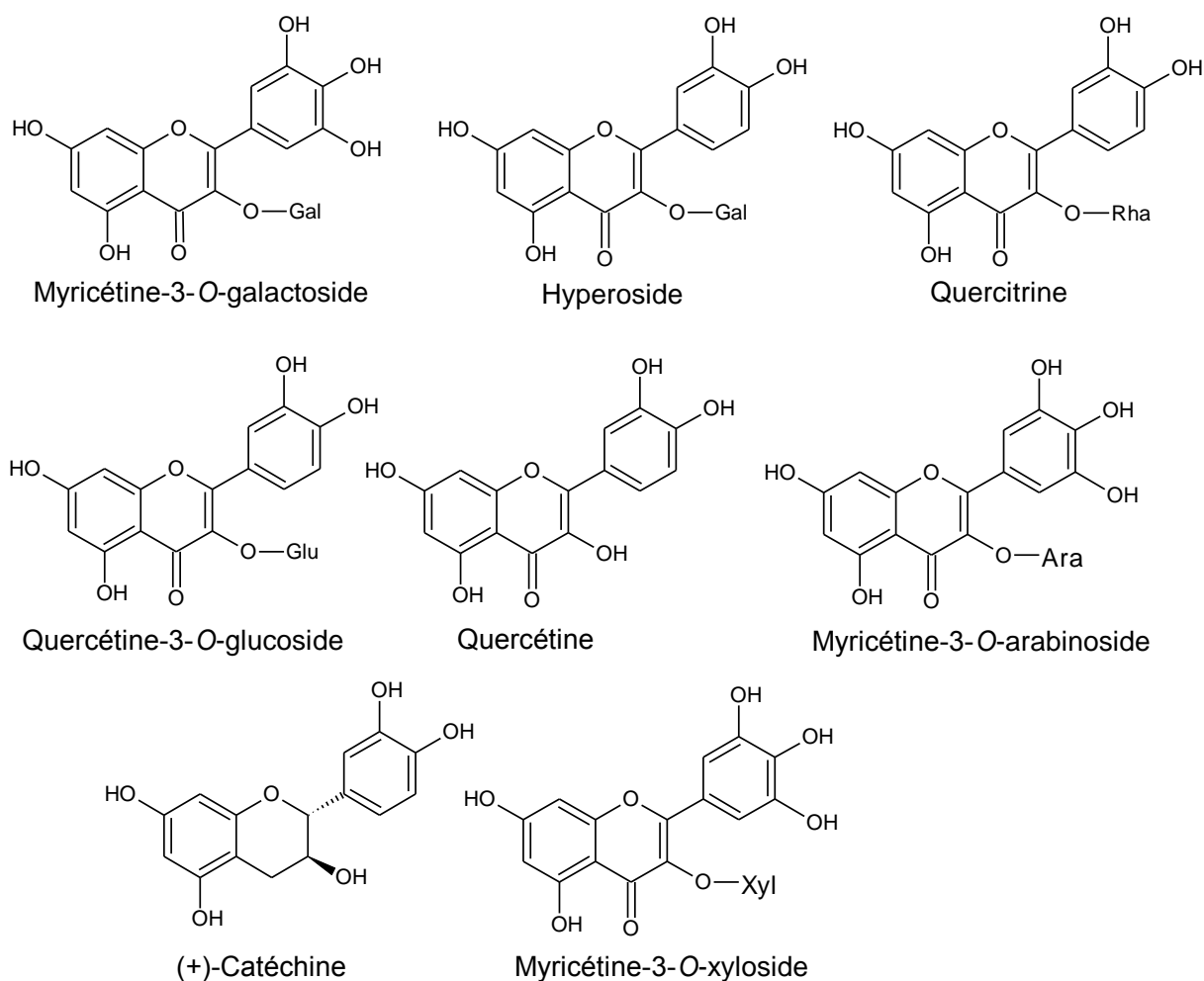
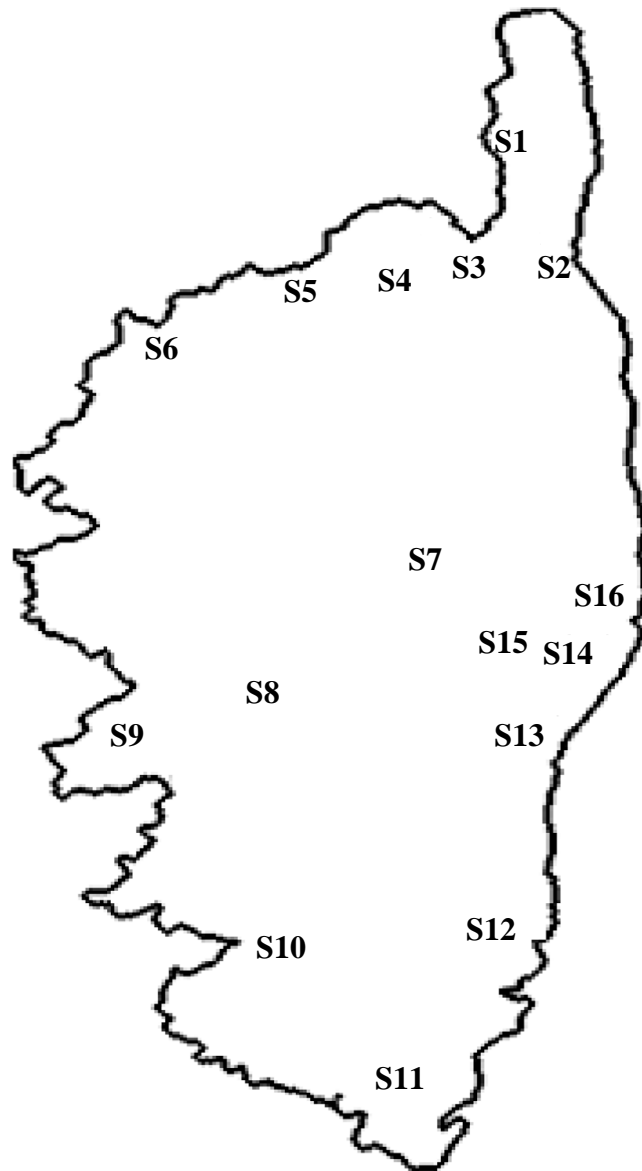


Figure 39 : Structures des composés phénoliques identifiés dans les extraits de myrte

## I.2. Caractérisation chimique des baies de myrte de Corse et des spiritueux

### I.2.1. Variabilité intraspécifique de la composition volatile des baies

Les baies de myrte ont été cueillies sur 16 stations (**S1-S16**) réparties sur l'ensemble de la Corse (figure 40).



**S1** : Canari; **S2** : Bastia; **S3** : Saint Florent; **S4** : Agriates; **S5** : Lozari; **S6** : Calvi; **S7** : Corte; **S8** : Peri; **S9** : Ajaccio; **S10** : Sartene; **S11** : Bonifacio; **S12** : Porto Vecchio; **S13** : Travo; **S14** : Morta; **S15** : Abbazzia; **S16** : Aleria.

Figure 40 : Localisation des stations d'échantillonnage de *Myrtus communis* L.

a) *Etude des huiles essentielles*

Les huiles essentielles de myrte ont été préparées par hydrodistillation des baies issues des 16 stations (**S1-S16**). Les rendements d'extraction sont compris entre 0,03 et 0,04%. L'analyse des 16 huiles essentielles par CPG-DIF et CPG/SM a permis d'identifier 39

composés (tableau 17) en utilisant la méthodologie décrite dans la **Partie A III.1**. Ces composés se répartissent en 15 monoterpènes hydrocarbonés (**2-12, 14-17**), 11 monoterpènes oxygénés (**13, 18, 20-28**), 9 sesquiterpènes hydrocarbonés (**29-37**), 2 sesquiterpènes oxygénés (**38-39**) et 2 composés oxygénés non terpéniques (**1, 19**). Le taux d'élucidation de la composition chimique oscille entre 97,9 et 99,9% de la composition totale. Les huiles essentielles sont dominées par les monoterpènes hydrocarbonés et par les monoterpènes oxygénés représentant respectivement 59,3 à 64,2% et 32,0 à 36,2% de l'huile essentielle. D'un point de vue qualitatif, les échantillons de l'ensemble des stations présentent une composition chimique homogène. D'un point de vue quantitatif, les composés majoritaires sont l' $\alpha$ -pinène **3** (45,1 à 48,2%) et le 1,8-cinéole **13** (25,0 à 27,3%) suivi dans une moindre proportion par le limonène **12** (4,7 à 5,5%), le p-cymène **11** (1,9 à 3,2%) et le  $\delta$ -3-carène **9** (1,6 à 2,8%). Sur la base de la simple observation des chromatogrammes, il apparaît que les huiles essentielles des différentes stations présentent des profils chromatographiques similaires aussi bien qualitativement que quantitativement.

L'homogénéité des compositions chimiques des huiles essentielles de baies de myrte de Corse sur l'ensemble du territoire est confirmée par une Analyse de Variance (ANOVA). Les résultats (annexe I.1) montrent bien qu'il n'y a pas de variations significatives entre les échantillons (pour  $p < 0,05$ ). Nous pouvons donc établir une composition moyenne caractérisée par l' $\alpha$ -pinène **3** ( $46,5 \pm 0,9\%$ ), le 1,8-cinéole **13** ( $26,0 \pm 0,7\%$ ), le limonène **12** ( $5,1 \pm 0,2\%$ ), le p-cymène **11** ( $2,7 \pm 0,6\%$ ) et le  $\delta$ -3-carène **9** ( $2,3 \pm 0,5\%$ ). La teneur moyenne de chaque constituant est reportée dans la dernière colonne du tableau 17.

De la comparaison avec la littérature, il apparaît que le profil chromatographique « type » des baies de myrte de Corse se distingue fortement de celui observé en Tunisie (dominé par le 1,8-cinéole, l'acétate de géranyle et le linalol) [Wannes et coll., 2009]. A contrario, il est à rapprocher de celui des baies de Sardaigne [Tuberoso et coll., 2006] ; cependant, il faut nuancer cette constatation car les huiles essentielles de Sardaigne ont montré d'importantes variations dans les teneurs en composés majoritaires en fonction de la provenance des fruits.

Enfin, nous constatons que les huiles essentielles des baies et des feuilles du myrte de Corse ont des compositions chimiques analogues [Bradesi et coll., 1997].

Tableau 17 : Composition chimique des huiles essentielles de baies de *Myrtus communis* L. en fonction de la localisation des échantillons.

n°	Composés	Ir L <sup>a</sup>	Ir A <sup>b</sup>	Ir P <sup>c</sup>	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	Moyenne
1	Isobutyrate d'isobutyle	-	902	1090	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2 ± 0,1
2	α-Thujène	932	922	1023	1,0	1,0	0,7	0,7	1,0	1,0	0,7	0,7	1,0	0,7	0,3	0,5	0,9	0,8	0,9	0,5	0,8 ± 0,2
3	α-Pinène	936	931	1022	45,8	47,3	47,8	45,3	45,8	46,9	48,2	45,7	46,5	46,7	47,0	45,1	46,2	46,8	46,3	47,1	46,5 ± 0,9
4	α-Fenchène	941	943	1047	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	tr	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	0,1 ± 0,1
5	Camphène	950	943	1066	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1 ± 0,1
6	β-Pinène	978	970	1110	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6 ± 0,0
7	Myrcène	987	979	1159	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2 ± 0,1
8	α-Phellandrière	1002	997	1164	0,5	0,5	0,4	0,4	0,5	0,5	0,4	0,4	0,5	0,4	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,3	0,4 ± 0,1
9	δ-3-Carène	1010	1005	1147	2,7	2,7	1,6	1,6	2,7	2,7	1,6	1,7	2,7	1,7	2,2	2,8	2,5	2,7	2,5	1,7	2,3 ± 0,5
10	α-Terpinène	1013	1008	1178	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2 ± 0,1
11	p-Cymène	1015	1010	1169	3,1	3,1	1,9	2,0	3,1	3,1	1,9	2,0	3,1	2,0	3,0	3,2	3,0	2,9	3,1	2,0	2,7 ± 0,6
12	Limonène	1025	1018	1199	5,1	5,1	4,7	5,4	5,0	5,2	4,7	5,5	5,1	5,2	4,9	5,3	5,1	4,7	5,0	5,1	5,1 ± 0,2
13	1,8-Cinéole	1024	1020	1209	25,9	25,0	26,5	26,5	25,6	25,2	26,8	26,8	25,4	27,3	25,1	26,7	26,3	25,8	25,5	26,2	26,0 ± 0,7
14	(Z)-β-Ocimène	1029	1024	1230	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1 ± 0,0
15	γ-Terpinène	1051	1047	1243	2,1	2,0	1,4	1,4	2,0	2,1	1,4	1,4	2,0	1,5	1,8	2,0	1,7	1,6	2,0	1,5	1,7 ± 0,3
16	p-Cyménène	1075	1071	1430	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1 ± 0,0
17	Terpinolène	1082	1078	1280	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0	0,9	1,0	1,0	1,3	1,0	1,1	1,0 ± 0,1
18	Linalol	1086	1081	1544	1,5	1,4	1,6	1,6	1,7	1,4	1,6	1,6	1,2	1,6	1,3	1,4	1,5	1,5	1,7	1,6	1,5 ± 0,1
19	2-Méthylbutyrate d'isobutyle*	1092	1086	1472	0,3	0,4	0,3	0,2	0,3	0,4	0,3	0,2	0,4	0,3	0,5	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3 ± 0,1
20	trans-Pinocarvéol	1126	1125	1650	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2 ± 0,0
21	Terpinèn-4-ol	1164	1161	1600	0,5	0,3	0,5	0,6	0,4	0,3	0,5	0,6	0,4	0,6	0,6	0,5	0,4	0,5	0,5	0,6	0,5 ± 0,1
22	α-Terpinéol	1176	1179	1700	2,0	1,7	2,3	3,0	2,0	1,7	2,4	3,0	1,8	2,7	2,2	2,0	1,9	2,6	2,3	2,9	2,3 ± 0,4
23	Géraniol	1235	1233	1843	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4	0,2	0,4	0,4	0,3	0,3	0,2	0,4	0,4	0,4 ± 0,1
24	Acétate de myrtényle	1313	1307	1684	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2 ± 0,1
25	Acétate d'α-terpinyle	1335	1332	1681	0,2	0,3	0,3	0,4	0,2	0,3	0,3	0,4	0,2	0,4	0,2	0,4	0,2	0,3	0,2	0,4	0,3 ± 0,1

<b>26</b>	Acétate de néryle	1342	1342	1726	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	0,1 ± 0,0
<b>27</b>	Acétate de géranyle	1362	1357	1752	2,1	2,0	2,0	2,2	2,1	2,0	2,0	2,3	2,0	2,2	1,8	2,1	1,9	2,3	2,0	2,3	2,1 ± 0,1
<b>28</b>	Méthyl eugenol	1369	1367	2009	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,4	0,5	0,7	0,5	0,4	0,5	0,5	0,6	0,5 ± 0,1
<b>29</b>	β-Elémène	1389	1388	1589	0,3	0,1	0,2	0,2	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2 ± 0,1
<b>30</b>	(E)-β-Caryophyllène	1421	1424	1591	1,0	1,0	0,7	0,8	0,9	1,1	0,7	0,8	1,0	0,7	1,1	0,9	0,8	0,7	0,9	0,8	0,9 ± 0,1
<b>31</b>	γ-Elémène	1429	1429	1604	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1 ± 0,0
<b>32</b>	α-Humulène	1455	1456	1665	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2 ± 0,1
<b>33</b>	β-Sélinène	1486	1483	1712	0,4	0,4	0,2	0,3	0,4	0,4	0,2	0,3	0,4	0,2	0,4	0,2	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3 ± 0,1
<b>34</b>	α-Sélinène	1494	1495	1520	0,2	0,4	0,2	0,3	0,2	0,4	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3 ± 0,1
<b>35</b>	β-Bisabolène	1503	1500	1720	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	tr	tr	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1 ± 0,0
<b>36</b>	δ-Cadinène	1520	1515	1749	0,1	0,1	0,2	tr	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	0,1 ± 0,0
<b>37</b>	Germacrène B	1543	1541	1728	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2 ± 0,0
<b>38</b>	Oxyde de caryophyllène	1578	1576	1980	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2 ± 0,1
<b>39</b>	α-Sélin-11-èn-4-ol	1660	1652	2241	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2 ± 0,0
Monoterpènes hydrocarbonés					62,5	64,1	60,7	59,3	62,5	63,9	61,5	59,9	63,1	60,5	61,7	61,9	62,2	62,5	62,5	60,4	61,9 ± 1,4
Monoterpènes oxygénés					33,7	32,0	34,6	35,7	33,7	32,2	35,0	36,1	32,3	36,2	32,8	34,5	33,4	34,3	33,6	35,6	34,1 ± 1,4
Sesquiterpènes hydrocarbonés					2,7	2,6	2,1	2,2	2,5	2,8	2,0	2,2	2,7	2,0	2,5	2,2	2,3	2,0	2,6	2,2	2,4 ± 0,3
Sesquiterpènes oxygénés					0,5	0,3	0,4	0,4	0,5	0,3	0,4	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4	0,4 ± 0,1
Autres					0,5	0,6	0,4	0,3	0,5	0,6	0,4	0,3	0,6	0,4	0,6	0,6	0,4	0,5	0,4	0,4	0,5 ± 0,1
<b>Total</b>					<b>99,9</b>	<b>99,6</b>	<b>98,2</b>	<b>97,9</b>	<b>99,7</b>	<b>99,8</b>	<b>99,3</b>	<b>98,9</b>	<b>99,2</b>	<b>99,5</b>	<b>98,1</b>	<b>99,6</b>	<b>98,8</b>	<b>99,7</b>	<b>99,6</b>	<b>99,0</b>	<b>99,3 ± 0,6</b>

**S1** : Canari; **S2** : Bastia; **S3** : Saint Florent; **S4** : Agriates; **S5** : Lozari; **S6** : Calvi; **S7** : Corte; **S8** : Peri; **S9** : Ajaccio; **S10** : Sartene; **S11** : Bonifacio; **S12** : Porto Vecchio; **S13** : Travo; **S14** : Morta; **S15** : Abbazzia; **S16** : Aleria.

Les n° des composés correspondent à l'ordre d'éluion sur colonne apolaire.

<sup>a</sup> Indices de rétention obtenus à partir des données de la littérature [König et coll. 2001]

<sup>b</sup> Indices de rétention obtenus sur colonne apolaire (Rtx-1)

<sup>c</sup> Indices de rétention obtenus sur colonne polaire (Rtx-wax)

Les abondances des composés sont exprimées en pourcentages relatifs.

Les composés ont été identifiés à partir de la bibliothèque « arômes » du laboratoire (sauf \* : composés identifiés à partir de la bibliothèque commerciale NIST [2008])

*b) Etude de la fraction volatile par MEPS*

Les fractions volatiles des baies de myrte des 16 stations ont été pré-concentrées par MEPS puis analysées par CPG-DIF et CPG/SM. Nous avons identifié 25 composés parmi lesquels deux composés non détectés dans l'huile essentielle : l'aromadendrène **31a** et le valencène **33a**. Le taux d'élucidation moyen des fractions volatiles est de 93,7%. Ces 25 composés se regroupent en 11 monoterpènes hydrocarbonés (**2-3**, **6-9**, **11-12**, **14-15**, **17**), 6 monoterpènes oxygénés (**13**, **18**, **21-22**, **25**, **27**), 7 sesquiterpènes hydrocarbonés (**29-33a** y compris **31a**) et 1 composé non terpénique (**19**) ; chaque groupe représente respectivement 55,0%, 35,9%, 2,4% et 0,4% de la composition volatile. Ici, encore, les profils chromatographiques des échantillons issus des 16 stations sont très proches. Le tableau 18 rapporte la teneur moyenne pour chaque constituant ; les écarts-types, relativement faibles, montrent, une nouvelle fois, l'homogénéité de la composition chimique en volatils des baies de myrte de Corse. Les composés majoritaires sont l' $\alpha$ -pinène ( $31,9 \pm 3,6\%$ ), le 1,8-cinéole ( $29,0 \pm 2,2\%$ ) et dans une moindre teneur le p-cymène ( $9,0 \pm 0,7\%$ ), le limonène ( $5,6 \pm 0,4\%$ ), le linalol ( $2,9 \pm 0,6\%$ ), le  $\delta$ -3-carène ( $2,4 \pm 0,3\%$ ) et le  $\gamma$ -terpinène ( $2,3 \pm 0,5\%$ ).

La comparaison des résultats des analyses obtenus après pré-concentration par MEPS et hydrodistillation des baies montre des différences entre les profils chromatographiques des fractions volatiles et ceux des huiles essentielles. Au niveau qualitatif, parmi les 39 composés précédemment identifiés dans les huiles essentielles, seuls 23 d'entre eux ont été détectés dans l'espace de tête (tableau 18). A l'inverse, deux constituants (**31a**, **33a**) n'ont pas été décelés dans les huiles essentielles. D'un point de vue quantitatif, les compositions chimiques des deux sortes d'échantillons présentent des analogies au niveau de certains constituants majoritaires ; il s'agit du 1,8-cinéole (29,0% vs 26,0%, respectivement) et du limonène (5,6% vs 5,1%, respectivement). Concernant l' $\alpha$ -pinène, son taux est plus faible dans l'espace de tête (31,9%) que dans l'huile essentielle (46,5%) alors que la teneur en p-cymène est plus élevée dans la fraction volatile (9,0% vs 2,7%, respectivement). D'une manière générale, on peut dire que les deux méthodes d'extraction permettent d'obtenir des données comparables quant à la composition volatile des baies ; les deux types de profils chromatographiques diffèrent surtout au niveau des constituants minoritaires. A titre d'exemple, les 16 composés (**1**, **4-5**, **10**, **16**, **20**, **23-24**, **26**, **28**, **34-39**) non détectés après extraction par MEPS ont des teneurs comprises entre 0,1 et 0,5%. De même, les composés **31a** et **33a**, identifiés

uniquement dans l'espace de tête, représentent respectivement 0,1 et 0,3% de la fraction volatile. Il en ressort que la MEPS peut être utilisée comme méthode alternative pour obtenir un « diagnostic » rapide et fiable de la composition en volatils des baies du myrte commun.

Tableau 18 : Compositions moyennes en volatils obtenues après pré-concentration par MEPS et hydrodistillation des baies de myrte.

n°	Composés	Ir L <sup>a</sup>	Ir A <sup>b</sup>	Ir P <sup>c</sup>	MEPS	Hydrodistillation
1	Isobutyrate d'isobutyle	-	902	1090	-	0,2 ± 0,1
2	α-Thujène	932	922	1023	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,2
3	α-Pinène	936	931	1022	31,9 ± 3,6	46,5 ± 0,9
4	α-Fenchène	941	943	1047	-	0,1 ± 0,1
5	Camphène	950	943	1066	-	0,1 ± 0,1
6	β-Pinène	978	970	1110	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,0
7	Myrcène	987	979	1159	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1
8	α-Phellandrène	1002	997	1164	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1
9	δ-3-Carène	1010	1005	1147	2,4 ± 0,3	2,3 ± 0,5
10	α-Terpinène	1013	1008	1178	-	0,2 ± 0,1
11	p-Cymène	1015	1010	1169	9,0 ± 0,7	2,7 ± 0,6
12	Limonène	1025	1018	1199	5,6 ± 0,4	5,1 ± 0,2
13	1,8-Cinéole	1024	1020	1209	29,0 ± 2,2	26,0 ± 0,7
14	(Z)-β-Ocimène	1029	1024	1230	0,4 ± 0,2	0,1 ± 0,0
15	γ-Terpinène	1051	1047	1243	2,3 ± 0,5	1,7 ± 0,3
16	p-Cyménène	1075	1071	1430	-	0,1 ± 0,0
17	Terpinolène	1082	1078	1280	1,5 ± 0,3	1,0 ± 0,1
18	Linalol	1086	1081	1544	2,9 ± 0,6	1,5 ± 0,1
19	2-Méthylbutyrate d'isobutyle*	1092	1086	1472	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1
20	trans-Pinocarvéol	1126	1125	1650	-	0,2 ± 0,0
21	Terpinèn-4-ol	1164	1161	1600	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,1
22	α-Terpinéol	1176	1179	1700	0,9 ± 0,2	2,3 ± 0,4
23	Géraniol	1235	1233	1843	-	0,4 ± 0,1
24	Acétate de myrtényle	1313	1307	1684	-	0,2 ± 0,1
25	Acétate d'α-terpinyle	1335	1332	1681	0,7 ± 0,2	0,3 ± 0,1
26	Acétate de néryle	1342	1342	1726	-	0,1 ± 0,0
27	Acétate de géranyle	1362	1357	1752	1,9 ± 0,4	2,1 ± 0,1
28	Méthyl eugenol	1369	1367	2009	-	0,5 ± 0,1
29	β-Elémène	1389	1388	1589	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,1
30	(E)-β-Caryophyllène	1421	1424	1591	1,0 ± 0,3	0,9 ± 0,1
31	γ-Elémène	1429	1429	1604	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
31a	Aromadendrène	1443	1437	1602	0,1 ± 0,0	-
32	α-Humulène	1455	1456	1665	0,4 ± 0,3	0,2 ± 0,1
33	β-Sélinène	1486	1483	1712	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
33a	Valencène	1494	1488	1709	0,3 ± 0,1	-
34	α-Sélinène	1494	1495	1520	-	0,3 ± 0,1

<b>35</b>	$\beta$ -Bisabolène	1503	1500	1720	-	0,1 $\pm$ 0,0
<b>36</b>	$\delta$ -Cadinène	1520	1515	1749	-	0,1 $\pm$ 0,0
<b>37</b>	Germacrène B	1543	1541	1728	-	0,2 $\pm$ 0,0
<b>38</b>	Oxyde de caryophyllène	1578	1576	1980	-	0,2 $\pm$ 0,1
<b>39</b>	$\alpha$ -Sélin-11-èn-4-ol	1660	1652	2241	-	0,2 $\pm$ 0,0
Monoterpènes hydrocarbonés					55,0 $\pm$ 3,4	61,9 $\pm$ 1,4
Monoterpènes oxygénés					35,9 $\pm$ 1,9	34,1 $\pm$ 1,4
Sesquiterpènes hydrocarbonés					2,4 $\pm$ 1,7	2,4 $\pm$ 0,3
Sesquiterpènes oxygénés					-	0,4 $\pm$ 0,1
Autres					0,4 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,1
<b>Total</b>					<b>93,7 <math>\pm</math> 2,2</b>	<b>99,3 <math>\pm</math> 0,6</b>

Les n° des composés correspondent à l'ordre d'élution sur colonne apolaire.

<sup>a</sup> Indices de rétention obtenus à partir des données de la littérature [König et coll. 2001]

<sup>b</sup> Indices de rétention obtenus sur colonne apolaire (Rtx-1)

<sup>c</sup> Indices de rétention obtenus sur colonne polaire (Rtx-wax)

Les abondances des composés sont exprimées en pourcentages relatifs.

Les composés ont été identifiés à partir de la bibliothèque « arômes » du laboratoire (sauf \* : composés identifiés à partir de la bibliothèque commerciale NIST [2008]).

### I.2.2. Fraction volatile des spiritueux

Cinq liqueurs et cinq eaux de vie ont été choisies aléatoirement dans le stock de notre partenaire industriel parmi les lots du millésime le plus récent dans le but d'établir une cartographie chimique de ces spiritueux. Les composés volatils ont été extraits par ELL en diluant les matrices dans un mélange eau/éther diéthylique/hexane, puis en agitant le mélange durant une heure. Le solvant est évaporé après décantation et séparation de la phase organique (Tuberoso et coll. [2006]). L'analyse a été faite par CPG et CPG/SM.

L'étude des liqueurs a ainsi conduit à l'identification de 39 composés rapportés au tableau 19 qui reprend la composition moyenne de l'huile essentielle à fin de comparaison. Nous ne retrouvons pas le  $\gamma$ -élémane **31** et l' $\alpha$ -sélinène **34** dans les liqueurs, par contre nous mettons en évidence la présence d'aromadendrène **31a** et de valencène **33a** non détectés dans les huiles essentielles. Ces quatre molécules sont toutefois des composés minoritaires avec des taux allant de 0,1 à 0,3% de la composition chimique totale de l'une et l'autre matrice. Dans les deux matrices, les composés majoritaires sont l' $\alpha$ -pinène **3** (46,5% dans l'huile essentielle et de 43,7% après l'ELL des liqueurs), le 1,8-cinéole **13** (26,0 et 28,9%, respectivement) et le limonène **12** (5,1 et 5,0 %, respectivement).



L'étude des eaux de vie a permis l'identification des mêmes constituants que pour les liqueurs à l'exception de quatre d'entre eux :  $\beta$ -bisabolène **35**, germacrène B **37**, oxyde de caryophyllène **38** et  $\alpha$ -sélin-11-èn-4-ol **39**. La différence qualitative avec la composition de l'huile essentielle est donc constituée par les six composés manquants et la présence de **31a** et **33a**. Comme déjà indiqué, tous ces composés ont de faibles teneurs dans les différentes matrices et somme toute, les profils chromatographiques des deux spiritueux présentent de nombreuses similitudes avec ceux obtenus pour les huiles essentielles ; en première approximation, on peut dire qu'ils sont comparables.

Les liqueurs présentent une concentration totale en volatils (3784,3  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ ) plus importante que les eaux de vie (834,8  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ ). Les deux types de spiritueux sont largement dominés par l' $\alpha$ -pinène **3** (43,7% et 52,4%, respectivement) et le 1,8-cinéole **13** (28,9% et 22,6%, respectivement).

Au cours du processus industriel de fabrication (macération des baies dans l'éthanol puis distillation des baies imbibées), la transmission des composés volatils du fruit à la liqueur se déroule avec une modification mineure de la composition chimique des matrices. Ces modifications sont à peine plus importantes au niveau de l'eau de vie. Sur la base de ces observations, nous pouvons conclure à une bonne héritabilité des volatils et que, donc, la qualité olfactive des produits transformés est fortement dépendante de la composition en volatils des baies.

La méthode ELL s'avère consommatrice de solvants et nécessite un grand nombre d'opérations manuelles. Afin de proposer aux industriels du secteur une méthode plus adaptée pour un contrôle rapide de la qualité des spiritueux, nous avons eu recours à la MEPS après une étape d'optimisation (cf. tableau E1 en partie expérimentale).

L'extraction par ELL permet d'aboutir à des compositions chimiques plus étoffées que la MEPS. En effet, les fractions volatiles des liqueurs et eaux de vie pré-concentrées dans l'espace de tête sont seulement caractérisées par 20 et 18 composés, respectivement (tableau 19). La perte d'information se situe principalement au niveau des constituants hydrocarbonés minoritaires et des monoterpènes oxygénés. On note également des taux plus élevés en

monoterpènes et sesquiterpènes hydrocarbonés dans les fractions volatiles obtenues par MEPS.

De plus, la comparaison entre la liqueur et l'eau de vie fait apparaître quelques différences qualitatives, puisque le (*Z*)- $\beta$ -ocimène **14** est détecté uniquement dans l'eau de vie alors que le linalol **18**, le 2-méthylbutyrate d'isobutyle **19** et le terpinèn-4-ol **21** ne le sont que dans la liqueur. Cependant, il ne s'agit que de composés minoritaires. Au niveau des composés majoritaires, nous retrouvons l' $\alpha$ -pinène **3** (49,2 et 60%) et le 1,8-cinéole **13** (24,1 et 13,5%) dans les deux types de matrices.

Nous avons conclu que l'analyse chromatographique après MEPS révélait les caractéristiques principales de la composition en volatils des baies du myrte commun et donc que la MEPS pouvait être utilisée comme méthode alternative pour obtenir un « diagnostic » rapide et fiable. De même, nous pouvons dire que la technique de pré-concentration par MEPS appliquée aux liqueurs et eaux de vie de myrte nous a permis d'observer des profils chromatographiques similaires à ceux obtenus respectivement après ELL.

Quel que soit le mode de préparation de l'échantillon (ELL ou MEPS) les profils chromatographiques des baies, liqueurs et eaux de vie de myrte sont tout à fait comparables. Nous pouvons, donc, conclure à une bonne héritabilité de façon indépendante de la méthode utilisée. En conséquence, sans que l'on puisse affirmer que la MEPS est véritablement une méthode alternative pour une étude approfondie, cette technique appliquée aux baies de myrte préfigure de façon satisfaisante la qualité des spiritueux. Rappelons qu'elle présente l'avantage d'un gain de temps et d'énergie ainsi que de l'absence de solvants.

Tableau 19 : Composition chimique en volatils des liqueurs et des eaux de vie

n°	Composés	HE				Liqueur			Eau de vie		
		Ir L <sup>a</sup>	Ir A <sup>b</sup>	Ir P <sup>c</sup>	%	ELL	MEPS		ELL	MEPS	
						$\mu\text{g}/100\text{ml}$	%	%	$\mu\text{g}/100\text{ml}$	%	%
1	Isobutyrate d'isobutyle	-	902	1090	0,2 ± 0,1	3,7 ± 0,1	0,1 ± 0,0	-	0,9 ± 0,1	0,1 ± 0,0	-
2	$\alpha$ -Thujène	932	922	1023	0,8 ± 0,2	26,9 ± 1,3	0,7 ± 0,1	0,2 ± 0,1	7,7 ± 0,9	0,9 ± 0,1	0,5 ± 0,1
3	$\alpha$ -Pinène	936	931	1022	46,5 ± 0,9	1677,3 ± 103,7	43,7 ± 4,1	49,2 ± 3,8	447,4 ± 39,2	52,4 ± 4,6	60,0 ± 5,7
4	$\alpha$ -Fenchène	941	943	1047	0,1 ± 0,1	3,8 ± 0,2	0,1 ± 0,0	-	1,7 ± 0,3	0,2 ± 0,1	-
5	Camphène	950	943	1066	0,1 ± 0,1	3,9 ± 0,2	0,1 ± 0,0	-	1,8 ± 0,3	0,1 ± 0,1	-
6	$\beta$ -Pinène	978	970	1110	0,6 ± 0,0	19,2 ± 1,0	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,2	4,3 ± 0,7	0,5 ± 0,2	0,7 ± 0,1
7	Myrcène	987	979	1159	0,2 ± 0,1	7,5 ± 0,3	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,1	2,6 ± 0,3	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,0
8	$\alpha$ -Phellandrène	1002	997	1164	0,4 ± 0,1	15,4 ± 0,8	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,1	3,4 ± 0,4	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,1
9	$\delta$ -3-Carène	1010	1005	1147	2,3 ± 0,5	69,1 ± 4,4	1,8 ± 0,3	1,8 ± 0,3	19,6 ± 1,7	2,3 ± 0,2	1,8 ± 0,2
10	$\alpha$ -Terpinène	1013	1008	1178	0,2 ± 0,1	7,7 ± 0,5	0,2 ± 0,0	-	2,0 ± 0,4	0,2 ± 0,0	-
11	p-Cymène	1015	1010	1169	2,7 ± 0,6	76,8 ± 6,9	2,0 ± 0,1	4,7 ± 0,3	16,2 ± 1,7	1,9 ± 0,2	3,0 ± 0,3
12	Limonène	1025	1018	1199	5,1 ± 0,2	191,9 ± 16,3	5,0 ± 0,3	4,3 ± 0,5	22,2 ± 1,4	2,6 ± 0,2	2,9 ± 0,2
13	1,8-Cinéole	1024	1020	1209	26,0 ± 0,7	1109,2 ± 94,9	28,9 ± 1,7	24,5 ± 2,1	193,0 ± 13,9	22,6 ± 1,6	13,5 ± 1,0
14	(Z)- $\beta$ -Ocimène	1029	1024	1230	0,1 ± 0,0	3,8 ± 0,3	0,1 ± 0,0	-	0,7 ± 0,3	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0
15	$\gamma$ -terpinène	1051	1047	1243	1,7 ± 0,3	53,7 ± 3,7	1,4 ± 0,2	2,1 ± 0,4	12,0 ± 0,8	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1
16	p-Cyménène	1075	1071	1430	0,1 ± 0,0	3,6 ± 0,4	0,1 ± 0,0	-	1,0 ± 0,2	0,1 ± 0,0	-
17	Terpinolène	1082	1078	1280	1,0 ± 0,1	42,2 ± 4,0	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,4	9,4 ± 0,5	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1
18	Linalol	1086	1081	1544	1,5 ± 0,1	61,4 ± 5,1	1,6 ± 0,2	0,2 ± 0,0	12,8 ± 1,1	1,5 ± 0,1	-
19	2-méthylbutyrate d'isobutyle*	1092	1086	1472	0,3 ± 0,1	7,9 ± 0,4	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,1	1,5 ± 0,2	0,2 ± 0,0	-
20	trans-Pinocarvéol	1126	1125	1650	0,2 ± 0,0	7,8 ± 0,4	0,2 ± 0,0	-	1,6 ± 0,1	0,2 ± 0,0	-
21	Terpinèn-4-ol	1164	1161	1600	0,5 ± 0,1	23,0 ± 1,4	0,6 ± 0,1	0,1 ± 0,0	6,0 ± 0,4	0,7 ± 0,0	-
22	$\alpha$ -Terpinéol	1176	1179	1700	2,3 ± 0,4	119,0 ± 9,9	3,1 ± 0,4	-	23,9 ± 2,0	2,8 ± 0,2	-
23	Géraniol	1235	1233	1843	0,4 ± 0,1	15,4 ± 1,0	0,4 ± 0,1	-	3,4 ± 0,2	0,4 ± 0,0	-
24	Acétate de myrtényle	1313	1307	1684	0,2 ± 0,1	11,5 ± 0,6	0,3 ± 0,0	-	2,6 ± 0,4	0,3 ± 0,0	-

<b>25</b>	Acétate d' $\alpha$ -terpinyle	1335	1332	1681	0,3 $\pm$ 0,1	15,4 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,0	-	3,2 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 0,0	-
<b>26</b>	Acétate de néryle	1342	1342	1726	0,1 $\pm$ 0,0	3,7 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0	-	1,4 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,0	-
<b>27</b>	Acétate de géranyle	1362	1357	1752	2,1 $\pm$ 0,1	88,3 $\pm$ 6,5	2,3 $\pm$ 0,2	-	16,2 $\pm$ 1,4	1,9 $\pm$ 0,1	-
<b>28</b>	Méthyl eugenol	1369	1367	2009	0,5 $\pm$ 0,1	19,2 $\pm$ 1,7	0,5 $\pm$ 0,1	-	4,3 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,0	-
<b>29</b>	$\beta$ -Elémène	1389	1388	1589	0,2 $\pm$ 0,1	7,6 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,0
<b>30</b>	( <i>E</i> )- $\beta$ -Caryophyllène	1421	1424	1591	0,9 $\pm$ 0,1	19,2 $\pm$ 1,2	0,5 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,3	3,0 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 0,1	4,2 $\pm$ 0,3
<b>31</b>	$\gamma$ -Elémène	1429	1429	1604	0,1 $\pm$ 0,0	-	-	-	-	-	-
<b>31a</b>	Aromadendrène	1443	1437	1602	-	7,9 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	1,4 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,1
<b>32</b>	$\alpha$ -Humulène	1455	1456	1665	0,2 $\pm$ 0,1	7,8 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,1
<b>33</b>	$\beta$ -Sélinène	1486	1483	1712	0,3 $\pm$ 0,1	11,5 $\pm$ 1,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,0
<b>33a</b>	Valencène	1494	1488	1709	-	11,5 $\pm$ 1,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,1
<b>34</b>	$\alpha$ -Sélinène	1494	1495	1520	0,3 $\pm$ 0,1	-	-	-	-	-	-
<b>35</b>	$\beta$ -bisabolène	1503	1500	1720	0,1 $\pm$ 0,0	3,5 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0	-	-	-	-
<b>36</b>	$\delta$ -Cadinène	1520	1515	1749	0,1 $\pm$ 0,0	3,8 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0	-	1,0 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,0	-
<b>37</b>	Germacrène B	1543	1541	1728	0,2 $\pm$ 0,0	7,2 $\pm$ 0,5	0,2 $\pm$ 0,1	-	-	-	-
<b>38</b>	Oxyde de caryophyllène	1578	1576	1980	0,2 $\pm$ 0,1	8,0 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,0	-	-	-	-
<b>39</b>	$\alpha$ -Sélin-11-èn-4-ol	1660	1652	2241	0,2 $\pm$ 0,0	8,1 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,0	-	-	-	-
Monoterpènes hydrocarbonés					61,9 $\pm$ 1,4	2202,7 $\pm$ 123,8	57,4 $\pm$ 3,7	64,9 $\pm$ 3,9	552 $\pm$ 42,0	64,6 $\pm$ 4,8	72,4 $\pm$ 2,3
Monoterpènes oxygénés					34,1 $\pm$ 1,4	1473,8 $\pm$ 88,5	38,4 $\pm$ 1,6	24,8 $\pm$ 2,0	211,8 $\pm$ 15,9	31,4 $\pm$ 1,8	13,5 $\pm$ 0,8
Sesquiterpènes hydrocarbonés					2,4 $\pm$ 0,3	80,1 $\pm$ 1,9	2,1 $\pm$ 0,1	5,1 $\pm$ 0,7	11,2 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 1,0	8,7 $\pm$ 0,3
Sesquiterpènes oxygénés					0,4 $\pm$ 0,1	16,1 $\pm$ 0,5	0,4 $\pm$ 0,0	-	-	-	-
Autres					0,5 $\pm$ 0,1	11,6 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,0	-
<b>Total</b>					<b>99,3 <math>\pm</math> 0,6</b>	<b>3784,3 <math>\pm</math> 163,3</b>	<b>98,2 <math>\pm</math> 1,2</b>	<b>95,2 <math>\pm</math> 4,5</b>	<b>777,4 <math>\pm</math> 50,7</b>	<b>97,7 <math>\pm</math> 1,9</b>	<b>94,6 <math>\pm</math> 2,0</b>

Les n° des composés correspondent à l'ordre d'élution sur colonne apolaire.

<sup>a</sup> Indices de rétention obtenus à partir des données de la littérature [König et coll. 2001]

<sup>b</sup> Indices de rétention obtenus sur colonne apolaire (Rtx-1)

<sup>c</sup> Indices de rétention obtenus sur colonne polaire (Rtx-wax)

Les teneurs des composés sont exprimées en pourcentages relatifs.

Les composés ont été identifiés à partir de la bibliothèque « arômes » du laboratoire (sauf \* : composés identifiés à partir de la bibliothèque commerciale NIST [2008])

### I.2.3. Variabilité intraspécifique de la composition phénolique des baies

La caractérisation de la composition phénolique des baies de myrte des 16 stations a été réalisée par CLHP-DAD, d'une part, et par CLHP/SM, d'autre part (cf. **Partie A III.2**). Nous avons identifié 14 composés rapportés au tableau 20. Les principaux composés sont la myricétine-3-*O*-arabinoside **9** (358,1 à 1364,2 mg/l), la myricétine-3-*O*-galactoside **7** (137,3 à 1184,8 mg/l), la myricétine **12** (237,5 à 1091,1 mg/l) et l'épigallocatechine **5** (179,7 à 1017,9 mg/l).

D'un point de vue qualitatif, si les extraits des 16 stations sont marqués par la présence des 14 constituants, les teneurs de ces composés ne semblent pas homogènes pour l'ensemble des stations. En effet, les stations **S1-S4** montrent une concentration totale en composés phénoliques très supérieure à celle des stations **S5-S16**. La variabilité est particulièrement marquée au niveau des concentrations des constituants majoritaires. Par exemple, le composé principal dans tous les échantillons ; la myricétine-3-*O*-arabinoside **9** présentent une abondance comprise entre 1203 et 1364 mg/l dans les stations **S1** à **S4** et une abondance allant de 358 à 576 mg/l pour les localisations **S5** à **S16**.

L'analyse ANOVA (annexe I.2) permet de confirmer statistiquement que l'ensemble des stations ne présente pas une composition chimique homogène. Ainsi, l'analyse par Classification Ascendante Hiérarchique (annexe I.3) établit l'existence de deux groupes distincts ; les profils chromatographiques des extraits issus des échantillons **S1** à **S4** sont analogues et diffèrent significativement de ceux des stations **S5** à **S16** qui sont semblables entre eux. Les deux groupes se différencient principalement par la richesse en composés phénoliques : les échantillons du premier groupe ont une concentration totale qui varie entre 7962,7 mg/l et 8170,5 mg/l alors que ceux du second groupe présentent une teneur comprise entre 1882,3 mg/l et 2496,0 mg/l. Le premier groupe (**S1-S4**) est dominé par la myricétine **12** (978,8 à 1091,1 mg/l), deux dérivés glycosylés de celle-ci : la myricétine-3-*O*-arabinoside **9** (1203,8 à 1364,2 mg/l) et la myricétine-3-*O*-galactoside **7** (988,9 à 1184,8 mg/l) et l'épigallocatechine **5** (919,4 à 1017,9 mg/l). Pour l'autre groupe, les mêmes constituants majoritaires sont observés mais à des concentrations moindres : la myricétine **12** (237,5 à 468,7 mg/l), la myricétine-3-*O*-arabinoside **9** (358,1 à 576,6 mg/l), la myricétine-3-*O*-galactoside **7** (137,3 à 210,8 mg/l) et l'épigallocatechine **5** (179,7 à 287,2 mg/l).

D'après Gardeli et coll. [2008], la composition phénolique du myrte commun est influencée par les variations climatiques saisonnières. En ce qui nous concerne, l'échantillonnage a eu lieu durant une même période de l'année. Les variations sont probablement imputables aux facteurs environnementaux, notamment à l'exposition et aux conditions climatiques, variant avec les zones de récoltes. Ainsi, la variabilité intraspécifique du myrte à l'origine de ces deux groupes « phénoliques » pourrait être due à des différences au niveau du stade végétatif des fruits ou de leur teneur en eau. Cette hypothèse est en partie confirmée par la proximité géographique des stations **S1-S4** qui présentent les concentrations en composés phénoliques les plus élevées.

Si nous comparons nos résultats avec ceux de la littérature [Martin et coll., 1999 ; Montoro et coll., 2006a, 2006b ; Tuberoso et coll., 2010], nous constatons que les compositions phénoliques des baies de Sardaigne diffèrent quantitativement de celles de Corse ; notamment au niveau des composés majoritaires avec des teneurs plus importantes en myricétine-3-*O*-galactoside **7** et en myricétine-3-*O*-rhamnoside **8** dans celles de Sardaigne et en myricétine **12**, en myricétine-3-*O*-arabinoside **9** et en épigallocatechine **5** dans celles de Corse. Ces composés sont des marqueurs permettant de différencier les baies des deux îles.

Tableau 20 : Composition phénolique des extraits de baies de *Myrtus communis* L. en fonction de la localisation des échantillons.

n°	Composés	tr (mn)	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16
1	Acide gallique	9,1	78,6	79,4	87,4	74,5	24,4	19,0	32,1	20,9	23,4	25,5	24,9	15,7	24,8	27,4	37,5	31,1
2	Acide ellagique	19,6	73,9	89,8	92,3	91,1	29,1	26,8	22,8	18,3	28,3	22,9	38,5	30,3	37,3	24,5	33,5	20,6
3	Catéchine	21,2	242,4	215,7	202,6	242,0	61,2	81,8	60,7	79,5	51,2	74,9	117,2	114,8	108,2	82,3	75,8	94,4
4	Epicatechine-3-O-gallate	23,6	100,1	79,4	98,4	108,3	33,3	22,8	33,0	41,8	58,5	39,4	37,7	18,6	46,9	42,8	25,5	32,9
5	Epigallocatechine	28,5	987,2	919,4	1006,6	1017,9	251,9	237,3	187,4	191,1	179,7	213,2	287,2	240,9	276,0	236,4	212,4	259,5
6	Epigallocatechine-3-O-gallate	29,6	499,3	536,5	482,9	443,8	97,7	100,6	86,9	110,2	134,5	94,8	107,1	77,2	98,1	105,4	95,7	93,3
7	Myricétine-3-O-galactoside	35,8	1184,8	1097,6	990,1	988,9	171,2	152,5	183,1	149,4	193,7	178,5	199,6	137,3	210,8	199,4	152,9	175,5
8	Myricétine-3-O-rhamnoside	36,6	402,4	405,9	427,7	379,4	227,5	166,8	199,0	174,7	184,5	204,8	220,3	143,6	231,3	227,5	140,8	164,3
9	Myricétine-3-O-arabinoside	37,2	1203,8	1246,7	1364,2	1255,4	576,6	543,5	501,3	409,3	464,7	484,3	408,4	441,6	397,4	537,3	405,6	358,1
10	Quercétine-3-O-glucoside	37,5	649,5	639,6	611,1	731,2	144,6	158,6	234,0	139,4	167,4	143,0	144,5	81,0	153,6	159,2	107,6	128,7
11	Quercétine-3-O-rhamnoside	38,1	788,4	743,5	700,3	813,9	153,7	167,4	185,8	140,3	177,9	193,1	283,4	247,6	272,0	215,6	268,4	183,1
12	Myricétine	38,5	1004,6	1023,8	978,8	1091,1	319,8	370,2	329,8	278,3	337,1	237,5	358,3	468,7	297,3	255,1	442,0	349,3
13	Quercétine	41,5	634,6	588,4	657,0	650,7	169,9	184,2	155,2	103,8	139,2	154,9	217,7	201,3	168,8	172,2	198,9	191,6
14	Kaempférol	46,3	278,3	297,0	341,7	282,3	44,0	52,5	37,7	25,3	55,8	52,6	51,2	43,6	62,3	58,7	66,5	47,5
	Acides phénoliques		152,5	169,2	179,7	165,6	53,5	45,8	54,9	39,2	51,7	48,4	63,4	46,0	62,1	51,9	71,0	51,7
	Flavan-3-ols		1829,0	1751,0	1790,5	1812,0	444,1	442,5	368,0	422,6	423,9	422,3	549,2	451,5	529,2	466,9	409,4	480,1
	Flavonols glycosylés		4228,9	4133,3	4093,4	4168,8	1273,6	1188,8	1303,2	1013,1	1188,2	1203,7	1256,2	1051,1	1265,1	1339,0	1075,3	1009,7
	Flavonols		1917,5	1909,2	1977,5	2024,1	533,7	606,9	522,7	407,4	532,1	445,0	627,2	713,6	528,4	486,0	707,4	588,4
	<b>Total</b>		<b>8127,9</b>	<b>7962,7</b>	<b>8041,1</b>	<b>8170,5</b>	<b>2304,9</b>	<b>2284,0</b>	<b>2248,8</b>	<b>1882,3</b>	<b>2195,9</b>	<b>2119,4</b>	<b>2496,0</b>	<b>2262,2</b>	<b>2384,8</b>	<b>2343,8</b>	<b>2263,1</b>	<b>2129,9</b>

S1 : Canari; S2 : Bastia; S3 : Saint Florent; S4 : Agriates; S5 : Lozari; S6 : Calvi; S7 : Corte; S8 : Peri; S9 : Ajaccio; S10 : Sartene; S11 : Bonifacio; S12 : Porto Vecchio; S13 : Travo; S14 : Morta; S15 : Abbazzia; S16 : Aleria.

Les n° des composés correspondent à l'ordre d'élution : temps de rétention (tr) croissant.

Les concentrations des composés dans l'extrait sont exprimées en mg/l. Les composés ont été identifiés à partir de la bibliothèque du laboratoire.

#### I.2.4. Fraction phénolique des liqueurs

L'analyse par CLHP/DAD et CLHP/SM des liqueurs commerciales a conduit à l'identification des mêmes 14 composés (tableau 21) préalablement détectés dans les extraits méthanoliques des baies (tableau 20). Les profils chromatographiques des liqueurs étudiées sont semblables et l'on peut définir une abondance moyenne. Les composés phénoliques se répartissent en : deux acides phénoliques (**1**, **2**) ayant une concentration de 52,9 mg/l, en quatre flavan-3-ols (**3-6**) ayant une concentration de 442,7 mg/l, en cinq flavonols glycosylés (**7-11**) ayant un concentration de 973,3 mg/l et trois flavonols (**12-14**) ayant une concentration de 613,2 mg/l. Les composés majoritaires sont la myricétine **12** (386,7 mg/l), la myricétine-3-*O*-arabinoside **9** (301,7 mg/l), l'épigallocatechine **5** (231,5 mg/l) et la quercétine-3-*O*-rhamnoside **11** (231,1 mg/l).

Après comparaison de ces résultats avec ceux obtenus lors des analyses sur la variabilité chimique des baies (cf. **Partie B I.2.3**), nous constatons que les teneurs en phénols totaux des liqueurs commerciales (2083,0 mg/l) sont du même ordre de grandeur que celles des extraits des stations **S5-S16** (1882,3 à 2496,0 mg/l). Rappelons que les extraits des baies des stations **S1-S4** présentent des concentrations beaucoup plus élevées (7962,7 à 8170,5 mg/l). Il faut toutefois considérer que l'obtention d'une liqueur résulte de la « dilution » de l'extrait éthanolique induisant une diminution des concentrations des analytes. Le facteur de dilution appliqué par l'industriel est de l'ordre de 2. En appliquant ce facteur de dilution aux extraits de baies des différentes stations, nous constatons que les liqueurs commerciales ont des teneurs globales deux fois plus fortes que les extraits de baies de stations **S5-S16** et deux fois plus faibles que les extraits de baies des stations **S1-S4** (tableau 21). Ces écarts peuvent être dus à une différence de maturité des fruits liée aux effets pédo-climatiques entre la récolte réalisée par l'industriel et celle effectuée par notre laboratoire. En effet, l'approvisionnement en baies est étalé sur un mois pour l'industriel alors que - dans notre cas - il a été accompli en seulement trois jours. Ainsi, le procédé d'échantillonnage industriel permet d'obtenir une composition phénolique représentative du territoire et modérant l'effet du stade de maturité des baies.



Au niveau de la répartition des familles de composés, nous retrouvons systématiquement des concentrations intermédiaires pour les liqueurs commerciales par rapport à celles de stations **S1-S4** et **S5-S16**. Par exemple, les acides phénoliques **1-2** sont présents à une teneur de 52,9 mg/l (**S1-S4** : 83,4 mg/l ; **S5-S16** : 26,7 mg/l), les flavan-3-ols **3-6** : 442,7 mg/l (**S1-S4** : 897,8 mg/l ; **S5-S16** : 225,4 mg/l ), les flavonols glycosylés **7-11** : 973,3 mg/l (**S1-S4** : 2078,1 mg/l ; **S5-S16** : 590,3 mg/l) et les flavonols **12-14** : 613,2 mg/l (**S1-S4** : 978,5 mg/l ; **S5-S16** : 279,1 mg/l).

En ce qui concerne les composés majoritaires individualisés, nous retrouvons des concentrations pour les liqueurs qui sont à mi-chemin entre les deux groupes de stations (**S1-S4** et **S5-S16**). En effet, la teneur en myricétine **12** dans les liqueurs est de 386,7 mg/l alors qu'elle est de 512,3 et 168,5 mg/l dans les extraits des stations **S1-S4** et **S5-S16**, respectivement. La concentration en myricétine-3-O-arabinoside **9** est de 301,7 mg/l dans les liqueurs (**S1-S4** : 633,8 mg/l ; **S5-S16** : 230,3 mg/l), celle de l'épigallocatechine **5** est de 231,5 mg/l (**S1-S4** : 491,4 mg/l ; **S5-S16** : 115,5 mg/l) et celle de la quercétine-3-O-rhamnoside **11** est de 231,1 mg/l (**S1-S4** : 380,8 mg/l ; **S5-S16** : 103,7 mg/l). Nous notons également que l'ordre d'abondance des constituants majoritaires sur le profil chimique des liqueurs est différent de celui des extraits ; cette différence entre les liqueurs et les stations d'échantillonnage est plus marquée pour les stations **S1-S4** que pour **S5-S16**.

Pour conclure, nous retrouvons dans les liqueurs l'ensemble des composés phénoliques identifiés dans les extraits de baies de *Myrtus communis* L. Les différences quantitatives entre les stations et les liqueurs peuvent être dues à la période, à la durée et au lieu de récolte ; en effet, les baies servant à l'industriel pour la fabrication de la liqueur lui sont apportées sur une période d'un mois et en provenance de différentes micro-régions de l'île. Malgré ces différences nous observons un transfert global des constituants lors de la fabrication des liqueurs s'effectuant donc sans modifications significatives de la composition phénolique.

Notre partenaire industriel s'est montré très intéressé par nos résultats puisque la connaissance de la composition chimique des spiritueux peut amener à la mise en place d'une définition de la qualité d'une liqueur au sein de l'entreprise voire au niveau de l'ensemble des acteurs du secteur et déboucher sur un label. De plus, l'analyse de la composition chimique des baies est également utile aux professionnels car en connaissant les teneurs en composés ils

peuvent déterminer le niveau de qualité des fruits qui leur sont proposés et, par exemple, en fixer le prix.

Tableau 21 : Compositions phénoliques moyennes des liqueurs commerciales, des extraits de baies S1-S4 et S5-S16

n°	Composés	tr (mn)	Liqueur	S1-S4	S5-S16
1	Acide gallique	9,2	19,9 ± 2,1	40,0 ± 2,7	12,8 ± 3,0
2	Acide ellagique	19,6	32,9 ± 3,2	43,4 ± 4,3	13,9 ± 3,2
3	Catéchine	21,2	97,7 ± 5,4	112,8 ± 9,9	41,8 ± 10,7
4	Epicatechine-3- <i>O</i> -gallate	23,6	27,9 ± 2,1	48,3 ± 6,1	18,1 ± 5,5
5	Epigallocatechine	28,5	231,5 ± 10,2	491,4 ± 22,1	115,5 ± 17,4
6	Epigallocatechine-3- <i>O</i> -gallate	29,6	85,5 ± 7,4	245,3 ± 19,2	50,1 ± 7,0
7	Myricétine-3- <i>O</i> -galactoside	35,8	157,9 ± 10,0	532,7 ± 47,3	87,7 ± 11,7
8	Myricétine-3- <i>O</i> -rhamnoside	36,6	173,2 ± 15,2	201,9 ± 9,9	95,2 ± 16,4
9	Myricétine-3- <i>O</i> -arabinoside	37,3	301,7 ± 21,5	633,8 ± 34,1	230,3 ± 34,3
10	Quercétine-3- <i>O</i> -glucoside	37,4	110,4 ± 10,0	328,9 ± 25,8	73,4 ± 18,2
11	Quercétine-3- <i>O</i> -rhamnoside	37,8	231,1 ± 25,1	380,8 ± 25,1	103,7 ± 24,5
12	Myricétine	38,5	386,7 ± 27,1	512,3 ± 24,0	168,5 ± 34,4
13	Quercétine	41,5	178,1 ± 21,1	316,3 ± 15,5	85,7 ± 15,5
14	Kaempférol	46,3	48,4 ± 7,8	149,9 ± 14,5	24,9 ± 5,6
	Acides phénoliques		52,9 ± 5,3	83,4 ± 5,6	26,7 ± 4,4
	Flavan-3-ols		442,7 ± 25,1	897,8 ± 16,8	225,4 ± 25,2
	Flavonols glycosylés		973,3 ± 81,8	2078,1 ± 28,7	590,3 ± 57,9
	Flavonols		613,2 ± 56,0	978,5 ± 27,0	279,1 ± 47,4
	<b>Total</b>		<b>2083,0 ± 168,2</b>	<b>4037,8 ± 46,3</b>	<b>1121,5 ± 77,0</b>

Les n° des composés correspondent à l'ordre d'éluion : temps de rétention (tr) croissant.

Les concentrations moyennes dans les liqueurs sont exprimées en mg/l et calculées à partir des résultats obtenus sur cinq bouteilles d'un même lot commercial.

Les concentrations moyennes dans les extraits des stations sont exprimées en mg/l et calculées après application d'un facteur de dilution de 2

Les composés ont été identifiés à partir de la bibliothèque du laboratoire.

### I.2.5. Phénols totaux et activités antioxydantes des liqueurs

Durant une année, nous avons mesuré l'évolution des phénols totaux et de l'activité antioxydante de trois lots de liqueurs commerciales élaborées simultanément : le lot **A** est fermé, conservé à l'obscurité et à température ambiante (méthode de stockage type industriel) ; il est analysé après 3 mois, 6 mois, 12 mois et 15 mois de conservation. Le lot **B** est conservé dans les mêmes conditions que le lot **A** mais il est analysé seulement après 12 et 15

mois de conservation. Le lot **C** est étudié avec une temporalité analogue au lot **A** mais il est conservé à la lumière et à température ambiante.

La mesure des phénols totaux est réalisée par le test de Folin-Ciocalteu (tableau 22). Pour les trois lots, nous observons une baisse des teneurs en phénols totaux lors de la conservation. Par ailleurs, nous remarquons que le procédé de conservation - à l'abri ou non de la lumière (lot **A** et **C** respectivement) - n'a pas d'impact sur cette concentration.

L'activité antioxydante des liqueurs a été mesurée par l'intermédiaire de trois tests : FRAP, ABTS et DPPH (tableau 22). Nous constatons que les trois lots de liqueurs ont répondu positivement à tous les tests. En outre, nous notons une baisse de l'activité antioxydante au cours de la période d'analyse, quel que soit le test réalisé.

Avec le test FRAP, nous observons, tout d'abord, une faible baisse de l'activité pour les liqueurs jusqu'au sixième mois de conservation, puis nous constatons que l'activité diminue fortement entre le sixième et le douzième mois de conservation. Enfin, une diminution plus faible est enregistrée entre le douzième et le quinzième mois de conservation. De plus, pour chaque série d'analyse, les trois lots de liqueurs répondent de manière similaire.

Les résultats des tests ABTS et DPPH sont proches. Nous observons tout d'abord une diminution de l'activité antioxydante de l'ordre de 3 à 5% entre le troisième et le sixième mois de conservation, puis une baisse un peu plus forte aux alentours de 10% entre le sixième et le douzième mois de conservation ainsi qu'entre le douzième et le quinzième mois de conservation. De plus, comme pour le test FRAP, nous n'observons pas de différences entre les lots de liqueurs ce qui suggère que les conditions de conservation que nous avons mis en place ont une influence similaire sur la baisse de l'activité antioxydante.

A la vue de ces résultats, il apparaît que l'activité antioxydante des liqueurs est étroitement corrélée avec les teneurs en composés phénoliques. Celles-ci sont stables durant les six premiers mois de conservation. Au delà de cette période, nous observons une dégradation de ces teneurs et donc une diminution des propriétés antioxydantes. Cependant, la forte baisse de l'activité n'est observée que sur un seul des trois tests (FRAP) ; la baisse est beaucoup plus modérée selon les deux autres tests. Ces résultats sont comparables à ceux décrits par Montoro et coll. [2006] qui ont mis en évidence une diminution du pouvoir

antioxydant liée aux concentrations décroissantes en anthocyanes à partir de quatre mois de conservation. Par ailleurs, les modifications de la concentration en phénols totaux au cours de la conservation peuvent induire une dégradation de la flaveur du produit. Cette hypothèse ne peut être vérifiée que par des analyses sensorielles.

Tableau 22 : Phénols totaux et tests antioxydants réalisés sur les liqueurs de myrte

<b>Folin-Ciocalteu</b>				<b>FRAP</b>					
	<i>Juillet 2008</i>	<i>Octobre 2008</i>	<i>Mars 2009</i>	<i>Juillet 2009</i>		<i>Juillet 2008</i>	<i>Octobre 2008</i>	<i>Mars 2009</i>	<i>Juillet 2009</i>
	mgGAE/l <sup>a</sup>	mgGAE/l <sup>a</sup>	mgGAE/l <sup>a</sup>	mgGAE/l <sup>a</sup>		TEAC <sup>b</sup>	TEAC <sup>b</sup>	TEAC <sup>b</sup>	TEAC <sup>b</sup>
<b>A</b>	684,1±15,2	653,1±11,1	510,8±27,8	464,9±2,6	<b>A</b>	3411,2±48,8	3243,0±61,8	1468,6±44,8	1189,4±29,5
<b>B</b>	-	-	504,0±25,1	493,7±12,1	<b>B</b>	-	-	1375,5±33,4	1149,0±81,8
<b>C</b>	692,4±7,8	657,1±20,4	494,6±21,1	483,9±3,7	<b>C</b>	3422,3±41,5	3257,9±53,6	1397,8±114,7	1236,3±16,2

<b>ABTS</b>				<b>DPPH</b>					
	<i>Juillet 2008</i>	<i>Octobre 2008</i>	<i>Mars 2009</i>	<i>Juillet 2009</i>		<i>Juillet 2008</i>	<i>Octobre 2008</i>	<i>Mars 2009</i>	<i>Juillet 2009</i>
	TEAC <sup>b</sup>	TEAC <sup>b</sup>	TEAC <sup>b</sup>	TEAC <sup>b</sup>		TEAC <sup>b</sup>	TEAC <sup>b</sup>	TEAC <sup>b</sup>	TEAC <sup>b</sup>
<b>A</b>	227,9±4,7	220,7±6,8	197,8±1,8	180,3±3,2	<b>A</b>	198,5±5,9	188,6±6,6	167,4±8,3	145,0±7,6
<b>B</b>	-	-	201,4±0,4	172,3±0,5	<b>B</b>	-	-	161,9±5,0	141,5±11,6
<b>C</b>	222,2±4,2	215,6±4,3	199,5±5,9	181,2±3,8	<b>C</b>	195,0±4,6	186,2±8,3	166,5±16,5	146,2±9,0

<sup>a</sup> Les résultats pour le test de Folin sont exprimés en mg équivalent acide gallique par litre

<sup>b</sup> Les résultats (TEAC) sont exprimés en µM équivalent trolox par litre

## II. Le cédrat

### II.1. Bibliographie

#### II.1.1. Botanique et Ethnobotanique

Le cédrat, *Citrus medica* L., appartient à la famille des Rutacées, sous-famille des Aurantiacées, tribu des *Citrae*. Les cédratiers sont des arbres de 3 à 5 m de hauteur maximale, à branches épineuses, à feuilles coriaces, ovales et allongées. Les fleurs sont blanches pour la variété à pulpe douce (*Citrus medica* L. var. *corsican* ou Cédrat de Corse) et généralement pourpres (anthocyanées) à rosées pour les variétés à pulpe acide. Les fruits sont souvent de grande taille et allongés. En fonction des variétés, ils peuvent dépasser une longueur de 15 cm et atteindre 3 kg notamment quand l'arbre est jeune. La peau du fruit est souvent irrégulière, bosselée à rugueuse et très épaisse. Elle adhère fortement aux quartiers dont la pulpe est généralement peu juteuse. Cet agrume est considéré comme l'ancêtre du citron (*Citrus limon* L. Burm.) ; il a été génétiquement identifié comme faisant partie des trois ou quatre taxons de base (espèces ancestrales) du genre *Citrus* [Nicolosi et coll., 2000 ; Luro et coll., 2001].



Figure 41 : Illustration de *Citrus medica* L. [Risso et Poiteau, 1818]

De nombreux auteurs s'accordent à dire que ce fruit serait apparu sur les contreforts de l'Himalaya et serait arrivé en Perse au VII<sup>ème</sup> siècle av. J.C ; les échanges commerciaux entre la Vallée de l'Indus et la Mésopotamie expliqueraient cette migration vers l'ouest. Apprécié pour ses qualités odorantes et ornementales, il est amené en Grèce par les botanistes qui accompagnaient Alexandre le Grand en Mésopotamie en 325 av. J.C. Théophraste, philosophe botaniste grec, décrit pour l'une des toutes premières fois ce qui sera appelé la pomme persique ou pomme médique [Tolkowsky, 1938]. Certains auteurs estiment que le cédrat aurait été introduit beaucoup plus tôt en Palestine grâce aux échanges entre les Hébreux, les Perses et les Assyriens. Victor Loret [1891] évoque même la présence de fruits séchés dans des tombes datant de l'antiquité Egyptienne du XII<sup>ème</sup> siècle avant notre ère. On trouve également des traces plus récentes chez les romains dans les écrits de Virgile, Dioscorides et Pline [Andrews, 1961].

Dès son arrivée en Méditerranée, ses utilisations sont multiples. Les usages pharmaceutiques sont décrits par plusieurs auteurs gréco-romains et arabes dont Théophraste (372 av. J.C., 287 av. J.C.), Virgile (70 av. J.C., 19 av. J.C.), Pline (23 ap J.C., 79 ap J.C.), Athénée (II<sup>ème</sup> et III<sup>ème</sup> siècle de notre ère), Gargilius Martialis (III<sup>ème</sup> siècle de notre ère) et le Vizir Aboul Qâsim (X<sup>ème</sup> siècle de l'Hégire). Le cédrat était qualifié alors d'antiseptique, de cicatrisant, d'antipoison ou d'antitussif en fonction des parties de la plante utilisées. L'écorce de l'arbre, les feuilles et les différentes parties du fruit jusqu'aux pépins étaient utilisées [Huet et coll., 1986]. La diffusion du cédrat dans le bassin méditerranéen est fortement liée à son utilisation rituelle dans la religion juive. Le cédrat fait partie des quatre espèces de plantes que les juifs utilisent lors de la fête des Tabernacles ou des Cabanes (Sukkot) ; les fidèles font sept fois le tour de la synagogue avec un bouquet composé d'une branche de palme, de saule, de myrte et un cédrat.

L'arrivée du cédrat en Corse est un objet de controverse entre auteurs ; il est cultivé en Méditerranée dès l'Antiquité et pourtant sa présence en Corse n'est officiellement évoquée qu'au début du XIX<sup>ème</sup> siècle [Huet et coll., 1986 ; Nivaggioli, 2002]. La production a connu son apogée à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle en fournissant près d'un tiers de la production mondiale. Les cédrats conservés en saumure étaient exportés en Italie et en Europe du nord pour la production de fruits confits destinés à la fabrication de *panetone* italiens et de *Christmas cakes* anglais et allemands [Nivaggioli, 2002]. La variété cultivée en Corse (*Citrus medica* L.

var. *corsican*) appelée Cédrat de Corse est une variété spécifique à pulpe douce dont les qualités aromatiques et organoleptiques étaient très recherchées par les confiseurs.

Le cédrat est aujourd'hui connu pour son utilisation alimentaire ; le fruit est confit, transformé en confiture, en bonbon, en liqueur ou en eau de vie. Dans le sud de l'Italie, on trouve de nombreuses pâtisseries, de la glace, du granité et un grand nombre de boissons à base de cédrat. Confit en saumure, il entre même dans la garniture de certaines pizzas proposées dans les restaurants de Santa Maria del Cedro en Calabre. A l'instar des autres espèces du genre *Citrus*, le cédrat peut également trouver de multiples applications en parfumerie ou en cosmétique à travers la richesse et la diversité des composés volatils et phénoliques contenus dans les fruits et les feuilles.

## II.1.2. Composition chimique

### a) *Les composés volatils*

La première étude sur la composition chimique de l'huile essentielle de cédrat date d'une vingtaine d'années. Shiota [1990] a constaté que l'essence de zeste de la variété Main de Bouddha cultivée au Japon est riche en limonène et en  $\gamma$ -terpinène.

Par la suite, Fleisher et Fleisher [1991, 1996] ont étudié la composition des huiles essentielles de zeste et de feuilles de la variété Etrog provenant du Yémen. Il en ressort que l'huile essentielle des feuilles est dominée par le limonène (24,8%), le géraniol (23,1%), le néral (17,1%) et le phytol (10,2%) alors que celle de zeste est caractérisée par le limonène (52,6%) et le  $\gamma$ -terpinène (14,5%).

En 1998, Poiana et coll. [1998] ont comparé les compositions chimiques des huiles essentielles et des extraits de zeste de la variété Diamante d'origine italienne obtenus par trois méthodes d'extraction : l'hydrodistillation, l'extraction au pentane et l'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique. Les deux premières ont permis d'obtenir des mélanges caractérisés par le limonène (59,7-60,8%) et le  $\gamma$ -terpinène (23,4-24,6%) alors que l'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique conduit à des extraits plus riches en sesquiterpènes, en composés hétérocycliques et en cires.

Concernant les compositions chimiques des huiles essentielles de cédrats cultivés en Corse, Lota et coll. [1999] ont étudié celles de zeste de cinq variétés (Rhobs el Arsa, Etrog, Main de Bouddha, Corsican et Diamante). Il apparaît qu'elles sont caractérisées par : - le limonène comme unique composé majoritaire (Rhobs el Arsa) ; - le limonène associé au  $\gamma$ -terpinène (Etrog, Main de Bouddha et Corsican) ; - le limonène accompagné du couple géraniol/néral (Diamante). Les compositions chimiques des huiles essentielles de feuilles ont également été rapportées dans cette étude ; elles s'avèrent homogènes par des teneurs importantes en limonène, géraniol et néral pour les cinq variétés précitées ainsi que pour la variété Poncire commun.

Ces résultats sont analogues à ceux des travaux de Vekiari et coll. [2002, 2004] qui rapportent des compositions chimiques riches en limonène, géraniol et néral dans les huiles essentielles de feuilles et de zeste de cédrat Diamante cultivé en Grèce. En outre, les auteurs ont comparé la composition chimique des huiles essentielles obtenues à partir de plantes saines et à partir de plantes infectées par le virus exocortis. Ils ont observé que les concentrations en monoterpènes hydrocarbonés ( $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène, (*Z*)- et (*E*)- $\beta$ -ocimène) dans les huiles essentielles de zeste augmentent significativement chez les individus malades ce qui conduit, de fait, à une forte diminution de celles en composés oxygénés (nérol, néral, géraniol, géraniol, etc). En revanche, les profils chromatographiques des huiles essentielles de feuilles issues d'arbres sains et malades sont qualitativement et quantitativement similaires et donc les teneurs en composés volatils dans les feuilles ne semblent pas être affectées par la maladie.

Plus récemment, Gabriele et coll. [2009] ont également étudié la composition des huiles essentielles de zeste de cédrat Diamante d'Italie en fonction de la maturité du fruit (cédrat vert de petite taille, cédrat vert de grande taille et cédrat jaune) et selon trois méthodes mécaniques. Ils constatent que les teneurs en composés majoritaires (limonène et  $\gamma$ -terpinène) varient légèrement en fonction du degré de maturité. Par exemple, les pourcentages relatifs en limonène et en  $\gamma$ -terpinène oscillent entre 51,27-60,56% et 20,89- 24,40%, respectivement. En revanche, quelle que soit la méthode d'extraction utilisée les auteurs n'ont pas observé de variations significatives des compositions chimiques des essences.



## b) Les composés phénoliques

A notre connaissance, aucune étude n'a été menée sur la composition phénolique du cédrat alors que le nombre d'articles traitant des constituants phénoliques présents dans d'autres espèces du genre *Citrus* est important. Aussi, à défaut du cédrat, nous avons choisi d'illustrer par ces autres espèces, les résultats des travaux sur les composés phénoliques.

En 1998, Mouly et coll. [1998] ont travaillé sur les flavanones glycosylées et les flavones polyméthoxylées présentes dans diverses variétés d'orange et de mandarine. L'analyse qualitative et quantitative a été faite par CLHP-DAD (détecteur à barrettes de diodes) par comparaison des temps de rétention et des spectres UV réalisés à deux longueurs d'ondes : 280 nm et 330 nm. Celles-ci correspondent aux maxima d'absorption des flavanones glycosylées, d'une part, et des flavones polyméthoxylées, d'autre part. L'analyse met en évidence la présence de : - la narirutine, l'hespéridine, la scutélarine et la didymine pour les flavanones glycosylées ; - la sinensétine, l'hexaméthoxyflavone, la nobilétine, l'heptaméthoxyflavone et la tangéretine pour les flavones polyméthoxylées. Les flavanones glycosylées (400 mg/l) sont les molécules les plus abondantes avec une concentration totale dix fois plus importante que les flavones polyméthoxylées (40 mg/l).

Oufedjikh et coll., [2000] ont étudié l'effet de l'irradiation  $\gamma$  sur la clémentine et montrent que les concentrations en flavonoïdes diminuent de moitié après irradiation. L'analyse par CLHP-UV-VIS des flavonoïdes obtenus après extraction liquide-liquide indique que les fruits sont riches en flavanones glycosylées et en flavones polyméthoxylées. Les auteurs ont notamment identifié la scutélarine, l'isoscutélarine, la tangéretine, la sinensétine, la nobilétine, la quercétagétine et l'heptaméthoxyflavone.

En 2001, Gorinstein et coll., [2001] ont déterminé la composition en acides phénoliques de la peau d'orange par fluorescence. Les composés identifiés sont l'acide caféique, l'acide p-coumarique, l'acide sinapique, l'acide férulique et l'acide ascorbique.

Plus récemment, Belajovà et Suhaj [2004] ont analysé par CLHP-DAD les polyphénols du jus d'orange. Ils en déduisent que l'hespéridine est le composé majoritaire avec une teneur de 92 mg/l. Les autres constituants tels que la quercétine (23 mg/l), la néohespéridine (7 mg/l) et la naringine (2 mg/l) sont présents à des teneurs moindres.

## II.2. Diversité moléculaire des cédratiers

### II.2.1. Les feuilles : approche chimio-génétique de 24 variétés

La chimio-taxonomie (chemotaxonomy ou chemosystematics en anglais), est l'un des principaux mots clés de revues scientifiques de référence telles que *Phytochemistry*, *Chemistry & Biodiversity* ou *Biochemical Systematic and Ecology*. Cette science vise à classifier et identifier les plantes en se basant sur les similitudes et les différences de leur composition chimique et biochimique. Les composés les plus fréquemment utilisés sont les protéines, les acides aminés et les métabolites secondaires.

Dans cette partie de nos travaux, nous avons conduit une étude chimio-génétique sur 24 variétés **V1-V24**, répertoriées au tableau 23. Vingt-trois d'entre elles (**V1-V23**) sont cultivées à la station de recherche UR INRA-GEQA (commune de San Giuliano, Corse) et une variété (**V24**) provient de Bari (Calabre) en Italie. Nous avons corrélé leur diversité génétique et la variabilité chimique des huiles essentielles de leurs feuilles. D'un point de vue taxonomique, les feuilles de 11 variétés de cédrats supposés « vraies » (ou ancestrales) ('Main de Bouddha' **V1**, 'Etrog' (SRA 130) **V2**, 'Etrog' (SRA 131) **V3**, 'Etrog 861' **V4**, 'Etrog 861-S1' **V5**, 'Etrog type' **V6**, 'Humpang' **V7**, 'Diamante' **V8**, 'Corsican' **V9**, 'Poncire commun' **V10**, 'Diamante d'Italie' **V24**), sont de forme obovale, de couleur vert pale et ne possèdent pas de pétioles ailés [Risso et Poiteau, 1818]. Phénotypiquement, les treize autres cultivars ('Mac Veu de Montagne' **V11**, 'Damas' **V12**, 'Ommeyades' **V13**, 'Fourny' **V14**, 'Rhobs el Arsa' **V15**, 'Verruqueux' **V16**, 'Florence' **V17**, 'Ada Jamir' **V18**, 'Kadu Mul' **V19**, 'Mac Nao N' **V20**, 'Mac Nao Si' **V21**, 'Poncire de Colioure' **V22**, 'Mac Nao San' **V23**) se différencient des cédratiers "vrais" par des variations de la forme et de la couleur des feuilles.

Par ailleurs, nous avons complété cette étude chimio-génétique par une approche chimio-taxonomique sur un échantillonnage réduit de 17 variétés de cédrat (**V1-V17**) sélectionnées à partir des résultats obtenus lors de l'étude chimio-génétique. Notre approche a consisté à déterminer les compositions volatiles et phénoliques des zestes de ces 17 cultivars afin de les confronter aux caractéristiques morphologiques. Enfin, nous avons procédé à la caractérisation des composés (volatils et phénoliques) présents dans les deux autres parties du fruit à savoir l'albédo et la pulpe. Le tableau 23 reprend les divers types d'analyses réalisées sur les différents organes des cultivars.

Tableau 23: Numérotation des cultivars et analyses réalisées à partir de leurs différents organes

n°	Variété	n° d'accession <sup>a</sup>	Feuilles	Zeste	Albédo	Pulpe
V1	Main de Bouddha	SRA 640	Vol. <sup>b</sup> /Gen.	Vol. <sup>b</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.
V2	Etrog	SRA 130	Vol. <sup>b</sup> /Gen.	Vol. <sup>b</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.
V3	Etrog	SRA 131	Vol. <sup>b</sup> /Gen.	Vol. <sup>b</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.
V4	Etrog 861	SRA 132	Vol. <sup>b</sup> /Gen.	Vol. <sup>b</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.
V5	Etrog 861-S1	SRA 709	Vol. <sup>b</sup> /Gen.	Vol. <sup>b</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.
V6	Etrog type	SRA 861	Vol. <sup>b</sup> /Gen.	Vol. <sup>b</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.
V7	Humpang	SRA 722	Vol. <sup>b</sup> /Gen.	Vol. <sup>b</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.
V8	Diamante	SRA 540	Vol. <sup>b</sup> /Gen.	Vol. <sup>b</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.
V9	Corsican	SRA 613	Vol. <sup>b</sup> /Gen.	Vol. <sup>b</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.
V10	Poncire Commun	SRA 701	Vol. <sup>b</sup> /Gen.	Vol. <sup>b</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.
V11	Mac Veu de Montagne	SRA 760	Vol. <sup>b</sup> /Gen.	Vol. <sup>b</sup> /Phe.	-	-
V12	Damas	SRA 837	Vol. <sup>b</sup> /Gen.	Vol. <sup>b</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.
V13	Ommeyades	SRA 832	Vol. <sup>b</sup> /Gen.	Vol. <sup>b</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.
V14	Fourny	SRA 794	Vol. <sup>b</sup> /Gen.	Vol. <sup>b</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.
V15	Rhobs el Arsa	ICVN 0110244	Vol. <sup>b</sup> /Gen.	Vol. <sup>b</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.
V16	Verruqueux	SRA 1043	Vol. <sup>b</sup> /Gen.	Vol. <sup>b</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.
V17	Florence	SRA 1042	Vol. <sup>b</sup> /Gen.	Vol. <sup>b</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.	Vol. <sup>c</sup> /Phe.
V18	Ada Jamir	ICVN 0110230	Vol. <sup>b</sup> /Gen.	-	-	-
V19	Kadu Mul	SRA 717	Vol. <sup>b</sup> /Gen.	-	-	-
V20	Mac Nao N	SRA 793	Vol. <sup>b</sup> /Gen.	-	-	-
V21	Mac Nao Si	SRA 833	Vol. <sup>b</sup> /Gen.	-	-	-
V22	Poncire de Colioure	ICVN 0110233	Vol. <sup>b</sup> /Gen.	-	-	-
V23	Mac Nao San	SRA 821	Vol. <sup>b</sup> /Gen.	-	-	-
V24	Diamante d'Italie	-	Vol. <sup>b</sup> /Gen.	-	-	-

<sup>a</sup> Les noms et les numéros d'accession des variétés correspondent à ceux référencés par la station INRA GEQA  
 Vol. : <sup>b</sup> composés volatils extraits par hydrodistillation ; <sup>c</sup> composés volatils extraits par MEPS.  
 Phe. : composés phénoliques  
 Gen. : analyse génétique.

#### a) Caractéristiques génétiques

##### *Diversité cytoplasmique*

Trois marqueurs polymorphiques mitochondriaux ont été utilisés pour révéler le polymorphisme entre les génomes mitochondriaux des cédrats et les profils moléculaires

d'autres espèces d'agrumes. Ces marqueurs ont généré huit allèles (dont sept parmi le groupe des vrais cédrats) et ont permis de différencier cinq profils mitochondriaux (Figure 45).

- Un groupe de 13 cultivars (Groupe A : 'Main de Bouddha' **V1**, 'Etrog' (SRA 130) **V2**, 'Etrog' (SRA 131) **V3**, 'Etrog 861' **V4**, 'Etrog 861-S1' **V5**, 'Etrog type' **V6**, 'Humpang' **V7**, 'Diamante' **V8**, 'Corsican' **V9**, 'Poncire commun' **V10**, 'Mac Veu de Montagne' **V11**, 'Mac Nao San' **V23**, 'Diamante d'Italie' **V24**) de cédrats partageant un même profil spécifique a été identifié à partir d'autres espèces de base comme les limes, les pamplemousses et les mandarines (figure 42).

- Les 11 autres variétés ('Damas' **V12**, 'Ommeyades' **V13**, 'Fourny' **V14**, 'Rhobs el Arsa' **V15**, 'Verruqueux' **V16**, 'Florence' **V17**, 'Ada Jamir' **V18**, 'Kadu Mul' **V19**, 'Mac Nao N' **V20**, 'Mac Nao Si' **V21**, 'Poncire de Colioure' **V22**) de cédrats sont réparties dans plusieurs groupes : 'Ada Jamir' **V18** est associé à la lime « mexicaine » et 'Kadu Mul' **V19** avec les mandarines « Cléopâtre » et « Willow leaf ». Tous les autres cultivars ('Damas' **V12**, 'Ommeyades' **V13**, 'Fourny' **V14**, 'Rhobs el Arsa' **V15**, 'Verruqueux' **V16**, 'Florence' **V17**, 'Mac Nao N' **V20**, 'Mac Nao Si' **V21**, 'Poncire de Colioure' **V22**) sont caractérisés par un mitotype similaire au pamplemousse et à ses hybrides (orange amère, orange et citron).

Pour mieux cerner la diversité cytoplasmique et l'hérédité maternelle dans le groupe des cédrats, nous avons exploré le polymorphisme de marqueurs SSR (Single Sequence Repeat appelés aussi microsatellites) universels des génomes chloroplastiques (cpSSR). Les trois amorces microsatellites chloroplastiques testées sur les 24 cultivars de cédrat ont donné 13 allèles différents et ont révélé neuf profils chloroplastiques (tableau E2 : partie expérimentale).

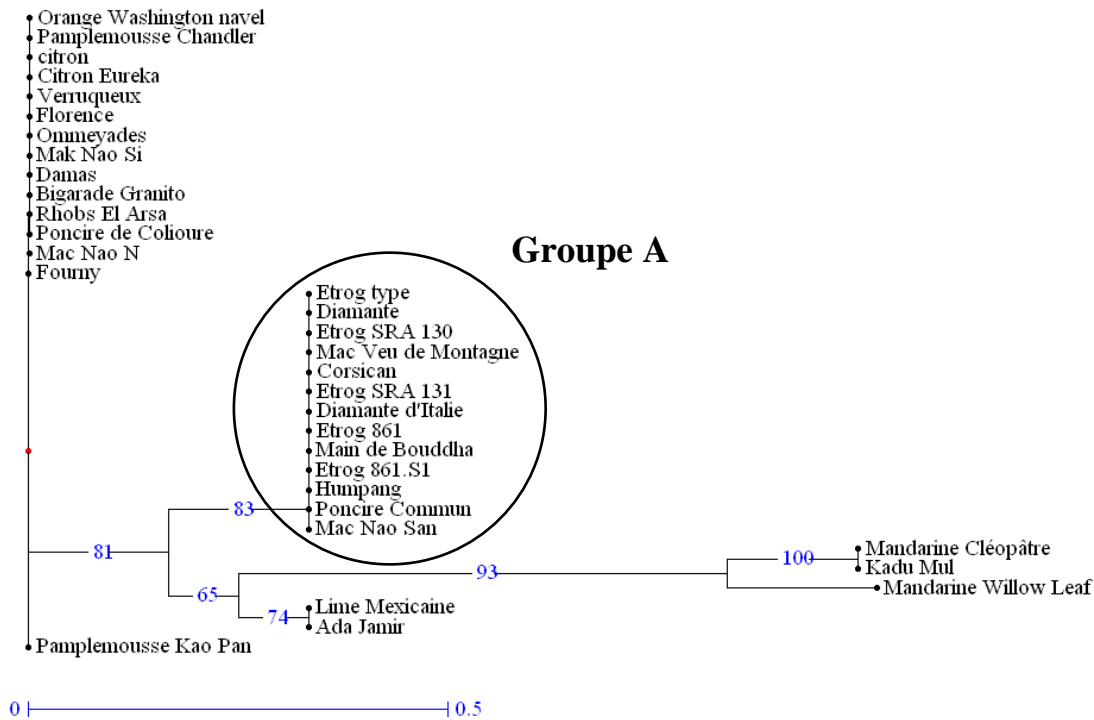


Figure 42 : Dendrogramme sur la base des marqueurs mitochondriaux représentant les relations entre 24 variétés de cédrats et huit *Citrus* de références.

Les marqueurs cpSSR des 24 variétés de cédrat et de huit agrumes de références ont été comparés (Figure 43) ; nous retrouvons le mitotype (Figure 42) regroupant treize variétés de cédrats (Groupe A : **V1-V11, V23-V24**). Ce groupe est divisé en deux sous-groupes avec les marqueurs cpSSR : l'un est constitué par les variétés 'Main de Bouddha' **V1**, 'Etrog' (SRA 130) **V2**, 'Etrog' (SRA 131) **V3**, 'Etrog 861' **V4**, 'Etrog 861-S1' **V5** et l'autre par les huit autres variétés ('Etrog type' **V6**, 'Humpang' **V7**, 'Diamante' **V8**, , 'Corsican' **V9**, 'Poncire commun' **V10**, 'Mac Veu de Montagne' **V11**, 'Mac Nao San' **V23** et 'Diamante d'Italie' **V24**). Ces deux chlorotypes se différencient uniquement par le marqueur Ccmp5 et par la variation d'un seul nucléotide.

Les autres variétés (**V12-V22**) sont soit associées à des agrumes de références soit esseulées à cause d'un chlorotype particulier (Figure 43). Les cultivars 'Damas' **V12**, 'Ommeyades' **V13**, 'Rhobs el Arsa' **V15**, 'Florence' **V17** et 'Poncire de Colioure' **V22** sont associés au chlorotype orange amère/citron. 'Fourny' **V14** et 'Mac Nao Si' **V21** sont inclus parmi les génotypes orange/pamplemousse et 'Kadu Mul' **V19** avec les variétés de mandarines. Les trois variétés restantes ('Verruqueux' **V16**, 'Ada Jamir' **V18** et 'Mac Nao N' **V20**) ont des chlorotypes originaux.

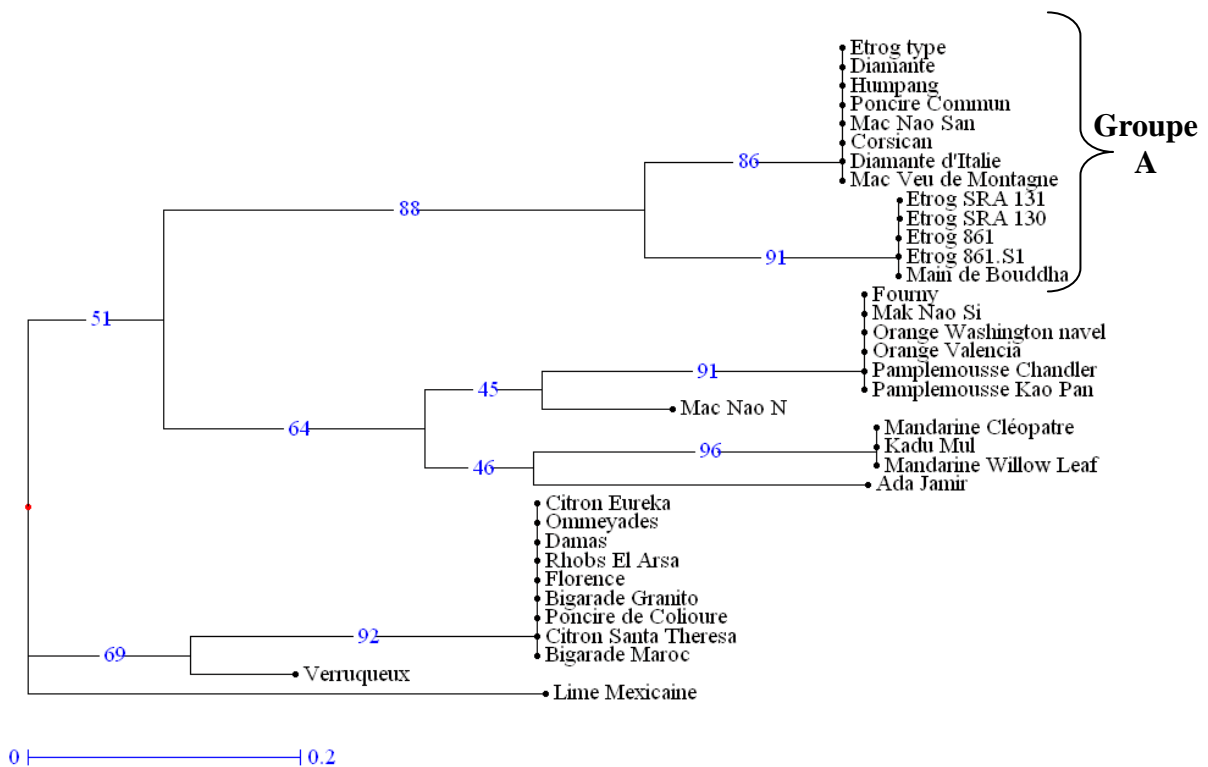


Figure 43 : Dendrogramme sur la base des marqueurs cpSSR représentant les relations entre 24 variétés de cédrats et huit *Citrus* de références.

### *Diversité des marqueurs SSR nucléaires*

Les 22 amorces SSR nucléaires ont généré un total de 130 allèles entre les différents cultivars de cédrat et allant de 3 à 10 allèles par marqueur (en moyenne 5,9 allèles / locus) (tableau E2).

Les 24 cultivars de cédrats, sont génétiquement distincts à l'exception de deux couples ayant la même empreinte génétique : 'Rhobs el Arsa' **V15** / 'Poncire de Colioure' **V22** et 'Damas' **V12** / 'Ommeyades' **V13**. Les deux cultivars de 'Diamante' cultivés en Corse (**V8**) et en Italie (**V24**) se différencient sur deux loci parmi les 22. Deux allèles supplémentaires ont été identifiés sur le cultivar 'Diamante' provenant d'Italie par rapport à celui de Corse (qui a été introduit au sein de la collection INRA de San Giuliano à partir de plants cultivés en Grèce).

De façon plus globale (figure 44), le groupe **A** (**V1-V11**, **V23-V24**) ainsi que 4 autres cultivars de cédrat ('Fourny' **V14**, 'Mac Nao Si' **V21**, 'Ada Jamir' **V18** et la lime

‘Méxicaine’) se démarquent très clairement des autres variétés d’agrumes. Les variétés de cédratier ‘Damas’ **V12**, ‘Ommeyades’ **V13**, ‘Rhobs el Arsa’ **V15** et ‘Poncire de Colioure’ **V22** forment un groupe bien distinct du précédent et des *Citrus* de références. Les variétés ‘Verruqueux’ **V16**, ‘Florence’ **V17** et ‘Mac Nao N’ **V20** sont isolées et ne font partie d’aucun groupe. La variété ‘Kadu Mul’ **V19** est associée au Citron Eureka (*C. limon*). En ce qui concerne les agrumes de références, la variété Orange « Washington navel » (*C. sinensis*), celle Bigaradier « Granito » (*C. aurantium*) et les variétés Mandarines « Cléopâtre » (*C. reshni*) et Willow leaf (*C. reticulata*) forment un groupe à part entière. Enfin, un dernier groupe est composé de deux variétés de Pamplemousses « Kao Pan » et « Chandler » (*C. maxima*).

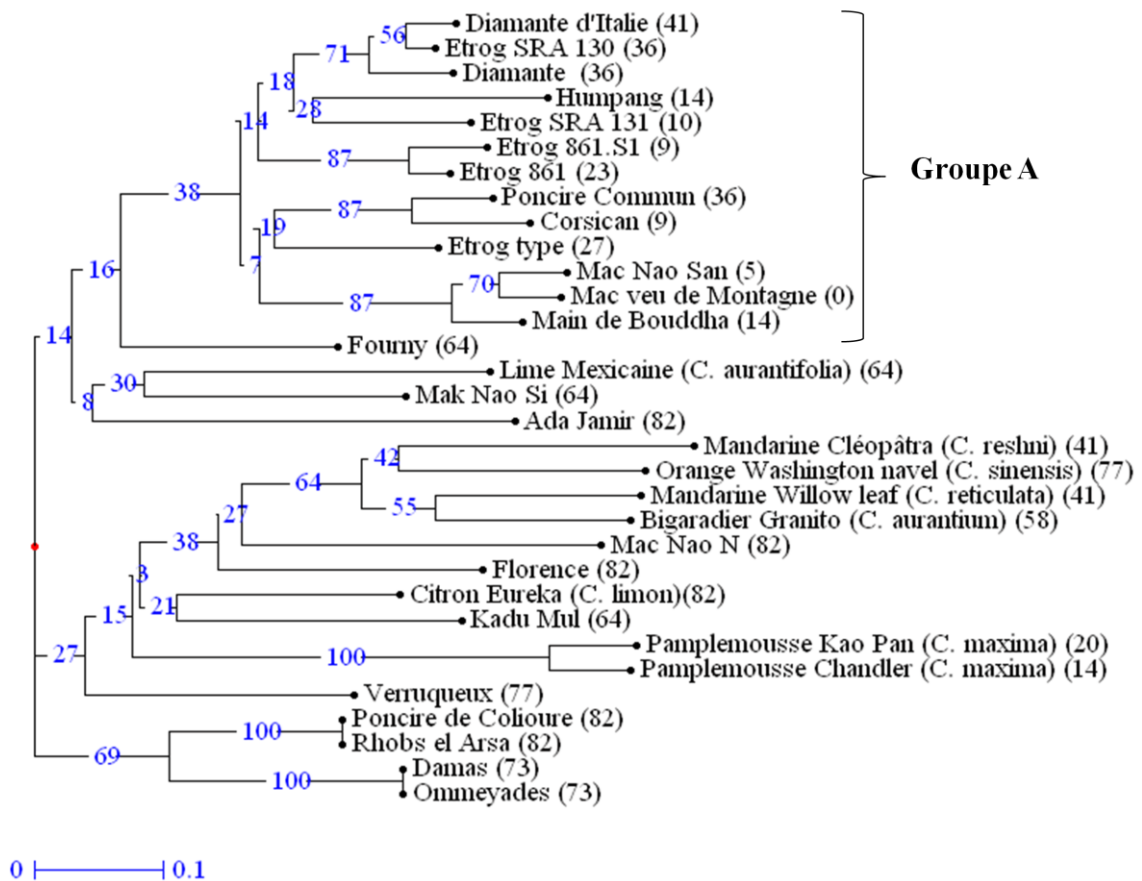


Figure 44 : Dendrogramme sur la base des marqueurs SSRg et EST-SSR représentant les relations entre les 24 variétés de cédrats et 8 *Citrus* de références.

Comme souligné précédemment (figure 42 et 43), la diversité génétique des cédratiers (figure 44) est constituée d’un groupe de 13 cultivars (Groupe A : **V1-V11, V23-V24**) génétiquement proches (faibles distances génétique entre chaque variété). Les 11 autres variétés (**V12-V22**) présentent entre-elles des distances génétiques plus importantes que celles

du groupe **A**. Celui-ci a révélé 53 allèles (2,4 allèles/locus) dont 7 spécifiques qui ne sont pas présents parmi les autres variétés. Au sein de ces dernières, qui se rapprochent des agrumes de référence pour certaines d'entre-elles, nous avons relevé 116 allèles (5,6 allèles/locus) dont 70 étaient absents du groupe **A**. Par ailleurs, l'hétérozygotie renforce la différenciation observée au niveau de la diversité allélique avec des valeurs relatives faibles ( $< 0,36$ ) pour les 13 cultivars (le groupe **A** ayant une moyenne de 0,2) et une hétérozygotie élevée pour tous les 11 autres (0,64) (figure 44). Certaines variétés ('Etrog' (SRA131) **V3**, 'Etrog 861-S1' **V5**, 'Corsican' **V9**, 'Mac Nao San' **V23**) ont une homozygotie particulièrement prononcée ( $< 0,1$ ) voir totalement fixée ('Mac Veu de Montagne' **V11**).

#### *b) Composition chimique des huiles essentielles de feuilles*

Nous avons entrepris la caractérisation de la composition chimique des huiles essentielles de feuilles des 24 variétés de cédrats par CPG et CPG/SM. Le tableau 24 reprend les 43 composés qui ont été identifiés dans les huiles essentielles pour un taux d'élucidation variant de 94,7 à 99,9% de la composition chimique totale. Ces constituants se répartissent en 12 monoterpènes hydrocarbonés **1-2, 4-9, 11-13, 16** (14,2-89,8%), 16 monoterpènes oxygénés **10, 14-15, 18-23, 25-31** (2,2-75,3%), 7 sesquiterpènes hydrocarbonés **32-38** (0,1-3,5%), 4 sesquiterpènes oxygénés **39-42** (0,0 à 1,6%), 1 diterpène oxygéné **43** (0,0-5,7%) et 3 composés oxygénés non-terpéniques **3, 17, 24** (0,0-2,5%). Le limonène **9** est le composé majoritaire avec un taux moyen de 30,9%. Les autres constituants ayant une abondance moyenne élevée sont le géraniol **28** (15,1%), le néral **26** (10,7%), le géraniol **27** (8,2%), le nérol **25** (8,0%) et le sabinène **4** (3,2%). Chacun des autres composés rapportés représentent en moyenne moins de 3% de la composition des huiles essentielles. Cependant, certains d'entre eux ( $\beta$ -pinène **5**, p-cymène **8**, 1,8-cinéole **10**, (*E*)- $\beta$ -ocimène **12**,  $\gamma$ -terpinène **13**, linalol **18**, citronellal **19**) peuvent avoir une abondance supérieure à 10% dans les huiles essentielles de quelques cultivars.

Dix variétés de cédrat (**V1-V8, V22, V24**) ont comme composés majoritaires le limonène **9** (24,0- 48,7%), le géraniol **28** (14,3-26,2%) et le néral **26** (11,6-19,0%). Parmi ces variétés, trois d'entre elles ('Main de Bouddha', 'Etrog', et 'Diamante') ont déjà été étudiées par Lota et coll. [1999] qui ont rapporté les mêmes profils chimiques. Ce chimiotype a déjà été décrit dans le genre *Citrus* puisque nous le retrouvons dans de nombreuses variétés de limes (*C. aurantifolia* : Antillaise, Nouvelle-Calédonie, Ambilobe, Mexicaine, Kirk ; *C.*



*latifolia* : El Kseur, Bearss, De Perse, Tahiti) [Lota et coll., 2002] et dans deux variétés de citrons (*C. aurata* Risso : Pomme d'Adam ; *C. pennivesiculata* (Lush.) Tan. : Moi) [Lota et coll., 2002].

Les cédratiers 'Corsican' **V9** et 'Poncire commun' **V10** sont caractérisés par des taux élevés en géraniol **27** (22,1 et 26,9%, respectivement) et en nérol **25** (16,4 et 20,2%, respectivement). A notre connaissance, des teneurs aussi élevées pour ces deux composés n'ont jamais été observé chez d'autres espèces du genre *Citrus*. La variété 'Corsican' **V9** se différencie également par une quantité non négligeable de (*E*)-phytol **43** (5,7%). Nos observations diffèrent de celles publiées précédemment par Lota et coll. [1999] qui ont indiqué que les huiles essentielles de feuilles de ces deux cultivars sont dominées par le limonène, le géraniol et le nérol.

Les huiles essentielles de six cultivars (**V11-V16**) sont dominées par le limonène **9** (23,5-47,5%) puis, en proportions du même ordre de grandeur, par le nérol **25** (9,1-11,6%), le néral **26** (7,3- 16,1%), le géraniol **27** (8,8-13,7%) et le géraniol **28** (9,1-19,1%). Ce type de profil chimique n'a jamais été décrit au sein du genre *Citrus*. Parmi ces cultivars, seul 'Rhobs el Arsa' a déjà été caractérisé [Lota et coll., 1999] ; de nouveau, nos résultats ne sont pas en accord avec ceux de ces auteurs qui, ici encore, ont rapporté un chimiotype limonène/géraniol/nérol. Le cultivar 'Mac Nao San' **V23** se démarque de ces six variétés par une forte teneur en géraniol **28** (26,9%), suivi du limonène **9** (20,9%), du nérol **25** (14,6%), du néral **26** (14,3%) et du géraniol **27** (8,7%).

Le cédrat de 'Florence' **V17** se singularise par des teneurs élevées en limonène **9** (32,2%) et en  $\beta$ -pinène **5** (23,7%). Ce type chimique a déjà été relevé chez une variété d'orange amère (*C. myrtifolia* chinensis) [Lota et coll., 2001] et une variété de citron (*C. lumia* Risso & Poit : Citron sp Jaffa) [Lota et coll., 2002]. Toutefois, aucun article ne fait référence à la composition chimique de ce cultivar.

La variété 'Ada Jamir' **V18** exhibe une composition chimique très atypique avec le 1,8-cinéole **10** comme constituant majoritaire (25,7%) ; en effet, ce composé n'a pas été trouvé dans les huiles essentielles des autres cultivars étudiés. Nos résultats sont en accord avec ceux de Lota et coll. [2002] qui avaient également observé ce chimiotype pour cette variété.

Tableau 24 : Composition chimique des huiles essentielles de feuilles de 24 cultivars de cédrat

n°	Composés	Ir L <sup>a</sup>	Ir A <sup>b</sup>	Ir P <sup>c</sup>	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13	V14	V15	V16	V17	V18	V19	V20	V21	V22	V23	V24
1	$\alpha$ -Thujène	932	922	1023	tr	tr	tr	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	tr	0,2	0,3	0,9	0,3	-	-	-
2	$\alpha$ -Pinène	936	931	1022	0,2	0,3	0,3	0,4	0,2	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	0,3	0,2	0,2	0,9	0,3	0,2	0,4	1,1	1,1	2,7	1,2	0,1	tr	0,3
3	6-Méthylhept-5-èn-2-one	963	963	1337	0,6	0,5	1,5	1,4	1,0	0,5	1,1	0,7	0,5	0,2	1,0	0,5	0,8	0,8	0,2	0,5	-	-	-	-	-	0,7	-	0,6
4	Sabinène	964	969	1111	0,6	0,5	0,7	0,6	0,5	0,1	0,1	0,2	0,1	0,4	0,2	0,2	0,3	1,7	0,2	0,2	3,4	9,1	24,7	2,3	23,9	0,3	0,1	0,7
5	$\beta$ -Pinène	978	970	1110	0,1	-	0,1	0,2	0,1	tr	tr	-	tr	0,1	tr	0,6	1,0	2,5	0,4	0,2	23,7	0,6	1,5	18,7	1,4	0,2	0,1	0,1
6	Myrcène	987	979	1159	1,2	1,0	1,2	1,5	0,9	0,8	0,9	0,7	0,3	0,8	2,1	0,8	1,4	1,3	1,1	1,5	0,9	1,4	2,7	0,9	2,7	1,1	0,5	1,4
7	$\alpha$ -Terpinène	1013	1008	1178	-	tr	0,1	0,1	tr	-	tr	-	-	tr	tr	-	2,0	tr	-	0,1	0,4	-	-	-	-	-	-	-
8	p-Cymène	1015	1010	1169	tr	0,1	0,1	0,1	0,9	0,1	0,1	-	0,2	0,2	-	0,1	tr	0,1	-	2,0	0,1	0,4	1,5	12,2	1,2	0,4	tr	0,3
9	Limonène	1025	1018	1199	33,2	37,6	38,3	39,4	27,3	24,0	33,6	29,5	13,4	26,6	47,5	23,5	24,7	32,8	40,1	46,3	32,2	15,3	22,7	4,4	29,7	35,2	20,9	48,7
10	1,8-Cinéole	1024	1020	1209	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25,7	-	-	-	-	-	-
11	(Z)- $\beta$ -Ocimène	1027	1026	1230	1,2	1,1	0,2	0,5	tr	0,5	1,2	0,3	tr	tr	-	0,6	0,4	0,8	-	-	0,7	0,7	1,0	0,3	-	-	0,4	-
12	(E)- $\beta$ -Ocimène	1029	1024	1233	1,9	1,5	0,4	1,0	0,5	1,1	1,8	0,4	0,1	0,4	1,4	5,2	4,8	6,9	7,0	1,7	5,7	2,4	3,9	11,9	2,6	10,2	0,6	0,5
13	$\gamma$ -Terpinène	1051	1047	1243	0,4	0,4	0,6	1,6	0,5	tr	1,0	-	0,1	0,1	0,1	tr	tr	0,2	tr	tr	0,4	1,9	2,8	33,3	2,1	0,0	0,2	0,4
14	(E)-Oxyde de linalol THF	1059	1059	1440	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,2	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-
15	(Z)-Oxyde de linalol THF	1073	1074	1469	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	0,1	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Terpinolène	1082	1078	1280	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	tr	-	0,1	0,1	0,3	0,1	tr	0,3	0,3	0,3	0,6	2,2	0,5	0,0	tr	0,1
17	Nonanal	1084	1083	1388	0,2	0,5	-	0,2	1,4	0,1	0,1	0,4	0,3	0,2	0,1	0,1	-	0,1	0,1	tr	0,3	0,2	-	2,1	-	0,1	0,8	0,3
18	Linalol	1086	1086	1544	0,5	1,2	0,4	1,2	-	1,0	1,6	0,6	2,4	1,3	1,0	1,0	1,1	1,2	0,7	0,7	0,7	6,2	11,0	0,4	10,0	0,8	0,8	0,8
19	Citronellal	1129	1132	1479	0,8	1,7	3,9	1,7	2,7	0,4	0,8	0,8	0,5	0,5	0,5	0,4	0,8	1,1	0,5	0,6	1,3	0,5	11,8	-	10,2	1,1	1,3	1,5
20	Isonéral	1140	1142	1556	0,8	0,5	0,9	1,0	0,4	0,7	0,2	1,1	0,2	0,1	0,4	0,8	0,9	0,9	0,3	0,3	0,3	0,2	0,1	-	tr	0,6	0,7	0,3
21	Isogéranial	1156	1159	1748	1,3	0,8	1,4	1,5	0,8	1,1	0,3	1,6	0,4	0,3	0,6	1,0	1,4	1,4	0,5	0,6	0,5	0,2	-	-	tr	1,0	tr	0,4
22	Terpinèn-4-ol	1164	1161	1600	0,1	0,1	0,3	0,3	0,2	0,1	0,6	tr	0,3	0,1	0,1	0,1	0,2	0,5	0,1	0,1	1,2	1,6	6,2	0,9	4,9	0,1	1,2	0,1
23	$\alpha$ -Terpinéol	1176	1179	1700	0,4	0,3	0,5	0,5	0,4	0,3	0,9	0,2	0,7	0,5	0,2	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	1,6	6,6	1,0	0,6	0,8	0,2	0,2	0,3
24	Décanal	1185	1185	1498	-	-	-	-	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	-	0,1	tr	-	0,6	-	-	-	-	-	-	-
25	Nérol	1210	1212	1799	7,6	7,7	5,0	5,1	8,4	10,2	3,2	9,5	16,4	20,2	10,8	10,2	11,6	9,1	10,8	11,2	1,2	7,8	1,9	0,2	2,1	4,5	14,6	3,3
26	Néral	1215	1214	1679	14,9	13,1	12,2	12,3	12,1	17,5	11,6	19,0	11,1	7,2	7,5	16,1	12,5	9,9	9,3	7,3	3,9	4,7	0,5	-	1,0	15,2	14,3	12,1
27	Géraniol	1235	1233	1843	6,8	8,6	5,1	4,2	4,5	13,7	5,5	3,2	22,1	26,9	11,6	13,7	11,9	8,8	11,1	10,1	2,4	4,8	0,1	tr	0,1	2,0	8,7	2,8
28	Géranial	1244	1245	1710	24,2	14,3	16,6	16,6	21,1	22,6	16,5	26,2	15,7	4,2	9,4	19,1	17,6	13,8	10,9	9,1	5,2	5,8	0,6	-	1,2	21,3	26,9	18,6
29	Acétate de citronellyle	1331	1334	1657	-	0,2	0,4	0,4	0,6	0,1	0,9	-	0,4	0,3	0,3	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,4	0,2	tr	0,2	0,0	0,1	0,2

<b>30</b>	Acétate de néryle	1342	1343	1725	0,1	1,4	1,7	1,7	2,2	0,7	2,7	0,3	1,5	1,1	1,2	0,7	0,6	0,5	0,4	0,6	2,3	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	1,2	0,6
<b>31</b>	Acétate de géranyle	1362	1357	1752	0,1	2,3	3,9	4,0	5,2	1,9	6,0	1,1	3,6	1,9	1,4	1,9	2,2	1,5	1,4	1,4	2,6	0,1	0,2	-	tr	1,5	3,4	2,3
<b>32</b>	( <i>E</i> )- $\beta$ -Caryophyllène	1421	1424	1591	0,8	0,5	0,5	0,4	0,4	0,7	1,8	0,4	0,4	0,3	0,4	0,7	0,4	0,4	0,4	1,5	1,9	0,1	0,2	0,4	0,2	0,2	-	0,6
<b>33</b>	<i>trans</i> - $\alpha$ -Bergamotène	1429	1431	1581	0,1	0,1	tr	tr	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,2	tr	0,1	-	0,2	-	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	0,1
<b>34</b>	( <i>E</i> )- $\beta$ -Farnésène	1446	1444	1661	0,1	-	tr	-	0,5	0,1	0,2	-	0,6	0,1	tr	0,1	tr	tr	-	0,2	0,3	-	-	-	-	-	-	-
<b>35</b>	Germacrène-D	1479	1475	1704	0,2	tr	-	-	-	-	0,2	-	0,3	0,1	-	-	-	-	-	0,1	0,1	-	0,0	-	0,1	-	-	tr
<b>36</b>	Bicyclogermacrène	1494	1489	1727	tr	0,3	0,1	tr	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,2	0,3	0,4	0,7	tr	0,2	0,3	tr	0,2	-	-
<b>37</b>	$\alpha$ -Bisabolène	1496	1495	1730	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	tr	tr	-	0,2	tr	0,1	tr	0,3	0,3	0,1	0,3	-	0,1	0,1	-	0,0	0,5	-	
<b>38</b>	$\beta$ -Bisabolène	1498	1502	1720	-	tr	0,1	0,1	0,1	0,2	0,7	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,4	tr	-	tr	tr	-	-	0,2
<b>39</b>	( <i>Z</i> )-Nérolidol	1546	1549	2037	-	0,1	0,4	tr	0,1	tr	0,4	tr	0,3	0,3	0,1	tr	0,2	0,1	0,5	-	1,1	0,6	0,1	0,1	0,3	0,4	-	0,2
<b>40</b>	Spathulénol	1557	1562	2119	-	tr	0,1	-	-	tr	-	-	0,3	0,1	-	-	-	-	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-
<b>41</b>	Santal-10- <i>en</i> -2-ol	1649	1654	2168	-	-	-	-	-	-	tr	-	0,1	0,1	-	-	-	0,1	0,1	0,1	tr	-	-	-	-	-	-	-
<b>42</b>	$\alpha$ -Bisabolol	1672	1668	2217	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,4	-	0,1	-	-	-	0,1
<b>43</b>	( <i>E</i> )-Phytol	2107	2101	2617	0,5	0,4	0,8	0,4	1,0	0,1	1,4	0,9	5,7	0,4	0,1	0,1	0,1	0,2	0,6	0,6	0,8	0,1	0,2	0,6	0,2	0,5	0,5	0,7
	Monoterpènes hydrocarbonés				38,9	42,5	42,1	45,6	31,1	26,8	38,9	31,2	14,2	28,7	51,7	31,3	35,1	47,3	49,1	52,5	68,2	33,3	62,7	89,8	65,6	47,6	22,8	52,5
	Monoterpènes oxygénés				57,6	52,2	52,3	50,5	58,6	70,3	50,8	63,6	75,3	64,6	45,0	65,5	61,5	49,5	46,5	43,0	23,3	64,4	33,9	2,2	30,7	48,6	73,4	43,3
	Sesquiterpènes hydrocarbonés				1,5	1,1	0,8	0,6	1,3	1,2	3,2	0,9	1,8	0,9	0,6	1,1	0,9	1,2	0,9	2,9	3,5	0,1	0,5	0,8	0,4	0,4	0,5	0,9
	Sesquiterpènes oxygénés				0,1	0,2	0,6	0,0	0,2	0,1	0,7	0,1	0,8	0,6	0,2	0,1	0,3	0,3	0,8	0,4	1,6	0,6	0,2	0,1	0,3	0,4	0,0	0,3
	Diterpènes oxygénés				0,5	0,4	0,8	0,4	1,0	0,1	1,4	0,9	5,7	0,4	0,1	0,1	0,1	0,2	0,6	0,6	0,8	0,1	0,2	0,6	0,2	0,5	0,5	0,7
	Autres				0,8	1,0	1,5	1,6	2,5	0,6	1,3	1,2	0,9	0,5	1,1	0,6	0,8	1,0	0,3	0,5	0,9	0,2	0,0	2,1	0,0	0,8	0,8	0,9
	<b>Total</b>				<b>99,4</b>	<b>97,4</b>	<b>98,1</b>	<b>98,7</b>	<b>94,7</b>	<b>99,1</b>	<b>96,3</b>	<b>97,9</b>	<b>98,7</b>	<b>95,7</b>	<b>98,7</b>	<b>98,7</b>	<b>98,7</b>	<b>99,5</b>	<b>98,2</b>	<b>99,9</b>	<b>98,3</b>	<b>98,8</b>	<b>97,5</b>	<b>95,5</b>	<b>97,1</b>	<b>98,3</b>	<b>98,0</b>	<b>98,6</b>

La numérotation des variétés **V1-V17** correspond à celle du tableau 23.

Les n° des composés correspondent à l'ordre d'élution sur colonne apolaire.

<sup>a</sup> Indices de rétention obtenus à partir des données de la littérature [König et coll. 2001] ; <sup>b</sup> Indices de rétention obtenus sur colonne apolaire (Rtx-1) ; <sup>c</sup> Indices de rétention obtenus sur colonne polaire (Rtx-wax).

Les abondances des composés sont exprimées en pourcentages relatifs ; tr : trace (<0,05%)

Les composés ont été identifiés à partir de la bibliothèque « arômes » du laboratoire.

Les cultivars ‘Kadu Mul’ **V19** et ‘Mac Nao Si’ **V21** sont riches en limonène **9** (22,7 et 29,7%, respectivement), sabinène **4** (24,7 et 23,9%), linalol **18** (11,0 et 10,0%) et citronellal **19** (11,8 et 10,2%). A notre connaissance, ce type de composition en volatils n’a pas été décrit dans la bibliographie relative au genre *Citrus* ; en revanche, nous retrouvons ces mêmes constituants majoritaires dans les huiles essentielles de deux variétés de citron (*C. jambhiri* Lush. : Rough lemon ; *Citrus* sp. Voangiala) [Lota et coll., 2002 ; Huang et Pu, 2000] et de trois variétés de limes (*C. limettioides* Tan. : Douce, India ; *C. limonia* Osb. Volkameriana) [Lota et coll., 2002].

Enfin, l’huile essentielle de ‘Mac Nao N’ **V20** présente également une composition chimique particulière par la présence des composés majoritaires suivants :  $\gamma$ -terpinène **13** (33,3%),  $\beta$ -pinène **5** (18,7%), p-cymène **8** (12,2%) et (*E*)- $\beta$ -ocimène **12** (11,9%). A notre connaissance, la caractérisation de la fraction légère des feuilles de cette variété n’a jamais été réalisée auparavant. D’après la littérature, l’huile essentielle de ce cultivar présente une composition comparable à celle d’une variété de citron (*Citrus* sp. Ichang) ; cette dernière est également dominée par le  $\gamma$ -terpinène et le  $\beta$ -pinène mais présente des taux en p-cymène et (*E*)- $\beta$ -ocimène plus faibles [Lota et coll., 2002].

Afin de classer les 24 variétés sur la base des compositions chimiques de leurs feuilles qui présentent une diversité chimique importante aussi bien au niveau qualitatif que quantitatif, nous avons réalisé une étude statistique par l’intermédiaire d’une analyse en composante principale (ACP, figures 45 et 46) et d’une classification ascendante hiérarchique (CAH, figure 47).

La figure 45 montre les 13 constituants représentatifs de la variabilité des huiles essentielles de feuilles. Les deux axes principaux F1 et F2 représentent respectivement 35,58% et 18,40% de la variabilité des échantillons (Figures 45 et 46). L’axe F1 est corrélé positivement avec trois composés (sabinène **4**, linalol **18**, citronellal **19**) et négativement avec quatre composés (nérol **25**, néral **26**, géraniol **27**, géranial **28**). L’axe F2 est corrélé positivement avec quatre composés ( $\beta$ -pinène **5**, p-cymène **8**, (*E*)- $\beta$ -ocimène **12**,  $\gamma$ -terpinène **13**) et négativement avec, également, quatre composés (sabinène **4**, limonène **9**, linalol **18**, citronellal **19**).

Les figures 46 et 47 permettent de visualiser deux groupes d'échantillons en fonction de leurs compositions chimiques et sur la base des variables définies à la figure 45.

Le premier groupe (**I**) est composé de 19 variétés (**V1-V16, V22-V24**) ; il est caractérisé par un type chimique à 5 constituants majoritaires : limonène / nérol / géraniol / géraniol / néral. L'analyse approfondie de la figure 47 permet de distinguer trois chimiotypes au sein de ce groupe.

- Le premier d'entre eux, est constitué de 12 variétés (**V1-V8, V12, V22-V24**) caractérisées par des taux élevés en limonène **9**, en néral **26** et en géraniol **28**.
- Le deuxième chimiotype contient deux variétés ('Corsican' **V9** et 'Poncire commun' **V10**) qui ont une composition chimique riche en nérol **25** et en géraniol **27** ainsi que des teneurs en limonène **9**, néral **26** et géraniol **28** plus faibles que les autres variétés du groupe **I**.
- Enfin, le troisième chimiotype est formé par 5 variétés (**V11, V13-V16**) dont les compositions chimiques sont dominées par le limonène **9** et dans une moindre mesure par des teneurs équivalentes en nérol **25**, néral **26**, géraniol **27** et géraniol **28**.

Le deuxième groupe (**II**) contient cinq variétés (**V17-V21**) dont les profils chimiques sont très diversifiés. Seuls les cultivars Kadu Mul' **V19** et 'Mac Nao Si' **V21** ont des huiles essentielles présentant des compositions chimiques comparables avec comme composés majoritaires le sabinène **4**, le limonène **5**, le linalol **18** et le citronellal **19**. Les trois autres variétés (**V17, V18** et **V20**) sont isolées les unes des autres en raison de compositions chimiques variées : l'huile essentielle de 'Florence' **V17** est dominée par le limonène **9** et le  $\beta$ -pinène **5**; celle de 'Ada Jamir' **V18** par le 1,8-cinéole **10** et le limonène **9** ; celle de 'Mac Nao N' **V20** par le  $\gamma$ -terpinène **13**, le  $\beta$ -pinène **5**, le p-cymène **8** et le (*E*)- $\beta$ -ocimène **12**.

Enfin, nous n'observons qu'un recouvrement partiel entre les groupes génétiques et chimiques, puisque le groupe **A** (**V1-V11, V23-V24**) - mis en évidence avec les analyses génétiques - se retrouve intégralement dans le groupe **I**. Cependant les 13 variétés du groupe **A** sont dispersées en 3 chimiotypes à l'intérieur du groupe **I**. De plus, ce dernier comprend 6 variétés (**V12-V16, V22**) absentes du groupe **A**.

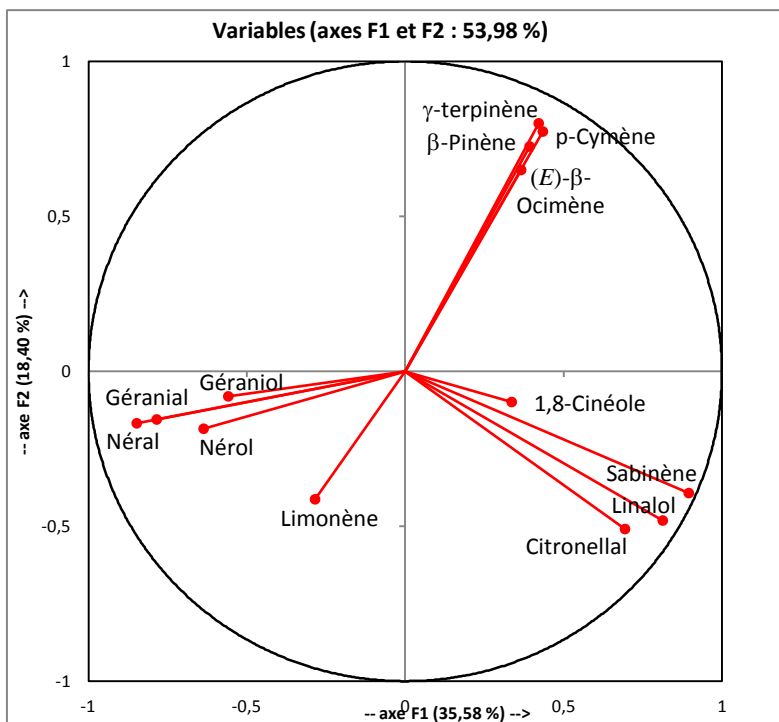


Figure 45 : ACP de la distribution des principaux composés volatils des feuilles de 24 variétés de cédrat

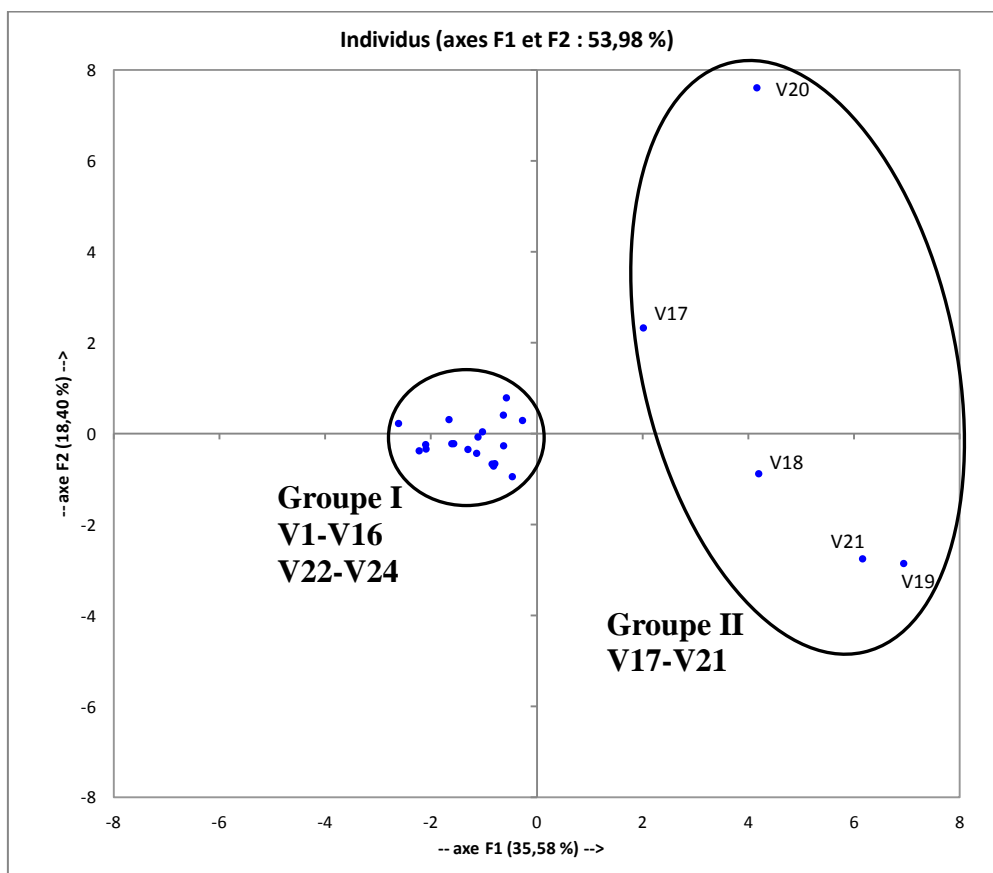


Figure 46 : ACP de la distribution des cultivars **V1-V24** (tableau 22) en fonction de la composition des huiles essentielle de feuilles

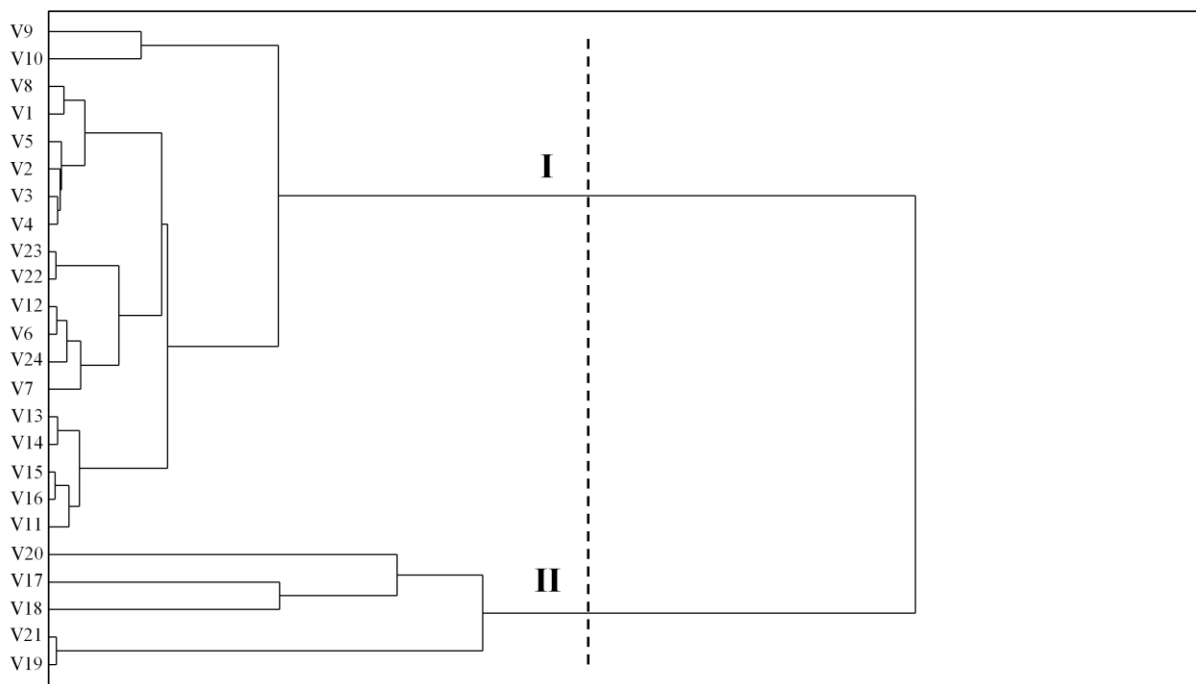


Figure 47 : CAH des 24 variétés **V1-V24** (tableau 22) de cédrat en fonction de la composition chimique des huiles essentielles de feuilles

## II.2.2. Les fruits : approche chimio-taxonomique de 17 variétés

Dans cette partie, les 17 variétés de fruits étudiées (**V1-V17**) ont été sélectionnées sur la base de l'approche chimique. A l'exception de la variété 'Florence', elles appartiennent toutes au groupe **I** établi sur la base de la composition chimique des huiles essentielles de feuilles. Ces variétés présentent des types chimiques statistiquement proches au niveau des volatils des feuilles ; l'objectif est donc de les différencier à l'aide de la composition volatile et phénolique des fruits.

### a) Caractéristiques morphologiques des cédrats

Les fruits de cédratiers de la variété 'Corsican' **V9** sont généralement de couleur jaune-orange clair, de forme large et elliptique, ayant des dimensions de 7 à 10 cm en largeur et de 8 à 14 cm en longueur. Cette variété est la seule dont la pulpe n'est pas acide.

Le cultivar 'Main de Bouddha' **V1** est un cédrat de forme atypique puisque le fruit se divise en plusieurs sections dont l'apparence rappelle une main. Les fruits des quatre 'Etrog' **V2-V5** sont de taille plus petite que ceux de la variété 'Corsican' **V9**. Ils correspondent à

diverses accessions ('Etrog' (SRA 130) **V2**, 'Etrog' (SRA 131) **V3**, 'Etrog 861' **V4**, 'Etrog 861-S1' **V5**) du même phénotype ; ils sont de couleur jaune, généralement lisses, ellipsoïdes à fusiformes. Les fruits de forme ellipsoïde des variétés 'Etrog type' **V6** et 'Diamante' **V8** (largement cultivé en Calabre) sont plus réguliers et moins bosselés que ceux de 'Corsican' **V9**. La variété 'Humpang' **V7** produit des fruits de grande taille, d'aspect lisse et de forme ellipsoïdale. Le fruit de 'Poncire commun' **V10** est similaire au niveau de la taille et de la forme à ceux des variétés 'Etrog' **V2-V5**. Les fruits de 'Mac Veu de Montagne' **V11** sont petits, jaunes et de forme globuleuse à ovale. Les fruits de 'Damas' **V12** et 'Ommeyades' **V13** sont semblables : jaunes, ellipsoïdales, rugueux, bosselés et légèrement plus petits que ceux de 'Corsican' **V9**. Le cultivar 'Fourny' **V14** est considéré comme un hybride de cédrat et de citron ; il produit des fruits jaunes, piriformes et de taille comparable à ceux de 'Corsican' **V9**. Le nom 'Rhobs el Arsa' **V15** signifie 'pain du jardin' en arabe et reflète les caractères du fruit : grand, plat et jaune. Le fruit de 'Verruqueux' **V16** a la forme d'une lime ; il est de petite taille avec un zeste très rugueux.

Enfin, le fruit de la variété 'Florence' **V17** est de taille importante, de forme globuleuse et possède un grand apex mammiforme. Les fruits de cette variété sont d'abord de couleur brun-rose puis virent à l'orange en murissant. Ce cultivar, probablement d'origine hybride, est couramment utilisé dans le sud de la France (Menton) pour confectionner de la « marmelade de cédrat ».

#### *b) Compositions volatile et phénolique des zestes*

##### *Les huiles essentielles*

Par analyse en CPG et CPG/SM (cf. Partie **A III.1**), nous avons déterminé la composition chimique des huiles essentielles de zestes des 17 variétés de cédrat (**V1-V17**) cultivés en Corse au sein de la station de recherche UR INRA-GEQA. Les compositions de ces huiles essentielles de zestes sont données dans le tableau 25 pour lequel nous avons conservé le numérotage des volatils des huiles essentielles de feuilles répertoriés au tableau 24.



Tableau 25 : Compositions chimiques des huiles essentielles de zestes de 17 cultivars de cédrat

n°	Composés	Ir L <sup>a</sup>	Ir A <sup>b</sup>	Ir P <sup>c</sup>	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13	V14	V15	V16	V17
1	$\alpha$ -Thujène	932	922	1023	1,4	0,7	0,6	1,1	1,0	-	1,3	-	0,7	0,7	0,7	tr	-	-	-	-	0,1
2	$\alpha$ -Pinène	936	931	1022	3,2	2,0	1,4	2,6	2,4	0,4	2,9	0,3	1,7	1,6	1,7	0,8	0,6	0,7	0,6	0,6	1,1
3	6-Méthylhept-5-èn-2-one	963	963	1337	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	0,2	tr	0,3	0,2	0,1	0,1	-	0,1	tr	tr	-	0,1
4	Sabinène	964	969	1111	0,4	0,4	0,2	0,3	0,3	0,2	0,4	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,5	0,1	0,1	1,8
5	$\beta$ -Pinène	978	970	1110	2,9	1,8	1,8	2,4	2,4	0,5	2,7	0,2	1,6	1,7	2,1	0,1	-	2,5	-	-	12,4
6	Myrcène	987	979	1159	1,7	2,1	1,5	1,7	1,7	1,7	1,7	1,4	1,3	1,5	1,3	3,1	2,7	2,7	2,4	2,8	2,0
7	$\alpha$ -Terpinène	1013	1008	1178	0,7	0,1	0,4	-	0,5	-	0,7	-	0,4	0,4	0,1	-	-	-	-	-	tr
8	p-Cymène	1015	1010	1169	3,4	0,4	3,6	0,5	5,7	-	4,5	tr	1,1	2,3	10,7	-	-	-	-	-	-
9	Limonène	1025	1020	1199	39,5	58,1	46,5	51,0	44,8	64,6	43,3	57,8	43,7	47,5	42,7	89,1	83,8	84,5	86,3	94,3	66,8
11	(Z)- $\beta$ -Ocimène	1027	1026	1230	-	-	0,1	0,1	0,5	-	0,2	-	0,6	-	0,3	-	-	-	-	-	-
12	(E)- $\beta$ -Ocimène	1029	1024	1230	0,5	0,9	0,4	1,1	1,0	0,8	1,2	0,2	1,5	1,2	0,6	0,4	0,4	0,8	0,1	-	0,6
13	$\gamma$ -Terpinène	1051	1047	1243	28,6	15,2	23,9	27,2	25,2	-	30,1	0,3	16,8	17,9	17,3	2,0	0,1	tr	-	0,2	1,4
16	Terpinolène	1082	1078	1280	1,4	0,7	1,0	1,2	1,2	0,2	1,4	-	0,7	0,8	0,7	0,1	tr	tr	0,1	-	0,1
17	Nonanal	1084	1083	1388	0,1	0,1	0,1	tr	tr	-	-	0,2	tr	0,2	-	0,1	0,1	0,1	-	-	0,2
18	Linalol	1086	1081	1544	0,3	0,4	0,3	0,2	0,2	0,6	0,3	0,6	0,5	0,5	0,8	0,3	0,7	0,7	0,5	0,2	0,6
19	Citronellal	1129	1132	1479	0,5	0,2	0,2	0,3	0,3	0,4	0,1	0,4	0,6	0,4	0,4	0,2	0,2	0,1	0,1	-	0,1
20	Isonéral	1140	1142	1556	0,3	0,2	0,3	0,1	0,2	0,5	0,1	0,4	0,6	0,3	0,3	tr	0,2	0,1	0,1	-	0,1
21	Isogéranial	1156	1159	1748	0,5	0,3	0,5	0,2	0,4	0,8	0,1	0,7	1,1	0,6	0,7	0,1	0,3	0,2	0,1	tr	0,2
22	Terpinèn-4-ol	1164	1161	1600	0,5	0,2	0,4	0,2	0,3	0,1	0,4	tr	0,4	0,5	0,6	0,1	tr	0,1	-	-	0,3
23	$\alpha$ -Terpinéol	1176	1179	1700	0,9	0,5	0,7	0,4	0,5	0,3	0,7	0,2	0,8	0,9	0,9	0,1	0,2	0,3	0,2	0,1	0,8
24	Décanal	1185	1185	1498	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2
25	Nérol	1210	1212	1799	1,2	2,2	1,1	0,6	0,6	2,6	1,3	5,7	2,1	1,2	0,9	0,2	1,1	0,6	1,6	-	0,7
26	Néral	1215	1214	1679	3,6	3,3	4,8	2,0	3,1	8,8	1,3	8,7	7,8	6,8	5,9	0,3	2,2	1,3	1,5	0,2	1,7
27	Géraniol	1235	1233	1843	1,2	2,3	1,4	0,8	0,6	2,7	1,5	7,6	2,5	1,1	1,0	0,2	1,7	0,8	1,7	-	1,0
28	Géranial	1244	1245	1710	5,2	4,6	7,0	2,9	4,7	12,0	1,8	11,6	10,9	9,4	8,5	0,4	3,1	1,8	1,7	0,3	2,6
29	Acétate de citronellyle	1331	1334	1657	tr	0,1	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	Acétate de néryle	1342	1343	1725	0,3	1,2	0,3	0,6	0,5	0,9	0,1	0,5	0,7	0,4	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	-	0,5
31	Acétate de géranyle	1362	1357	1752	0,2	0,8	0,5	1,0	0,6	0,5	0,2	0,3	0,6	0,2	0,3	0,1	1,0	0,4	0,3	0,1	0,8
32	(E)- $\beta$ -Caryophyllène	1421	1424	1591	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	tr	0,1	0,1	0,2	-	-	0,1	0,1	0,1	-	0,2
33	<i>trans</i> - $\alpha$ -Bergamotène	1429	1431	1581	0,1	0,3	0,1	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3
34	(E)- $\beta$ -Farnésène	1446	1444	1661	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	0,1	-	0,1
35	Germacrène-D	1479	1475	1704	0,2	0,1	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	-	-	-	-	0,4	0,6

<b>36</b> Bicyclogermacrène	1494	1489	1727	tr	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	0,2
<b>37</b> $\alpha$ -Bisabolène	1496	1495	1730	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>38</b> $\beta$ -Bisabolène	1498	1502	1720	0,2	0,4	0,2	-	0,3	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2	0,1	0,1	0,6	0,5	0,4	0,4	0,6	
<b>39</b> (Z)-Nérolidol	1546	1549	2037	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1
<b>41</b> Santal-10-èn-2-ol	1649	1654	2168	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	-
Monoterpènes hydrocarbonés				83,7	82,4	81,4	89,2	86,7	68,4	90,4	60,3	70,3	75,8	78,4	95,8	87,7	91,7	89,6	98,0	86,3	
Monoterpènes oxygénés				14,7	16,3	17,5	9,4	12,0	30,2	7,9	36,7	28,6	22,3	20,5	2,1	10,8	6,6	7,9	0,9	9,4	
Sesquiterpènes hydrocarbonés				0,6	1,0	0,4	0,9	0,7	0,9	0,6	0,7	0,4	0,5	0,2	0,2	1,2	1,0	0,9	1,0	2,0	
Sesquiterpènes oxygénés				0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	tr	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	
Autres				0,2	0,2	0,2	0,0	0,1	0,2	0,0	0,7	0,2	0,3	0,1	0,1	0,2	0,1	0,0	0,0	0,5	
<b>Total</b>				<b>99,2</b>	<b>99,9</b>	<b>99,5</b>	<b>99,5</b>	<b>99,5</b>	<b>99,7</b>	<b>98,9</b>	<b>98,4</b>	<b>99,5</b>	<b>98,9</b>	<b>99,2</b>	<b>98,2</b>	<b>99,9</b>	<b>99,4</b>	<b>98,4</b>	<b>99,9</b>	<b>98,3</b>	

La numérotation des variétés **V1-V17** correspond à celle du tableau 22.

Les n° des composés correspondent à ceux du tableau 23 (ordre d'élution sur colonne apolaire).

<sup>a</sup> Indices de rétention obtenus à partir des données de la littérature [König et coll. 2001]

<sup>b</sup> Indices de rétention obtenus sur colonne apolaire (Rtx-1)

<sup>c</sup> Indices de rétention obtenus sur colonne polaire (Rtx-wax)

Les abondances des composés sont exprimées en pourcentages relatifs.

tr : trace (<0,05%)

Les composés ont été identifiés à partir de la bibliothèque « arômes » du laboratoire.

Nous constatons qu'elles sont particulièrement riches en monoterpènes hydrocarbonés qui représentent jusqu'à 98% de la composition chimique totale. 37 composés ont été identifiés (tableau 25) ; ils se répartissent en 12 monoterpènes hydrocarbonés **1-2, 4-9, 11-13, 16** (60,3 à 98,03%), 13 monoterpènes oxygénés **18-23, 25-31** (0,9 à 36,7%), 7 sesquiterpènes hydrocarbonés **32-38** (0,2 à 2,0%), 2 sesquiterpènes oxygénés **39, 41** (0,0 à 0,1%) et 3 composés non-terpéniques oxygénés **3, 17, 24** (0,0 à 0,7%). Au niveau des composés, nous observons que le limonène **9** présente toujours les teneurs les plus élevées (39,5-94,3%), suivi pour 9 cultivars sur 17 du  $\gamma$ -terpinène **13** (15,2-30,1%).

Les essences de zestes des différentes variétés présentent donc des profils chromatographiques qualitativement similaires mais quantitativement variables. Pour traiter ces données, nous avons eu recours à des analyses statistiques par Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) et Analyse en Composante Principale (ACP) sur la matrice regroupant la composition des huiles essentielles des 17 variétés.

La figure 48 issue des analyses en CAH suggère l'existence de deux groupes chimiques distincts. Le premier groupe (groupe **I**) est divisé en deux sous-groupes **Ia** et **Ib** qui comprennent neuf (**V1-V5, V7, V9-V11**) et deux (**V6, V8**) variétés, respectivement. Les six autres cultivars (**V12-V17**) font partie du second groupe (groupe **II**) ; au sein de ce dernier, nous constatons que le cultivar 'Florence' **V17** est isolé des autres variétés.

Cette différenciation est également observée après analyse en ACP ; les figures 49 et 50 illustrent respectivement la distribution des composés volatils (37 variables) et des cultivars (échantillons) sur les axes F1 et F2. Ces derniers représentent 50,01% de la variabilité chimique des huiles de zestes. L'axe F1 (30,09%) est corrélé positivement avec le limonène **9** et négativement avec le  $\gamma$ -terpinène **13**, le néral **26** et le géranial **28**. Pour l'axe F2 (19,93%) une corrélation positive est rapportée avec le couple néral **26** et géranial **28** alors qu'une corrélation négative est observée avec le  $\gamma$ -terpinène **13** (figure 49).

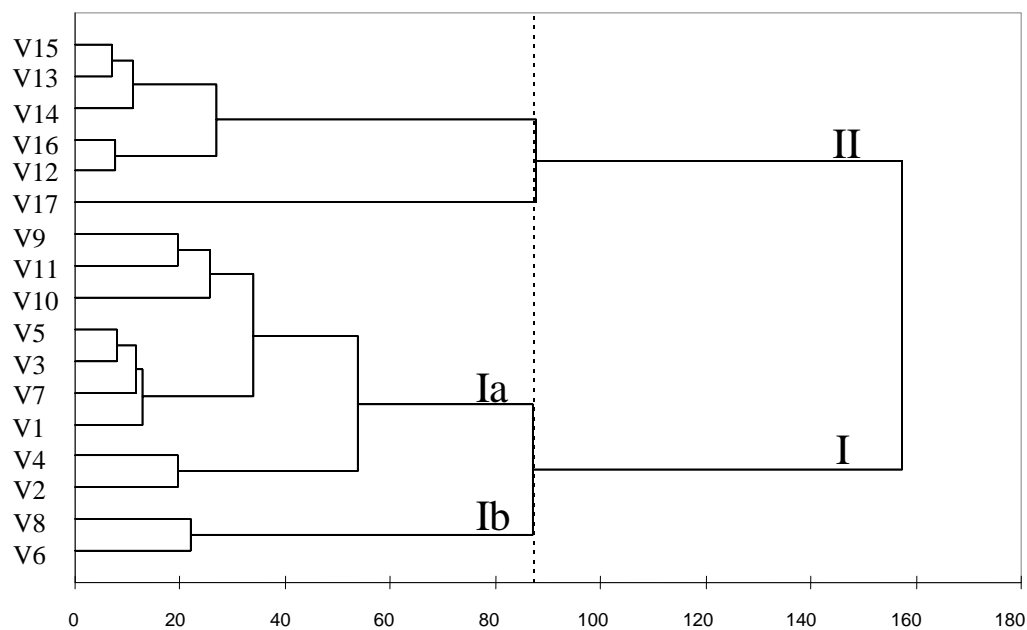


Figure 48 : CAH des 17 variétés de cédrat **V1-V17** (tableau 23) en fonction de la composition chimique des huiles essentielles de zestes

L'ACP donnée à la figure 50 montre qu'un premier groupe (groupe **I**) rassemble 11 cultivars (**V1-V11**). Cependant, il se décompose en deux sous groupes **Ia** et **Ib** que nous avons observé déjà sur le dendrogramme (figure 48). Les neuf variétés (**V1-V5**, **V7**, **V9-V11**) constituant le groupe **Ia** sont caractérisées par le couple limonène **9** (39,5-58,2%) et  $\gamma$ -terpinène **13** (15,2-30,1%). Seulement trois de ces variétés ('Main de Bouddha', 'Etrog', 'Corsican') ont été préalablement étudiées dans la littérature [Lota et coll., 1999 et Shiota, 1990]; les auteurs ont rapporté des compositions chimiques similaires aux nôtres. Le chimiotype limonène/ $\gamma$ -terpinène est très couramment observé pour les espèces de *Citrus* et a été rapporté notamment pour de nombreuses espèces de limes (*C. latifolia* et *C. aurantifolia*) et de citrons (*C. limon*) [Lota et coll., 2002]. Le groupe **Ib** est composé des cultivars 'Diamante' **V8** et 'Etrog type' **V6** dont les huiles essentielles sont dominées par le limonène **9** (57,8 et 64,6% respectivement), le gèranial **28** (11,6 et 12,0%) et le néral **26** (8,7 et 8,8%). A notre connaissance, ce type chimique n'a jamais été décrit pour les huiles de zestes d'autres espèces du genre de *Citrus*. Les études de Lota et coll [1999] et de Vekiari et coll. [2004] menées sur la variété 'Diamante' sont en accord avec nos observations alors que les analyses réalisées par Poiana et coll. [1998] mettent en évidence un profil limonène/ $\gamma$ -terpinène.

Le second groupe contient les six autres variétés (**V12-V17**). Le limonène **9** - avec des teneurs allant de 66,8 à 94,3% de la composition chimique totale - est le seul composé majoritaire des huiles essentielles des cinq variétés **V12** à **V16** ; les autres constituants ont des teneurs inférieures à 4% à l'exception, toutefois du  $\beta$ -pinène (12,4%) pour le cultivar 'Florence' **V17**. Une seule de ces variétés - à savoir 'Rhobs el Arsa' - a déjà fait l'objet d'une caractérisation de la composition de l'huile essentielle de zestes ; nos résultats sont analogues à ceux décrits dans cette étude [Lota et coll., 1999]. Par ailleurs, ce chimiotype à dominance limonène a été rapporté dans divers travaux relatifs à la composition volatile des mandarines (*C. reticulata*) [Fanciullino et coll., 2006] et des oranges (*C. aurantium*) [Huet, 1991 ; Lota et coll., 2001].

Le regroupement des cultivars en fonction de la composition chimique des huiles de zestes (figure 48) présente certaines analogies vis-à-vis de celui observé pour les huiles de feuilles (figure 47). En effet, le cultivar **V17** apparaît toujours détaché des autres cultivars. Les variétés **V13** à **V16** sont toujours réunies au sein du même groupe. Enfin, les cultivars **V1-V5** et **V7** ont eux aussi des profils chimiques semblables dans les feuilles et les zestes.

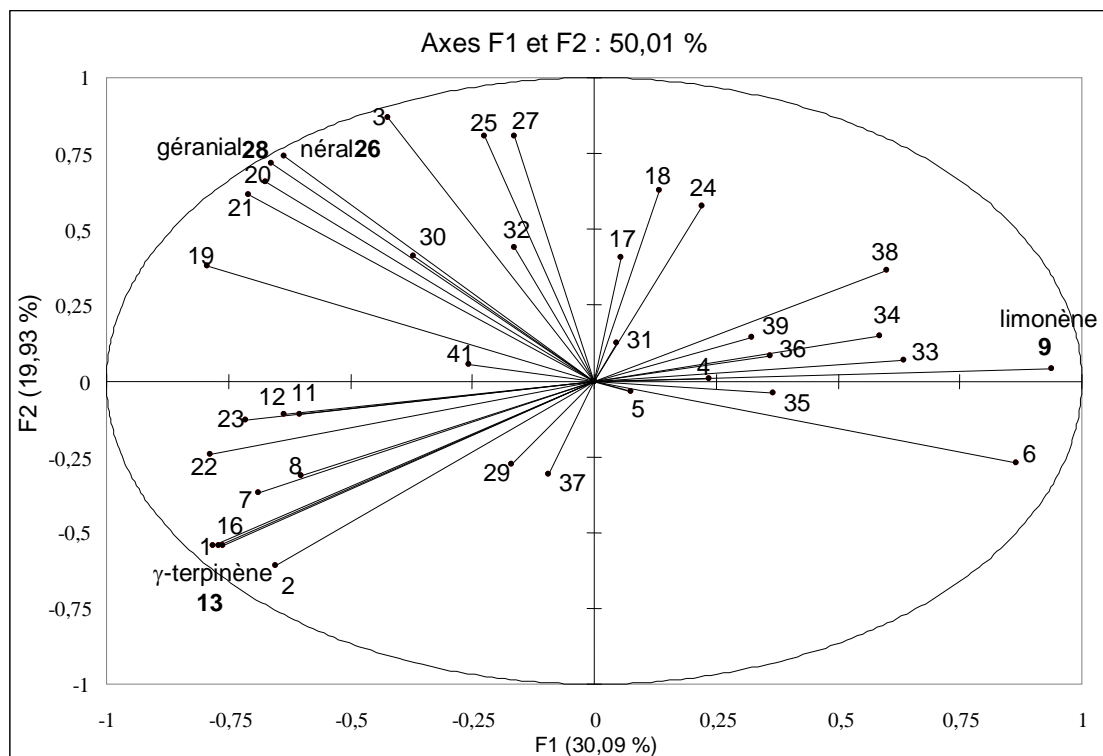


Figure 49 : ACP de la distribution des composés volatils (tableau 24) identifiés dans les zestes de 17 variétés de cédrat

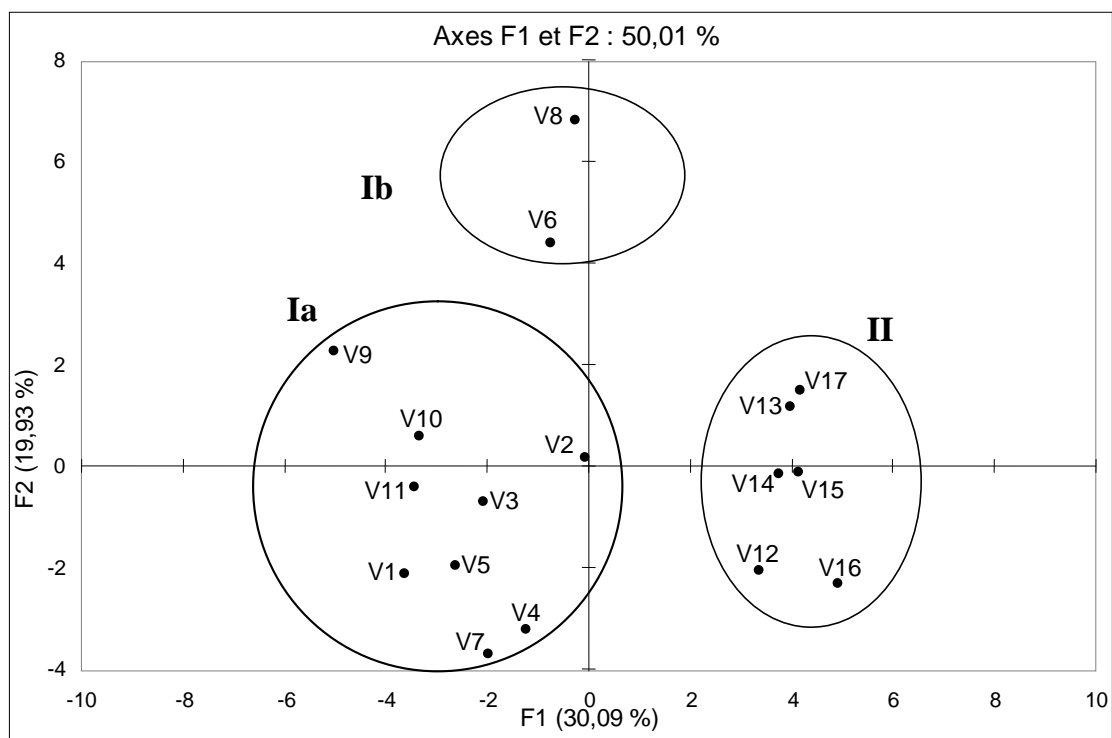


Figure 50 : ACP de la distribution des cultivars **V1-V17** (tableau 23) en fonction de la composition des huiles essentielles de zestes

### *Les extraits*

Nous avons également étudié les compositions phénoliques des zestes de 17 variétés de cédrats (**V1-V17**). Pour cela, nous avons réalisé des extractions par macération des zestes dans le méthanol pendant 24 heures (cf. partie expérimentale). Après filtration, les extraits obtenus ont été analysés par CLHP/SM-ESI selon la méthodologie décrite précédemment (cf. Partie A **III.2**).

Nous identifions 30 composés se répartissant en sept acides (cinq acides phénoliques **1, 4-7** et deux dérivés d'acides phénoliques **2-3**), huit flavones (sept non glycosylées **18, 22-23, 26-29** et une glycosylée **11**), six flavanones (deux non glycosylées **19-20** et quatre glycosylées **8, 10, 12, 15**), sept flavonols (cinq non glycosylés **13, 16, 24-25, 30** et deux glycosylés **9, 14**), une dihydrochalcone **17** et un biflavonoïde **21** (tableau 26).

Tableau 26 : Composition phénolique des extraits de zestes de 17 cultivars de cédrat

n°	Composés	TR (mm)	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13	V14	V15	V16	V17
1	Ac. Gallique	1,9	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr
2	Ac. Shikimique	2,2	5,1	-	1,2	8,6	0,3	4,0	tr	14,7	9,7	13,0	tr	32,2	19,3	4,4	2,5	15,1	-
3	Ac. Quinique	2,4	200,4	304,0	283,2	249,5	297,0	254,8	399,0	348,5	303,0	432,5	497,5	695,0	615,0	384,4	474,5	535,0	69,5
4	Ac. Vanillique	3,3	-	5,6	0,9	-	-	3,7	1,1	-	3,1	3,0	-	-	-	2,5	-	1,9	-
5	Ac. p-Coumarique	6,7	13,0	8,3	2,0	5,3	0,7	3,1	8,6	93,0	7,7	3,3	5,0	34,2	3,9	48,8	3,8	11,9	52,6
6	Ac. Sinapique	7,2	-	-	-	4,6	-	1,5	2,4	-	1,1	11,0	1,8	54,5	12,1	6,6	2,2	8,8	21,5
7	Ac. Ferulique	7,4	0,3	5,7	14,1	4,6	9,7	5,9	8,8	34,5	7,2	5,1	10,1	101,0	79,4	11,3	79,5	36,6	35,8
8	Flavanomarine	7,7	-	-	-	-	-	1,2	-	-	1,4	1,3	-	-	5,2	-	1,3	4,7	2,8
9	Hyperoside	8,3	2,5	2,0	3,8	2,1	1,8	3,9	15,9	2,7	12,1	6,8	3,7	2,6	1,7	2,2	1,1	19,5	10,8
10	Narirutine	8,4	-	0,6	-	-	-	0,6	0,0	-	0,2	tr	tr	0,8	tr	1,1	5,3	0,9	0,2
11	Diosmine	8,5	-	4,7	4,5	1,0	1,8	2,1	4,5	2,2	5,1	3,8	0,8	10,3	7,3	8,1	-	2,4	5,0
12	Néohespéridine	8,5	16,8	1,4	2,2	-	1,5	4,4	3,7	5,9	10,2	2,0	2,9	32,1	48,4	9,5	10,8	18,7	7,8
13	Quercétine	8,6	33,4	-	-	8,0	4,2	-	6,1	-	-	-	2,4	-	52,4	-	-	34,3	-
14	Rutine	8,6	49,5	73,6	26,2	90,5	51,0	42,8	1116,0	31,2	27,2	770,0	363,5	328,0	492,0	716,0	206,4	1545,0	408,5
15	Néoériocitrine	8,7	-	5,2	0,1	4,5	-	0,6	0,5	-	-	1,0	0,8	-	13,9	4,4	58,9	18,1	255,5
16	Robinétine triméthylether	8,7	0,7	-	4,4	4,2	-	3,8	3,8	2,2	2,8	3,1	-	-	0,4	3,3	3,5	14,4	1,3
17	Néohespéridine dihydrochalcone	8,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,4	-	-	1,7	-	1,4	2,0	-
18	Wogonine	9,5	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	Hespéretine	9,8	0,6	-	-	-	0,6	-	0,3	0,6	-	-	0,6	0,6	0,1	0,4	0,1	0,2	0,7
20	Naringénine	9,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	0,4	-	-
21	Amentoflavone	10,3	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-
22	Lutéoline	11,0	-	-	-	-	-	-	-	tr	0,1	-	-	-	-	0,1	-	-	0,5
23	Sinensétine	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,3	tr	tr	0,4	tr	0,2	tr	tr	6,8	tr
24	Datiscétine	11,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	Casticine	11,2	0,4	tr	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	-	0,1	0,1	-	0,8	0,3
26	Eupatorine	11,3	-	-	-	0,5	-	-	1,2	-	-	0,8	3,7	0,8	0,8	1,5	3,6	2,8	3,8
27	Nobilétine	11,3	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	-	tr	tr	tr	0,1	0,2	2,4	tr	4,5	1,3	tr

<b>28</b>	Scutellaréine tetraméthylether	11,5	tr	tr	tr	0,2	tr	tr	tr	0,1	-	-	1,0	0,1	0,1	tr	tr	36,0	tr
<b>29</b>	Tangérétine	11,8	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	tr	tr
<b>30</b>	Retusine	12,4	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	-	tr	-	-	tr	tr	tr	0,3	-	tr
	Acides phénoliques	13,3	19,6	16,9	14,4	10,4	14,3	20,8	127,5	19,0	22,4	16,8	189,7	95,4	69,3	85,5	59,2	109,9	
	Dérivés acides phénoliques	205,5	304,0	284,4	258,1	297,3	258,8	399,0	363,2	312,7	445,5	497,5	727,2	634,3	388,8	477,0	550,1	69,5	
	Flavones	0,4	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	1,2	0,4	0,1	0,8	5,2	1,1	3,5	1,6	8,1	46,9	4,3	
	Flavones glycosylés	0,0	4,7	4,5	1,0	1,8	2,1	4,5	2,2	5,1	3,8	0,8	10,3	7,3	8,1	0,0	2,4	5,0	
	Flavanones	0,6	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,3	0,6	0,0	0,0	0,6	0,6	0,7	0,4	0,5	0,2	0,7	
	Flavanones glycosylés	16,8	7,2	2,3	4,5	1,5	6,8	4,2	5,9	11,8	4,3	3,7	32,9	67,5	15,0	76,3	42,4	266,3	
	Flavonols	34,5	0,0	4,4	12,2	4,3	4,1	10,0	2,3	2,8	3,1	2,5	0,0	52,9	3,5	3,7	49,5	1,5	
	Flavonols glycosylés	52,0	75,6	30,0	92,6	52,8	46,7	1131,9	33,9	39,3	776,8	367,2	330,6	493,7	718,2	207,5	1564,5	419,3	
	Autres	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0	1,7	0,1	1,4	2,0	0,0	
	<b>Total</b>	<b>322,9</b>	<b>411,1</b>	<b>342,5</b>	<b>383,7</b>	<b>368,6</b>	<b>332,8</b>	<b>1571,9</b>	<b>535,8</b>	<b>390,7</b>	<b>1258,1</b>	<b>894,3</b>	<b>1292,4</b>	<b>1357,1</b>	<b>1204,8</b>	<b>860,1</b>	<b>2317,3</b>	<b>876,4</b>	

La numérotation des variétés **V1-V17** correspond à celle du tableau 23.

Les n° des composés correspondent à l'ordre d'éluion : temps de rétention (TR) croissant.

Les concentrations des composés dans l'extrait sont exprimées en mg/l.

tr : trace (<0,1 mg/l)

Les composés ont été identifiés à partir de la bibliothèque du laboratoire.



D'une manière générale, nous constatons une prédominance des flavonols (389,7 mg/l), plus particulièrement des flavonols glycosylés (378,4 mg/l) et des composés dérivés des acides phénoliques (380,8 mg/l). Les acides phénoliques (53,2 mg/l) et les flavanones glycosylées (33,5 mg/l) peuvent également être présents en quantités appréciables. En revanche, les flavonols non glycosylés (11,3 mg/l), les flavones glycosylées ou non (8,1 mg/l), les flavanones (0,3 mg/l), et le couple dihydrochalcone / biflavonoïde (0,4 mg/l) sont faiblement représentés, voire absents, dans certains extraits méthanoliques.

Sur l'ensemble des variétés, les composés majoritaires sont la rutine **14** (539,6 mg/l) et l'acide quinique **3** (445,2 mg/l). Il est à noter que quelques composés sont présents à des concentrations appréciables dans certains cédrats ; il s'agit de l'acide p-coumarique **5** (0,7-93,0 mg/l), de la quercétine **13** (2,4-52,4 mg/l), de la néoériocitrine **15** (0,1-255,5 mg/l), de l'acide shikimique **2** (0,3-32,2 mg/l), de l'acide sinapique **6** (1,1-54,5 mg/l), de la néohesperidine **12** (1,4-48,4 mg/l) et de la scutellaréine tetraméthyléther **28** (0,0-36,0 mg/l).

L'analyse statistique par Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) (figure 51) permet de mettre en évidence trois groupes de cultivars. Le premier (groupe **I**) est constitué de neuf variétés (**V1-V6**, **V8-V9**, **V17**). Huit d'entre elles (**V1-V6**, **V8**, **V9**) sont dominées par l'acide quinique **3** (200,4-348,5 mg/l) et dans une moindre mesure par la rutine **14** (26,2-90,5 mg/l). La variété 'Florence' **V17** apparaît sur le graphique (figure 51) à l'écart dans ce groupe. Cette observation est confirmée par sa composition chimique présentant une forte concentration en rutine **14** (408,5 mg/l) et en néoériocitrine **15** (255,5 mg/l) ainsi qu'une teneur exceptionnellement faible en acide quinique **3** (69,5 mg/l).

Le deuxième groupe (groupe **II**) renferme quatre variétés (**V11-V13**, **V15**) dont la composition phénolique présente de fortes teneurs en acide quinique **3** (474,5-695,0 mg/l) et en rutine **14** (206,4-492,0 mg/l). Nous remarquons que les groupes **I** et **II** sont caractérisés par le même chimiotype, cependant ils diffèrent par les concentrations des composés majoritaires qui sont plus élevées dans les extraits des cultivars du groupe **II**.

Le troisième groupe (groupe **III**) contient également quatre variétés (**V7**, **V10**, **V14**, **V16**) dont les composés majoritaires sont la rutine **14** (716,0-1545,0 mg/l) suivi de l'acide quinique **3** (384,4-535,0 mg/l). Graphiquement le cultivar 'Verruqueux' **V16** apparaît détaché du groupe (figure 51) ; son chimiotype est similaire à celui des trois autres variétés (**V7**, **V10**,

**V14**) mais il s'en distingue par une très forte teneur en rutine **14** (1545,0 mg/l) et une concentration élevée en scutellaréine tetraméthyléther (36,0 mg/l).

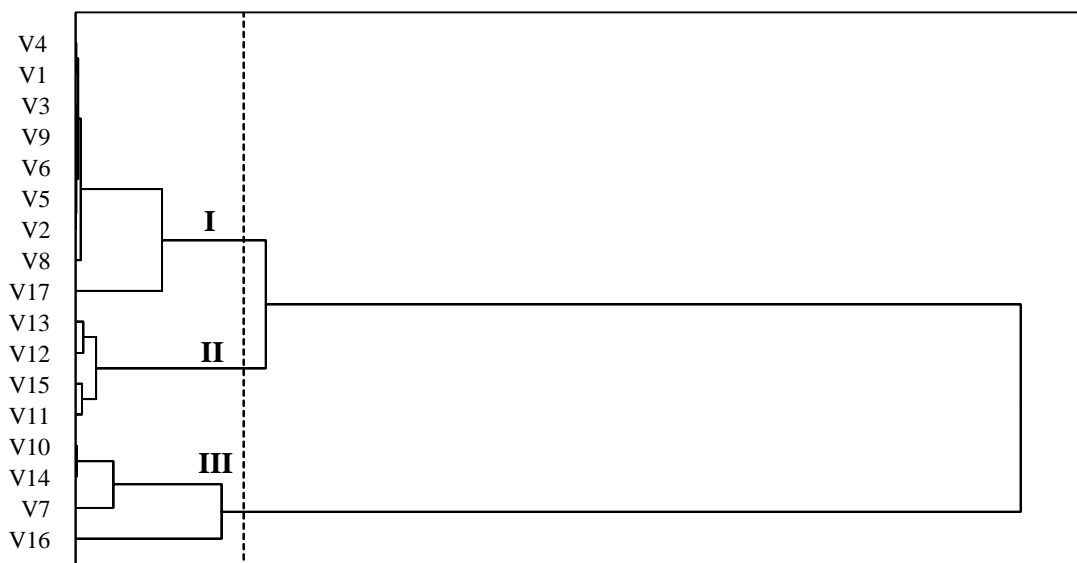


Figure 51 : CAH des 17 variétés de cédrat **V1-V17** (tableau 23) en fonction de la composition phénolique des extraits de zestes

A ce stade de nos travaux, l'étude du recouplement des groupes de cultivars obtenus pour les extraits phénoliques et les huiles essentielles n'est pas concluante. A titre d'exemple, le groupe de variétés réunissant **V1-V6, V8** et **V9** (groupe I) n'est pas retrouvé avec les huiles. De la même manière, le regroupement des autres variétés (**V7, V10-V16**) sur la base de la composition phénolique (groupe **II** et **III**) ne recouvrent pas celui établi avec les constituants volatils. Néanmoins, la variété **V17** se détache des autres cédratiers dans les deux cas.

### *c) Compositions volatile et phénolique des albédos et des jus*

#### *Les fractions volatiles*

Par MEPS, dans les espaces de tête, nous avons pré concentré les volatils des albédos et des jus de 16 variétés de cédrats **V1-V10** et **V12-V17** ; la variété 'Mac Veu de Montagne' **V11** n'a pu être traitée car ayant un albédo très fin et une pulpe trop sèche. L'extraction des espaces de tête a conduit après analyse par CPG et CPG-SM à l'identification de 15 et 25

constituants, respectivement ; soit un total de 26 composés différents repris aux tableaux 27 et 28, respectivement. Il est à préciser que nous avons conservé le numérotage des composés volatils des feuilles et des zestes (tableaux 24 et 25). Ces constituants se répartissent en 12 monoterpènes hydrocarbonés (**1-16a**), 6 monoterpènes oxygénés (**22-31**) et 8 sesquiterpènes hydrocarbonés (**32-38a**). A notre connaissance, les compositions en volatils des albédos et des jus de ces différentes variétés sont décrites pour la première fois.

Dans les albédos, tous les composés identifiés sont hydrocarbonés. Les monoterpènes dominant largement la fraction volatile avec des teneurs allant de 82,0 à 99,9%. Le limonène **9** est le composé majoritaire dans toutes les variétés avec des teneurs variant de 46,7 à 98,1% ; il peut être accompagné, dans certains cultivars (**V1-V5**, **V7**, **V9-V10**), par le  $\gamma$ -terpinène **13** et/ou le p-cymène **8**. Nous notons que l'*allo*-ocimène **16a** est détecté dans la plupart des albédos alors qu'il ne l'avait pas été dans les les zestes et les feuilles. Les sesquiterpènes sont faiblement représentés avec un taux n'excédant pas 1,6% à l'exception du cultivar 'Fourny' **V14** (7,1%). Le cédrat 'Florence' **V17** se distingue par une concentration importante en sélina-4(15),5-diène **33a** (13,3%) ; en effet, ce dernier n'est pas détecté (**V1-V12**, **V14**) ou présent à une abondance n'excédant pas 0,2% (**V13**, **V15**, **V16**) dans les autres variétés.

A l'exception de la variété 'Corsican' **V9**, la fraction volatile des jus des 16 variétés se différencie de celle des albédos par la présence de monoterpènes oxygénés. Avec un taux allant de 46,5 à 95,9%, le limonène **9** est composé majoritaire de tous les cultivars ; dans la plupart des cas (**V1-V10**, **V14**), il est suivi par deux autres monoterpènes hydrocarbonés : le  $\gamma$ -terpinène **13** et/ou le p-cymène **8**. 'Florence' **V17** est l'unique variété présentant une abondance relativement importante (22,7%) en sesquiterpènes hydrocarbonés. Il s'agit notamment du (*E*)- $\beta$ -caryophyllène **32** (2,0%), du *trans*- $\alpha$ -bergamotène **33** (5,4%), du (*E*)- $\beta$ -farnésène **34** (0,5%), du germacrène D **35** (4,6%), du valencène **35a** (2,6%), du  $\beta$ -bisabolène **38** (6,7%) et du  $\delta$ -cadinène **38a** (0,9%). Ceux-ci ne sont pas détectés ou faiblement représentés (0,2-5,1%) dans la pulpe des fruits des autres variétés. Enfin, le valencène **35a** et le  $\delta$ -cadinène **38a** ne sont détectés que dans les jus de 'Rhobs el Arsa' **V15** et 'Florence' **V17**.

Tableau 27 : Compositions chimiques des fractions volatiles des albédos de 16 cultivars de cédrat

n°	Composés	Ir L <sup>a</sup>	Ir A <sup>b</sup>	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V12	V13	V14	V15	V16	V17
1	$\alpha$ -Thujène	932	922	0,6	0,1	0,3	0,3	0,4	-	1,0	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-
2	$\alpha$ -Pinène	936	931	1,2	0,3	0,7	0,6	0,8	0,1	1,7	0,1	0,3	0,4	0,3	0,2	0,6	0,4	0,2	0,8
4	Sabinène	964	969	0,2	0,1	0,1	0,1	-	-	0,3	-	-	0,1	-	-	-	-	tr	0,4
5	$\beta$ -Pinène	978	970	1,0	0,5	0,8	0,5	0,7	-	1,2	-	0,2	0,3	-	-	0,3	-	-	5,8
6	Myrcène	987	979	1,4	2,0	2,1	1,1	0,4	1,1	2,0	1,2	3,3	0,8	2,7	2,3	1,9	3,8	3,9	0,3
8	p-Cymène	1015	1010	22,6	1,0	1,5	20,1	32,3	-	11,4	-	11,1	1,3	-	-	-	-	-	-
9	Limonène	1025	1020	46,7	71,9	62,9	52,1	46,9	95,8	46,9	98,1	74,3	65,9	95,4	92,5	88,5	93,4	92,6	74,3
12	(E)- $\beta$ -Ocimène	1029	1024	0,3	1,5	1,5	0,7	1,8	1,3	3,0	0,2	6,1	0,2	0,4	0,6	0,4	0,5	-	0,2
13	$\gamma$ -Terpinène	1051	1047	23,8	19,6	27,8	18,1	13,2	-	29,6	-	-	29,6	-	-	-	-	-	-
16	Terpinolène	1082	1078	1,5	1,4	1,3	1,7	1,4	0,2	1,3	0,2	1,2	0,7	-	-	-	0,2	0,1	0,1
16a	allo-Ocimène	1123	1121	0,1	0,2	0,2	0,4	1,0	0,2	0,7	0,1	0,3	0,1	-	-	0,5	-	0,1	0,1
32	(E)- $\beta$ -Caryophyllène	1421	1424	-	0,1	0,1	0,2	-	-	-	-	-	-	-	0,7	1,3	0,2	0,1	0,4
33	trans- $\alpha$ -Bergamotène	1429	1431	0,1	0,2	0,1	0,8	-	-	0,1	-	-	0,2	0,5	2,2	2,2	0,2	0,5	0,7
33a	Sélina-4(15),5-diène	1433	1434	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	0,2	0,1	13,3
38	$\beta$ -Bisabolène	1498	1502	-	0,1	0,1	0,6	-	0,2	0,1	-	-	-	0,2	1,1	3,6	0,1	0,5	0,9
	Monoterpènes hydrocarbonés			99,4	98,6	99,2	95,7	98,9	98,7	99,1	99,9	96,8	99,5	98,8	95,6	92,2	98,3	96,9	82,0
	Sesquiterpènes hydrocarbonés			0,1	0,4	0,3	1,6	0,0	0,2	0,2	0,0	0,0	0,2	0,7	4,2	7,1	0,7	1,2	15,3
	<b>Total</b>			<b>99,5</b>	<b>99,0</b>	<b>99,5</b>	<b>97,3</b>	<b>98,9</b>	<b>98,9</b>	<b>99,3</b>	<b>99,9</b>	<b>96,8</b>	<b>99,7</b>	<b>99,5</b>	<b>99,8</b>	<b>99,3</b>	<b>99,0</b>	<b>98,1</b>	<b>97,3</b>

La numérotation des variétés correspond à celle du tableau 23.

Les n° des composés correspondent à ceux du tableau 23 (ordre d'élution sur colonne apolaire).

<sup>a</sup> Indices de rétention obtenus à partir des données de la littérature [König et coll. 2001]

<sup>b</sup> Indices de rétention obtenus sur colonne apolaire (Rtx-1)

Les abondances des composés sont exprimées en pourcentages relatifs.

Les composés ont été identifiés à partir de la bibliothèque « arômes » du laboratoire.

Tableau 28 : Compositions chimiques des fractions volatiles des jus de 16 cultivars de cédrat

n°	Composés	Ir L <sup>a</sup>	Ir A <sup>b</sup>	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V12	V13	V14	V15	V16	V17
1	$\alpha$ -Thujène	932	922	2,4	-	-	-	1,6	0,2	0,2	0,3	0,8	0,7	0,1	-	0,4	-	0,3	0,1
2	$\alpha$ -Pinène	936	931	6,8	0,7	2,3	0,6	1,9	0,5	0,8	0,7	1,5	2,0	0,2	0,2	0,5	0,5	-	1,0
2a	Camphène	943	947	0,2	-	1,2	-	0,5	0,1	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	0,1
4	Sabinène	964	969	0,6	-	2,1	-	0,5	0,2	0,2	0,4	0,2	0,5	-	-	0,1	-	-	-
5	$\beta$ -Pinène	978	970	4,3	0,1	1,7	0,1	0,0	0,7	0,3	0,3	1,1	1,6	2,7	-	0,1	1,3	2,1	4,3
6	Myrcène	987	979	3,1	2,2	0,0	1,1	5,4	1,5	2,3	2,4	1,6	2,0	-	2,9	2,5	2,3	0,2	3,1
8	p-Cymène	1015	1010	1,0	2,3	3,4	6,6	11,7	3,8	3,9	4,2	12,2	4,5	-	-	2,2	-	1,7	0,1
9	Limonène	1025	1020	49,6	75,2	46,5	58,7	49,6	85,3	76,5	79,0	64,2	49,9	95,9	95,7	84,2	91,7	88,4	62,8
12	(E)- $\beta$ -Ocimène	1029	1024	0,9	0,9	0,4	0,9	1,9	0,9	0,9	0,9	0,4	-	0,1	0,1	0,7	-	3,1	-
13	$\gamma$ -Terpinène	1051	1047	29,2	15,3	28,8	29,7	9,6	2,4	10,4	6,3	11,5	26,3	-	0,1	4,8	-	0,1	0,9
16	Terpinolène	1082	1078	1,3	0,8	2,7	1,4	4,2	0,2	0,7	1,4	0,5	1,2	0,1	0,1	1,3	0,1	-	0,7
16a	allo-Ocimène	1123	1124	0,1	0,1	0,8	0,1	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1
22	Terpinèn-4-ol	1164	1161	0,1	0,1	-	0,1	-	-	-	-	-	1,2	0,1	-	-	0,1	0,1	0,1
23	$\alpha$ -Terpinéol	1176	1179	0,2	0,2	2,8	0,1	2,7	-	0,6	1,3	-	1,1	0,1	0,1	1,1	0,1	0,3	0,2
26	Néral	1215	1214	-	0,2	-	0,1	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1	-
28	Géranial	1244	1245	-	0,2	-	-	0,9	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	Acétate de néryle	1342	1343	-	0,3	2,3	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-
31	Acétate de géranyle	1362	1357	-	0,3	-	0,1	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	0,3	-	-
32	(E)- $\beta$ -caryophyllène	1421	1424	0,1	0,1	-	0,1	-	0,1	-	-	-	1,3	-	-	-	0,1	0,6	2,0
33	trans- $\alpha$ -Bergamotène	1429	1431	0,1	-	-	-	-	0,1	-	-	-	1,7	0,1	0,3	0,1	1,1	0,1	5,4
34	(E)- $\beta$ -Farnésène	1446	1444	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	0,1	-	0,5
35	Germacrène D	1480	1486	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	0,1	-	0,1	0,1	4,6
35a	Valencène	1497	1501	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,4	-	2,6
38	$\beta$ -Bisabolène	1498	1502	0,1	0,1	-	0,1	-	0,2	0,5	0,4	-	2,1	0,3	0,4	0,5	0,1	1,3	6,7
38a	$\delta$ -Cadinène	1515	1522	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	0,9

Monoterpènes hydrocarbonés	99,5	97,6	89,9	99,2	86,9	95,9	96,2	95,9	94,0	88,7	99,1	99,1	96,9	95,9	95,9	73,1
Monoterpènes oxygénés	0,3	1,3	5,1	0,5	3,6	0,8	0,6	1,3	0,0	2,3	0,3	0,1	1,1	0,6	0,5	0,3
Sesquiterpènes hydrocarbonés	0,2	0,2	0,0	0,2	0,0	0,4	0,7	0,4	0,0	5,1	0,4	0,8	0,6	2,9	2,1	22,7
<b>Total</b>	<b>99,9</b>	<b>99,1</b>	<b>95,0</b>	<b>99,9</b>	<b>90,5</b>	<b>97,1</b>	<b>97,5</b>	<b>97,6</b>	<b>94,0</b>	<b>96,1</b>	<b>99,8</b>	<b>99,9</b>	<b>98,6</b>	<b>99,3</b>	<b>98,5</b>	<b>96,1</b>

La numérotation des variétés correspond à celle du tableau 23.

Les n° des composés correspondent à ceux du tableau 23 (ordre d'élution sur colonne apolaire).

<sup>a</sup> Indices de rétention obtenus à partir des données de la littérature [König et coll. 2001]

<sup>b</sup> Indices de rétention obtenus sur colonne apolaire (Rtx-1)

Les abondances des composés sont exprimées en pourcentages relatifs.

Les composés ont été identifiés à partir de la bibliothèque « arômes » du laboratoire.

Les analyses par CAH basées sur les compositions des fractions volatiles des albédos (tableau 27) et des jus (tableau 28) ont permis de regrouper les différentes variétés.

Huit cultivars (groupe **I** : **V1-V5, V7, V9-V10**) apparaissent toujours groupés que ce soit dans le dendrogramme des albédos (figure 52) ou dans celui des jus (figure 53). Ces variétés sont riches en limonène **9** (albédo : 46,7-74,3% ; jus : 49,6-76,5%) et en  $\gamma$ -terpinène **13** (albédo : 13,2-29,6% ; jus : 9,6-29,7%). Il faut également noter que ces variétés peuvent présenter une forte abondance de p-cymène **8** dans l'albédo (1,0-32,3%).

Les huit cultivars restants (groupe **II** : **V6, V8, V12-V16**) forment également un même groupe aussi bien dans le cas des albédos (figure 52) que dans celui des jus (figure 53). La composition chimique de ces variétés est dominée par le limonène **9** (albédo : 88,5-98,1% ; jus : 84,2-95,9%).

Graphiquement, la variété 'Florence' **V17** est isolé sur les figures 52 et 53 ; elle se démarque des autres variétés par une teneur élevée en sesquiterpènes hydrocarbonés dans l'albédo (sélina-4(15),5-diène **33a** : 13,3%) et dans le jus ( $\beta$ -bisabolène **38** : 6,7% ; *trans*  $\alpha$ -bergamotène **33** : 5,4% ; germacrène D **35** : 4,6%).

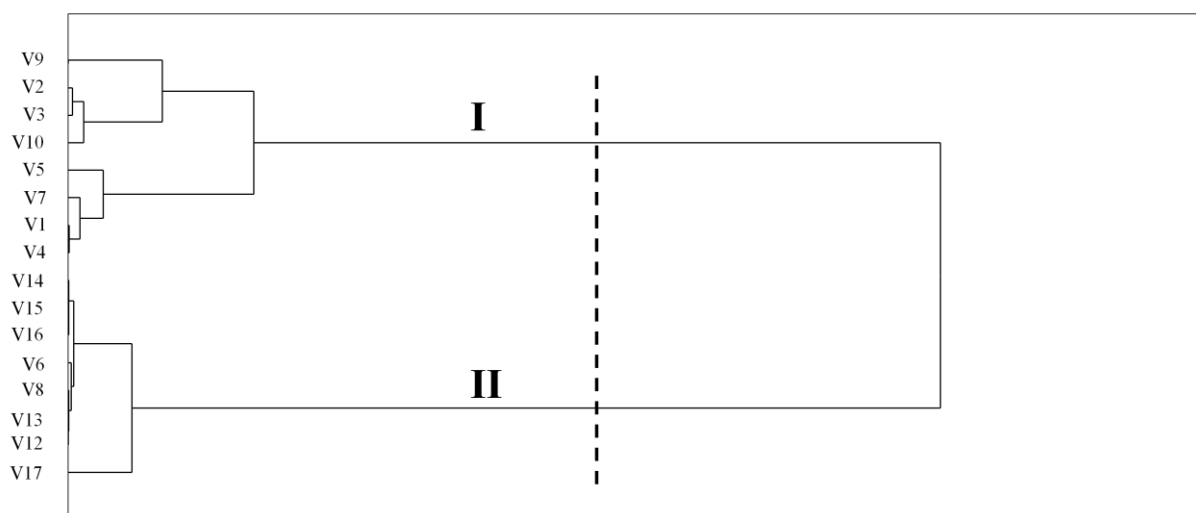


Figure 52 : CAH des 16 variétés de cédrat (tableau 23) en fonction de la composition volatile des albédos

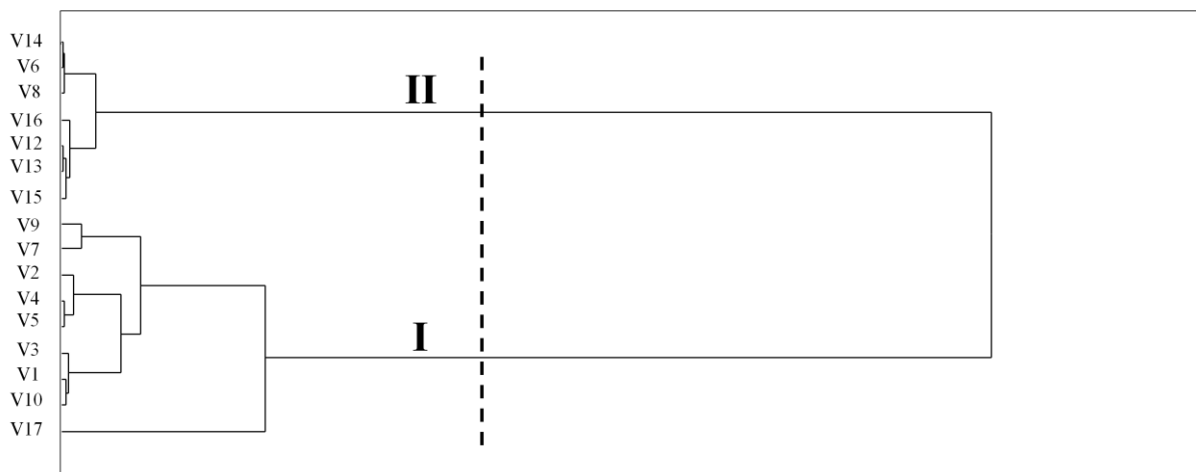


Figure 53 : Dendrogramme CAH des 16 variétés de cédrat (tableau 23) en fonction de la composition volatile des jus

Les variétés **V1-V5**, **V7**, **V9-V10** sont regroupées sur la base de la composition chimique des huiles essentielles des zestes et sur celle des fractions volatiles des albédos et des jus. Les cultivars **V12-V16** et **V6,V8** forment un seul et même groupe sur la base des fractions volatiles des albédos et des jus mais se subdivisent en deux groupes sur celle des huiles essentielles des zestes. Enfin, la variété **V17** se démarque des autres cultivars aussi bien au niveau du zeste que de l'albédo et du jus.

### *Les extraits*

L'analyse par CLHP/SM-ESI des extraits au méthanol des albédos et des jus des 16 cultivars (**V1-V10**, **V12-V17**) a permis l'identification de 29 et 26 composés, respectivement. Soit un total de 29 composés repris aux tableaux 29 et 30 respectivement. Il est à préciser que nous avons conservé le numérotage des composés phénoliques des zestes (tableau 26). Ces constituants se répartissent en cinq acides phénoliques **1**, **4-7**, deux dérivés d'acides phénoliques **2-3**, sept flavones (six non glycosylées **22-23**, **26-29** et une glycosylée **11**), six flavanones (deux non glycosylées **19-20** et quatre glycosylées **8**, **10**, **12**, **15**), sept flavonols (cinq non glycosylés **13**, **16**, **24-25**, **30** et deux glycosylés **9**, **14**), une dihydrochalcone **17** et un biflavonoïde **21**.



Tableau 29 : Composition phénolique des extraits d'albédos de 16 cultivars de cédrat

n°	Composés	TR (mn)	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V12	V13	V14	V15	V16	V17
1	Ac. Gallique	1,9	-	-	-	-	7,8	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Ac. Shikimique	2,2	7,4	4,9	0,1	3,0	2,5	3,4	tr	-	3,4	1,9	41,6	21,0	tr	11,6	11,5	3,5
3	Ac. Quinique	2,4	69,5	32,4	14,7	42,4	12,8	15,0	117,0	10,6	23,6	10,5	545,0	695,0	51,0	158,0	361,0	30,9
4	Ac. Vanillique	3,3	4,0	-	8,1	1,6	-	-	-	-	6,3	2,4	-	-	0,0	-	-	-
5	Ac. p-Coumarique	6,7	35,3	12,0	14,0	-	18,3	3,7	22,0	21,3	208,5	27,0	75,5	22,2	6,1	13,3	45,9	19,5
6	Ac. Sinapique	7,2	-	4,3	-	1,8	4,4	1,9	0,6	-	0,8	2,4	-	1,7	0,4	3,0	4,4	0,6
7	Ac. Ferulique	7,4	10,7	12,2	7,2	0,7	35,3	15,6	32,7	6,2	19,7	11,8	-	93,5	8,5	37,0	35,3	36,2
8	Flavanomaréine	7,7	-	4,7	2,5	-	-	1,1	1,7	-	2,5	1,7	-	24,0	9,3	18,3	131,0	4,0
9	Hyperoside	8,3	2,3	4,7	-	-	2,9	2,9	5,3	-	-	2,5	4,5	4,0	1,8	2,7	3,9	2,3
10	Narirutine	8,4	0,7	1,1	-	1,9	-	1,9	0,7	0,2	0,2	tr	2,0	0,5	12,0	12,8	17,8	0,4
11	Diosmine	8,5	4,6	-	6,2	55,5	-	-	2,3	4,7	3,8	14,5	-	10,9	0,7	14,7	0,6	2,3
12	Néohepéridine	8,5	14,0	20,9	8,4	26,5	2,5	12,5	9,5	14,8	7,9	7,1	53,0	17,4	20,9	63,0	35,3	10,3
13	Quercétine	8,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15,0	-	-	35,9	-
14	Rutine	8,6	9,1	26,3	18,0	-	16,2	14,0	12,2	-	11,1	13,4	-	8,5	6,2	36,0	525,0	5,2
15	Néoériocitrine	8,7	3,3	129,5	130,5	54,0	66,0	7,5	50,0	1,2	-	5,4	121,0	10,6	20,9	180,0	-	80,0
16	Robinéatine triméthylether	8,7	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	0,2	-	0,6	1,8	-
17	Néohepéridine dihydrochalcone	8,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	-	-	-	3,0	2,6	-
19	Hespéretine	9,8	0,6	-	-	-	-	-	0,6	0,6	0,6	0,1	0,8	0,4	0,6	0,3	0,4	0,6
20	Naringénine	9,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	0,7	7,8	-	-
21	Amentoflavone	10,3	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	-	tr	-	-	-
22	Lutéoline	11,0	-	-	-	2,0	-	0,3	-	-	-	tr	-	2,4	5,4	0,9	-	3,2
23	Sinensétine	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,6	0,2
24	Datiscétine	11,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,9	-	7,1	-	-
25	Casticine	11,2	tr	-	-	-	-	-	tr	-	-	tr	-	-	-	-	0,1	tr
26	Eupatorine	11,3	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	0,3	0,4	0,5	0,3
27	Nobilétine	11,3	0,1	-	tr	0,1	0,1	tr	tr	-	0,2	tr	tr	0,1	tr	0,6	tr	3,8
28	Scutellaréine	11,5	0,1	tr	-	tr	tr	tr	0,1	tr	0,1	tr	tr	tr	tr	tr	1,8	0,8

tetraméthylether																		
<b>29</b>	Tangérétine	11,8	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,2
<b>30</b>	Retusine	12,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	-
	Acides phénoliques	49,9	28,4	29,2	4,0	65,8	21,1	55,3	27,5	235,3	43,4	75,5	117,4	14,9	53,2	85,5	56,3	
	Dérivés acides phénoliques	76,9	37,3	14,8	45,3	15,3	18,3	117,0	10,6	27,0	12,4	586,6	716,0	51,0	169,6	372,5	34,3	
	Flavones	0,1	0,0	0,0	2,1	0,1	0,3	0,4	0,0	0,3	0,0	0,0	2,4	5,7	1,9	2,9	8,5	
	Flavones glycosylés	4,6	0,0	6,2	55,5	0,0	0,0	2,3	4,7	3,8	14,5	0,0	10,9	0,7	14,7	0,6	2,3	
	Flavanones	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,6	0,6	0,1	0,8	1,0	1,3	8,1	0,4	0,6	
	Flavanones glycosylés	18,0	156,2	141,4	82,3	68,5	23,1	61,9	16,2	10,5	14,1	176,0	52,4	63,0	274,1	184,1	94,7	
	Flavonols	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	19,1	0,0	7,7	37,8	0,0	
	Flavonols glycosylés	11,4	31,0	18,0	0,0	19,1	16,8	17,4	0,0	11,1	15,9	4,5	12,5	7,9	38,7	528,9	7,4	
	Autres	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	0,0	3,0	2,6	0,0	
	<b>Total</b>	<b>161,4</b>	<b>252,8</b>	<b>209,5</b>	<b>189,3</b>	<b>168,8</b>	<b>79,6</b>	<b>255,2</b>	<b>59,6</b>	<b>288,5</b>	<b>101,7</b>	<b>843,3</b>	<b>931,7</b>	<b>144,5</b>	<b>570,9</b>	<b>1215,2</b>	<b>204,1</b>	

La numérotation des variétés correspond à celle du tableau 23.

Les n° des composés correspondent à l'ordre d'éluion : temps de rétention (TR) croissant.

Les concentrations des composés dans l'extrait sont exprimées en mg/l.

tr : trace (<0,1 mg/l)

Les composés ont été identifiés à partir de la bibliothèque du laboratoire.

Tableau 30 : Composition phénolique des jus de 16 cultivars de cédrat

n°	Composés	TR (mn)	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V12	V13	V14	V15	V16	V17
1	Ac. Gallique	1,9	-	-	-	-	9,6	-	-	tr	-	-	15,1	-	2,4	-	-	-
2	Ac. Shikimique	2,2	1,5	-	-	-	-	3,8	-	-	2,1	0,3	2,1	0,8	-	0,7	0,7	-
3	Ac. Quinique	2,4	35,7	9,3	39,8	19,5	14,5	9,3	16,0	16,1	19,6	14,0	96,5	43,5	43,0	43,4	42,3	20,5
4	Ac. Vanillique	3,3	0,8	0,6	2,5	0,9	0,8	-	-	0,6	-	0,5	-	-	-	0,5	0,9	-
5	Ac. p-Coumarique	6,7	-	-	-	-	-	-	-	-	1,8	-	-	-	-	-	-	-
6	Ac. Sinapique	7,2	-	-	-	-	-	tr	tr	-	1,8	2,1	-	1,0	-	-	-	0,9
7	Ac. Ferulique	7,4	0,3	0,3	7,0	0,4	0,2	0,8	6,5	0,1	0,4	0,5	10,4	-	4,3	2,9	-	2,8
8	Flavanomarine	7,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	-	1,4	-	-	-	-
9	Hyperoside	8,3	-	-	-	-	-	1,6	1,3	-	-	1,3	-	1,7	-	2,0	2,4	6,9
10	Narirutine	8,4	tr	-	-	-	0,7	-	tr	-	-	tr	-	tr	0,2	-	tr	tr
11	Diosmine	8,5	7,4	2,7	12,9	2,4	10,0	4,5	8,2	5,5	2,1	1,9	8,6	18,6	1,6	3,3	0,9	17,6
12	Néohespéridine	8,5	4,7	1,0	1,2	1,1	0,7	6,5	0,8	3,1	1,7	1,0	9,1	13,0	5,5	7,2	4,0	9,1
14	Rutine	8,6	8,4	13,8	16,7	8,3	6,6	8,9	22,0	5,9	3,1	1,7	27,3	26,5	3,3	44,7	47,9	7,0
15	Néoéricitrine	8,7	-	-	-	-	-	0,3	0,5	-	-	-	4,3	0,9	0,7	-	0,9	2,5
16	Robinéatine triméthylether	8,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-
17	Néohespéridine dihydrochalcone	8,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2	-	1,6	-	1,4	1,3	-
19	Hespéretine	9,8	2,8	-	-	-	0,6	1,1	0,6	0,6	1,2	0,1	-	0,2	0,6	0,2	0,2	0,6
20	Naringénine	9,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr
21	Amentoflavone	10,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr
22	Lutéoline	11,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,7	0,1	tr	-	-	0,1
23	Sinensétine	11,0	tr	tr	tr	-	tr	-	tr	-	tr	tr	-	-	tr	-	tr	tr
26	Eupatorine	11,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	0,3
27	Nobilétine	11,3	tr	-	-	-	tr	-	tr	-	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr
28	Scutellaréine tetraméthylether	11,5	tr	tr	-	-	tr	-	tr	-	tr	tr	-	tr	tr	-	-	tr
29	Tangéretine	11,8	tr	tr	tr	-	tr	-	tr	-	tr	tr	-	-	tr	tr	tr	tr
30	Retusine	12,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-
	Acides phénoliques		1,1	0,9	9,5	1,3	10,6	0,8	6,5	0,7	4,0	3,0	25,5	1,0	6,7	3,4	0,9	3,7

Dérivés acides phénoliques	37,1	9,3	39,8	19,5	14,5	13,0	16,0	16,1	21,6	14,3	98,6	44,2	43,0	44,0	43,0	20,5
Flavones	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,7	0,1	0,0	0,3	0,0	0,3
Flavones glycosylées	7,4	2,7	12,9	2,4	10,0	4,5	8,2	5,5	2,1	1,9	8,6	18,6	1,6	3,3	0,9	17,6
Flavanones	2,8	0,0	0,0	0,0	0,6	1,1	0,6	0,6	1,2	0,1	0,0	0,2	0,6	0,2	0,2	0,6
Flavanones glycosylées	4,7	1,0	1,2	1,1	1,4	6,8	1,3	3,1	1,7	2,3	13,4	15,3	6,3	7,2	4,9	11,6
Flavonols	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0
Flavonols glycosylés	8,4	13,8	16,7	8,3	6,6	10,5	23,2	5,9	3,1	3,0	27,3	28,2	3,3	46,7	50,3	13,9
Autres	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	1,6	0,0	1,4	1,3	0,0
<b>Total</b>	<b>61,5</b>	<b>27,6</b>	<b>80,0</b>	<b>32,5</b>	<b>43,6</b>	<b>36,6</b>	<b>55,7</b>	<b>31,8</b>	<b>33,7</b>	<b>25,9</b>	<b>175,0</b>	<b>109,1</b>	<b>61,5</b>	<b>106,4</b>	<b>101,6</b>	<b>68,1</b>

La numérotation des variétés correspond à celle du tableau 23.

Les n° des composés correspondent à l'ordre d'élution : temps de rétention (TR) croissant.

Les concentrations des composés dans l'extrait sont exprimées en mg/l.

tr : trace (<0,1 mg/l)

Les composés ont été identifiés à partir de la bibliothèque du laboratoire.

D'une manière générale, les extraits d'albédos sont plus riches en composés phénoliques (367,6 mg/l en moyenne) que les jus (65,7 mg/l en moyenne). La composition chimique des albédos est dominée par les dérivés d'acides phénoliques (148,5 mg/l), les flavanones glycosylées (94,6 mg/l), les acides phénoliques (60,9 mg/l) et les flavonols glycosylés (48,6 mg/l). Les familles majoritaires dans les jus sont les dérivés d'acides phénoliques (30,9 mg/l), les flavonols glycosylés (16,8 mg/l) et dans une moindre mesure les flavones glycosylées (6,7 mg/l), les flavanones glycosylées (5,2 mg/l) et les acides phénoliques (5,0 mg/l). Enfin, au niveau des composés majoritaires, nous constatons que l'acide quinique **3** présente les teneurs les plus élevées (albédo : 10,5-695,0 mg/l ; jus : 9,3-96,5 mg/l). La concentration en rutine **14** peut également s'avérer importante dans les albédos et les jus de certaines variétés.

La comparaison des compositions phénoliques des différents albédos (tableau 29) combinée à une analyse par CAH, permet de classer les variétés en deux groupes statistiques (figure 54). Le premier groupe (**I**) réunit douze variétés (**V1-V10**, **V14**, **V17**) caractérisées par des teneurs totales en composés phénoliques comprises entre 59,6 et 288,5 mg/l. Cependant, ce groupe présente des compositions chimiques disparates, rendant difficile la mise en évidence d'un réel chimiotype. Le deuxième groupe (**II**) rassemble trois variétés (**V12-V13**, **V15**) dont les teneurs en phénols totaux s'échelonnent de 570,9 à 931,7 mg/l. Ce groupe ne présente pas une composition chimique homogène puisque : - la variété **V12** a comme composés majoritaires l'acide quinique **3** (545,0 mg/l) et la néoéricitrine **15** (121,0 mg/l) ; - la variété **V13** est dominée par l'acide quinique **3** (695,0 mg/l) alors que ; - la variété **V15** est riche en néoéricitrine **15** (180,0 mg/l) et en acide quinique **3** (158,0 mg/l). Enfin, la variété **V16** - isolée sur la figure 54 - se singularise des autres cultivars par la concentration la plus élevée en composés phénoliques (1215,2 mg/l). La rutine **14** (525,0 mg/l), l'acide quinique **3** (361,0 mg/l) et la flavanomaréine **8** (131,0 mg/l) sont les composés les plus abondants dans ce cultivar.

En ce qui concerne les jus, le traitement statistique CAH aboutit également à la formation de deux groupes distincts (figure 55). Le premier groupe (**I**) réunit les mêmes douze variétés (**V1-V10**, **V14**, **V17**) que précédemment ; elles ont les teneurs en composés phénoliques les plus faibles (25,9-80,0 mg/l). Ce groupe inclut dix variétés (**V1**, **V3-V6**, **V8-V10**, **V14**, **V17**) dont la composition chimique est dominée par l'acide quinique **3** (9,3-43,0 mg/l), associé parfois à la diosmine **11** (**V5** et **V17** : 10,0 et 17,6 mg/l, respectivement) ou à la

rutine **14** (V6 : 8,9 mg/l). Les variétés V2 et V7 ont des profils chimiques riches en rutine **14** (13,8 et 22,0 mg/l, respectivement) et en acide quinique **3** (9,3 et 16,0 mg/l, respectivement). Le deuxième groupe (II) est composé de quatre variétés (V12, V13, V15 et V16) qui présentent les plus fortes concentrations en composés phénoliques (101,6-175,0 mg/l). Les cultivars V12 et V13 sont riches en acide quinique **3** (96,5 et 43,5 mg/l, respectivement) avec des teneurs appréciables en rutine **14** (27,3 et 26,5 mg/l, respectivement). Les variétés V15 et V16 se singularisent par des concentrations équivalentes en acide quinique **3** (43,4 et 42,3 mg/l, respectivement) et en rutine **14** (44,7 et 47,9 mg/l, respectivement).

Comme pour les constituants volatils, les groupes de variétés établis sur la base de la composition phénolique des albédos et des jus ne recouvrent pas les groupes observés avec les zestes.

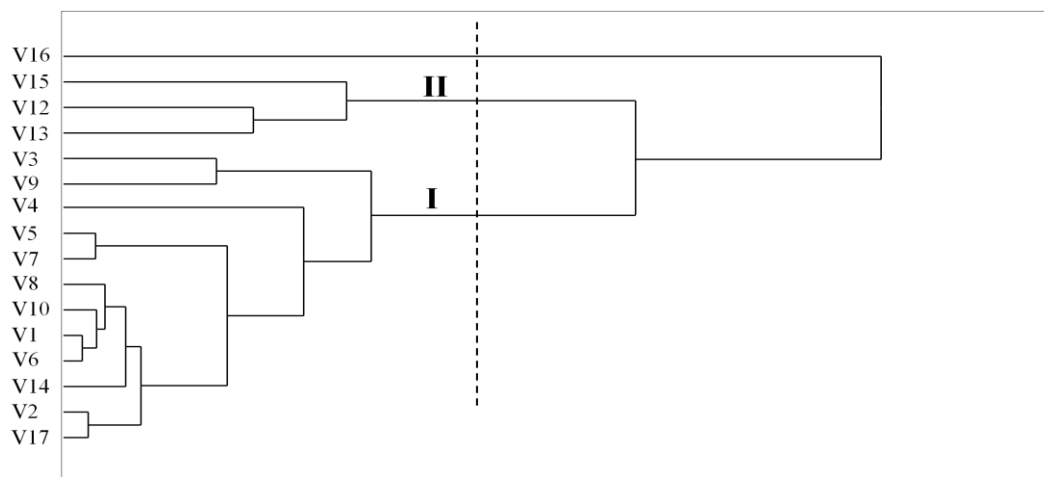


Figure 54 : CAH des 16 variétés de cédrat (tableau 23) en fonction de la composition phénolique des albédos.

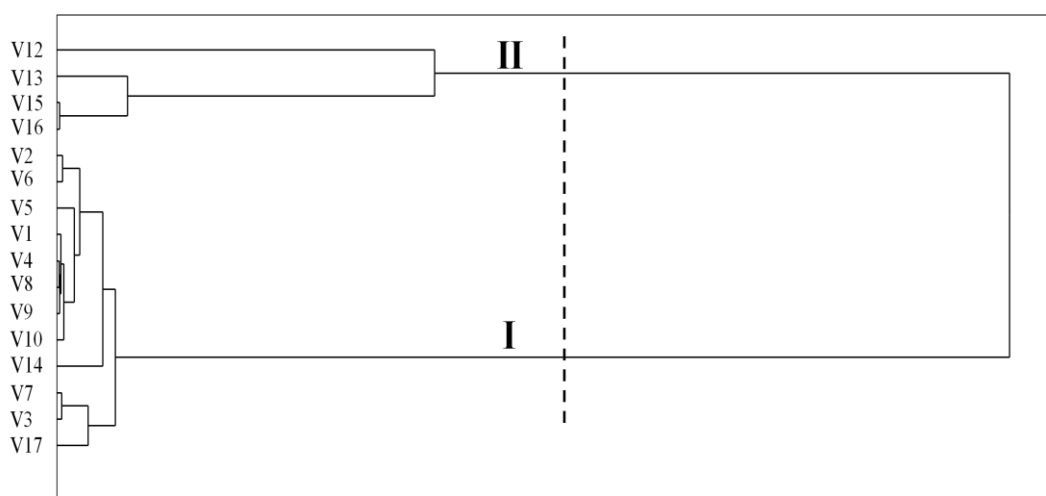


Figure 55 : CAH des 16 variétés de cédrat (tableau 23) en fonction de la composition phénolique des jus.

### II.2.3. Synthèse

L'étude génétique menée sur 24 variétés de cédratiers nous a permis de mettre en évidence un groupe de 13 cultivars **V1-V11** et **V23,V24** présentant des distances génétiques faibles au niveau cytoplasmique et nucléaire. Ce résultat est en accord avec la littérature dans laquelle les cédrats y sont décrits comme une espèce ayant un polymorphisme génétique très faible [Nicolosi et coll. 2000, Luro et coll. 2001, Ollitrault et coll. 2003, Barkley et coll. 2006, Froelicher et coll. 2011]. Nous pouvons donc les considérer génétiquement comme d'authentiques cédrats appelés aussi « vrais » cédrats ou cédrats ancestraux. D'un point de vue taxonomique, ces observations sont confirmées puisque les feuilles de ces variétés ont une morphologie caractéristique des cédrats ; elles sont de forme obovale, de couleur vert pale et ne possèdent pas de pétioles ailés. D'un point de vue phénotypique, les fruits de ces variétés ont des caractéristiques morphologiques similaires, notamment une adhérence forte entre la pulpe et l'albédo. *A contrario*, les analyses génétiques suggèrent que les 11 autres cultivars **V12-V22** botaniquement répertoriés parmi les cédrats seraient de « faux » cédrats c'est-à-dire des hybrides ou des progénitures d'hybrides. Ces résultats se confirment au niveau des caractéristiques morphologiques des feuilles et des fruits (faible adhérence de la pulpe à l'albédo) de ces 11 variétés qui diffèrent phénotypiquement des « vrais » cédrats.

Parmi les « faux » cédrats (**V12-V22**), cinq cultivars **V17-V21** présentent des profils génétiques et des compositions chimiques des huiles essentielles de feuilles très diversifiées. Sur la base des marqueurs chloroplastiques, nous avons fait l'hypothèse - pour la variété 'Florence' **V17** - d'une filiation maternelle avec les citrons ou les oranges amères. Cependant, par complémentarité allélique, aucun candidat parmi les agrumes échantillonnés ne peut être proposé comme possible parent mâle de cette variété. Néanmoins, quelques allèles spécifiques suggèrent un hybride de cédrat comme ancêtre de ce cultivar. Cette variété **V17** présente toujours un profil chimique singulier par rapport aux autres variétés étudiées. En effet, les compositions chimiques en volatils des feuilles (limonène/ $\beta$ -pinène), des zestes (limonène/ $\beta$ -pinène), de l'albédo (limonène/sélin-4(15),5-diène), du jus (limonène/ $\beta$ -bisabolène/*trans*- $\alpha$ -bergamotène) ainsi que celles des extraits de zestes (rutine/néoériocitrine), d'albédo (néoériocitrine/acide férulique/acide quinique) et de jus (acide quinique/diosmine/néohespéridine) montrent que ce cultivar se distingue systématiquement des cédrats ancestraux mais aussi des hybrides. Ainsi, la classification taxonomique de la

variété ‘Cédrat de Florence’ **V17** au sein des cédrats est discutable aussi bien au niveau des observations chimiques et génétiques que morphologiques. En effet, cette variété possède des fruits de couleur orangée à maturité contrairement aux autres cédrats (qu’ils soient « ancestraux » ou pas) qui sont jaunes ou jaunes pâles.

La constitution génétique complexe de la variété ‘Ada Jamir’ **V18** combine un cytoplasme des mitochondries de lime ‘Mexicaine’ et un chloroplaste proche de la mandarine. Cette originalité génétique du cultivar vis-à-vis du groupe des « vrais » cédrats se confirme au niveau chimique par la teneur abondante en 1,8-cinéole dans l’huile essentielle de feuilles.

Sur la base des marqueurs nucléaires SSR, la variété ‘Kadu Mul’ **V19** est proche du citron ‘Eureka’ et la variété ‘Mac Nao Si’ **V21** est proche de la lime ‘Mexicaine’ ; ces deux cultivars sont probablement issus de croisements entre citrons et limes pour ‘Kadu Mul’ **V19** et ‘Mac Nao Si’ **V21**, respectivement. De plus, ces résultats sont confortés par la composition chimique des huiles essentielles de feuilles de ‘Kadu Mul’ **V19** et ‘Mac Nao Si’ **V21** qui ont le même chimiotype (limonène, sabinène, linalol et citronellal) que certaines variétés de citrons et de limes [Lota et coll., 2002].

D’un point de vue génétique, la variété ‘Mac Nao N’ **V20** se singularise également des « vrais » cédrats. Toutefois, il est difficile de clarifier sa filiation au regard de nos résultats. Les huiles essentielles de feuilles de ‘Mac Nao N’ **V20** sont atypiques par des teneurs élevées en  $\gamma$ -terpinène,  $\beta$ -pinène, p-cymène et (*E*)- $\beta$ -ocimène.

Associé au cultivar ‘Rhobs el Arsa’ **V15** au niveau des marqueurs SSR nucléaires, le « faux » cédrat ‘Poncire de Colioure’ **V22** se distingue des « vrais » cédrats par une teneur en (*E*)- $\beta$ -ocimène relativement élevée dans l’huile essentielle de feuilles.

Les cinq autres variétés de « faux » cédrats (‘Cédrat de Damas’ **V12**, ‘Cédrat des Ommeyades’ **V13**, ‘Fourny’ **V14**, ‘Rhobs el Arsa’ **V15**, ‘Verruqueux’ **V16**) ont des compositions volatiles similaires. En effet, les huiles essentielles de feuilles sont caractérisées par le limonène puis par des teneurs équivalentes en géraniol, néral, géraniol et nérol (sauf pour la variété **V12** où les taux en géraniol et néral sont un peu plus élevés).

Au niveau des fruits, la composition chimique des zestes (huile essentielle), des albédos (fraction volatile) et des jus (fraction volatile) est dominée par le limonène. Ce résultat indique que les différentes parties du fruit ont des compositions volatiles relativement homogènes. Pour ce qui est des constituants phénoliques, les extraits de zestes de ces variétés exhibent tous le couple acide quinique/rutine comme composés majoritaires alors que pour l’albédo et le jus nous n’observons pas d’uniformité de la composition chimique. En outre,



quatre de ces variétés (**V12**, **V13**, **V15**, **V16**) présentent des concentrations totales en composés phénoliques dans les albédos et les jus beaucoup plus importantes que les autres variétés étudiées.

Les 13 cultivars (**V1-V11**, **V23-V24**) considérés génétiquement comme de « vrais » cédrats exhibent des huiles essentielles de feuilles riches en limonène, néral et géranial (**V1-V8**, **V24**) ou en limonène, nérol et géranol (**V9-V10**). Seule les variétés **V11** et **V23** présente une composition chimique (nérol/néral/géranol/géranial) ne correspondant pas à ces deux chimiotypes. Concernant les compositions chimiques des fruits des 11 « vrais » cédrats étudiés (**V1-V11**), les fractions volatiles (zestes, albédos et jus) de neuf d'entre eux **V1-V5**, **V7**, **V9-V11** sont caractérisées par le chimiotype : limonène/ $\gamma$ -terpinène. Il est à noter qu'aucun des « faux » cédrats ne présente ce chimiotype dans les zestes.

A ce stade, il convient de rappeler que les chimiotypes limonène/ $\gamma$ -terpinène observés dans les zestes d'une majorité de cédratiers ancestraux sont très couramment observés chez les limes (*C. latifolia* et *C. aurantifolia*) et les citrons (*C. limon*) [Jantan et coll. 1996 ; Huang et Pu, 2000 ; Lota et coll., 2002]. Ce résultat est conforté par ceux de Nicolosi et coll. qui supposent que les limes descendent d'un croisement entre le cédrat et *C. micrantha* [Nicolosi et coll., 2000]. *A contrario*, le chimiotype à dominance limonène des cédrats hybrides a été rapporté dans divers travaux relatifs à la composition volatile des zestes de mandarines (*C. reticulata*) [Fanciullino et coll., 2006] et des oranges amères (*C. aurantium*) [Huet, 1991 ; Lota et coll., 2001].

Les huiles essentielles de zestes des deux autres variétés **V6** et **V8** se distinguent des précédentes par un type chimique : limonène/néral/géranial. Comme certains « faux » cédrats, les fractions volatiles des albédos et des jus de ces deux cultivars présentent de fortes teneurs en limonène. Ce résultat peut s'expliquer par les phénomènes d'équilibre mis en jeu lors de l'extraction par espace de tête qui entraîne une surreprésentation des monoterpènes hydrocarbonés (limonène) au détriment des oxygénés (néral et géranial) qui étaient fortement représentés dans les huiles essentielles de zestes.

Les compositions phénoliques des différentes parties du fruit ne permettent pas de mettre en évidence des chimiotypes spécifiques aux « vrais » cédrats. En revanche, nous constatons que la majorité des cédrats authentiques exhibent des concentrations en phénols totaux bien inférieures à celles des « faux » cédrats.

Bien que génétiquement proches, les 13 « vrais » cédrats ne sont pas pour autant identiques, ce qui nous amène à proposer des hypothèses sur la filiation entre le Cédrat de Corse **V9** et certaines variétés. D'après les marqueurs cytoplasmiques SSR les variétés 'Corsican' **V9**, 'Etrog type' **V6** et 'Poncire commun' **V10** peuvent être rapprochées. En effet, la distribution allélique des marqueurs SSR nucléaires suggère une possible autofécondation de 'Poncire commun' **V10** qui serait à l'origine de la variété 'Corsican' **V9** réduisant de fait le niveau d'hétérozygotie (6 loci hétérozygotes de 'Poncire commun' **V10** sont homozygotes chez 'Corsican' **V9**). La proximité génétique entre 'Etrog type' **V6** et 'Corsican' **V9** se retrouve par des similitudes au niveau phénotypique. Les pétales de ces deux variétés sont totalement blancs, et non violacés comme ceux des autres variétés (notamment les différents cultivars 'Etrog' **V2-V5**). Du point de vue de la composition volatile des huiles essentielles de feuilles (limonène/géraniol/nérol), la variété 'Corsican' **V9** se rapproche de nouveau de 'Poncire commun' **V10** et se démarquent notablement des autres cédratiers. Ainsi, une différenciation entre le cédrat 'Corsican' **V9** et la variété 'Diamante' **V8** est envisageable sur la base de la composition volatile.

Ce résultat s'avère intéressant en vue d'une éventuelle certification sur l'origine géographique et botanique des liqueurs et eaux de vie puisque si la Corse produit des fruits confits, des confitures et des spiritueux à partir de la variété 'Corsican', la variété 'Diamante' est de même utilisée en Italie (Calabre) pour la fabrication des produits agroalimentaires dérivés. A ce stade, il serait toutefois souhaitable de confirmer notre hypothèse par une étude des spiritueux correspondants à ces deux cultivars.

### **II.3. Procédés de fabrication et de conservation des liqueurs de cédrat de Corse**

Notre étude a pour objectif *in fine* le suivi et l'amélioration de la qualité des spiritueux élaborés à partir du cédrat de Corse. La croissance du marché des liqueurs en Corse, nous a conduit à nous intéresser à ce produit dérivé et, en préalable, à caractériser les huiles essentielles et extraits alcooliques des zestes de *Citrus medica* L. var. *corsican*. A notre connaissance, peu de travaux ont été menés sur la composition chimique des huiles essentielles préparées à partir de cette variété et aucune recherche n'a été réalisée sur les extraits. Dans cette partie, notre travail vise à étudier l'influence du stade de maturité des fruits sur les compositions terpénique et phénolique des produits dérivés afin de sélectionner

des caractères phytochimiques préférentiels pouvant permettre de définir, de suivre et d'améliorer la qualité nutritionnelle et sensorielle des spiritueux. Pour cela, 1500 fruits à l'état de bourgeon ont été sélectionnés sur 100 arbres cultivés dans des conditions pédoclimatiques identiques. Enfin, nous avons cherché à optimiser les conditions de fabrication (masse de végétal, degré alcoolique, temps de macération) et de conservation des liqueurs en déterminant l'influence de ces facteurs sur la composition chimique des spiritueux.

### II.3.1. Maturité des fruits

Comme la plupart des cédratiers, la variété Cédrot de Corse ou *Corsican*, fleurit plusieurs fois par an. Du fait de ces floraisons multiples, il n'est pas rare de trouver, sur le même arbre, des fleurs à différents stades de développement et des fruits à différents stades de maturité. Traditionnellement, la première récolte de cédrats de Corse s'étale de septembre à novembre ; elle est considérée comme la principale récolte donnant des fruits d'excellente qualité. Une deuxième série de fruits peut, ensuite, être récoltée de janvier à février, donnant généralement des fruits trop gros ou trop jaunes.

Les critères de déclenchement de récolte sont le calibre, la taille et la couleur du fruit. En fonction des objectifs de transformation les fruits sont récoltés à différentes tailles :

- Fruits petits (100 à 200g) et de couleur verte pour l'utilisation rituelle à l'occasion de fêtes juives telle la fête de Soukkot ou fête des Tabernacles (Figure 55);



Figure 55 : Caisses de cédrats (variété Diamante) récoltés pour la fête de Soukkot. Santa Maria del Cedro, Calabre, Italie (Photo Franck Curk) .

- Fruits moyens (moins d'un kg) et de couleur vert pâle pour la confection de fruits confits entiers ou demi-entiers. D'après Hildrhum et Tjaberg [1972], le stade de maturité n'impacte pas la qualité des fruits confits en termes de texture. Au contraire, la température et la durée du processus de fermentation pour confire les fruits modifient sensiblement la texture des produits obtenus ;
- Fruits mal formés ou trop gros, verts, verts pâles et jaunes pour la fabrication de divers confiseries, confitures et liqueurs. A notre connaissance, l'influence du stade de maturité du fruit sur la composition volatile et phénolique n'a jamais été prise en considération pour déterminer rationnellement la date de récolte des fruits destinés à la confiserie ou à la production de liqueurs.

a) *Détermination du degré de maturité des fruits*

Afin de mesurer le degré de maturité des cédrats de Corse, nous avons utilisé la méthode décrite par Stenzel et coll. [2006] basée sur le calcul des degrés-jours de croissance (DJC) [Ometto, 1981]. Les fruits sont considérés comme « murs » lorsqu'une certaine valeur des DJC est atteinte dans l'année. Cette dernière dépend des espèces et/ou variétés étudiées mais aussi des conditions pédoclimatiques. Il est à relever que cette procédure permet d'obtenir des résultats indépendants des variations interannuelles de température.

Techniquement, nous avons marqué les fleurs de cédratier à partir de la date de l'anthèse (fleurs épanouies au 15 avril 2010) sur une parcelle de production située à Lucciana en Haute-Corse (42° 30' 57'' N, 9° 28' 13'' E). A partir de cette date, la température de l'air a été relevée chaque jour par des enregistreurs placés à hauteur d'homme sur la canopée de deux arbres (face est). Sur une période allant du baguage des fleurs (15 avril 2010) au tout dernier jour de récolte des fruits (4 janvier 2011), le nombre de DJC a été calculé en utilisant les trois formules A, B ou C suivantes [Ometto, 1981]. Le choix de la formule dépend de la température minimum ( $T_m$ ) et maximum ( $T_M$ ) de chaque jour considéré.

Formule A : Si  $T_m > 12.8^{\circ}\text{C}$  et  $TM < 36^{\circ}\text{C}$

$$\text{DJC} = \frac{TM + T_m}{2} - T_p$$

Avec une température plancher ( $T_p$ ) de  $12,8^{\circ}\text{C}$  et une température plafond ( $TP$ ) de  $36^{\circ}\text{C}$

Formule B : Si  $T_m < 12.8^{\circ}\text{C}$  et  $TM < 36^{\circ}\text{C}$

$$\text{DJC} = \frac{(TM - T_p)^2}{2(TM - T_m)}$$

Avec  $T_p = 12,8^{\circ}\text{C}$  et  $TP = 36^{\circ}\text{C}$

Formule C : Si  $T_m > 12.8^{\circ}\text{C}$  et  $TM > 36^{\circ}\text{C}$

$$\text{DJC} = \frac{2(TM - T_m)(T_m - T_p) + (TM - T_m)^2 - (TM - TP)^2}{2(TM - T_m)}$$

Avec  $T_p = 12,8^{\circ}\text{C}$   $TP = 36^{\circ}\text{C}$

A compter de l'apparition des premiers fruits (45 jours après l'anthèse), nous avons récoltés simultanément 30 fruits par mois de juillet à janvier. Le tableau 31 indique le nombre de jours par mois pendant lesquels les formules A, B et C sont utilisées, les DJC de chaque mois et le cumul des DJC depuis la date d'anthèse jusqu'à la récolte.

Tableau 31 : Nombre de jours d'utilisation des formules A, B, C et mesure des DJC mensuels et cumulés du 15 avril au 31 décembre 2010

	Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre
Formule A	-	15	25	17	27	24	14	-	-
Formule B	15	14	-	-	-	-	17	30	31
Formule C	-	2	5	14	4	6	-	-	-
DJC mensuels	68,2	300,1	336,7	444,9	434,1	343,7	177,8	67,8	31,6
DJC cumulés au			30 juin	31 juillet	31 août	30 septembre	31 octobre	30 novembre	31 décembre
			705,0	1149,9	1584,0	1927,7	2105,5	2173,3	2204,9

Nous constatons que les DJC mensuels augmentent fortement entre avril (68,2 sur 15 jours) et mai (300,1) ; même si pour le mois d'avril nous n'avons relevé que les DJC de la 2<sup>ème</sup> quinzaine, l'extrapolation au mois entier est une hypothèse valable. Ensuite, les DJC mensuels croissent plus lentement jusqu'en août (449,3). Enfin, ils diminuent rapidement les mois suivants pour atteindre la valeur de 31,5 en décembre. Nous avons également déterminé la quantité des DJC reçue par le fruit au moment de la récolte. En raison des valeurs des DJC/mois, la courbe d'accumulation croît rapidement jusqu'en septembre puis prend une valeur asymptotique. Pour la période de récolte traditionnelle des fruits (octobre-novembre), le cumul moyen en DJC est de l'ordre de 2000. Stenzel et coll. [2006] ont constaté que les oranges récoltées au Brésil (Etat de Sao Paulo) requièrent entre 2500 et 3600 DJC pour arriver à pleine maturité. Dans notre étude, un tel niveau de DJC n'est jamais atteint et ne semble pas nécessaire pour obtenir des cédrats considérés comme « murs » ; ceci peut s'expliquer par les différences de climat entre la Corse (type méditerranéen) et le Brésil (type tropical). En effet, Volpe et coll. [2000] ont signalé que le niveau de maturation des fruits est influencé par la quantité d'eau reçue par l'arbre ; un déficit hydrique durant la maturité peut entraîner une maturation précoce des fruits.

Lors de chacune des récoltes, nous avons relevé les caractéristiques morphologiques des fruits : poids, longueur, largeur et couleur (tableau 32). Nous notons un accroissement de chacun de ces caractères de juillet à octobre puis une stabilisation ; entre novembre et janvier. Les fruits « murs » (à partir du mois d'octobre) ont un poids compris entre 1100 et 1300 g, une longueur de 12 à 13 cm et une largeur de 12,5 à 13,5 cm.

Tableau 32 : Evolution statistique des caractéristiques phénotypiques

	<b>Juillet</b>	<b>Août</b>	<b>Septembre</b>	<b>Octobre</b>	<b>Novembre</b>	<b>Décembre</b>	<b>Janvier</b>
<b>Poids (g)</b>	119,1 ± 33,5	349,2 ± 62,7	821,4 ± 201,1	1218,6 ± 187,1	1122,6 ± 272,2	1203,0 ± 146,3	1289,1 ± 281,7
<b>Longueur (cm)</b>	6,9 ± 0,8	9,3 ± 1,0	12,0 ± 1,8	12,4 ± 1,5	13,0 ± 1,0	12,4 ± 1,3	12,2 ± 1,1
<b>Largeur (cm)</b>	6,0 ± 0,6	9,1 ± 0,7	11,7 ± 1,4	13,5 ± 1,1	12,5 ± 1,3	13,3 ± 0,5	13,3 ± 1,2
<b>Couleur du zeste</b>	Vert foncé	Vert foncé	Vert	Vert pâle avec zones jaunissantes	Jaune pâle	Jaune	Jaune sombre avec zone tournant à l'orange

*b) Composition volatile du zeste au cours de la maturation des fruits*

Nous avons préparé l'huile essentielle de zestes correspondant à chaque récolte mensuelle. Les rendements de 0,4 % en juillet croissent de façon irrégulière pour passer par un maximum de 0,72% en décembre (tableau 33).

Les analyses par CPG et CPG/SM nous ont permis d'identifier 30 composés représentant de 97,6 à 99,5% de la composition chimique totale (tableau 34). Parmi eux, nous relevons la présence de 12 monoterpènes hydrocarbonés (**1**, **2**, **4-9**, **11-13**, **16**), 12 monoterpènes oxygénés (**18-23**, **25-28**, **30-31**), 4 sesquiterpènes hydrocarbonés (**32-33**, **35**, **38**) et 2 composés non terpéniques oxygénés (**3**, **17**). Tous ces composés ont déjà été détectés dans l'huile essentielle de zeste de cédrat de Corse cultivé à l'INRA de San Giuliano.

Au cours de la maturation du fruit, les huiles essentielles présentent toujours des teneurs importantes en monoterpènes hydrocarbonés (66,8-82,5%). Cependant, nous relevons des variations quantitatives entre la composition volatile des fruits issus de la première récolte (juillet) et celles des fruits des récoltes suivantes (août à janvier). Les échantillons de juillet présentent un pourcentage en  $\gamma$ -terpinène **13** plus faible (6,7%) ainsi que des teneurs en nérol **25** (5,9%), néral **26** (5,7%), géraniol **27** (6,6%) et géraniol **28** (8,2%) plus élevées que les huiles essentielles obtenues à partir des fruits prélevés les mois suivants. Celles-ci montrent une composition chimique relativement stable avec un profil chromatographique dominé par le limonène **9** (56,1 à 60,6%) et le  $\gamma$ -terpinène **13** (11,5 à 15,2%). Ce profil chimique est analogue à celui mis en évidence précédemment (cf. tableau 25) à partir du même cultivar 'Corsican' en culture à la station INRA de San Giuliano.

La composition volatile des essences préparées à partir de fruits avant maturité (petite taille et couleur vert foncé) récoltés en juillet se rapproche de celle des feuilles (cf. tableau 24) par des taux relativement importants en nérol **25**, néral **26**, géraniol **27** et géraniol **28**. Il semble donc que la différenciation des profils chimiques entre les fruits et les feuilles du cédrat de Corse se produit au cours du processus de maturation du fruit. L'ensemble de nos résultats indiquent que la qualité en termes de composés volatils des spiritueux ne sera impactée que dans le cas d'une récolte précoce des fruits. En outre, cela peut permettre d'étendre la période de récolte des fruits sans pour autant modifier la qualité aromatique de la liqueur.

Tableau 33 : Rendements en huile essentielle de zeste

Rendements	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Janvier
	0,40%	0,62%	0,70%	0,67%	0,65%	0,72%	0,69%

Tableau 34 : Evolution de la composition chimique de l'huile essentielle au cours de la maturation des fruits

n°	Composés	Ir L <sup>a</sup>	Ir A <sup>b</sup>	Ir P <sup>c</sup>	Juil.	Août	Sept.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.
1	$\alpha$ -Thujène	932	922	1023	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1
2	$\alpha$ -Pinène	936	931	1022	0,4 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,4	1,1 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,3
3	6-Méthylhept-5-èn-2-one	963	963	1337	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	tr	tr	tr	0,2 $\pm$ 0,1
4	Sabinène	964	969	1111	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1
5	$\beta$ -Pinène	978	970	1110	0,4 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,2
6	Myrcène	987	979	1159	1,1 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,1
7	$\alpha$ -Terpinène	1013	1008	1178	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1
8	p-Cymène	1015	1010	1169	2,4 $\pm$ 1,1	1,4 $\pm$ 0,7	0,5 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,5
9	Limonène	1025	1020	1199	54,2 $\pm$ 4,0	57,8 $\pm$ 1,7	60,3 $\pm$ 1,0	60,6 $\pm$ 1,2	56,1 $\pm$ 1,9	57,9 $\pm$ 3,0	54,6 $\pm$ 1,1
11	(Z)- $\beta$ -Ocimène	1027	1026	1230	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,0
12	(E)- $\beta$ -Ocimène	1029	1024	1230	0,7 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,2
13	$\gamma$ -Terpinène	1051	1047	1243	6,7 $\pm$ 2,6	11,5 $\pm$ 0,2	12,5 $\pm$ 0,4	14,4 $\pm$ 0,8	14,2 $\pm$ 2,4	13,6 $\pm$ 1,7	15,2 $\pm$ 1,4
16	Terpinolène	1082	1078	1280	0,4 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1
17	Nonanal	1084	1083	1388	0,1 $\pm$ 0,1	tr	tr	tr	tr	tr	tr
18	Linalol	1086	1081	1544	0,6 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,2
19	Citronellal	1129	1132	1479	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1
20	Isonéral	1140	1142	1556	0,5 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,1
21	Isogéranial	1156	1159	1748	0,8 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,1
22	Terpinèn-4-ol	1164	1161	1600	0,4 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1
23	$\alpha$ -Terpinéol	1176	1179	1700	0,9 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,3



<b>25</b> Nérol	1210	1212	1799	5,9 ± 0,7	4,8 ± 0,3	1,8 ± 0,1	3,9 ± 1,0	4,3 ± 1,0	2,5 ± 1,9	2,6 ± 0,9
<b>26</b> Néral	1215	1214	1679	5,7 ± 1,5	3,8 ± 0,5	4,5 ± 0,4	2,1 ± 0,1	3,3 ± 1,5	3,6 ± 0,8	4,7 ± 0,6
<b>27</b> Géraniol	1235	1233	1843	6,6 ± 1,3	5,8 ± 0,4	2,1 ± 0,2	5,1 ± 0,9	5,4 ± 0,5	2,7 ± 1,9	2,3 ± 0,6
<b>28</b> Géraniol	1244	1245	1710	8,2 ± 2,3	5,1 ± 0,7	6,6 ± 0,6	2,9 ± 0,2	4,2 ± 1,3	4,9 ± 1,0	6,6 ± 1,1
<b>30</b> Acétate de néryle	1342	1343	1725	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,3
<b>31</b> Acétate de géranyle	1362	1357	1752	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,2
<b>32</b> ( <i>E</i> )- $\beta$ -Caryophyllène	1421	1424	1591	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
<b>33</b> <i>trans</i> - $\alpha$ -Bergamotène	1429	1431	1581	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0
<b>35</b> Germacrène-D	1479	1475	1704	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
<b>38</b> $\beta$ -Bisabolène	1498	1502	1720	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
Monoterpènes hydrocarbonés				66,8 ± 5,7	76,1 ± 1,3	79,5 ± 1,5	82,5 ± 1,9	77,0 ± 4,1	80,5 ± 4,4	78,6 ± 2,1
Monoterpènes oxygénés				30,5 ± 4,1	22,2 ± 2,0	18,4 ± 1,2	16,3 ± 1,8	20,3 ± 5,1	16,5 ± 6,1	19,8 ± 1,3
Sesquiterpènes hydrocarbonés				0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,1 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,1
Autres				0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	tr	tr	tr	0,2 ± 0,1
<b>Total</b>				<b>98,0 ± 2,2</b>	<b>99,1 ± 0,9</b>	<b>98,8 ± 0,9</b>	<b>99,5 ± 0,2</b>	<b>98,1 ± 1,2</b>	<b>97,6 ± 1,7</b>	<b>99,3 ± 0,9</b>

Les n° des composés correspondent à ceux du tableau 24 (ordre d'élution sur colonne apolaire).

<sup>a</sup> Indices de rétention obtenus à partir des données de la littérature [König et coll. 2001]

<sup>b</sup> Indices de rétention obtenus sur colonne apolaire (Rtx-1)

<sup>c</sup> Indices de rétention obtenus sur colonne polaire (Rtx-wax)

Les abondances des composés sont exprimées en pourcentages relatifs.

tr : trace (<0,05%)

Les composés ont été identifiés à partir de la bibliothèque « arômes » du laboratoire.

c) *Composition phénolique du zeste au cours de la maturation des fruits*

Pour chaque récolte de fruits, 100 grammes de zestes ont été mis à macérer dans 1 litre d'éthanol à 60°. D'une part, nous avons déterminé les rendements des macérations réalisées (tableau 35) ; la quantité de matière sèche dans les extraits augmente entre juillet et décembre puis diminue en janvier. D'autre part, les extraits obtenus ont été analysés par CLHP/SM-ESI afin de suivre l'évolution des constituants phénoliques en fonction de la période de récolte (tableau 36).

Concernant la composition phénolique (tableau 36), nous notons une augmentation de la concentration totale entre juillet et août ; puis, une diminution progressive entre août et janvier. 19 composés phénoliques ont été identifiés dans les extraits éthanoliques de zeste de cédrat de Corse. Ils se répartissent en quatre acides phénoliques (**4-7**), deux dérivés d'acides phénoliques (**2-3**), quatre flavones (**22-23**, **27**, **29**), une flavone glycosylée (**11**), trois flavanones glycosylées (**8**, **10**, **12**), trois flavonols (**16**, **25**, **30**), deux flavonols glycosylés (**9**, **14**). Les composés les plus abondants sont les dérivés d'acides phénoliques (162,7-661,5 mg/l) suivis, dans une moindre mesure, par les acides phénoliques (5,8-11,0 mg/l), les flavanones glycosylées (1,6-10,7 mg/l), les flavonols glycosylés (6,9-19,8 mg/l) et les flavones glycosylées (0,5-16,6 mg/l). L'ensemble de ces composés a été préalablement détecté dans les zestes du cédrat de Corse cultivé à San Giuliano. De plus, nous notons que les teneurs mesurées pour les fruits de la station INRA sont proches de celles relevées pour les mois d'octobre-novembre.

Quelle que soit la période de récolte, le composé majoritaire est l'acide quinique **3**. Les concentrations de ce dernier accusent, cependant, de fortes variations quantitatives passant de 548,5 mg/l en juillet à 647,2 mg/l en août ; avant de diminuer les mois suivants, jusqu'à atteindre 159,6 mg/l en janvier. Les concentrations de certains flavonoïdes connaissent une évolution différente. La concentration en rutine **14** diminue de juillet à septembre passant de 17,5 mg/l à 4,2 mg/l ; puis augmente, les mois suivants, pour atteindre des valeurs comprises entre 9,6 et 12,0 mg/l tandis que la concentration en diosmine **11** connaît une diminution progressive entre juillet et janvier (16,6 mg/l et 0,5 mg/l, respectivement). En outre, il apparaît que la composition phénolique des échantillons prélevés en octobre-novembre est similaire à celle observée pour la même variété de cédrat cultivée à la station de San Giuliano (cf. tableau 26).

Tableau 35 : Rendement en matière sèche des extraits en fonction de la date de récolte

	Juil.	Août	Sept.	Oct.	Nov.	Déc.	Jan.
<b>Rendement</b>	3,23%	3,61%	3,84%	3,92%	4,07%	5,43%	5,21%

Tableau 36 : Composition phénolique (mg/l) des extraits de zeste en fonction de la période de récolte des fruits

n°	Composés	TR (mn)	Juil.	Août	Sept.	Oct.	Nov.	Déc.	Jan.
2	Ac. Shikimique	2,2	13,4±1,1	14,3±1,2	11,3±1,5	9,4±0,6	5,2±0,4	4,0±0,5	3,1±0,4
3	Ac. Quinique	2,4	548,5±30,7	647,2±43,3	490,9±33,8	344,9±23,1	245,2±18,0	200,7±17,4	159,6±12,2
4	Ac. Vanillique	3,3	2,2±0,3	2,4±0,3	2,7±0,3	2,3±0,3	1,8±0,2	1,7±0,3	1,9±0,4
5	Ac. p-Coumarique	6,7	3,6±0,6	8,0±0,9	6,7±0,3	5,3±0,7	4,7±0,6	4,2±0,7	2,7±0,4
6	Ac. Sinapique	7,2	-	0,4±0,1	0,3±0,1	0,6±0,1	0,6±0,1	0,7±0,1	0,7±0,2
7	Ac. Ferulique	7,4	0,1±0,1	0,1±0,1	0,2±0,2	0,5±0,1	0,4±0,1	0,4±0,2	0,5±0,1
8	Flavanomarine	7,7	2,3±0,3	1,9±0,3	1,5±0,3	1,3±0,3	1,3±0,2	1,3±0,3	1,4±0,3
9	Hyperoside	8,3	2,3±0,1	2,1±0,1	2,8±0,2	3,0±0,5	2,9±0,5	3,1±0,4	3,2±0,2
10	Narirutine	8,4	0,1±0,1	tr	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,1	0,1±0,1
11	Diosmine	8,5	16,6±1,2	9,2±1,1	2,9±0,4	1,4±0,3	1,1±0,3	0,7±0,2	0,5±0,2
12	Néohesperidine	8,5	2,1±0,1	0,2±0,1	-	7,5±1,0	9,2±0,8	8,7±0,9	9,1±0,6
14	Rutine	8,6	17,5±0,9	12,9±1,0	4,2±0,5	4,7±0,6	12,0±1,0	10,3±1,1	9,6±1,0
16	Robinépine triméthylether	8,7	0,6±0,2	0,3±0,0	0,8±0,2	0,5±0,2	0,3±0,1	0,5±0,1	0,3±0,1
22	Lutéoline	11,0	0,1±0,0	0,1±0,1	tr	0,1±0,1	0,1±0,0	0,1±0,1	tr
23	Sinensétine	11,0	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr
25	Casticine	11,2	2,9±0,4	0,4±0,1	0,1±0,1	0,2±0,1	0,1±0,0	0,2±0,1	0,1±0,0
27	Nobilétine	11,3	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
29	Tangéretine	11,8	tr	tr	tr	tr	tr	-	-
30	Retusine	12,4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-
	Acides phénoliques		5,9±0,9	11,0±1,2	10,0±0,9	8,6±1,0	7,5±0,8	7,0±1,1	5,8±0,7
	Dérivés acides phénoliques		561,9±31,2	661,5±44,9	502,2±33,6	354,3±23,1	250,4±18,4	204,7±15,5	162,7±10,6
	Flavones		0,1±0,1	tr	tr	0,1±0,2	0,1±0,1	0,1±0,1	tr
	Flavones glycosylés		16,6±1,2	9,2±1,1	2,9±0,4	1,4±0,3	1,1±0,3	0,7±0,2	0,5±0,2
	Flavanones glycosylés		4,4±0,5	2,0±0,4	1,6±0,3	8,9±1,2	10,7±1,0	10,0±1,3	10,6±0,8
	Flavonols		3,4±0,5	0,6±0,1	0,8±0,2	0,7±0,2	0,4±0,1	0,6±0,1	0,4±0,1
	Flavonols glycosylés		19,8±0,9	15,0±1,0	6,9±0,7	7,7±0,9	14,9±1,4	13,4±1,5	12,8±1,2
	<b>Total</b>		<b>612,1±40,3</b>	<b>699,3±47,2</b>	<b>524,4±36,2</b>	<b>381,7±26,9</b>	<b>285,1±22,1</b>	<b>236,5±19,9</b>	<b>192,8±13,7</b>

Les n° des composés correspondent à ceux tableau 25 (ordre d'éluion : temps de rétention (TR) croissant). Les concentrations des composés dans l'extrait sont exprimées en mg/l. tr : trace (<0,1 mg/l).

Les composés ont été identifiés à partir de la bibliothèque du laboratoire

Contrairement à la conclusion à laquelle nous avons abouti sur la base des teneurs en composés volatils, nous remarquons que le degré de maturité des fruits a un impact important sur la qualité du fruit au niveau de la composition phénolique. Dans le zeste au cours de la

maturation du fruit (exprimée en DJC cumulés), nous constatons une production de flavonoïdes préférentiellement aux acides organiques et phénoliques. En effet, pour les fruits verts (DJC cumulés < 2000 : juillet-octobre) le ratio concentration en flavonoïdes / acides est inférieur à 0,1 (0,08 ; 0,04 ; 0,02 ; 0,05, respectivement) alors que pour les fruits jaunes (DJC cumulés > 2000 : novembre-janvier), ce même ratio est supérieur à 0,1 (0,11 ; 0,12 ; 0,15, respectivement).

En conclusion, alors que la composition en composés volatils du zeste de cédrat varie peu au cours de sa maturation la composition phénolique évolue fortement durant cette période. Pour conserver une qualité gustative équivalente à celle d'aujourd'hui, il est, donc, préférable maintenir la date de récolte à la période comprise entre début octobre et fin novembre.

### II.3.2. Elaboration et conservation des liqueurs

Les pratiques utilisées par notre partenaire industriel pour la fabrication de spiritueux à base de cédrat de Corse relèvent d'un savoir-faire ancestral. Elles consistent en une macération à proportion de 100 grammes de zestes dans 1 litre d'éthanol à 60° pendant huit semaines.

Les fruits ont été cueillis à la mi-octobre. Cette période fait partie du créneau que nous avons recommandé pour la récolte (début octobre à fin novembre). En fluctuant autour de la recette traditionnelle, nous avons préparé différents extraits éthanoliques en faisant varier la quantité de zestes (50 g/l, 100 g/l et 150 g/l) et le degré alcoolique (60°, 75° et 96°). Par la combinaison de ces conditions, nous obtenons neuf extraits **A-I** (tableau 37) dont nous avons suivi l'évolution des compositions volatile et phénolique pendant 10 semaines de macération en effectuant des prélèvements au bout de 24 h (J<sub>1</sub>), 72 h (J<sub>3</sub>), une semaine (S<sub>1</sub>), deux semaines (S<sub>2</sub>), trois semaines (S<sub>3</sub>), quatre semaines (S<sub>4</sub>), six semaines (S<sub>6</sub>), huit semaines (S<sub>8</sub>) et dix semaines (S<sub>10</sub>).

Tableau 37 : Identification des macérations

		Quantité de zeste		
		50 g/l	100 g/l	150 g/l
<b>Degré alcoolique de la macération</b>	60°	A	B	C
	75°	D	E	F
	96°	G	H	I

A partir des neuf extraits alcooliques (**A-I**), nous avons élaboré 27 liqueurs en laboratoire à partir des extraits obtenus après 4, 8 et 10 semaines de macération. Tous les spiritueux ont été préparés à un titre alcoolémique de 24%, à une concentration en sucre de 180 g/l. En plus des « liqueurs expérimentales » et dans l'optique de vérifier que nos résultats sont transposables à l'échelle industrielle, nous avons analysé 3 bouteilles d'un même lot fournies par notre partenaire. Les liqueurs expérimentales et commerciales ont été réalisées à partir de cédrats provenant du même verger ; elles ont été conservées à température ambiante et à la lumière du jour. Les compositions volatiles et phénoliques des liqueurs ont été étudiées pendant une année de conservation en réalisant des prélèvements sur une même bouteille après 1 jour ( $J_1$ ), une semaine ( $S_1$ ), deux semaines ( $S_2$ ), trois semaines ( $S_3$ ) et tous les mois ( $M_1$  à  $M_{12}$ ). Ce suivi représente 32 analyses (16 pour la composition en volatils et 16 pour la composition phénolique) pour chacune des 30 liqueurs (27 expérimentales et 3 commerciales), soient 960 analyses.

*a) Composition volatile*

La fraction volatile des extraits, pré-concentrée dans l'espace de tête et extraite par MEPS, a été caractérisée par CPG et CPG/SM. Le tableau 38 donne l'aire totale du signal sur le chromatogramme en fonction du type et de la durée de la macération. Nous constatons que le taux global en composés volatils augmente avec la concentration en zeste pour des macérations obtenues avec un même degré alcoolique (**A,B,C** / **D,E,F** / **G,H,I** respectivement). Pour les extraits obtenus à partir d'une même quantité de zestes (**A,D,G** / **B,E,H** / **C,F,I** respectivement), nous remarquons que cette même concentration totale en volatils diminue lorsque le degré alcoolique augmente. Ce résultat peut s'expliquer par une saturation de l'espace de tête par l'éthanol entraînant une diminution de l'adsorption des composés volatils sur la fibre en raison des phénomènes de compétition. De plus, nous

observons que le taux en volatils dans les extraits est relativement élevé après 24 heures de macération ; il passe par un maximum au bout de quatre à six semaines. En outre, le signal le plus élevé correspond à la macération **C** (150 g/l à 60°) et est atteint au bout de quatre semaines. Rappelons que la macération industrielle correspond à la combinaison **B-S<sub>8</sub>** (100g/l d'éthanol à 60°; 8 semaines).

Tableau 38 : Aire totale du signal en CPG de l'espace de tête des macérations

	Temps de macération								
	<b>J<sub>1</sub></b>	<b>J<sub>3</sub></b>	<b>S<sub>1</sub></b>	<b>S<sub>2</sub></b>	<b>S<sub>3</sub></b>	<b>S<sub>4</sub></b>	<b>S<sub>6</sub></b>	<b>S<sub>8</sub></b>	<b>S<sub>10</sub></b>
<b>A</b>	58 146	55 772	64 647	68 612	68 850	70 653	<b>71 544</b>	70 553	69 227
<b>B</b>	79 119	78 978	82 426	86 013	85 109	85 557	<b>86 503</b>	83 004	84 786
<b>C</b>	104 000	106 000	110 000	115 000	113 000	<b>116 000</b>	113 000	112 000	106 000
<b>D</b>	18 779	21 850	24 278	<b>25 817</b>	22 119	23 637	24 269	22 160	23 333
<b>E</b>	53 693	54 478	59 265	60 156	55 889	59 230	<b>62 558</b>	61 573	57 523
<b>F</b>	77 634	76 396	74 367	76 915	76 814	80 300	<b>81 382</b>	79 322	78 106
<b>G</b>	4 724	5 200	5 139	5 075	5 406	<b>5 916</b>	5 659	5 254	5 518
<b>H</b>	9 760	10 648	11 151	11 579	11 308	<b>12 124</b>	11 289	11 383	11 846
<b>I</b>	14 868	15 026	15 267	16 100	16 350	<b>16 607</b>	15 902	15 762	15 223

17 composés ont été identifiés aussi bien dans les extraits que dans les liqueurs, représentant de 98,2 à 99,9% de la fraction volatile. Ils se répartissent en 10 monoterpènes hydrocarbonés (**1, 2, 4-6, 8, 9, 12, 13, 16**), 4 monoterpènes oxygénés (**26, 28, 30, 31**) et 3 sesquiterpènes hydrocarbonés (**32, 33, 38**).

Dans le cas des macérations, nous n'observons pas de différences qualitatives et quantitatives significatives de la composition chimique en fonction de la concentration en zeste, du degré alcoolique ou du temps de macération (tableaux A3 à A11 en annexe). Les neuf extraits éthanoliques présentent comme composés majoritaires : le limonène **9** (57,5-69,6%) et le  $\gamma$ -terpinène **13** (15,4-26,2%). Les 15 autres constituants ont des teneurs nettement inférieures puisque les cinq principaux représentent chacun de 1 à 4% de la fraction volatile ; il s'agit de l' $\alpha$ -thujène **1**, l' $\alpha$ -pinène **2**, du  $\beta$ -pinène **5**, du myrcène **6** et du (*E*)- $\beta$ -ocimène **12**.

En ce qui concerne les liqueurs, nous n'observons pas de différences qualitatives et peu voire pas de différences quantitatives entre les liqueurs élaborées après 4, 8 et 10 semaines de macérations. Leur profil chimique est dominé par le limonène **9** (60,2-69,8%) et le  $\gamma$ -terpinène **13** (11,8-19,5%). Seules quelques différences quantitatives entre les profils chromatographiques des liqueurs et ceux des macérations mères **A-I** sont relevées ; les liqueurs exhibent des taux en  $\alpha$ -thujène **1** (1,0-2,6%),  $\alpha$ -pinène **2** (3,8-6,7%),  $\beta$ -pinène **5** (2,8-5,2%) et myrcène **6** (1,8-3,4%) légèrement plus importants que ceux des macérations (0,5-1,5%, 0,6-4,5%, 1,1-3,1%, 0,5-2,5%, respectivement).

Les 17 composés présents dans ces deux matrices ont déjà été identifiés dans l'huile essentielle de zeste qui en comprend 13 supplémentaires. Cependant, l'ensemble de ces derniers représentent moins de 10% de l'huile totale et concerne, principalement, les monoterpènes oxygénés. Compte tenu de la différence de préparation des échantillons, nous retrouvons le même type chimique que dans l'huile essentielle à savoir limonène /  $\gamma$ -terpinène.

Le tableau 39 propose une comparaison du profil chromatographique de la macération **B-S<sub>8</sub>** (correspondant aux conditions de la macération industrielle) avec celui de la macération **C-S<sub>4</sub>** (présentant le plus fort taux en composés volatils).

Les profils chimiques des macérations **B-S<sub>8</sub>** et **C-S<sub>4</sub>** sont similaires. Les composés majoritaires sont le limonène **9** (60,5 et 59,6%, respectivement) et le  $\gamma$ -terpinène **13** (21,8 et 22,0%, respectivement). Ces deux macérations se différencient par leur teneur globale en volatils représentée par l'aire totale du signal (tableau 38) ; la macération **C-S<sub>4</sub>** présente un signal plus élevé que celui de **B-S<sub>8</sub>** d'environ 40%.

L'étude de la composition en volatils, durant 10 semaines, des 9 macérations nous a permis de constater que la composition chimique est relativement homogène tant au niveau qualitatif qu'au niveau quantitatif. Une différenciation peut s'effectuer sur la base de la force du signal (aire totale du chromatogramme). Sur ce critère la macération **C-S<sub>4</sub>** correspond aux conditions de fabrication conduisant aux meilleurs résultats. Cependant, sur ce seul critère des composés volatils, le principal avantage de **C-S<sub>4</sub>** sur la pratique industrielle actuelle semble être un gain de temps de l'ordre de 4 semaines.

Tableau 39 : Composition en volatils extrait par MEPS des macérations **B-S<sub>8</sub>** et **C-S<sub>4</sub>**

n°	Composés	Ir L <sup>a</sup>	Ir A <sup>b</sup>	B-S <sub>8</sub>	C-S <sub>4</sub>
1	α-Thujène	932	922	1,2	1,5
2	α-Pinène	936	931	3,6	3,4
4	Sabinène	964	969	0,3	0,3
5	β-Pinène	978	970	2,8	2,4
6	Myrcène	987	979	2,4	2,3
8	p-Cymène	1015	1010	1,3	0,6
9	Limonène	1025	1020	60,5	59,6
12	(E)-β-Ocimène	1029	1024	3,0	3,0
13	γ-Terpinène	1051	1047	21,8	22,0
16	Terpinolène	1082	1078	1,0	1,2
26	Néral	1215	1212	0,1	0,1
28	Géranial	1244	1239	0,1	0,2
30	Acétate de néryle	1342	1339	tr	0,1
31	Acétate de géranyle	1362	1356	tr	tr
32	(E)-β-Caryophyllène	1421	1424	0,3	0,8
33	trans-α-Bergamotène	1429	1431	0,3	0,8
38	β-Bisabolène	1498	1502	0,2	0,6
	Monoterpènes hydrocarbonés			97,9	96,3
	Monoterpènes oxygénés			0,2	0,4
	Sesquiterpènes hydrocarbonés			0,8	2,2
	<b>Total</b>			<b>98,9</b>	<b>98,9</b>

Les n° des composés correspondent à ceux du tableau 24 (ordre d'élution sur colonne apolaire). <sup>a</sup> Indices de rétention obtenus à partir des données de la littérature [König et coll. 2001]. <sup>b</sup> Indices de rétention obtenus sur colonne apolaire (Rtx-1). Les abondances des composés sont exprimées en pourcentages relatifs. Les composés ont été identifiés à partir de la bibliothèque « arômes » du laboratoire.

L'évolution des liqueurs préparées à partir de ces macérations **B-S<sub>8</sub>** (méthode industrielle) et **C-S<sub>4</sub>** (teneur en volatils plus élevée et temps de macération inférieur) est présentée dans le tableau 40 auquel nous y avons ajouté la liqueur commerciale. Pour une meilleure lisibilité nous présentons seulement les résultats des analyses réalisées après 1 jour, 3 mois, 6 mois et 12 mois de conservation. Pour une liqueur donnée, la composition en volatils ne varie que faiblement. Les liqueurs **B-S<sub>8</sub>** et commerciale montrent un profil chimique similaire et des teneurs en composés très proches. Ainsi, du point de vue de la composition en volatils, nous avons montré que notre liqueur expérimentale est semblable à celle commerciale. Nous observons également une très forte similitude de la composition chimique entre les liqueurs **C-S<sub>4</sub>** et **B-S<sub>8</sub>**. Le seul critère qui différencie ces liqueurs est leur teneur en composés volatils représentée ici par l'aire totale du chromatogramme. Enfin, quel que soit le mode de préparation, le vieillissement des liqueurs - laboratoires et commerciales - ne semble pas altérer la teneur et la composition chimique des arômes (tableaux 40 et A12-A16 en annexe). Nous pouvons donc conclure que la qualité des liqueurs au niveau des constituants terpéniques, n'est pas altérée par la durée de conservation.



Tableau 40 : Composition chimique de la fraction volatile des trois liqueurs de cédrats

n°	Composés	Ir L <sup>a</sup>	Ir A <sup>b</sup>	J <sub>1</sub>			M <sub>3</sub>			M <sub>6</sub>			M <sub>12</sub>		
				C-S <sub>4</sub>	B-S <sub>8</sub>	Comm <sup>c</sup>	C-S <sub>4</sub>	B-S <sub>8</sub>	Comm <sup>c</sup>	C-S <sub>4</sub>	B-S <sub>8</sub>	Comm <sup>c</sup>	C-S <sub>4</sub>	B-S <sub>8</sub>	Comm <sup>c</sup>
1	α-Thujène	932	922	2,4	1,5	2,2	2,0	2,4	1,3	2,2	1,3	1,8	1,4	1,6	1,9
2	α-Pinène	936	931	6,3	6,0	6,0	5,9	6,4	5,7	6,7	4,8	6,4	5,3	5,5	4,9
4	Sabinène	964	969	0,6	0,6	0,4	0,5	0,5	0,4	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,3
5	β-Pinène	978	970	4,6	4,9	4,6	4,7	4,6	4,5	5,2	2,8	5,1	3,7	4,1	4,0
6	Myrcène	987	979	3,1	2,3	2,8	3,0	2,9	2,0	3,4	1,8	3,1	3,2	2,8	2,7
8	p-Cymène	1015	1010	1,6	1,3	1,2	1,5	1,5	6,1	3,1	2,3	3,1	2,0	1,7	1,1
9	Limonène	1025	1020	63,9	64,4	64,2	64,2	65,9	63,9	61,8	67,3	63,2	62,1	62,3	63,4
12	(E)-β-Ocimène	1029	1024	1,7	1,3	1,6	1,7	1,4	1,1	1,6	1,9	1,6	1,8	1,7	1,6
13	γ-Terpinène	1051	1047	14,8	16,9	15,0	15,4	13,1	13,9	15,0	16,8	15,0	18,5	18,8	18,3
16	Terpinolène	1082	1078	0,3	0,3	0,4	0,2	0,3	0,1	0,2	0,2	0,1	0,4	0,5	0,5
26	Néral	1215	1212	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
28	Géranial	1244	1239	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
30	Acétate de néryle	1342	1339	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
31	Acétate de géranyle	1362	1356	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
32	(E)-β-Caryophyllène	1421	1424	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr
33	trans-α-Bergamotène	1429	1431	-	tr	-	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
38	β-Bisabolène	1498	1502	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Monoterpènes hydrocarbonés				99,3	99,5	98,4	99,1	99,0	99,0	99,4	99,4	99,6	98,8	99,2	98,7
Monoterpènes oxygénés				tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Sesquiterpènes hydrocarbonés				tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	
<b>Total</b>				<b>99,3</b>	<b>99,5</b>	<b>98,4</b>	<b>99,1</b>	<b>99,0</b>	<b>99,0</b>	<b>99,4</b>	<b>99,4</b>	<b>99,6</b>	<b>98,8</b>	<b>99,2</b>	<b>98,7</b>
<b>Aire totale</b>				107000	96000	97000	108000	95000	95000	110000	97000	96000	108000	97000	96000

Les n° des composés correspondent à ceux du tableau 23 (ordre d'élution sur colonne apolaire).

<sup>a</sup> Indices de rétention obtenus à partir des données de la littérature [König et coll. 2001]. <sup>b</sup> Indices de rétention obtenus sur colonne apolaire (Rtx-1). <sup>c</sup> Comm : liqueurs commerciales. Les abondances des composés sont exprimées en pourcentages relatifs. Les composés ont été identifiés à partir de la bibliothèque « arômes » du laboratoire.

## *b) Composition phénolique*

La composition phénolique des neuf extraits (**A-I**) et des trente liqueurs a été déterminée par CLHP/SM-ESI selon la méthodologie décrite en partie **A.III.2**. Ainsi, nous relevons la présence de 19 composés incluant quatre acides phénoliques (**4-7**), deux dérivés d'acides phénoliques (**2-3**), quatre flavones (**22, 23, 27, 29**), une flavone glycosylée (**11**), trois flavanones glycosylées (**8, 10, 12**), trois flavonols (**16, 25, 30**) et deux flavonols glycosylés (**9,14**) (tableaux A17 à A25 en annexe). Dans les liqueurs nous ne détectons que 16 composés. Il s'agit des 19 composés détectés dans les extraits auxquels il faut soustraire deux flavones (**27, 29**) et un flavonol (**30**) (tableaux A26 à A30 en annexe). La diminution du nombre de composés détectés entre la macération et la liqueur peut s'expliquer par le fait que la liqueur est une « dilution » de la macération et donc, certains composés peuvent atteindre une concentration inférieure au seuil de détection de l'appareil, d'autant plus que les composés dont il s'agit n'étaient détectés qu'à l'état de trace dans la macération.

Toutes les macérations présentent un profil chromatographique analogue ; en termes de concentration, celui-ci est dominé par l'acide quinique **3**, suivi de la rutine **14**, la néohesperidine **12**, l'acide shikimique **2**, l'acide p-coumarique **5** et l'hyperoside **9**. La comparaison des extraits ayant le même degré alcoolique (**A,B,C / D,E,F / G,H,I**) montre que l'augmentation de la quantité de zeste n'induit pas une augmentation proportionnelle en composés phénoliques (tableau 41). A titre d'exemple, l'extrait **A** (50 g de zeste/l) et l'extrait **B** (100 g/l) présentent respectivement des concentrations moyennes en composés phénoliques de 186,4 mg/l (soit un rendement d'extraction de 0,37%) et 240,9 mg/l (0,24%). Nos résultats démontrent également que les extraits obtenus avec des quantités identiques de zestes (**A,D,G / B,E,H / C,F,I**) ont des concentrations en phénols totaux qui diminuent lorsque le degré alcoolique augmente. Les macérations **A, D** et **G** (50 g/l) présentent des teneurs moyennes en phénols de 186,4 mg/l, 178,8 mg/l et de 166,9 mg/l, respectivement. De plus et comme pour la composition en volatils, la composition phénolique évolue peu au cours de la période de macération ; la concentration maximale est atteinte entre la troisième et la huitième semaine selon la préparation. Enfin, parmi toutes les macérations nous notons que l'extrait **C** présente les concentrations en composés phénoliques les plus élevées quelle que soit la durée d'extraction ; la teneur maximum (313,5 mg/l) étant atteinte au bout de quatre semaines. La combinaison **C-S<sub>4</sub>** apparaît, ici encore, comme correspondant aux conditions optimales.

Tableau 41 : Evolution de la concentration totale en composés phénoliques (mg/l)

	Temps de macération									
	<b>J<sub>1</sub></b>	<b>J<sub>3</sub></b>	<b>S<sub>1</sub></b>	<b>S<sub>2</sub></b>	<b>S<sub>3</sub></b>	<b>S<sub>4</sub></b>	<b>S<sub>6</sub></b>	<b>S<sub>8</sub></b>	<b>S<sub>10</sub></b>	
Macérations	<b>A</b>	180,1	196,3	175,5	191,5	<b>201,7</b>	169,9	178,8	185,4	198,3
	<b>B</b>	234,7	242,0	245,5	234,6	237,2	234,2	<b>250,8</b>	249,1	224,8
	<b>C</b>	304,9	279,2	275,9	306,5	278,8	<b>313,5</b>	282,3	309,6	283,9
	<b>D</b>	186,2	185,8	158,1	169,9	188,4	176,1	<b>195,7</b>	172,0	176,5
	<b>E</b>	235,7	234,2	211,4	220,6	217,5	230,1	227,6	<b>245,6</b>	241,1
	<b>F</b>	254,7	259,9	255,5	248,6	259,2	<b>276,6</b>	257,9	263,4	259,8
	<b>G</b>	164,1	175,2	147,0	172,8	178,9	158,0	163,8	<b>182,0</b>	160,0
	<b>H</b>	198,6	212,0	180,8	197,0	194,8	198,9	197,3	<b>209,2</b>	201,5
	<b>I</b>	224,0	229,6	229,3	232,4	225,9	<b>234,2</b>	225,9	221,8	218,6

Comme nous venons de le rapporter pour les extraits, nous observons que la concentration totale en composés phénoliques n'est pas proportionnelle à une augmentation de la masse de zestes pour les liqueurs élaborées à partir des macérations ayant un même degré d'alcool (**A,B,C / D,E,F / G,H,I**) et une corrélation négative est observée entre le taux d'alcool de la macération et la concentration en composés phénoliques dans les liqueurs. Cette diminution est imputable à deux phénomènes : - l'eau plus polaire que l'éthanol conduit à une meilleure extraction des constituants phénoliques ; - une dilution croissante des macérations (60°, 75° et 96°, respectivement) est nécessaire afin d'obtenir des liqueurs ayant même titre alcoolique (24°).

De nouveau, nous avons prêté une attention particulière aux macérations **B-S<sub>8</sub>** et **C-S<sub>4</sub>**. Le tableau 42 propose une comparaison de leurs profils chromatographiques sur la base de la composition phénolique. D'un point de vue qualitatif, les deux macérations sont similaires puisque nous y détectons les mêmes composés. En revanche, des différences quantitatives sont observées sans pour autant modifier la hiérarchie des composés majoritaires. L'acide quinique **3** présente les teneurs les élevées (211,1 et 266,8 mg/l, respectivement pour **B-S<sub>8</sub>** et **C-S<sub>4</sub>**), suivi par la rutine **14** (16,8 et 20,4 mg/l, respectivement) et dans une moindre mesure par la néohespéridine **12** (4,5 et 6,1 mg/l, respectivement), l'acide shikimique **2** (4,8 et 6,1 mg/l, respectivement), l'acide p-coumarique **5** (4,0 et 5,0 mg/l, respectivement) et l'hyperoside **9** (3,2 et 3,6 mg/l, respectivement).

Tableau 42 : Composition phénolique des macérations **B-S<sub>8</sub>** et **C-S<sub>4</sub>** (mg/l)

n°	Composés	TR (mn)	B-S <sub>8</sub>	C-S <sub>4</sub>
2	Ac. Shikimique	2,2	4,8	6,1
3	Ac. Quinique	2,4	211,1	266,8
4	Ac. Vanillique	3,3	1,6	2,0
5	Ac. p-Coumarique	6,7	4,0	5,0
6	Ac. Sinapique	7,2	0,8	0,7
7	Ac. Ferulique	7,4	0,6	0,6
8	Flavanomaréine	7,7	1,1	1,5
9	Hyperoside	8,3	3,2	3,6
10	Narirutine	8,4	tr	tr
11	Diosmine	8,5	0,4	0,3
12	Néohespéridine	8,5	4,5	6,1
14	Rutine	8,6	16,8	20,4
16	Robinétine triméthylether	8,7	0,3	0,4
22	Lutéoline	11,0	tr	tr
23	Sinensétine	11,0	tr	tr
25	Casticine	11,2	tr	tr
27	Nobilétine	11,3	tr	tr
29	Tangéretine	11,8	tr	tr
30	Retusine	12,4	tr	tr
	Acides phénoliques		6,9	8,3
	Dérivés acides phénoliques		215,9	272,9
	Flavones		tr	tr
	Flavones glycosylées		0,4	0,3
	Flavanones glycosylées		5,7	7,6
	Flavonols		0,3	0,4
	Flavonols glycosylés		20,0	24,0
	<b>Total</b>		<b>249,1</b>	<b>313,5</b>

Les n° des composés correspondent à ceux tableau 26 (ordre d'élution : temps de rétention (TR) croissant).

Les concentrations des composés dans l'extrait sont exprimées en mg/l.

tr : trace (<0,1 mg/l)

Les composés ont été identifiés à partir de la bibliothèque du laboratoire.

Comme précédemment, nous avons comparé les compositions chimiques des liqueurs commerciales et celles préparées à partir des extraits **B-S<sub>8</sub>** et **C-S<sub>4</sub>** (tableau 43). Les deux premières ont des profils chimiques similaires tant au niveau qualitatif que quantitatif et peuvent être considérées comme similaires. La liqueur **C-S<sub>4</sub>** exhibe, pour chaque mesure, des teneurs supérieures à **B-S<sub>8</sub>**. Enfin, nous notons que, quelle que soit la liqueur analysée, la teneur en composés phénoliques ne diminue pas au cours de la conservation et le profil chimique n'est pas modifié.

Tableau 43 : Compositions phénoliques de trois liqueurs de cédrat (mg/l)

n°	Composés	TR (mn)	J <sub>1</sub>			M <sub>3</sub>			M <sub>6</sub>			M <sub>12</sub>		
			C-S <sub>4</sub>	B-S <sub>8</sub>	Comm <sup>a</sup>	C-S <sub>4</sub>	B-S <sub>8</sub>	Comm <sup>a</sup>	C-S <sub>4</sub>	B-S <sub>8</sub>	Comm <sup>a</sup>	C-S <sub>4</sub>	B-S <sub>8</sub>	Comm <sup>a</sup>
2	Ac. Shikimique	2,2	2,2	1,5	1,6	2,4	1,7	1,5	2,0	1,8	1,6	2,1	2,0	1,6
3	Ac. Quinique	2,4	103,9	80,9	79,4	104,7	81,2	78,2	99,3	87,1	82,0	100,4	85,3	83,2
4	Ac. Vanillique	3,3	0,7	0,6	0,5	0,8	0,7	0,5	0,8	0,6	0,5	0,7	0,6	0,6
5	Ac. p-Coumarique	6,7	1,9	1,7	1,8	2,0	1,6	1,6	2,0	1,6	1,7	1,8	1,5	1,7
6	Ac. Sinapique	7,2	0,3	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2
7	Ac. Ferulique	7,4	0,4	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3
8	Flavanomaréine	7,7	0,5	0,4	0,5	0,6	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,4
9	Hyperoside	8,3	1,3	1,1	1,0	1,6	1,2	1,1	1,4	1,4	1,2	1,4	1,4	1,2
10	Narirutine	8,4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
11	Diosmine	8,5	0,1	tr	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	tr
12	Néohespéridine	8,5	1,9	1,8	1,9	2,3	1,8	1,9	2,1	2,0	1,8	2,5	2,0	1,8
14	Rutine	8,6	7,2	6,9	5,7	8,3	4,8	5,4	8,9	4,9	5,2	8,1	7,0	5,5
16	Robinétine triméthylether	8,7	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
22	Lutéoline	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
23	Sinensétine	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
25	Casticine	11,2	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Acides phénoliques		3,2	2,8	2,7	3,4	2,8	2,5	3,4	2,7	2,7	3,1	2,6	2,8
	Dérivés acides phénoliques		106,1	82,4	81,0	107,1	82,9	79,7	101,3	88,9	83,6	102,5	87,3	84,8
	Flavones		tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Flavones glycosylés		0,1	0,0	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0
	Flavanones glycosylés		2,4	2,2	2,4	2,8	2,2	2,4	2,7	2,5	2,2	3,0	2,5	2,2
	Flavonols		0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	Flavonols glycosylés		8,6	8,0	6,7	9,9	6,0	6,5	10,3	6,3	6,4	9,5	8,5	6,7
	<b>Total</b>		<b>120,5</b>	<b>95,6</b>	<b>93,0</b>	<b>123,6</b>	<b>94,1</b>	<b>91,3</b>	<b>117,9</b>	<b>100,6</b>	<b>95,1</b>	<b>118,2</b>	<b>101,1</b>	<b>96,6</b>

Les n° des composés correspondent à ceux tableau 26 (ordre d'éluion : temps de rétention (TR) croissant). Les concentrations des composés dans l'extrait sont exprimées en mg/l. <sup>a</sup> Comm : liqueurs commerciales. tr : trace (<0,1 mg/l). Les composés ont été identifiés à partir de la bibliothèque du laboratoire.

Pour terminer et ainsi que nous l'avons fait pour la liqueur de myrte, nous avons réalisé des tests sur les propriétés antioxydantes de 3 lots de liqueur commerciale. Aucune activité antioxydante n'a été détectée. Ce résultat n'est pas étonnant dans la mesure où la liqueur de cédrat a une teneur en composés phénoliques 20 fois inférieure à celle de la liqueur de myrte.

Pour conclure, nous pouvons dire que les conditions de la macération de type C se distinguent des autres en conduisant à des teneurs en composés volatils et phénoliques supérieures tout en conservant le même chimiotype. Les teneurs maximales sont obtenues

pour la liqueur issue de la macération **C-S<sub>4</sub>**. Le temps de macération est alors réduit de moitié par rapport à la pratique de l'industriel. Cependant, une telle macération (150g zeste/l) nécessite 50% de plus de matière première qu'une macération de type B (100g/l) ce qui induit une augmentation des coûts de productions. L'augmentation de 50% de zeste (matière première) entre les macérations **B** et **C** induit une augmentation de l'ordre de 40% en composés volatils et de 26% en composés phénoliques. En conséquence, il est à remarquer que les rendements d'extraction dans les conditions de la macération **B** sont plus élevés que ceux obtenus avec les conditions de la macération **C**, de l'ordre de 7% pour les composés volatils et d'environ 19% pour les composés phénoliques.

La question qui se pose est de savoir si cette augmentation des coûts se justifie pour l'industriel. La réponse est dans la définition de la qualité. L'augmentation de la concentration des composés extraits implique-t-elle une augmentation significative de l'attractivité pour le consommateur ? Seuls une analyse sensorielle et un panel de dégustateurs peuvent y répondre. Il est à noter que la macération **B-S<sub>6</sub>**, tout en utilisant la même quantité de zeste que **B-S<sub>8</sub>**, présente une augmentation de l'ordre de 4% en composés volatils et de l'ordre de 0,7% en composés phénoliques. *A minima*, le producteur pourra réduire le temps de macération de 2 semaines sans augmentation de coût.

Pour ce qui est du vieillissement des liqueurs, nous avons montré que celles-ci ne sont pas altérées au niveau de leurs composés volatils et phénoliques lors d'un stockage dans des conditions normales de température et de lumière.

Enfin d'une manière plus globale, l'ensemble des résultats obtenus sur le cédrat de Corse montrent une bonne héritabilité des composés volatils et phénoliques du fruit vers la liqueur. Le profil chimique du fruit se retrouve intégralement dans la macération puis dans la liqueur (au facteur de dilution près). Dans l'optique de la certification de l'origine botanique des produits, ce résultat constitue une avancée prometteuse.

## Conclusion

---

Ces travaux de thèse réalisés au Laboratoire de Chimie des Produits Naturels (CPN) s'inscrivent dans le cadre de la Qualité, de la caractérisation et de la valorisation des ressources naturelles végétales et des productions agroalimentaires qui en sont dérivées. Sur ce dernier point, le partenariat avec la société Mavela nous a permis de tisser des liens avec le milieu professionnel qui, nous l'espérons, devraient se prolonger au-delà du présent travail.

Dans la première partie du document, nous avons rappelé les diverses techniques d'extractions et d'analyses des composés volatils et phénoliques à la disposition de l'expérimentateur, puis, nous avons explicité les méthodologies d'analyses choisies pour mener nos études. Sur le plan fondamental, nos travaux ont conduit sinon à l'élaboration du moins à l'adaptation d'une méthodologie en CLHP-SM et à la construction d'une bibliothèque de spectres de masse permettant une identification et une quantification fiables et rapides des composés phénoliques en mélange. Ils ont également permis de répertorier les règles de fragmentation de ces constituants permettant d'envisager l'obtention d'informations sur les structures de molécules inconnues ou absentes de notre bibliothèque.

La deuxième partie est articulée autour de l'étude de deux plantes utilisées pour l'élaboration de produits agroalimentaires identitaires : le myrte commun (*Myrtus communis* L.) et le cédrat (*Citrus medica* L.). Sur le plan appliqué, nos études ont donc consisté à caractériser les compositions volatile et phénolique des baies du myrte et des zestes de cédrats ainsi que celles des spiritueux correspondants. Nous avons suivi les composés d'intérêts depuis les végétaux jusqu'aux produits transformés afin de mettre en évidence des marqueurs chimiques permettant de certifier l'origine botanique et/ou géographique des spiritueux.

L'étude de la variabilité intraspécifique de *Myrtus communis* L. a montré que pour 16 stations réparties sur l'ensemble de la Corse, l'huile essentielle de baies présente une composition chimique homogène (qualitativement et quantitativement) dominée par l' $\alpha$ -pinène et le 1,8-cinéole alors que les extraits présentent la myricétine, la myricétine-3-O-arabinoside, la myricétine-3-O-galactoside et l'épigallocatechine comme composés

majoritaires avec des variations de concentrations en fonction de l'origine géographique des échantillons. Nous avons également étudié la composition chimique de spiritueux commerciaux. Ainsi, nous avons pu dresser la première « carte d'identité » chimique des liqueurs et eaux-de-vie afin de contribuer à la définition d'une Qualité locale, d'une part et de permettre de les différencier de spiritueux produits hors de Corse, d'autre part. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans *Food Chemistry* en 2010<sup>1</sup>.

Pour ce qui est de *Citrus medica* L., nous avons caractérisé 24 variétés de cédratiers en confrontant les résultats des études génétiques basées sur des marqueurs cytoplasmiques avec ceux des analyses de la composition chimique des huiles essentielles de feuilles et de zestes. Ces études ont permis de constater que 13 variétés de cédratiers sont génétiquement proches et peuvent être considérées comme de « vrais » cédrats ou cédrats ancestraux. Les huiles essentielles de feuilles sont caractérisées par les chimiotypes limonène/néral/géranial ou limonène/nérol/géranol et celles de zestes par les couples limonène/ $\gamma$ -terpinène ou limonène/néral/géranial. Au niveau morphologique, les feuilles de ces variétés sont de forme obovale, de couleur vert pâle, ne possèdent pas de pétioles ailés et les fruits sont caractérisés par une adhérence forte entre l'albêdo et la pulpe.

Les « faux » cédrats (11 variétés) se distinguent morphologiquement par des feuilles de forme variée et de couleur vert foncé ainsi que par des fruits ayant une adhérence faible entre l'albêdo et la pulpe. Les huiles essentielles de feuilles ont des chimiotypes très divers dominés généralement par des composés présents à de faibles teneurs dans les « vrais » cultivars tels que le  $\beta$ -pinène, le sabinène, le linalol, le citronellal, le (*E*)- $\beta$ -ocimène, le p-cymène, le  $\gamma$ -terpinène ou encore le 1,8-cinéole. Deux chimiotypes ont été mis en évidence dans les zestes de ces variétés : limonène et limonène/ $\beta$ -pinène. Ces travaux ont été valorisés par deux publications, l'une dans *Chemistry and Biodiversity*<sup>2</sup> en 2010 et l'autre dans *Phytochemistry*<sup>3</sup> en 2012.

---

<sup>1</sup> Barboni T., Venturini N., Paolini J., Desjobert J.M., Chiaramonti N., Costa J., Characterisation of volatiles and polyphenols for quality assessment of alcoholic beverages prepared from Corsican *Myrtus communis* berries, *Food Chemistry*, 2010, **122**, 1304-1312.

<sup>2</sup> Venturini N., Curk F., Desjobert J.M., Karp D., Costa J., Paolini J., Chemotaxonomic investigations of peel and petitgrain essential oils from 17 citron cultivars, *Chemistry and Biodiversity*, 2010, **7**, 736-751.

<sup>3</sup> Luro F., Venturini N., Costantino G., Paolini J., Ollitrault P., Costa J., Genetic and chemical diversity of citron (*Citrus medica* L.) based on nuclear and cytoplasmic markers and leaf essential oil composition, *Phytochemistry*, 2012, **77**, 186-196.



La dernière partie traite de l'élaboration et de la conservation des liqueurs de cédrat de Corse (*Citrus medica* var. *corsican*). Elle débute par une caractérisation chimique au cours de la phase de maturation. L'analyse du zeste pendant le développement du fruit a permis de suivre l'évolution de la composition volatile (huile essentielle) et phénolique (extraction à l'éthanol). Les fruits récoltés au mois de juillet conduisent à une huile essentielle de composition différente de celles obtenues entre août et janvier (teneur en monoterpènes oxygénés plus élevée). Les composés phénoliques présentent des variations quantitatives plus prononcées au cours du processus de maturation des fruits ; notamment une très forte diminution de l'acide quinique. Il en découle que la période de récolte des fruits est importante puisqu'elle conditionnera les qualités organoleptiques de la liqueur.

Le suivi des compositions chimiques de neuf macérations réalisées à partir de trois concentrations différentes en zeste et de trois degrés alcooliques et des liqueurs correspondantes a permis de constater que :

- les profils chimiques des macérations et des liqueurs correspondantes sont tous semblables.
- ces profils restent stables pendant au moins toute une année de vieillissement des liqueurs en bouteille.
- la durée de macération de huit semaines appliquée par l'industriel peut être réduite à six semaines pour un gain quantitatif modéré en composés extraits sans augmentation de la quantité de zeste utilisée. Une augmentation plus conséquente en composés extraits peut être obtenue mais nécessite une augmentation de 50% de la quantité de zeste utilisée. L'intervention, à ce niveau, d'un panel de dégustateurs est à même de justifier ou non l'augmentation du coût de production afférente.

Enfin, en mettant en avant la bonne héritabilité des composés, nous avons montré que la composition chimique des liqueurs est étroitement liée à celle des fruits dont elle est issue.

## Partie expérimentale

---

I. Echantillonnage du matériel végétal.....	178
II. Hydrodistillation.....	179
III. Paramètre de la MEPS.....	179
IV. Appareillage.....	180
V. Extraction aux solvants.....	183
VI. Relevé des températures.....	183
VII. Etudes statistiques.....	184
VIII. Analyse des phénols totaux et des activités antioxydantes.....	184
IX. Analyses génétiques.....	186

### I. Echantillonnage du matériel végétal

#### *Myrtus communis* L.

- Etude de la variabilité géographique : récolte fin octobre 2008.

Canari **S1** (42° 50' 43" N ; 9° 19' 41" E), Bastia **S2** (42° 42' 2" N ; 9° 25' 52" E), Saint-Florent **S3** (42° 41' 37" N ; 9° 19' 45" E), Désert des Agriates **S4** (42° 39' 34" N ; 9° 11' 26" E), Lozari **S5** (42° 38' 1" N ; 9° 0' 23" E), Calvi **S6** (42° 30' 51" N ; 8° 47' 30" E), Corte **S7** (42° 16' 33" N ; 9° 13' 14" E), Peri **S8** (42° 1' 33" N ; 8° 53' 57" E), Ajaccio **S9** (41° 58' 37" N ; 8° 48' 57" E), Sartene **S10** (41° 38' 51" N ; 8° 56' 33" E), Bonifacio **S11** (41° 25' 53" N ; 9° 7' 35" E), Porto-Vecchio **S12** (41° 38' 7" N ; 9° 14' 2" E), Travo **S13** (41° 54' 51" N ; 9° 22' 21" E), Morta **S14** (42° 0' 7" N ; 9° 23' 18" E), Abbazzia **S15** (42° 0' 29" N ; 9° 22' 17" E), Aleria **S16** (42° 7' 33" N ; 9° 28' 41" E).

#### *Citrus medica* L.

- Etude de la variabilité des espèces de cédrat: récolte novembre 2009.

Station INRA de San Giuliano (42° 17' 9" N ; 9° 31' 13" E).

- Etude de la composition chimique durant la phase de maturation des fruits : récolte de juillet 2009 à janvier 2010.

Vescovato (42° 30' 57" N ; 9° 28' 13" E)

## II. Hydrodistillation

Les hydrodistillations ont été réalisées avec un appareil de type Clevenger (bouilleurs de 5 litres), pendant une durée de 5 h. Les huiles essentielles sont conservées dans des flacons de verre ambré à une température de 4°C. Les rendements sont calculés par rapport à la masse de végétal frais.

## III. Paramètres de la MEPS

### - Mise en œuvre de la MEPS

Le processus d'extraction se déroule en trois étapes. L'échantillon est placé dans un pilulier équipé ou non d'un barreau aimanté. Le flacon est bouché et serti. Après un temps d'équilibre déterminé, l'aiguille renfermant la fibre perce le septum. Par pression sur le piston, la fibre est exposée dans l'espace de tête pendant un temps d'extraction défini. Enfin, la fibre est rétractée dans l'aiguille, laquelle est retirée du flacon et ensuite introduite dans l'injecteur du chromatographe.

### - Protocole d'optimisation

Pour chacune des analyses, les paramètres suivants ont été fixés :

- (i) Fibre triple de marque Supelco™ (Bellefonte, PA, USA), recouverte de divinylbenzène / carboxen / polydiméthylsiloxane (DVB/CAR/PDMS).
- (ii) Température et temps de désorption dans l'injecteur de la CPG : 250°C ; 5 mn.

L'optimisation a été en combinant diverses valeurs des quatre paramètres ci-dessous :

- Quantité de broyat végétal : 0,7 g ; 1,5 g ; 3 g ou volume d'extrait : 2 ml ; 5 ml ; 10 ml
- Température d'équilibre et d'extraction : 20°C ; 50°C ; 70°C
- Temps d'équilibre : 30 mn ; 60 mn ; 120 mn
- Temps d'extraction : 15 mn ; 30 mn ; 60 mn ; 120 mn

Pour chaque matrice (baies, albédo, jus, macération et spiritueux) et pour chacune des quantités (ou volumes) indiquées, l'extraction a été réalisée à chacune des températures pendant chacune des quatre durées indiquées. Les conditions ont été considérées comme étant

les meilleures lorsque le signal réponse en CPG-DIF est le plus intense sans qu'il y ait saturation et que l'on obtient le plus grand nombre de pics sur le chromatogramme.

Enfin, compte tenu des valeurs déterminées ci-dessus, un essai a été conduit pour chacun des temps d'équilibre indiqués. Comme précédemment, sur la base de la qualité du signal réponse, nous avons ainsi déduit les conditions optimales d'analyse. De plus tous les essais ont été réalisés en triple exemplaires.

Le tableau E1 reprend les conditions optimales ainsi déterminées.

Matrice	Quantité	Température d'équilibre et d'extraction	Temps d'équilibre / Temps d'extraction
<i>Myrtus communis</i> L.			
Baies	0,7 g	50°C	120 mn / 60 mn
Liqueur	10 ml	20°C	120 mn / 60 mn
Eau de vie	10 ml	20°C	120 mn / 60 mn
<i>Citrus medica</i> L.			
Albédo	3 g	70°C	120 mn / 60 mn
Jus	10 ml	50°C	120 mn / 60 mn
Macération	10 ml	20°C	120 mn / 30 mn
Liqueur	10 ml	20°C	120 mn / 30 mn

Tableau E1 : Conditions optimales d'analyses des composés volatils de *Myrtus communis* L. et de *Citrus medica* L.

#### IV. Appareillage

##### - Analyses par CPG-DIF

Les analyses par chromatographie en phase gazeuse ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe *Perkin Elmer Clarus 600*, équipé de deux colonnes capillaires Rtx-1 (polydiméthyl-siloxane, 60 m x 0,22 mm d.i) et Rtx-WAX (polyéthylène glycol, 60 m x 0,22 mm d.i) couplées chacune à un détecteur à ionisation de flamme.

Le gaz vecteur utilisé est l'hélium, la pression en tête de colonne est de 20 psi avec un débit d'1 ml/mn, la température de l'injecteur et des détecteurs est de 250°C. La programmation de la température consiste en une élévation de 60 à 230°C à 2°C/mn puis en un palier de 30 mn à 230°C. L'injection se fait en mode split 1/80. La quantité d'huile essentielle injectée est de 0,2 µl.

Pour chacun des composés, les indices de rétention polaires et apolaires sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme d'étalon d'alcane.

Pour ce qui est des fractions volatiles captées par MEPS, les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe *Perkin Elmer Autosystem XL* équipé de la colonne capillaire Rtx-1 et disposant des mêmes spécifications techniques que le *Perkin Elmer Clarus 600* décrit supra et dans les mêmes conditions opératoires. Les composés volatils ont été désorbés durant 5 mn en mode splitless avec un liner SPME Intel (0,75 mm Id : Supelco).

#### - **Analyses par CPG/SM**

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe *Perkin Elmer Autosystem XL*, doté d'un injecteur automatique et de deux colonnes (60 m x 0,22 mm d.i. ; épaisseur du film : 0,25  $\mu\text{m}$ ) polaire (Rtx-Wax) et apolaire (Rtx-1), couplé à un détecteur de masse *Perkin Elmer TurboMass*.

Le gaz vecteur utilisé est l'hélium (1 ml/mn) avec une pression en tête de colonne de 25 psi. La température de l'injecteur est de 250°C. La programmation de la température consiste en une élévation de 60 à 230°C, à 2°C/mn, puis en un palier de 30 mn à 230°C. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/80. La quantité d'huile essentielle injectée est de 0,2  $\mu\text{l}$ . Les molécules sont bombardées par un faisceau électronique de 70 eV, la détection se fait par un analyseur quadripolaire constitué d'un assemblage de quatre électrodes parallèles de section cylindrique. La température de la source est de 150°C. Les spectres de masse obtenus par impact électronique ont été acquis sur la gamme de masse 35-350 Da.

Pour ce qui est des fractions volatiles extraites par MEPS, les analyses ont été réalisées avec le même appareil et les mêmes paramètres.

#### - **Analyses par CLHP/DAD**

Les analyses ont été menées à l'aide d'un chromatographe *Perkin Elmer 200 series system* constitué d'une pompe binaire (*LC 200*), d'un injecteur (boucle d'injection 20 $\mu\text{l}$ ), d'un dégazeur (*series 200*), d'une colonne *Nucleosil 100-5* (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 $\mu\text{m}$ ) C18 en phase inverse (Machery-Nagel, Hoerdt, France) et d'un détecteur à barrettes d'iode (*DAD LC 200*). Les solvants sont : eau avec 0,1% d'acide acétique (solvant A) et l'acétonitrile (solvant B). Le gradient d'élution débute à 90% A et 10% B, puis passage à 80/20 en 15 minutes, puis passage à 60/40 en 10 minutes, puis passage à 40/60 en 10 minutes, puis passage à 30/70 en

10 minutes, puis pallier à 0/100 pendant 10 minutes (figure F1). Le débit est de 1 ml/mn. La détection des composés s'effectue à deux longueurs d'ondes : 280 nm et 350 nm.

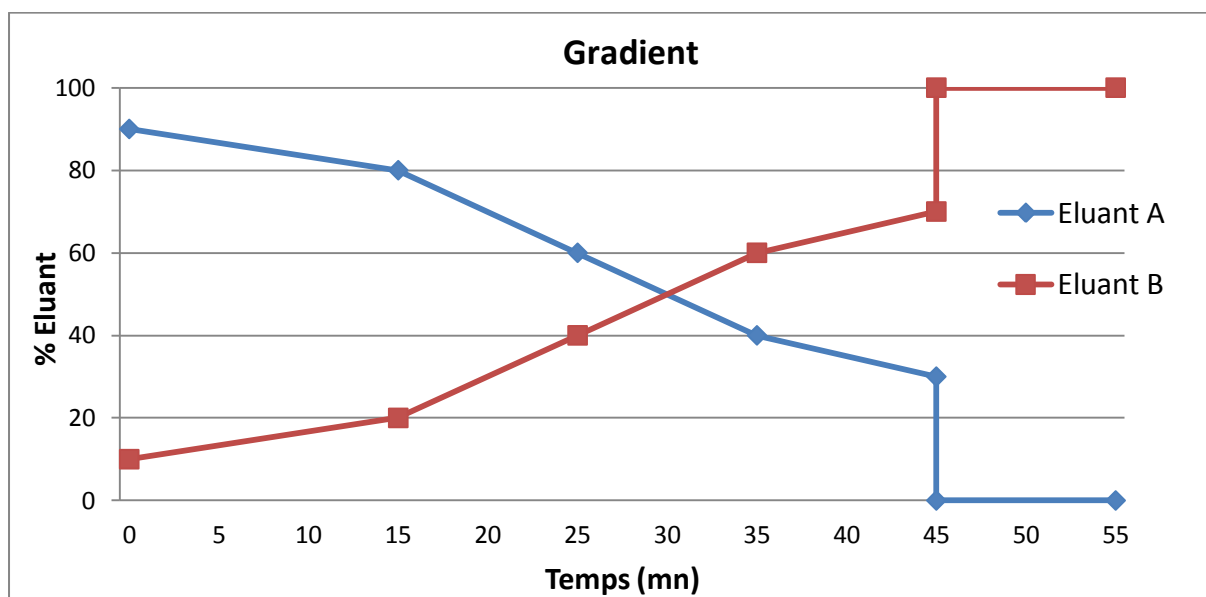


Figure F1 : Illustration du gradient de solvant utilisé en CLHP/DAD.

Eluant A : Eau (0,1% Acide acétique) et éluant B : Acétonitrile

#### - Analyses par CLHP/SM

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un système chromatographique *Perkin Elmer Flexar FX UHPLC Pump* doté d'un passeur automatique (boucle d'injection 10  $\mu$ l), de deux pompes, d'un dégazeur, d'une colonne *Kinetex XB-C18* (150 mm x 2,1 mm d.i, 2,6  $\mu$ m) C18 en phase inverse. La colonne est disposée dans un four et chauffée à 40°C. Le débit est de 250  $\mu$ l/mn. Le gradient de solvant débute à 90/10 (eau/acétonitrile) pendant 2 mn, puis passage de 90/10 à 0/100 en 10 mn, enfin palier de 5 mn à 0/100 (Figure F2).

La CLHP est couplée à un détecteur de masse *AB Sciex 3200 Qtrap* équipé d'une source de type electrospray (ESI) utilisée en mode négatif et positif. Le gaz d'ionisation est l'azote. La tension appliquée dans la source est -4500V en mode négatif et de +5500V en mode positif.

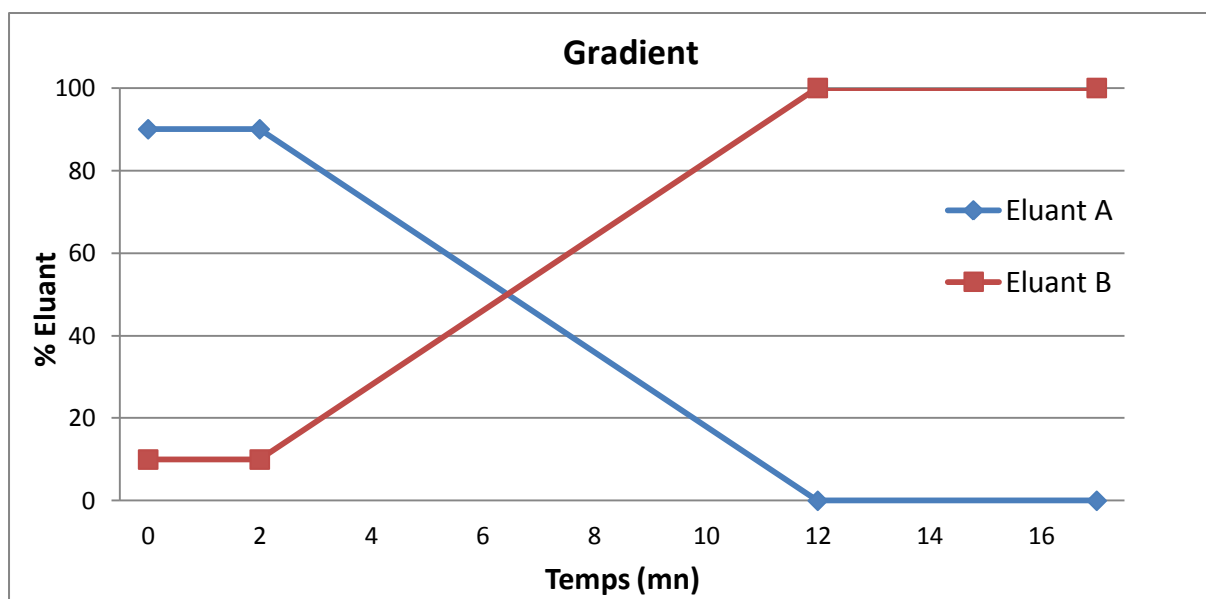


Figure F2 : Illustration du gradient de solvant utilisé en CLHP/SM.  
 Eluant A : Eau (0,1% Acide acétique) et éluant B : Acétonitrile

## V. Extraction au solvant

### - Etude sur la variabilité des baies de myrte

L'extraction des composés phénoliques des baies a été réalisée par macération à froid dans un mélange méthanol/eau (60/40) pendant 48 heures. Pour chacune des stations nous avons réalisé l'extraction de 600 g de baies fraîches dans 1 litre de solvant.

### - Etude sur la diversité variétale des cédrats

L'extraction des composés phénoliques des zestes et des albédos a été réalisée par macération à froid dans du méthanol pendant 24 heures. Pour toutes les variétés, les macérations étaient composées de 20 g de matière végétale (zeste ou albédo) et de 200 ml de solvant.

## VI. Relevé des températures

Les températures ont été relevées à l'aide d'appareils *Tinytag Plus 2* (Hydreka, France).

## VII. Etudes statistiques

Les études statistiques ont été menées avec XLSTAT Version 2009.4.06. Les ACP ont été réalisées avec des matrices de type Pearson. Les CAH et dendrogrammes ont été réalisés avec des matrices de dissimilarités calculées en distance euclidienne et la méthode d'agrégation choisie systématiquement est le lien moyen. Les composés dont le pourcentage relatif était au moins égal à 2 % dans l'un des échantillons étudiés ont été inclus dans les matrices de CAH et ACP.

## VIII. Analyses des phénols totaux et de l'activité antioxydante

### - Test de Folin-Ciocalteu

Placer 30  $\mu$ L d'échantillon à tester ou de solvant (blanc) dans les puits, puis ajouter 150  $\mu$ l de solution de FCR (Folin-Ciocalteu's phenol reagent ; Fluka 2N) diluée 10 fois. Ajouter au goutte à goutte pendant 8 mn 120  $\mu$ l de solution de carbonate de sodium à 7,5 %. La microplaque est mise à incuber dans le lecteur de microplaque pendant une heure à 30°C avant de faire une lecture d'absorbance à 765 nm (Biotek Powerwave XS). Une courbe de référence de l'absorbance en fonction de la masse d'acide gallique par litre de solution est réalisée. Les résultats pour l'échantillon étudié sont exprimés en milligramme d'acide gallique équivalent par litre de solution.

### - Test DPPH

280  $\mu$ l de solution de DPPH à 0,004 % (4 mg/100 ml de méthanol) sont déposés dans chaque puits d'une microplaque de 96 puits. On ajoute ensuite 20  $\mu$ l de solution à tester. Le mélange est laissé à incuber pendant 1 heure à 30°C. L'absorbance est ensuite mesurée à 515 nm. L'activité antioxydante est exprimée en fonction du Trolox (antioxydant de référence) par construction d'une courbe de réponse en concentration.

### - Test ABTS

Le radical cationique  $ABTS^{+\bullet}$  est généré par l'oxydation de l'ABTS par le persulfate de potassium. Une solution d'ABTS dissout dans de l'eau déionisée à une concentration de 7



mM est ajoutée à une solution de persulfate de potassium dissout dans de l'eau pure à une concentration de 2,45 mM. Le mélange réactionnel est maintenu dans l'obscurité à température ambiante pendant 12 à 16 h. L'ABTS n'est pas totalement oxydé par le persulfate de potassium, car d'après les coefficients stœchiométriques une mole de persulfate réagit avec 2 moles d'ABTS. L'absorbance n'est maximale et stable qu'après 6 heures de réaction et le radical cationique est stable pendant 2 jours à température ambiante et dans l'obscurité. La solution d'ABTS<sup>•+</sup> obtenue est diluée dans du méthanol de manière à ce que l'absorbance du mélange soit de  $0,70 \pm 0,02$  à 734 nm. 20 µl de solution à tester sont pipetés dans chaque puits, puis on ajoute 280 µl d'ABTS<sup>•+</sup>. L'absorbance est mesurée à 734 nm après 5 mn d'incubation à 30°C. L'activité antioxydante est exprimée en fonction du Trolox par construction d'une courbe de réponse en concentration.

#### - **Test FRAP**

##### *Préparation du réactif FRAP*

Une solution tampon (3,1 g d'acétate de sodium trihydraté et 16 ml d'acide acétique sont dilués dans un litre d'eau purifiée), une solution à 10 mM de TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine ; Fluka, 99%) dans 40 mM d'acide chlorhydrique, et une solution à 20 mM de fer III (FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O) sont mélangées selon les ratios respectifs 10 : 1 : 1. Cette solution de réactif FRAP est mise à incuber à 37°C avant usage.

##### *Préparation des solutions de référence*

Une gamme de solution de Fe(II) à différentes concentrations entre 100 et 1000 µM, ainsi qu'une gamme de solution de Trolox à différentes concentrations entre 25 et 800 µM sont préparées.

##### *Remplissage de la microplaque*

10 µl de solution à tester ou de solvant sont déposés dans chaque puits, puis on y ajoute un volume de 290 µl de solution FRAP préchauffée à 37°C. Le mélange réactionnel est incubé à 37°C dans le lecteur de microplaque pendant 4 mn. La lecture de l'absorbance se fait à 593 nm. L'activité antioxydante de l'échantillon est exprimée en fonction d'une solution connue de Fe(II) ou de Trolox (solutions de références), c'est-à-dire en µmol de Fe(II) ou en µmol de Trolox équivalent par gramme d'échantillon.

## **IX. Analyses génétiques**

### **- Protocole d'extraction-purification de l'ADN**

Le choix des marqueurs est effectué à partir d'ADN pur issu de feuilles provenant d'arbres mères en champ. L'ADN est extrait à partir de feuilles âgées de moins de 3 mois pour limiter la présence de tanins et de tissus lignifiés et d'en faciliter le broyage.

Chaque échantillon de feuille (environ 1 g) est broyé en présence d'azote liquide dans un mortier. Avant que le broyat ne soit décongelé, la poudre est homogénéisée dans un tampon préchauffé à 65°C (CTAB 2%, NaCl 1,4M, PVP 1%, EDTA 20 mM, Tris-HCl 0,1M pH 8). Le mélange est incubé pendant 15 mn à 65°C puis mis à refroidir à température ambiante. Les protéines sont précipitées en ajoutant un volume égal de chloroforme-alcool isoamylique (24:1). La solution est ensuite agitée manuellement pendant 5 mn puis centrifugée pendant 4 mn à 13000 rpm (rotations par minute). Le surnageant est récupéré et l'ADN est précipité en ajoutant 0,7 volume d'isopropanol. Le mélange est centrifugé pendant 2 mn à 5000 rpm.

Le culot est récupéré et l'ADN est resolubilisé dans 0,6 ml de tampon TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM, pH 8) et mis à incuber pendant 2 heures à 37°C. On ajoute ensuite un volume égal de chloroforme-alcool isoamylique (24:1). Le mélange est centrifugé pendant 4 mn à 13000 rpm. Le surnageant contenant l'ADN est récupéré. L'ADN est alors précipité dans 50 µl de NaCl 5M et 2 volumes d'éthanol absolu. Le mélange est centrifugé pendant 2 mn à 5000 rpm. Le culot contenant l'ADN est ensuite repris dans un volume d'éthanol 70° et centrifugé pendant 2 mn à 5000 rpm. Le culot contenant l'ADN est ensuite séché puis solubilisé dans 100 µl d'eau stérile.

### **- Choix des marqueurs microsatellites**

Avant de passer au crible les différents échantillons, nous avons tenu pour chaque espèce à déterminer les marqueurs microsatellites qui rendaient compte du plus grand polymorphisme, cela afin de bien distinguer les individus nucellaires identiques au plant mère des individus zygotiques. Les marqueurs que nous avons sélectionnés sont résumés dans le tableau E2.

Tableau E2: Caractéristiques des marqueurs cpSSR utilisés pour l'étude génétique des cédrats

Locus	PIC	Nb <sup>a</sup> Hétéroz	Nb <sup>b</sup> allèle	Variation allélique	Sequence Forward (5' -> 3')	Sequence reverse (5' -> 3')	Tm
Ci02A09	0.62	4	6	158-168	ACAGAAGGTAGTATTTAGGG	TTGTTTGGATGGGAAG	50
Ci07F11	0.81	14	6	154-196	ACTATGATTACTTTGCTTTGAG	GAAGAAACAAGAAAAAAT	50
Ci01C06	0.74	16	10	150-194	GGACCACAACAAAGACAG	TGGAGACACAAAGAAGAA	50
Ci03C08	0.69	13	7	220-262	CAGAGACAGCCAAGAGA	GCTTCTTACATTCCTCAAA	55
Ci06B07	0.65	16	6	118-130	CGGAACAATAAAACAAT	TGGGCTGTAGACAGTTA	50
C107E12	0.44	11	6	126-166	TGTAGTCAAAGCATCAC	TCTATGATTCCTGACTTTA	50
C107D05	0.67	7	5	204-216	TCGTTCTTGCTTTTCCAC	GAATCAAACCTACCCTCCAAT	55
Ci07E05	0.34	11	3	144-148	GGAGAACAACACAATG	ATCTTTCGGACAATCTT	50
C101F04a	0.42	12	6	180-212	AAGCATTTAGGGAGGGTCACT	TGCTGCTGCTGTTGTTGTTCT	55
Ci01H05	0.66	13	6	100-136	AAAACAACCAAAAGACAAGATT	TTCAAACAAACAACCAACTCG	55
Ci02D11	0.57	14	5	192-216	GAGTTGACCGAGAAGATT	TGAGTTTCAGTAAGTGTATGAG	55
Ci02G02	0.60	6	7	130-158	CAATAAGAAAACGCAGG	TGGTAGAGAAAACAGAGGTG	55
mest1	0.68	11	5	187-211	CAAGCCTCTCTTTAGTCCCA	AGTCTTTGGTGCTTCAGGC	55
mest2	0.65	15	4	229-238	ACCTTCAGCATCAACCTGCT	TTTGGTTTGTCTTGGAGCC	55
mest66	0.67	3	6	252-272	AAATCATGAGGGCAAGCCTA	GCCTTAGCTTCATCACCAGC	55
mest101	0.65	14	6	234-239	TTTGCCAACTCCCAAATCTC	AAGGGGCTGTTTCTCTCTCTG	55
mest542	0.54	5	3	263-267	CGTTTTGCGATTTCTCGTTT	ACCACCTCCGACACACTAGG	55
mest543	0.41	9	3	258-264	CCTCCTAAAGTGAGCCCTCC	AGCCCACAAGAAAAGCAA	55
mest830	0.62	16	6	214-246	TTCATGGCAGCTTGAGTTTC	TTGGTTTCTTTGGGGATCA	55
mest1118	0.68	14	7	157-179	CAACAAGTGGGAAGGGAGAC	GACGTTTTCCGACTTCAAA	55
mest940	0.75	15	10	152-210	GAGTCGCAGGACGAAAATCT	GTGGATTGATTCGGTGATCC	55
mest998	0.79	7	7	112-126	AAATAGAGAAAAGAAAGGGG	GTGAGAGTAGCGGAACAA	55
ntcp9	0.63	0	5	264-276	CTTCCAAGCTAACGATGC	CTGTCCTATCCATTAAGACAATG	55
ccmp5	0.79	0	4	86-100	TGTTCCAATATCTTCTTGTCATTT	AGGTTCCATCGGAACAATTAT	55
ccmp6	0.59	0	5	124-128	CGATGCATATGTAGAAAGCC	CATTACGTGCGACTATCTCC	55
nad2 4/3	0.56	0	3	240-260	GACCTTCACCTCAAATCA	TTCAGATAACACGCACC	55
rrn5/18	0.08	0	2	225-230	GAGGTCGGAATGGGATCGGG	GGGTGAAGTCGTAACAAGGT	55
nad7 1/2	0.08	0	2	120-130	TTTGATATAGGCTCGCT	GGAACATAGCATAGGG	55

<sup>a</sup> Nombre de cédrats hétérozygotes

<sup>b</sup> Nombres d'allèles détectés au sein des 24 variétés de cédrats

#### - Amplification des microsatellites

A partir de 10 ng d'ADN de chaque variété, la réaction PCR s'effectue dans un volume réactionnel de 15 µl de composition suivante : le tampon 1X (Eurogentec) ; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> ; 0,2 mM de dNTP ; 0,2 µM de chacune des amorces ; 0,75 U de *Taq* polymérase (Eurogentec). Les solutions réactionnelles sont recouvertes d'huile de paraffine et l'amplification est réalisée dans un thermocycleur (PTC 200, MJ Research). Le programme est le suivant : 5 mn 94°C, puis 40 cycles de (30 s à 94°C, 30 s à 50 ou 55°C selon les couples d'amorces, 30 s à 72°C).

### - **Vérification de l'amplification**

Afin de vérifier du bon déroulement de la PCR, nous réalisons un gel d'agarose à 2% dans lequel on dépose 8 µl du mélange réactionnel de la PCR avec 2 µl de tampon de charge dilué au 1/5<sup>ème</sup> (15% ficoll type 400, 0,25% xylène cyanol, 0,25% bleu de bromophénol). La migration dure 25 mn à 150 V. Le tampon de migration est du TBE 0,5 X (Tris Borate/EDTA electrophoresis buffer 5X: 54 g tris base 27,5 g, acide borique 20 ml, EDTA à 0,5M (pH 8.0), qsp 1 l eau distillée). Le gel est ensuite plongé durant 10 mn dans du BET (bromure d'éthidium 10 µg.ml<sup>-1</sup>). La révélation se fait sous Ultra-Violet (UV).

### - **Migration sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante**

La composition du gel à 8% en condition dénaturante est : urée 7 M, acrylamide 19:1 à 8%, TBE 0,5 X, qsp eau. La solution est filtrée et dégazée.

Aux amplifiats, on ajoute 50 µl (1 volume égal à celui de la solution PCR) de tampon de charge dénaturant (formamide 98%, xylène cyanol 0,25%, bleu de bromophénol 0,25%, 200 µl EDTA 0,5 M, pH 8). Les échantillons sont dénaturés pendant 3 mn à 94°C puis placés dans la glace à 4°C en attendant d'être déposés.

Après une pré-migration de 30 mn à 270 V dans une enceinte à 55°C maintenue à température grâce à un circuit fermé d'eau chaude, on dépose 25 µl d'échantillon par puit (un échantillon pour un puit). La migration dure 3 h 30 mn dans les mêmes conditions que la pré-migration. Le tampon utilisé est du TBE 0,5 X.

### - **Révélation au nitrate d'argent**

Les gels sont colorés selon le protocole de l'Institut de Recherche Agronomique de Valence (IVIA), Espagne:

- Fixation du gel dans un bain d'alcool à 10% pendant 20 mn
- Placer ensuite le gel dans un bain d'acide nitrique à 1% pendant 5 mn
- Faire 2 lavages de 5 mn chacun à l'eau ultra pure
- Plonger le gel dans une solution de coloration au nitrate d'argent à 0,2% pendant 20 mn. La solution est réutilisable 4 fois de suite
- Laver rapidement avec de l'eau ultra pure
- Pour la révélation du gel: ajouter 1/2 litre de révélateur (carbonate de sodium à 3%; ajouter le formaldéhyde à 600 µl.l<sup>-1</sup> juste avant l'utilisation du révélateur) et attendre que le gel s'obscurcisse. Le jeter et ajouter le reste de révélateur (1/2 litre) et laisser apparaître les bandes d'ADN marqué correspondant aux régions amplifiées du génome

- Arrêter la révélation en trempant le gel pendant 30 secondes dans un bain d'acide acétique à 10%
- Faire 3 lavages avec de l'eau ultra pure

## Références

---

5<sup>th</sup> Edition solid phase microextraction application guide, éd. Sigma-Aldrich, 2006, 135 pages.

Abad-Garcia B., Garmon-Lobato S., Berrueta L.A., Gallo B., Vicente F., A fragmentation study of dihydroquercetin using triple quadrupole mass spectrometry and its application for identification of dihydroflavonols in *Citrus* juices, *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 2009, **23**, 2785-2792.

Aberth W., Burlingame A.L., Comparison of three geometries for a cesium primary beam liquid secondary ion mass spectrometry source, *Analytical Chemistry*, 1984, **56**, 2915-2918.

Ablajan K., Abliz Z., Shang X.Y., He J.M., Zhang R.P., Shi J.G., Structural characterization of flavonol 3,7-di-O-glycosides and determination of the glycosylation position by using negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 2006, **41**, 352-360.

Adams R.P., Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. 4<sup>ème</sup> éd. Carol Stream, Illinois : Allured Publishing Corporation, 1995, 804 pages.

Agócs A., Nagy V., Szabó Z., Márk L., Ohmacht R., Deli J., Comparative study on the carotenoid composition of the peel and the pulp of different citrus species, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2007, **8**, 390-394.

Al J., Headspace solid phase microextraction for quantitative analysis in nonequilibrium situation, *Analytical Chemistry*, 1997, **69**, 1230-1236.

Andrews A.C., Acclimatization of citrus fruits in the Mediterranean region, *Agricultural History*, 1961, **35**, 35-46.

Apostolopoulou A.A., Flouros A.I., Demertzis P.G., Akrida-Demertzi K., Differences in concentration of principal volatile constituents in traditional Greek distillates, *Food Control*, 2005, **16**, 157-164.

*Aburi, arbre, arbigliule - Savoirs populaires sur les plantes de Corse*. Edité par le Parc Naturel Régional de la Corse, Ajaccio, 1993, 304 pages.

Arpino P.J., L'ionisation chimique une façon de modéliser les réactions de chimie organique dans un spectromètre de masse, *L'actualité chimique*, 1982, **4**, 19-28.

Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Witier P., Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. 4<sup>ème</sup> éd. Paris : Masson, 1995, 700 pages.

Arthur C.L., Pawliszyn J., Solid phase microextraction with thermal desorption using fused-silica optical fibers, *Analytical Chemistry*, 1990, **62**, 2145-2148.

Augusto F., Valente A.L.P., Tada E.D.S., Rivellino S.R., Screening of Brazilian fruit aromas using solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2000, **873**, 117-127.

Augusto F., Valente A.L.P. Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples, *Trends in Analytical Chemistry*, 2002, **21**, 428-438.

Augusto F., Leite e Lopes A., Zini C.A., Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances, *Trends in Analytical Chemistry*, 2003, **22**, 160-169.

Baldi A., Rosen R.T., Fukuda E.K., Ho C.T., Identification of non-volatile components in lemon peel by high performance liquid chromatography with confirmation by mass spectrometry and diode-array detection, *Journal of Chromatography A*, 1995, **718**, 89-97.

Barber M., Bordoli R.S., Sedgwick R.D., Tyler A.N., Bycroft B.W., Fast atom bombardment mass spectrometry of bleomycin A2 and B2 and their metal complexes, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1981, **101**, 632-638. (a)

Barber, M., Bordoli, R.S., Sedgwick, R.D., Tyler, A.N., Fast atom bombardment of solids as an ion source in mass spectrometry, *Nature*, 1981, **293**, 270-275. (b)

Barboni T., Luro F., Chiaramonti N., Desjobert J.M., Muselli A., Costa J., Volatile composition of hybrids *Citrus* juices by headspace solid-phase micro extraction/gas chromatography/mass spectrometry, *Food Chemistry*, 2009, **116**, 382-390.

Barboni T., Venturini N., Paolini J., Desjobert J.M., Chiaramonti N., Costa J., Characterisation of volatiles and polyphenols for quality assessment of alcoholic beverages prepared from Corsican *Myrtus communis* berries, *Food Chemistry*, 2010, **122**, 1304-1312.

Barkley N.A., Roose M.L., Krueger R.R., Federici C.T., Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collecting utilizing simple sequence repeat markers (SSRs), *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, **112**, 1519-1531.

Benavides A., Montoro P., Bassarello C., Piacente S., Pizza C., Catechin derivatives in *Jatropha macrantha* stems: Characterisation and LC/ESI/MS/MS quail-quantitative analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, **40**, 639-647.

Belajovà E., Suhaj M., Determination of phenolic constituents in *citrus* juices: Method of high performance liquid chromatography, *Food Chemistry*, 2004, **86**, 339-343.

Berahia T., Gaydou E.M., Cerrati C., Wallet J.C., Mass spectrometry of polymethoxylated flavones, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, **42**, 1697-1700.

Bertoli A., Pistelli L., Morelli I., Fraternali D., Giamperi L., Ricci D., Volatile constituents of different parts (roots, stems and leaves) of *Smyrniololus satrum* L., *Flavour and Fragrance Journal*, 2004, **19**, 522-525.

Bertoli A., Pistelli L., Morelli I., Fraternali D., Giamperi L., Ricci D., Volatile constituents of micropropagated plants of *Bupleurum fruticosum* L., *Plant Science*, 2004, **167**, 807-810.

Besharati-Seidani A., Jabbari A., Yamini Y., Saharkhiz M.J., Rapid extraction and analysis of volatile organic compounds of Iranian feverfew (*Tanacetum parthenium*) using headspace solvent microextraction (HSME), and gas chromatography/mass spectrometry, *Flavour and Fragrance Journal*, 2006, **21**, 502-509.

Beyer A., Biziuk M., Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food, *Food Chemistry*, 2008, **108**, 669-680.

Bianchi F., Careri M., Musci M., Volatile norisoprenoids as markers of botanical origin of Sardinian strawberry-tree (*Arbutus unedo* L.) honey: Characterisation of aroma compounds by dynamic headspace extraction and gas chromatography–mass spectrometry, *Food Chemistry*, 2005, **89**, 527-532.

Bicchi C., Frattini C., Raverdino V., Considerations and remarks on the analysis of *Anthemis nobilis* L. essential oil by capillary gas chromatography and “hyphenated” techniques, *Journal of Chromatography A*, 1987, **411**, 237-249.

Bicchi C., Cordero C., Iori C., Rubiolo P., Sandra P., Headspace sorptive extraction (HSSE) in the headspace analysis of aromatic and medicinal plants, *Journal of High Resolution Chromatography*, 2000, **23**, 539-546. (a)

Bicchi C., Drigo S., Rubiolo P., Influence of fibre coating in headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants, *Journal of Chromatography A*, 2000, **892**, 469-485. (b)

Bicchi C., Cordero C., Liberto E., Rubiolo P., Sgorbini B. Automated headspace solid-phase dynamic extraction to analyse the volatile fraction of food matrix, *Journal of Chromatography A*, 2004, **1024**, 217-226.



Bicchi C., Cordero C., Liberto E., Rubiolo P., Sgorbini B., David F., Sandra P. Dual-phase twisters: A new approach to headspace sorptive extraction and stir bar sorptive extraction, *Journal of Chromatography A*, 2005, **1094**, 9-16.

Bicchi C., Cordero C., Liberto E., Rubiolo P., Sgorbini B., Sandra P. Sorptive tape extraction in the analysis of the volatile fraction emitted from biological solid matrices, *Journal of Chromatography A*, 2007, **1148**, 137-144.

Bicchi C., Cordero C., Liberto E., Sgorbini B., Rubiolo P., Headspace sampling of the volatile fraction of vegetable matrices, *Journal of Chromatography A*, 2008, **1184**, 220-233. (a)

Bicchi C., Liberto E., Sgorbini B., Mondello L., Acampora Zellner B., Costa R., Quantitative analysis of essential oils: complex task, *Flavour and Fragrance Journal*, 2008, **23**, 382-391. (b)

Bimakr M., Rahman R.A., Taip F.S., Ganjloo A., Salleh L.M., Selamat J., Hamid A., Zaidul I.S.M., Comparison of different extraction method of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves, *Food and Bioproducts Processing*, 2011, **89**, 67-72.

Bird S.R., African aromatherapy: past, present and future applications, *The International Journal of Aromatherapy*, 2003, **13**, 185-195.

Blakley C.R., Vestal M.L., Thermospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 1983, **55**, 750-754.

Blanch G., Reglero G., Herraiz M., Tabera J., A comparison of different extraction methods for the volatile components of grape juice, *Journal of Chromatographic Science*, 1991, **29**, 11-15.

Boelens M.H., Jimenes R., The chemical composition of Spanish Myrtle oils, Part I, *Journal of Essential Oil Research*, 1991, **3**, 173-177.

Boelens M.H., Jimenes R., The chemical composition of Spanish Myrtle oils, Part II, *Journal of Essential Oil Research*, 1992, **4**, 359-353.

Bosch-Fusté J., Riu-Aumatell M., Guadayol J.M., Caixach J., López-Tamames E., Buxaderas S., Volatile profiles of sparkling wines obtained by three extraction methods and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis, *Food Chemistry*, 2007, **105**, 428-435.

Bousbia N., Vian M.A., Ferhat M.A., Petitcolas E., Meklati B.Y., Chemat F., Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity, *Food Chemistry*, 2009, **114**, 355-362.

Bouseta A., Collin S., Optimized Likens-Nickerson methodology for quantifying honey flavors, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, **43**, 1890-1897.

Bradesi P., Tomi F., Casanova J., Costa J., Bernardini A.F., Chemical composition of myrtle leaf essential oil from Corsica, *Journal of Essential Oil Research*, 1997, **9**, 283-288.

Bruins A.P., Gas Chromatography-Mass Spectrometry of essential oils. Part II. Positive ion and negative ion chemical ionization techniques. *Capillary Gas Chromatography in Essential Oils Analysis*. Ed Bicchi C, Sandra P. Heidelberg : Hüthig Verlag, 1987, p. 329-356.

Buldini P.L., Ricci L., Sharma J.L., Recent applications of sample preparation techniques in food analysis, *Journal of Chromatography A*, 2002, **975**, 47-70.

Burger B.V., Le Roux M., Munro Z.M., Wilken M.E., Production and use of capillary traps for headspace gas chromatography of airborne volatile organic compounds, *Journal of Chromatography A*, 1991, **552**, 137-151.

Burgot G., Pellerin F., Microextraction en phase solide (SPME), Les techniques de l'ingénieur, 2003, P1430, p. 1-20.

Caccamese S., Chillemi R., Racemization at C-2 of naringin in pummelo (*Citrus grandis*) with increasing maturity determined by chiral high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 2010, **1217**, 1089-1093.

Calabro M.L., Galtieri V., Cutroneo P., Tommasini S., Ficarra P., Ficarra R., Study of the extraction procedure by experimental design and validation of a LC method for determination of flavonoids in *Citrus bergamia* juice, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004, **35**, 349-363.

Calle Garcia D., Reichenbacher M., Danzer K., Hurlbeck C., Bartsch C., Feller K.H., Use of solid-phase microextraction-capillary-gas chromatography (SPME-CGC) for the varietal characterization of wines by means of chemometrical methods, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 1998, **360**, 784-787.

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

Cannac-Arteaga D., Contribution à l'amélioration de l'analyse de la fraction volatile de produits riches en eau par espace de tête dynamique couplé à la chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse, 137 pages, Thèse de troisième cycle, Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand, 2001, n° : 01 CLF2 2267.

Caprioli R.M., Fan T., Cottrell J.S., Continuous flow sample probe for fast atom bombardment mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 1986, **58**, 2949-295.

Caprioli R.M., Continuous flow fast atom bombardment mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 1990, **62**, 477A-485A.

Careri M., Elveri L., Mangia A., Musci M., Spectrophotometric and coulometric detection in the high-performance liquid chromatography of flavonoids and optimization of sample treatment for the determination of quercetin in orange juice, *Journal of Chromatography A*, 2001, **881**, 449-460.

Carini M., Aldini G., Furlanetto S., Stefani R., Maffei Facino R., Liquid Chromatography coupled to Ion-Trap Mass Spectrometry for the rapid screening and detection of polyphenol antioxidants from *Helichrysum stoechas*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2001, **24**, 517-526.

Caristi C., Bellocco E., Gargiulli C., Toscano G., Leuzzi U., Flavone-di-C-glycosides in *citrus* juices from Southern Italy, *Food Chemistry*, 2006, **95**, 431-437.

Casabianca H., Graff J.B., Jame P., Perruchietti C., Application of hyphenated techniques to the chromatographic authentication of flavours in food products and perfumes, *Journal of High Resolution Chromatography*, 1995, **18**, 279-285.

Casabianca H., Graff J.B., Faugier V., Fleig F., Grenier C., Enantiomeric distribution studies of linalool and linalyl acetate, *Journal of High Resolution Chromatography*, 1998, **21**, 107-112.

Cavalli J.F., Fernandez X., Lizzani-Cuvelier L., Loiseau A.M., Comparison of static headspace, headspace solid phase microextraction, headspace sorptive extraction, and direct thermal desorption techniques on chemical composition of French olive oils, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, **51**, 7709-7716.

Cavalli J.F., Fernandez X., Lizzani-Cuvelier L., Loiseau A.M., Characterization of volatile compounds of French and Spanish virgin olive oils by HS-SPME : Identification of quality-freshness markers, *Food Chemistry*, 2004, **88**, 151-157.

Cazaussus A., Pes R., Sellier N., Tabet J.C, GC-MS and GC-MS-MS analysis of a complex essential oil, *Chromatographia*, 1988, **25**, 865-869.

Chalchat J.C., Garry R.F., Michet A., Essential oils of myrtle (*Myrtus communis* L.) of the Mediterranean littoral, *Journal of Essential Oil Research*, 1998, **10**, 613-617.

Chemat F., Lucchesi M.E., Smadja J., Solvent-free microwave extraction of volatile natural substances, *Brevet Américain*, US 2004/0187340 A1, 2004. (a)

Chemat S., Lagha A., Aitamar H., Bartels P.V., Chemat F., Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds, *Flavour and Fragrance Journal*, 2004, **19**, 188-195. (b)

Cheng Y, Carmen De Vicente M, Meng H, Guo W, Tao N, Deng X., A set of primers for analyzing chloroplast DNA diversity in *Citrus* and related genera, *Tree Physiology*, 2005, **25**, 661-672.

Clarke S., Processing, extraction and purity. *Essential chemistry for aromatherapy*. 2<sup>ème</sup> édition. Londres : Elsevier, 2008, p. 79-93.

Clevenger J.F., Apparatus for volatile oil determination, description of new type, *American Perfumer & Essential Oil Review*, 1928, **23**, 467-503.

Coda L., Il liquore di mirto: aspetti storici e tradizione. In Franco M.A., Versini G., Saba R., *Caratterizzazione del liquore Mirto di Sardegna tradizionale*. Cagliari : Litotipografia Valdes, 1998, p. 11-34.

Coleman W.M., Gordon B.M., Lawrence B.M., Examinations of the matrix isolation Fourier transform infrared spectra of organic compounds: part XII, *Applied Spectroscopy*, 1989, **43**, 298-304.

Coleman W.M., Gordon B.M., Gas chromatography-matrix isolation-Fourier transform-infrared spectrometry of natural products, *Journal of Chromatographic Science*, 1991, **29**, 371-376.

Coste H., *Flore descriptive et illustrée de la France de la Corse et des contrées limitrophes*. Tome 2, taxon n°1275. Paris : Librairies des Sciences et des Arts, 1937, p. 75.

Costa R., Acampora Zeller B., Crupi M., De Fina M., Valentino M., Dugo P., Dugo G., Mondello L., GC-MS, GC-O and enantio-GC investigation of the essential oil of *Tarhomonanthus camphoratus* L., *Flavour and Fragrance Journal*, 2008, **23**, 40-48.

Cren-Olivé C., Déprez S., Lebrun S., Coddeville B., Rolando C., Characterization of methylation site of monomethylflavan-3-ols by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 2000, **14**, 2312-2319.

Cuoco G., Mathe C., Archier P., Chemat F., Vieillescazes C., A multivariate study of the performance of an ultrasound-assisted madder dyes extraction and characterization by liquid chromatography-photodiode array detection, *Ultrasonics Sonochemistry*, 2009, **16**, 75-82.

Cuyckens F., Ma Y.L., Pocsfalvi G., Claeys M., Tandem mass spectral strategies for the structural characterization of flavonoid glycosides, *Analisis*, 2000, **28**, 888-895.

Cuyckens F., Rozenberg R., de Hoffmann E., Claeys M., Structure characterization of flavonoid *O*-diglycosides by positive and negative nano-electrospray ionization ion trap mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 2001, **36**, 1203-1210.

Cuyckens F., Claeys M., Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids, *Journal of Mass Spectrometry*, 2004, **39**, 1-15.

Darriet F., Desjobert J.M., Costa J., Muselli A., Identification of chrysanthenyl esters from the essential oil of *Anthemis maritima* L. investigated by GC/RI, GC-MS (EI and CI) and C-13-NMR spectroscopy: chemical composition and variability, *Phytochemical Analysis*, 2009, **20**, 279-292.

Davis B.D., Brodbelt J.S., An investigation of the homolytic saccharide cleavage of deprotonated flavonol 3-*O*-glycosides in a quadrupole ion trap mass spectrometer, *Journal of Mass Spectrometry*, 2008, **43**, 1045-1052.

Decouzon M., G ribaldi S., Rouillard M., Sturla J.M., A new look at the spectroscopic properties of dihydrocarveol stereoisomers, *Flavour and Fragrance Journal*, 1990, **5**, 147-152.

Del Rio J.A., Arcas M.C., Benavente-Garcia O., Ortu o A., *Citrus* polymethoxylated flavones can confer resistance against *Phytophthora citrophthora*, *Penicillium digitatum*, and *Geotrichum* species, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, **46**, 4423-4428.

Demirci B., Demirci F., Baser H.C., Headspace-SPME and hydrodistillation of two fragrant *Artemisia* sp., *Flavour and Fragrance Journal*, 2005, **20**, 395-398.

Diaz A.M., Abeger A., Contribution   l'étude des composés phénoliques des graines de *Myrtus communis* L., *Plantes médicinales et phytoth rapie*, 1987, **21**, 317-322.

Diaz-Maroto M.C., Perez-Coello M.S., Cabezudo M.D. Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from spices. Comparison with simultaneous distillation-extraction, *Journal of Chromatography A*, 2002, **947**, 23-29.

Domon B., Costello C.E., A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates, *Glycoconjugate Journal*, 1988, **5**, 397-409.

Dong M.W., *Modern HPLC for practicing scientists*. 1<sup> re</sup>  d. Wiley, 2006, 304 pages.

Dugo G., Di Giacomo A., *The genus Citrus*. Londres, Taylor & Francis Publishing, 2002, 642 pages.

Elgamal M.H.A., Voigt D., Adam G, Mass spectroscopy of natural products. XXI. Comparative negative positive ion mass spectroscopic investigations of flavonoid compounds, *Journal für Praktische Chemie*, 1986, **328**, 893-902.

El-Sissi H.I., El-Ansary H., Tannins and polyphenolics of the leaves of *Myrtus communis*, *Planta Medica*, 1967, **15**, 41-51.

Escarpa A., Gonzalez M.C., High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties, *Journal of Chromatography A*, 1998, **823**, 331-337.

Fabre N., Rustan I., de Hoffmann E., Quetin-Leclercq J., Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2001, **12**, 707-715.

Faller A.L.K., Fialho E., Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2010, **23**, 561-568.

Fanciullino L.A., Tomi F., Luro F., Desjobert J.M., Casanova J., Chemical variability of peel and leaf oils of mandarins, *Flavour and Fragrance Journal*, 2006, **21**, 359-367.

Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M., Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science*, 1989, **246**, 64-71.

Ferrerres F, Llorach R, Gil-Izquierdo A., Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and penta-glycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 2004, **39**, 312-321.

Ferrerres F, Gil-Izquierdo A, Andrade PB, Valentao P, Tomas-Barberan FA., Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2007, **1161**, 214-223.

Flamini G., Cioni P.L., Morelli I., Use of solid-phase micro-extraction as a sampling technique in the determination of volatiles emitted by flowers, isolated flower parts and pollen, *Journal of Chromatography A*, 2003, **998**, 229-233.

Flamini G., Cioni P.L., Morelli I., Maccioni S., Baldini R., Phytochemical typologies in some populations of *myrtus communis* L. on Caprione Promontory, *Food Chemistry*, 2004, **85**, 599-604.

Flamini G., Cioni P.L., Morelli I., Composition of the essential oils and in vivo emission of volatiles of four *Lamium* species from Italy : *L. purpureum*, *L. hybridum*, *L. bifidum* and *L. amplexicaule*, *Food Chemistry*, 2005, **91**, 63-68.

Fleisher Z., Fleisher A., The essential oils of etrog (*Citrus medica* L. var. Ethrog Engl.). Aromatic plants of the holy Land and the Sinai, Part VI. *Journal of Essential Oil Research*, 1991, **3**, 377-379.

Fleisher Z., Fleisher A., Ethrog: the first *Citrus* in the western world, *Perfumer and Flavorist*, 1996, **21**, 11-16.

Froelicher Y., Mouhaya W., Bassene J-B, Costantino G, Kamiri M, Luro F, Morillon R, Ollitrault P., New universal mitochondrial PCR markers reveal new information on maternal citrus phylogeny, *Tree Genetics & Genomes*, 2011, **7**, 47-61.

Gabriele B., Fazio A., Dugo P., Costa R., Mondello L., Essential oil composition of *Citrus medica* L. Cv. Diamante (Diamante citron) determined after using different extraction methods, *Journal of Separation Science*, 2009, **32**, 99-108.

Gancel A.L., Ollitrault P., Froelicher Y., Tomi F., Jacquemond C., Luro F., Brillouet J.M., Leaf volatile compounds of seven *Citrus* somatic tetraploid hybrids sharing willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) as their common parent, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, **51**, 6006-6013.

Ganzler K., Salgó A., Valkó K., Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography, *Journal of Chromatography*, 1986, **371**, 299-306.

Gardeli C., Papageorgiou V., Mallouchos A., Theodosis K., Komaitis M., Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts, *Food Chemistry*, 2008, **107**, 1120-1130.

Garry R.P., Chalchat J.C., Les huiles essentielles de Myrte du pourtour méditerranéen, 10<sup>ème</sup> Journées Internationales des Huiles Essentielles, Dignes-les-Bains, 5-7/9/1991, Actes, *Rivista Italiana EPPOS*, N° spécial, 1992, 524-532.

Gattuso G., Barreca D., Gargiulli C., Leuzzi U., Caristi C., Flavonoid composition of *Citrus* juices, *Molecules*, 2007, **12**, 1641-1673.

Gauthier R., Gourai M., Bellakhdar J., A propos de l'huile essentielle de *Myrtus communis* L. var. Italica et var. Baetica récolté au Maroc, II, Rendement et composition selon le mode d'extraction; comparaison avec diverses sources, *Al Biruniya*, 1988, **4**, 117-132.

Gorinstein S., Martín-Belloso O., Park Y.S., Haruenkit R., Lojek A., Cíž M., Caspi A., Libman I., Trakhtenberg S., Comparison of some biochemical characteristics of different *Citrus* fruits, *Food Chemistry*, 2001, **74**, 309-315.

Grob K., Organic substances in potable water and in its precursor: Part I. Methods for their determination by gas-liquid chromatography, *Journal of Chromatography*, 1973, **84**, 255-273.

Harrison A.G., Chemical ionization mass spectrometry, 2<sup>nd</sup> éd. Boca Raton, Floride : CRC Press, 1992, 208 pages.

Hayouni E.A., AbedrabbaM., Bouix M., Hamdi M., The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts, *Food Chemistry*, 2007, **105**, 1126-1134.

Hedin P.A., Phillips V.A., Electron impact mass spectral analysis of flavonoids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, **40**, 607-611.

Hildrum K.I., Tjaberg T.B., Texture loss in fermented citron used for candying, *International Journal of Food Science and Technology*, 1972, **7**, 379-386.

de Hoffmann E., Stroobant V., *Spectrométrie de Masse*. 3<sup>ème</sup> éd. Paris : Dunod, 1999, 424 pages.

Hoffmann-Ribani R., Huber L.S., Rodriguez-Amaya D.B., Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2009, **22**, 263-268.

Horning E.C., Carroll D.I., Dzidic I., Haegele, H.D., Horning M.G., Stillwell R.N., Liquid chromatography-mass spectrometer-computer analytical system: continuous flow system based on atmospheric pressure ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography*, 1974, **99**, 13-21.

Huang Y., Pu Z., Chemical composition of the leaf essential oils from 110 citrus species, cultivars, hybrids and varieties of Chinese origin, *Perfumer and Flavorist*, 2000, **25**, 53-66.

Huck C.W., Huber C.G., Ongania K.H., Bonn G.K., Isolation and characterization of methoxylated flavones in the flowers of *Primula veris* by liquid chromatography and mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2000, **870**, 453-462.

Huck C.W., Buchmeiser M.R., Bonn G.K., Fast analysis of flavonoids in plant extracts by liquid chromatography-ultraviolet absorbance detection on poly(carboxylic acid)-coated silica and electrospray ionization tandem mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A*, 2001, **943**, 33-38.

Huet R., Dalnic R., Cassin J., Jacquemond C., Le cédrat méditerranéen. Le cédrat de Corse, *Fruits*, 1986, **41**, 113-119.

Huet R., Les huiles essentielles d'agrumes, *Fruits*, 1991, **46**, 551-576.



Hughes R.J., Croley T.R., Metcalfe C.D., March R.E., A tandem mass spectrometric study of selected characteristic flavonoids, *International Journal of Mass Spectrometry*, 2001, **210/211**, 371-385.

Hunt D.F., Shabanowitz J., Botz F.K., Chemical ionization mass spectrometry of salts and thermally labile organics with field desorption emitters as solids probes, *Analytical Chemistry*, 1997, **49**, 1160-1163.

Hvattum E., Ekeberg D., Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 2003, **38**, 43-49.

Ibáñez E., López-Sebastián S., Ramos E., Tabera J., Reglero G, Analysis of volatile fruit components by headspace solid-phase microextraction, *Food Chemistry*, 1998, **63**, 281-285.

International Centre for Science and High Technology (ICS) and United Nations Industrial Development Organization (UNIDO), *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*. Trieste : International Centre for Science and High Technology, 2008, 266 pages.

Ishikawa M., Ito O., Ishizaki S., Kurobayashi Y., Fujita A., Solid-phase aroma concentrate extraction (SPACE<sup>TM</sup>): a new headspace technique for more sensitive analysis of volatiles, *Flavour and Fragrance Journal*, 2004, **19**, 183-187.

Ito Y., Takeuchi T., Ishii D., Goto M., Direct coupling of micro high-performance liquid chromatography with fast atom bombardment mass spectrometry – part I, *Journal of Chromatography*, 1985, **346**, 161-166.

Ito Y., Takeuchi T., Ishii D., Goto M., Mizuno T., Direct coupling of micro high-performance liquid chromatography with fast atom bombardment mass spectrometry – part II, *Journal of Chromatography*, 1986, **358**, 201-207.

Jadhav D., Rekha B.N., Gogate P.R., Rathod V.K., Extarction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction, *Journal of Food Engineering*, 2009, **93**, 421-426.

Jantan I., Ahmad A.S., Ahmad A.R., Ali N.A.M., Ayop N., Chemical composition of some *Citrus* oils from Malaysia, *Journal of Essential Oil Research*, 1996, **8**, 627-632.

Jeanmonod D., Gamisans J., *Flora Corsica*. Aix-en-Provence : Edisud, 2007, 920 pages.

Jennings W., Shibamoto T., *Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass-capillary gas chromatography*. New-York : éd. Jovanovitch H.B., Academic Press, 1980, 472 pages.

Jimenez-Carmona M.M., Ubera J.L., Luque de Castro M.D. Comparison of continuous subcritical water extraction and hydrodistillation of marjoram essential oil, *Journal of Chromatography A*, 1999, **855**, 625-632.

Joulain D., Laurent R., Two closely related sesquiterpenols : 1-endobourbonanol and 1,6-germacradien-5-ol, *Journal of Essential Oil Research*, 1989, **1**, 197-200.

Joulain D., Method for analysing essential oil. Modern analysis methodologies : use and abuse, *Perfumer & Flavorist*, 1994, **19**, 5-17.

Joulain D., König W.A., *The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons*. Hambourg : éd. E.B.-Verlag, 1998, 658 pages.

Justesen U., Knuthsen P., Torben L., Quantitative analysis of flavonoids, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A*, 1998, **799**, 101-110.

Justesen U., Negative atmospheric pressure chemical ionisation low-energy collision activation mass spectrometry for the characterisation of flavonoids in extracts of fresh herbs, *Journal of Chromatography A*, 2000, **902**, 369-379.

Justesen U., Collision-induced fragmentation of deprotonated methoxylated flavonoids, obtained by electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 2001, **36**, 169-178.

Kalua C.M., Bedgood D.R., Prenzler P.D., Development of a headspace solid phase microextraction-gas chromatography method for monitoring volatile compounds in extended time-course experiments of olive oil, *Analytica Chimica Acta*, 2006, **556**, 407-414.

Kataoka H., Lord H.L., Pawliszyn J., Applications of solid-phase micro-extraction and gas chromatography in food analysis, *Journal of Chromatography A*, 2000, **880**, 35-62.

Klejdus B., Vitamvasova-Sterbova D., Kuban V., Identification of isoflavone conjugates in red clover (*Trifolium pratense*) by liquid chromatography-mass spectrometry after two-dimensional solid-phase extraction, *Analytica Chimica Acta*, 2001, **450**, 81-97.

Kok M.F., Yong F.M., Lim G., Rapid extraction method for reproducible analysis of aroma volatiles, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1987, **35**, 779-781.

Kolb B., Headspace sampling with capillary columns, *Journal of Chromatography A*, 1999, **842**, 163-205.

König W.A., Bülow N., Saritas Y., Identification of sesquiterpenes hydrocarbons by gas phase analytical methods, *Flavour and Fragrance Journal*, 1999, **14**, 367-378.

König W.A., Hochmuth D.H., Joulain D., Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils: *Library of Mass Finder 2.1* (cédérom), Hamburg, Allemagne : Institute of Organic Chemistry, 2001.

Kováts E., Gas Chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Advances in Chromatography*, ed. Par Giddings J.C. et Keller R.A. New-York : M. Decker Inc, 1965, p. 229-247.

Lane D., Jenkins S.W.D., 9<sup>th</sup> *International Symposium on Polynuclear aromatic hydrocarbons*, Columbus, Ohio, USA, 1984, 437-449.

Lang Q., Wai C.M., Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies – a practical review, *Talanta*, 2001, **53**, 771-782.

Lawrence B.M., *Essential oils 1976-1977*. Carol Stream, Illinois : Allured Publishing, 1978, 175 pages.

Lee M.H., Lin C.C., Comparison of techniques for extraction of isoflavones from the root of *Radix Puerariae*: ultrasonic and pressurized solvent extractions, *Food Chemistry*, 2007, **105**, 223-228.

Letellier M., Budzinski H., Bellocq J., Connan J., Focused microwave-assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes from sediments and source rocks, *Organic Geochemistry*, 1999, **30**, 1353-1365.

Lewars E.G., March R.E., Fragmentation of 3-hydroxyflavone; a computational and mass spectrometric study, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007, **21**, 1669-1679.

Li Q.M., Claeys M., Characterization and differentiation of diglycosyl flavonoids by positive ion fast atom bombardment and tandem mass spectrometry, *Biological Mass Spectrometry*, 1994, **23**, 406-416.

Likens, S.T., Nickerson, G.B., Detection of certain hop oil constituents in brewing products, *Journal of American Society of Brewing Chemists*, 1964, **22**, 5-13.

Liu X., Pawliszyn R., Wang L., Pawliszyn J. On-site monitoring of biogenic emissions from *Eucalyptus dunnii* leaves using membrane extraction with sorbent interface combined with a portable gas chromatograph system, *Analyst*, 2004, **129**, 55-62.

Loret V., *Le cédratier dans l'Antiquité*. Paris : éd. Connaissance et Mémoires, 1891, Réédité en mai 2004, 52 pages.

Lota M.L., de Rocca Serra D., Tomi F., Bessiere J.M., Casanova J., Chemical composition of peel and leaf essential oil of *Citrus medica* L. and *C. limonomedica* Lush., *Flavour and Fragrance Journal*, 1999, **14**, 161-166.

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

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, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, **50**, 796-805.

de Lourdes Mata Bilbao M., Andrés-Lacueva C., Jauregui O., Lamuela-Raventos R.M., Determination of flavonoids in a *Citrus* fruit extract by LC-DAD and LC-MS, *Food Chemistry*, 2007, **101**, 1742-1747.

Lu L., Song F.R., Tsao R., Jin Y.R., Liu Z.Q., Liu S.Y., Studies on the homolytic and heterolytic cleavage of kaempferol and kaempferide glycosides using electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2010, **24**, 169-172.

Lucchesi M.E., Chemat F., Smadja, J. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation, *Journal of Chromatography A*, 2004, **1043**, 323-327. (a)

Lucchesi M.E., Chemat F., Smadja J., An original solvent free microwave extraction of essential oil from spices, *Flavour and Fragrance Journal*, 2004, **19**, 134-138. (b)

Lucchesi M.E., *Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles*, 146 pages, thèse de troisième cycle, Chimie, Université de la Réunion, Saint Denis, 2005, n° tel-00118895.

Luque de Castro M.D., Priego-Capote F., Soxhlet extraction: Past and present panacea, *Journal of Chromatography A*, 2010, **1217**, 2383-2389.

Luro F., Rist D., Ollitrault P., Evaluation of genetic relationships in *Citrus* genus by means of sequence tagged microsatellites, *Acta Horticulturae*, 2001, **546**, 237-242.

Luro F., Venturini N., Costantino G., Paolini J., Ollitrault P., Costa J, Genetic and chemical diversity of citron (*Citrus medica* L.) based on nuclear and cytoplasmic markers and leaf essential oil composition, *Phytochemistry*, 2012, **77**, 186-196.

Ma Y.L., Li Q.M., Van den Heuvel H., Claeys M., Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1997, **11**, 1357-1364.

Ma Y.L., Vedernikova I., Van den Heuvel H., Claeys M., Internal glucose residue loss in protonated O-diglycosyl flavonoids upon low-energy collision-induced dissociation, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2000, **11**, 136-144.

Ma Y.L., Cuyckens F., Van den Heuvel H., Claeys M., Mass spectrometric methods for the characterisation and differentiation of isomeric O-diglycosyl flavonoids, *Phytochemical Analysis*, 2001, **12**, 159-165.

Mabry T.J., Markham K.R., *The Flavonoids*. New York : éd. Academic Press, 1975, 1204 pages.

Macleod J.L., de Troconis N.G., Volatile flavour components of mango fruit, *Phytochemistry*, 1982, **21**, 2523-2526.

Mamede M.E.O., Pastore G.M., Study of methods for the extraction of volatile compounds from fermented grape must, *Food Chemistry*, 2006, **96**, 586-590.

March R.E., Miao X.S., Fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution, *International Journal of Mass Spectrometry*, 2004, **231**, 157-167.

March R.E., Miao X.S., Metcalfe C.D., Stobiecki M., Marczak L., A fragmentation of an isoflavone glycoside, genistein-7-O-glucoside, using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution, *International Journal of Mass Spectrometry*, 2004, **232**, 171-183.

March R.E., Li H., Belgacem O., Papanastasiou D., High-energy and low energy collision-induced dissociation of protonated flavonoids generated by MALDI and by electrospray ionization, *International Journal of Mass Spectrometry*, 2007, **262**, 51-66.

Marriott P., Shellie R., Fergus J., Ong R., Morrison P., High resolution essential oil analysis by using comprehensive gas chromatographic methodology, *Flavour and Fragrance Journal*, 2000, **15**, 225-239.

Marriott P., Shellie R., Cornwell C., Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils, *Journal of Chromatography A*, 2001, **936**, 1-22.

Martin T., Rubio B., Villaescusa L., Fernandez L., Diaz A.M., Polyphenolic compounds from pericarps of *Myrtus communis*, *Pharmaceutical Biology*, 1999, **37**, 28-31.

Mastovská K., Lehotay S.J., Practical approaches to fast gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2003, **1000**, 153-180.

Mateus E., Barata R.C., Zrostlíková J., Gomes da Silva M.D.R., Paiva M.R., Characterization of the volatile fraction emitted by *Pinus* spp. by one- and two-dimensional chromatographic techniques with mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A*, 2010, **1217**, 1845-1855.

Matich A.J., Rowan D.D., Banks N.H., Solid phase microextraction for quantitative headspace sampling of apple, *Analytical Chemistry*, 1996, **68**, 4114-4118.

Mazza G., Gas chromatographic-mass spectrometric investigations of the volatile components of myrtle berries (*Myrtus communis* L.), *Journal of Chromatography*, 1983, **264**, 304-311.

McLafferty F.W., Michnowicz J.A., State-of-the-art GC/MS, *Chemtech*, 1992, **22**, 182-189.

McLafferty F.W., Tureček F., *Interpretation of mass spectra*, 4<sup>ème</sup> édition. Sausalito, Californie : éd. University Science Books, 1993, 371 pages.

McLafferty F.W., Stauffer D.B., The Wiley/NBS registry of mass spectral data 8<sup>th</sup> edition, 2008, Wiley-Interscience Publication.

Mendiola J.A., Herrero M., Cifuentes A., Ibañez E. Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications, *Journal of Chromatography A*, 2007, **1152**, 234-246.

Mengal P., Mompon B., Procédé et installation d'extraction sans solvant de produits naturels par micro-ondes, *Brevet Européen*, EP 698 076 B1, 1996.

Merken H.M., Beecher G.R., Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones, *Journal of Chromatography A*, 2000, **897**, 177-184.

Meyer-Warnod B., Natural essential oils: extraction processes and applications to some major oils, *Perfumer & Flavorist*, 1984, **9**, 93-103.

Miketova P., Schram K.H., Whitney J., Li M., Huang R., Kerns E., Valcic S., Timmermann B.N., Rourick R., Klohr S., Tandem mass spectrometry studies of green tea catechins. Identification of three minor components in the polyphenolic extract of green tea, *Journal of Mass Spectrometry*, 2000, **35**, 860-869.

Molnar-Perl I., Füzfa Zs., Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids, *Journal of Chromatography A*, 2005, **1073**, 201-227.

Mondelo L., Lewis A.C. Bartle K.D., *Multidimensional chromatography*. Chichester, Angleterre : John Wiley & Sons, 2002, 436 pages.

Mondello L., Casilli A., Tranchida P.Q., Dugo G., Dugo P., Comprehensive two-dimensional gas chromatography in combination with rapid scanning quadrupole mass spectrometry in perfume analysis, *Journal of Chromatography A*, 2005, **1067**, 235-243.

Mondello L., Casilli A., Tranchida P.Q., Furukawa M., Komori K., Miseki K., Dugo P., Dugo G., Fast enantiomeric analysis of a complex essential oil with an innovative multidimensional gas chromatographic system, *Journal of Chromatography A*, 2006, **1105**, 11-16.

Montoro P., Tuberoso C.I.G., Piacente S., Perrone A., De Feo V., Cabras P., Pizza C., Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, **41**, 1614-1619. (a)

Montoro P., Tuberoso C.I.G., Perrone A., Piacente S., De Feo V., Cabras P., Pizza C., Characterisation by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of anthocyanins in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur, *Journal of Chromatography A*, 2006, **1112**, 232-240. (b)

Mouly P., Gaydou E.M., Auffray A., Simultaneous separation of flavone glycosides and polymethoxylated flavones in *Citrus* juices using liquid chromatography, *Journal of chromatography A*, 1998, **800**, 171-179.

Mukhopadhyay M., *Natural extracts using supercritical carbon dioxide*. Boca Raton, Floride: éd. CRC Press, 2000, 360 pages.

Muñoz-Olivas R., Screening analysis: an overview of methods applied to environmental, clinical and food analyses, *Trends in Analytical Chemistry*, 2004, **23**, 203-216.

Musshoff F., Lachenmeier D.W., Kroener L., Madea B. Automated headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of amphetamines and synthetic designer drugs in hair samples, *Journal of Chromatography A*, 2002, **958**, 231-238.

Neue U.D., *HPLC Columns: Theory, Technology, and Practice*. New-York : éd. Wiley-VCH, 1997, 416 pages.

Nicolosi E., Deng Z.N., Gentile A., La Malfa S., Continella G., Tribulato E., Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers, *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, **100**, 1155-1166.

Nicolosi E, La Malfa S, El-Otmani M, Negbi M, Goldschmidt EE., The search for the authentic citron (*Citrus medica* L.): historic and genetic analysis, *HortScience*, 2005, **40**, 1963-1968.

Nikolic D., Van Breemen R.B., New metabolic pathways for flavanones catalyzed by rat liver microsomes, *Drug Metabolism and Disposition*, 2004, **32**, 387-397.

NIST (National Institute of Standards and Technology), *PC Version of the NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library*, 2008.

Nivaggioli H., Le cédratier en Corse ou le rêve éphémère de l'opulence, *Travaux scientifiques du Parc naturel régional et des réserves naturelles de Corse*, 2002, **60**, 123-142.

Noij T., Van Es A., Cramers C., Kijjks J., Selective removal of water in purge and cold-trap capillary gas chromatographic analysis of volatile organic traces in aqueous samples, *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications*, 1987, **10**, 60-66.

Núñez A.J., Bemelmans M.H., Maarse H., Isolation methods for the volatile components of grapefruit juice. Distillation and solvent extraction methods, *Chromatographia*, 1984, **18**, 153-158.

Núñez A.J., Gonzalez L.F., Janak J., Pre-concentration of headspace volatiles for trace organic analysis by gas chromatography, *Journal of Chromatography*, 1987, **300**, 127-162.

Ollitrault P., Jacquemond C., Dubois C., Luro F., Citrus. *Genetic diversity of cultivated tropical plants*, éd. Hamon, Seguin, Perrier et Glaszmann. Montpellier : Science Publishers, 2003, p. 193-197.

Ometto J.C., *Bioclimatologia vegetal*. São Paulo : éd. Agronomica Ceres, 1981. 425pages.

Oufedjikh H., Lacroix M., Mahrouz M., Amiot M.J., Effect of g-irradiation on phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase activity during storage in relation to peel injury from peel of *Citrus clementina* Hort. Ex. Tanaka, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, **48**, 559-565.

Paliyath G., Whiting M.D., Stasiak M.A., Mum D.P., Clegg B.S., Volatile production and fruit quality during development of superficial scald in red delicious apples, *Food Research International*, 1997, **30**, 95-103.

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 ionization spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2005, **1076**, 170-178.

Paolini J., Costa J., Bernardini A.F., Analysis of the essential oil from the roots *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* (L.) by GC, GC-MS and C<sup>13</sup> NMR, *Phytochemical Analysis*, 2007, **18**, 235-244. (a)



Paolini J., Muselli A., Bernardini A.F., Bighelli A., Casanova J., Costa J., Thymol derivatives from essential oil of *Doronicum corsicum* L., *Flavour and Fragrance Journal*, 2007, **22**, 479-487. (b)

Paolini J., Leandri C., Desjobert J.M., Barboni T., Costa J., Comparison of liquid-liquid extraction with headspace methods for the characterization of volatile fractions of commercial hydrolats from typically Mediterranean species, *Journal of Chromatography A*, 2008, **1193**, 37-49. (a)

Paolini J., Nasica E., Desjobert J.M., Muselli A., Bernardini A.F., Costa J., Analysis of volatile constituents isolated by hydrodistillation and headspace solid-phase microextraction from *Adenostyles briquetii* Gamisans, *Phytochemical Analysis*, 2008, **19**, 266-276. (b)

Paré J.R.J., Sigouin M., Lapointe J., Extraction de produits naturels assistée par micro-ondes, *Brevet européen*, EP 398798, 1990.

Pawliszyn J., Solid phase microextraction: theory and practice. New York : éd. Wiley-VCH, 1997, 247 pages.

Paya P., Anastassiades M., Mack D., Sigalova I., Tasdelen B., Oliva J., Barba A., Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection, *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 2007, **389**, 1697-1714.

Pellati A., Benvenuti S., Yoshizaki F., Bertelli D., Rossi M.C., Headspace solid-phase microextraction gas- chromatography-mass spectrometry analysis of the volatile compounds of *Evodia* species fruits, *Journal of Chromatography A*, 2005, **1087**, 265-273.

Penalver A., Pocurull E., Borrul P., Marce R.M., Evaluation of parameters in solid phase microextraction process, *Chromatographia*, 1999, **50**, 685-688.

Perez-Magarino S., Revilla I., Gonzalez-SanJose M.L., Beltran S., Various applications of liquid chromatography-mass spectrometry to the analysis of phenolic compounds, *Journal of Chromatography A*, 1999, **847**, 75-81.

*Pharmacopée Européenne*, 3<sup>ème</sup> édition, Conseil de l'Europe. Sainte Ruffine : éd. Maisonneuve S.A, 1997, 1918 pages.

Pikulski M., Brodbelt J.S., Differentiation of flavonoid glycoside isomers by using metal complexation and electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of American Society of Mass Spectrometry*, 2003, **14**, 1437-1453.

Pillonel L., Bosset J.O., Tabacchi R., Rapid preconcentration and enrichment techniques for the analysis of food volatile. A review, *Food Science and Technology*, 2002, **35**, 1-14.

Poiana M., Sicari V., Mincione B., A comparison between the chemical composition of the oil, solvent extract and supercritical carbon dioxide extract of *Citrus medica* L. cv. Diamante. *Journal of Essential Oil Research*, 1998, **10**, 145-152.

Pourmortazavi S.M., Hajimirsadeghi S.S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis, *Journal of Chromatography A*, 2007, **1163**, 2-24.

Richter B.E., Jones B.A., Ezzell J.L., Porter N.L., Avdalovic N., Pohl C., Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation, *Analytical Chemistry*, 1996, **68**, 1033-1039.

Ridgway K., Lalljie S.P.D., Smith R.M. Sample preparation for the determination of trace residues and contaminants in foods, *Journal of Chromatography A*, 2007, **1153**, 36-53.

de Rijke E., Zappey H., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U.A.T., Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple quadrupole and ion-trap instruments, *Journal of Chromatography A*, 2003, **984**, 45-58.

de Rijke E., Out P., Niessen W.M.A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U.A.T., Analytical separation and detection methods for flavonoids, *Journal of Chromatography A*, 2006, **1112**, 31-63.

Risso A., Poiteau A., *Histoire Naturelle des Orangers*. Paris : imprimerie de Mme Hérisant le Doux, 1818-1820, 280 pages.

Riu-Aumatell M., Castellari M., Lopez-Tamames E., Galassi S., Buxaderas S., Characterisation of volatile compounds of fruit juices and nectars by HS/SPME and GC/MS, *Food Chemistry*, 2004, **87**, 627-637.

Roberts J.K., Smith R.J., Use of liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy for the identification of impurities in drug substances, *Journal of Chromatography A*, 1994, **677**, 385-389.

Rocha S.M., Coutinho P., Barros A., Delgadillo I., Coimbra M.A., Rapid tool for distinction of wines based on the global volatile signature. *Journal of Chromatography A*, 2006, **1114**, 188-197.

Rodrigues F., Caldeira M., Câmara J.S., Development of a dynamic headspace solid-phase microextraction procedure coupled to GC-qMSD for evaluation the chemical profile in alcoholic beverages. *Analytica Chimica Acta*, 2008, **609**, 82-104.

Romani A., Pinelli P., Mulinacci N., Vincieri F.F., Tattini M., Identification and quantitation of polyphenols in leaves of *Myrtus communis* L., *Chromatographia*, 1999, **49**, 17-20.

Rosillo L., Salinas M.R., Garijo J., Alonso G.L., Studt of volatiles in grapes by dynamic headspace analysis: Application to the differanciation of somme *Vitis vinifera* varieties, *Journal of Chromatography A*, 1999, **847**, 155-159.

Rosset R., Caude M., Jardy A., *Chromatographie en phase liquide et supercritique*. Paris : éd. Masson, 1991, 919 pages.

Ruberto G., Renda A., Daguino C., Amico V., Spatafora C., Tringali C., De Tommasi N., Polyphenol constituents and antioxydant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape, *Food Chemistry*, 2007, **100**, 203-210.

Schieber A., Keller P., Carle R., Determination of phenolic acids and flavonoidsof apple and pear by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 2001, **910**, 265-273.

Schultze W., Lange G., Schmaus G., Isobutane and ammonia chemical ionization mass spectrometry of sesquiterpene hydrocarbons, *Flavour and Fragrance Journal*, 1992, **7**, 55-64.

Segal A., Gorecki T., Mussche P., Lips J., Pawliszyn J., Development of membrane extraction with a sorbent interface–micro gas chromatography system for field analysis, *Journal of Chromatography A*, 2000, **873**, 13-27.

Shellie R., Mondello L., Marriott P., Dugo G., Characterisation of lavender essential oils by using gas chromatography-mass spectrometry with correlation of linear retention indices and comparison with comprehensive two-dimensional gas chromatography, *Journal of Chromatography A*, 2002, **970**, 225-234.

Shi P., He Q, Song Y., Qu H., Cheng Y, Characterization and identification of isomeric flavonoid O-diglycosides from genus *Citrus* in negative electrospray ionization by ion trap mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 2007, **598**, 110-118.

Shiota H., Volatile components in the peel oil from fingered citron (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* swingle), *Flavour and Fragrance Journal*, 1990, **5**, 33-37.

Shulten H.R., Beckey H.D., Potentiality of the coupling of column liquid chromatography and field desorption mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1973, **83**, 315-320.

Shui G., Leong L.P., Separation and determination of organic acids and phenolics compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 2002, **977**, 89-96.

Sides A., Robards K., Helliwell S., Developments in extraction techniques and their application to analysis of volatiles in foods, *Trends in Analytical Chemistry*, 2000, **19**, 322-329.

Sinha S.N., Bhatnagar V.K., Doctor P., Toteja G.S., Agnihotri N.P., Kalra R.L., A novel method for pesticide analysis in refined sugar samples using a gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS/MS) and simple solvent extraction method, *Food Chemistry*, 2011, **126**, 379-386.

Sinyinda S., Gramshaw J.W., Volatiles of avocado fruit, *Food Chemistry*, 1998, **62**, 483-487.

Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W., *Introduction to modern liquid chromatography*, 3<sup>ème</sup> édition. New-York : éd. John Wiley & Sons, 2009, 960 pages.

Soufleros E.H., Mygdalia A.S., Natskoulis P., Characterization and safety evaluation of the traditional Greek fruit distillate “Mouro” by flavor compounds and mineral analysis, *Food Chemistry*, 2004, **86**, 625-636.

de Souza K.C.B., Schapoval E.E.S., Bassani V.L., LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-*O*-methylquercetin in *Achyrocline satureioides* preparations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002, **28**, 771-777.

Stashenko E.E., Jaramillo B.E., Martínez J.R., Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity, *Journal of Chromatography A*, 2004, **1025**, 93-103.

Stenzel N.M.C., Neves C.S.V., Marur C.J., dos Santos Scholz M.B., Gomes J.C., Maturation curves and degree-days accumulation for fruits of ‘Folha murcha’ orange trees, *Scientia Agricola*, 2006, **63**, 219-225.

Stevens J.F., Wollenweber E., Ivancic M., Hsu V.L., Sundberg S., Deinzer M.L., Leaf surface flavonoids of chrysothamnus, *Phytochemistry*, 1999, **51**, 771-780.

Stevenson R.J., Chen X.D., A study of volatile “trapping” in spray dried whey protein concentrate by “crushing” and/or vacuuming, and detection by solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry, *Food Research International*, 1996, **29**, 495-504.

Stobiecki M., Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoids glycosides, *Phytochemistry*, 2000, **54**, 237-256.

Stöggli W.M., Huck C.W., Bonn G.K., Structural elucidation of catechin and epicatechin in sorrel leaf extracts using liquid-chromatography coupled to diode array-, fluorescence-, and mass spectrometric detection, *Journal of Separation Science*, 2004, **27**, 524-528.

Sugisawa H., Sample preparation: isolation and concentration. *Flavor research recent advances*, éd. par Teranishi R., Flath R.A., Sugisawa H. New York: Marcel Dekker Inc., 1981, p. 11-15.

Tateo F., Picci V., Primo indagini sulla caratterizzazione GLC-MS dell'olio essenziale di mirto di Sardegna (*Myrtus communis* L.), *La Rivista della Società di Scienza dell'Alimentario*, 1982, **11**, 153-158.

Theis A.L., Waldack A.J., Hansen S.M., Jeannot M.A., Headspace solvent microextraction, *Analytical Chemistry*, 2001, **73**, 5651-5654.

Tomi F., Barzalona M., Casanova J., Luro F., Chemical variability of the leaf oil of 113 hybrids from *Citrus clementina* (Commun) x *Citrus deliciosa* (Willow leaf), *Flavour and Fragrance Journal*, 2008, **23**, 152-163.

Tolkowsky S., *Hesperides: A history of the culture and use of citrus fruits*. Londres: éd. John Bales, Sons & Curnow, Ltd, 1938, 371 pages.

Tsimogiannis D., Samiotaki M., Panayotou G., Oreopoulou V., Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS, *Molecules*, 2007, **12**, 593-606.

Tuberoso C.I.G., Barra A., Angioni A., Sarritzu E., Pirisi F.M. Chemical composition of volatiles in Sardinian myrtle (*Myrtus communis* L.) alcoholic extracts and essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, **54**, 1420-1426.

Tuberoso C.I.G., Rosa A., Bifulco E., Melis M.P., Atzeri A., Pirisi F.M., Dessì M.A., Chemical composition and antioxidant activities of *Myrtus communis* L. berries extracts, *Food Chemistry*, 2010, **123**, 1242-1251.

Valls J., Millan S., Pilar Marti M., Borrás E., Arola LL., Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavonols, *Journal of Chromatography A*, 2009, **1216**, 7143-7172.

Van den Dool H., Kratz P.D., A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, *Journal of Chromatography*, 1963, **11**, 463-471.

Vekiari S.A., Protopapadakis E.E., Papadopoulou P., Argyriadou-Giannovits N. Variation in the essential oils of citron leaves and peel infected by exocortis disease. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2002, **77**, 428-431.

Vekiari S.A., Protopapadakis E.E., Argyriadou-Giannovits N. Composition of the leaf and peel oils of *Citrus medica* L. "Diamante" from Crete, *Journal of Essential Oil Research*, 2004, **16**, 528-530.

Venturini N., Curk F., Desjobert J.M., Karp D., Costa J., Paolini J., Chemotaxonomic investigations of peel and petitgrain essential oils from 17 citron cultivars, *Chemistry and Biodiversity*, 2010, **7**, 736-751.

Vernin G., Lageot C., Couplage CG/SM pour l'analyse des arômes et des huiles essentielles, *Analisis*, 1992, **20**, 34-39.

Versari A., Natali N., Russo M.T., Antonelli A. Analysis of some Italian lemon liquor (limoncello). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, **51**, 4978-4983.

Vian M.A., Fernandez X., Visinoni F., Chemat F., Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils, *Journal of Chromatography A*, 2008, **1190**, 14-17.

Vichi S., Castellote A.I., Pizzale L., Conte L.S., Buxaderas S., Lopez-Tamames E., Analysis of virgin olive oil volatile compounds by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection, *Journal of Chromatography A*, 2003, **983**, 19-33.

Vichi S., Pizzale L., Conte L.S., Buxaderas S., Lopez-Tamames E., Simultaneous determination of volatile and semi-volatile aromatic hydrocarbons in virgin olive oil by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2005, **1090**, 146-154.

Vichi S., Guadayol J.M., Caixach J., Lopez-Tamames E., Buxaderas S., Monoterpenes and sesquiterpenes hydrocarbons of virgin olive oil by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2006, **1125**, 117-123.

Virot M., Tomao V., Ginies C., Visinoni F., Chemat F., Microwave-integrated extraction of total fats and oils, *Journal of Chromatography A*, 2008, **1196**, 57-64.

Volpe C.A., Schöffel R.R., Barbosa J.C., Influência de algumas variáveis meteorológicas sobre a qualidade dos frutos das laranjeiras 'Valência' e 'Natal', *Revista Brasileira de Agrometeorologia*, 2000, **8**, 85-94.

Vukics V., Guttman A., Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews*, 2010, **29**, 1-16.

Wang L., Lord H., Morehead R., Dorman F., Pawliszyn J. Sampling and monitoring of biogenic emissions by *Eucalyptus* leaves using membrane extraction with sorbent interface (MESI), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, **50**, 6281-6286.

Wang Y.C., Chuang Y.C., Hsu H.W., The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan, *Food Chemistry*, 2008, **106**, 277-284.

Wang K.W., Zhang H., Positive electrospray ionization tandem mass spectrometry of polymethoxylated flavones, *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 2009, **23**, 2107-2111.

Wannes W.A., Mhamdi B., Marzouk B., Variations in essential oils and fatty acid composition during *Myrtus communis* var. *italica* fruit maturation, *Food Chemistry*, 2009, **112**, 621-626.

Wannes W.A., Mhamdi B., Sriti J., Ben Jemia M., Ouchikh O., Hamdaoui G., Elyes Kchouk M., Marzouk B., Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italic* L.) leaf, stem and flower, *Food and Chemical Toxicology*, 2010, **48**, 1362-1370.

Waridel P., Wolfender J.L., Ndjoko K., Hobby K.R., Major H.J., Hostettmann K., Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ion-trap multi-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers, *Journal of Chromatography A*, 2001, **926**, 29-41.

Weintraub R.A., Ameer B., Johnson J.V., Yost R.A., Trace determination of naringenin and hesperitin by tandem mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, **43**, 1966-1968.

Weyerstahl P., Marschallweyerstahl H., Manteuffel E., Kaul V.K., Constituents of *Juniperus recurva* var. *squamata* oil, *Planta Medica*, 1988, **3**, 259-261.

Weyerstahl P., Marshall H., Rustaignan A., Constituents of the essential oil of *Myrtus communis* L. from Iran. *Flavour and Fragrance Journal*, 1994, **6**, 333-337.

Weyerstahl P., Marschall H., Weirauch M., Thefeld K., Surburg H., Constituents of commercial *Labdanum* oil, *Flavour and Fragrance Journal*, 1998, **13**, 295-318.

Whitehouse R.C., Dreyer R.N., Yamashita M., Fenn J.B., Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers, *Analytical Chemistry*, 1985, **57**, 675-679.

Whitman S.C., Kurowska E.M., Manthey J.A., Daugherty A., Nobiletin, a citrus flavonoid isolated from tangerines, selectively inhibits class A scavenger receptor-mediated metabolism of acetylated LDL by mouse macrophages, *Atherosclerosis*, 2005, **178**, 25-32.

Wilkes J.G., Conte E.D., Kim Y., Holcomb M., Sutherland J.B., Miller D.W., Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in foods, *Journal of Chromatography A*, 2000, **880**, 3-33.

Wollgast J., Anklam E., Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health?, *Food Research International*, 2000, **33**, 449-459.

Wright S., The theory of gene frequencies, dans *Evolution and the genetics of populations. Volume 2*. Chicago, Illinois : éd. University of Chicago Press, 1969, 520 pages.

Wu W., Liu Z., Song F., Liu S., Structural analysis of selected characteristic flavones by Electrospray tandem mass spectrometry, *Analytical Sciences*, 2004, **20**, 1103-1105.

Xu F., Liu Y., Zhang Z., Yang C., Tian Y., Quasi-MS<sup>n</sup> identification of flavanone 7-glycoside isomers in *Da Chengqi Tang* by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Chinese Medicine*, 2009, **4**, 15-25.

Yadegarinia D., Gachkar L., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A., Rasooli I., Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils, *Phytochemistry*, 2006, **67**, 1249-1255.

Yang Y., Battesti M.J., Djabou N., Muselli A., Paolini J., Tomi P., Costa J., Melissopalynological origin determination and volatile composition analysis of Corsican “chestnut grove” honeys, *Food Chemistry*, 2012, **132**, 2144-2154.

Yoshimura M., Amakura Y., Tokuhara M., Yoshida T., Polyphenolic compounds isolated from the leaves of *Myrtus communis*, *Journal of Natural Medicines*, 2008, **62**, 366-368.

Yost R.A., Enke C.G., Triple quadrupole mass spectrometry for direct mixture analysis and structure elucidation, *Analytical Chemistry*, 1979, **51**, 1251-1264.

Zhao Y., Wang L., Bao Y., Li C., A sensitive method for the detection and quantification of ginkgo flavonols from plasma, *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 2007, **21**, 971-981.

Zhou D.Y., Chen D.L., Xu Q., Xue X.Y., Zhang F.F., Liang X.M., Characterization of polymethoxylated flavones in *Fructus aurantii* by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization combined with tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, **43**, 1692-1699.



# Annexes

---

## I. Tests statistiques

### I.1. ANOVA des compositions chimiques des huiles essentielles de baies de myrte

Tableau A1 : Résultat de l'ANOVA ( $p < 0,05$ )

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	0,149855769	15	0,009990385	0,000143258	1	2,068134922
A l'intérieur des groupes	42400,11321	608	69,7370283			
Total	42400,26306	623				

La valeur de  $p$  est supérieur à 0,05 (probabilité = 1) nous devons donc accepter l'hypothèse nulle  $H_0$  et conclure qu'il n'y a pas de différence significative entre les différentes stations.

### I.2. ANOVA des compositions chimiques des extraits de baies de myrte

Tableau A2 : Résultat de l'ANOVA ( $p < 0,05$ )

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	7425719,772	15	495047,9848	9,480492652	8,00466E-17	1,714704241
A l'intérieur des groupes	10861247,89	208	52217,53794			
Total	18286967,66	223				

La valeur de  $p$  est inférieur à 0,05 (probabilité =  $8.10^{-17}$ ) nous devons donc rejeter l'hypothèse nulle  $H_0$  et conclure qu'il existe une différence significative entre les différentes stations.

### I.3. Analyse CAH des compositions chimiques des extraits de baies de myrte

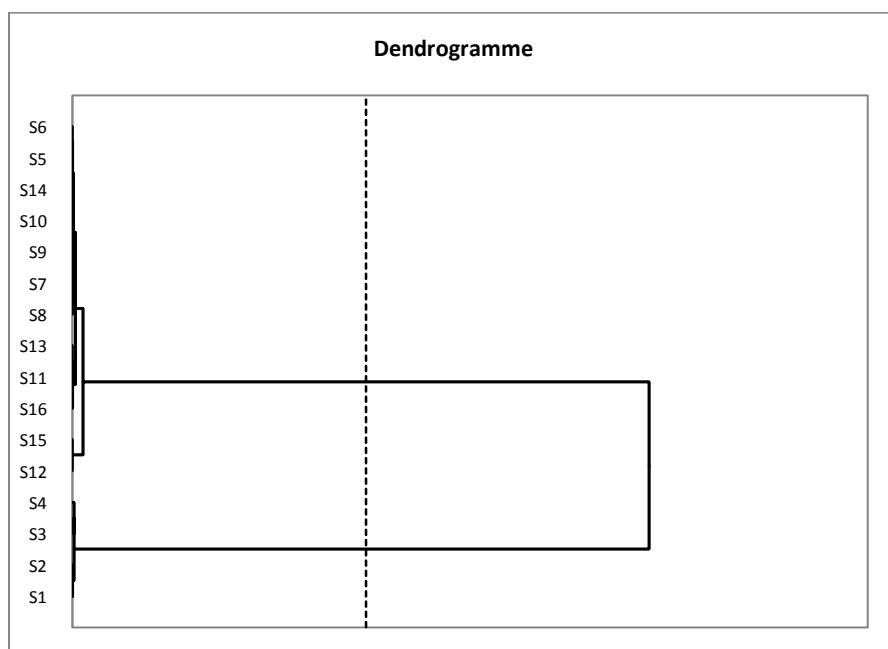


Figure A1 : Dendrogramme des extraits de baies de myrte

## II. Compositions chimiques des macérations et des liqueurs de cédrat de Corse

### II.1. Compositions chimiques en volatils (MEPS – CPG, CPG/SM)

La légende qui suit concerne les tableaux A3 à A16 :

Les n° des composés correspondent à ceux du tableau 24 (ordre d'éluion sur colonne apolaire).

<sup>a</sup> Indices de rétention obtenus à partir des données de la littérature [König et coll. 2001].

<sup>b</sup> Indices de rétention obtenus sur colonne apolaire (Rtx-1).

Les abondances des composés sont exprimées en pourcentages relatifs.

Les composés ont été identifiés à partir de la bibliothèque « arômes » du laboratoire.

Tableau A3 : Composition volatile de la macération A

n°	Composés	Ir L <sup>a</sup>	Ir A <sup>b</sup>	J <sub>1</sub>	J <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>10</sub>
1	α-Thujène	932	922	0,9	0,8	1,1	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0	0,9
2	α-Pinène	936	931	2,5	2,2	3,1	2,8	2,8	2,7	2,7	3,0	2,5
4	Sabinène	964	969	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2
5	β-Pinène	978	970	1,9	1,5	2,1	2,1	2,0	2,2	2,0	2,2	1,8
6	Myrcène	987	979	2,1	1,5	2,1	2,2	2,1	2,3	2,0	2,3	1,8
8	p-Cymène	1015	1010	0,6	0,2	0,7	0,5	0,5	1,0	0,9	0,8	0,5
9	Limonène	1025	1020	65,6	62,0	65,6	64,8	65,4	60,6	61,6	64,0	63,4
12	(E)-β-Ocimène	1029	1024	2,0	2,4	1,9	2,3	2,2	2,6	2,5	2,5	2,2
13	γ-Terpinène	1051	1047	20,6	25,3	19,7	20,5	19,8	23,0	22,9	20,7	22,6
16	Terpinolène	1082	1078	0,7	1,2	0,6	0,9	0,9	1,1	1,1	0,9	1,2
26	Néral	1215	1212	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
28	Géranial	1244	1239	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
30	Acétate de néryle	1342	1339	tr	tr	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	tr
31	Acétate de géranyle	1362	1356	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
32	(E)-β-Caryophyllène	1421	1424	0,4	0,6	0,6	0,5	0,6	0,6	0,5	0,5	0,4
33	trans-α-Bergamotène	1429	1431	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	0,5	0,5	0,4
38	β-Bisabolène	1498	1502	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2
	Monoterpènes hydrocarbonés			97,2	97,3	97,2	97,4	97,0	96,8	96,9	97,7	97,1
	Monoterpènes oxygénés			0,3	0,2	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2
	Sesquiterpènes hydrocarbonés			1,2	1,6	1,5	1,4	1,6	1,7	1,4	1,2	1,0
	<b>Total</b>			<b>98,7</b>	<b>99,1</b>	<b>99,1</b>	<b>99,1</b>	<b>98,9</b>	<b>98,8</b>	<b>98,6</b>	<b>99,1</b>	<b>98,3</b>

Tableau A4 : Composition volatile de la macération B

n°	Composés	Ir L <sup>a</sup>	Ir A <sup>b</sup>	J <sub>1</sub>	J <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>10</sub>
1	α-Thujène	932	922	0,9	1,1	1,4	0,7	1,2	1,2	1,0	1,2	1,1
2	α-Pinène	936	931	2,3	3,1	3,8	2,1	3,4	3,5	3,0	3,6	3,1
4	Sabinène	964	969	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3
5	β-Pinène	978	970	1,8	2,2	2,7	2,6	2,7	2,8	2,8	2,8	2,5
6	Myrcène	987	979	1,8	1,9	2,2	2,4	2,3	2,5	2,4	2,4	2,1
8	p-Cymène	1015	1010	0,3	0,2	0,5	0,9	0,7	0,9	0,9	1,3	1,6
9	Limonène	1025	1020	60,0	60,3	66,8	59,8	60,0	59,3	58,2	60,5	66,7
12	(E)-β-Ocimène	1029	1024	2,9	2,6	2,2	3,2	3,0	3,3	3,4	3,0	2,4
13	γ-Terpinène	1051	1047	26,2	23,8	16,4	23,7	22,7	20,9	22,9	21,8	16,6
16	Terpinolène	1082	1078	1,4	1,4	1,2	1,0	1,0	1,1	1,1	1,0	0,7
26	Néral	1215	1212	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
28	Géranial	1244	1239	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2
30	Acétate de néryle	1342	1339	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	tr	0,1
31	Acétate de géranyle	1362	1356	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
32	(E)-β-Caryophyllène	1421	1424	0,4	0,5	0,5	0,7	0,6	0,7	0,6	0,3	0,6
33	trans-α-Bergamotène	1429	1431	0,4	0,6	0,5	0,8	0,6	0,7	0,7	0,3	0,6
38	β-Bisabolène	1498	1502	0,2	0,4	0,3	0,5	0,4	0,4	0,5	0,2	0,3
	Monoterpènes hydrocarbonés			97,9	96,9	97,5	96,7	97,4	95,8	96,0	97,9	97,1
	Monoterpènes oxygénés			0,4	0,3	0,3	0,3	0,2	0,4	0,4	0,2	0,4
	Sesquiterpènes hydrocarbonés			1,0	1,5	1,3	2,0	1,6	1,8	1,8	0,8	1,5
	<b>Total</b>			<b>99,3</b>	<b>98,7</b>	<b>99,1</b>	<b>99,0</b>	<b>99,2</b>	<b>98,0</b>	<b>98,2</b>	<b>98,9</b>	<b>99,0</b>

Tableau A5 : Composition volatile de la macération C

n°	Composés	Ir L <sup>a</sup>	Ir A <sup>b</sup>	J <sub>1</sub>	J <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>10</sub>
1	α-Thujène	932	922	1,2	1,4	1,5	1,3	1,3	1,5	1,3	1,1	1,3
2	α-Pinène	936	931	3,3	4,3	4,1	4,0	3,9	3,4	4,0	3,4	3,9
4	Sabinène	964	969	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3
5	β-Pinène	978	970	2,5	2,8	3,1	2,8	3,0	2,4	3,6	2,7	2,9
6	Myrcène	987	979	2,4	0,5	2,5	0,4	2,5	2,3	2,4	2,4	2,4
8	p-Cymène	1015	1010	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	0,6	1,1	1,5	0,7
9	Limonène	1025	1020	62,1	61,7	66,5	61,6	59,2	59,6	57,5	60,7	67,3
12	(E)-β-Ocimène	1029	1024	2,7	2,6	1,9	2,7	2,7	3,0	3,0	2,9	1,9
13	γ-Terpinène	1051	1047	22,5	22,9	15,4	22,6	22,1	22,0	21,5	21,3	15,9
16	Terpinolène	1082	1078	0,9	1,0	0,6	1,0	1,1	1,2	1,1	1,1	1,0
26	Néral	1215	1212	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
28	Géranial	1244	1239	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1
30	Acétate de néryle	1342	1339	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	tr
31	Acétate de géranyle	1362	1356	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
32	(E)-β-Caryophyllène	1421	1424	0,3	0,3	0,6	0,6	0,7	0,8	0,7	0,5	0,5
33	trans-α-Bergamotène	1429	1431	0,3	0,5	0,6	0,6	0,7	0,8	0,7	0,4	0,5
38	β-Bisabolène	1498	1502	0,3	0,4	0,3	0,4	0,4	0,6	0,4	0,2	0,2
	Monoterpènes hydrocarbonés			98,2	97,6	96,1	96,9	96,5	96,3	95,8	97,3	97,6
	Monoterpènes oxygénés			0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2
	Sesquiterpènes hydrocarbonés			0,9	1,2	1,5	1,6	1,8	2,2	1,8	1,1	1,2
	<b>Total</b>			<b>99,5</b>	<b>99,2</b>	<b>98,1</b>	<b>98,9</b>	<b>98,7</b>	<b>98,9</b>	<b>98,0</b>	<b>98,6</b>	<b>99,0</b>

Tableau A6 : Composition volatile de la macération D

n°	Composés	Ir L <sup>a</sup>	Ir A <sup>b</sup>	J <sub>1</sub>	J <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>10</sub>
1	α-Thujène	932	922	0,7	0,6	0,9	0,8	0,8	0,8	0,8	0,7	0,8
2	α-Pinène	936	931	1,9	2,5	2,2	2,1	2,1	2,1	2,1	2,0	2,1
4	Sabinène	964	969	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2
5	β-Pinène	978	970	1,6	1,9	1,8	1,7	1,7	1,8	1,7	1,6	1,7
6	Myrcène	987	979	2,3	2,1	2,0	1,9	2,0	2,0	2,0	1,9	1,7
8	p-Cymène	1015	1010	1,1	0,9	1,0	0,8	0,9	1,1	1,1	1,3	1,3
9	Limonène	1025	1020	66,9	65,7	65,8	66,4	68,1	68,0	69,0	68,4	65,5
12	(E)-β-Ocimène	1029	1024	2,1	1,9	2,0	1,7	1,8	2,3	2,2	2,2	2,0
13	γ-Terpinène	1051	1047	21,7	21,0	21,8	21,2	18,8	18,4	18,0	16,8	21,7
16	Terpinolène	1082	1078	0,6	0,6	0,7	1,1	1,1	0,8	0,8	0,8	1,1
26	Néral	1215	1212	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
28	Géranial	1244	1239	0,2	0,2	tr	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2
30	Acétate de néryle	1342	1339	-	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	0,1
31	Acétate de géranyle	1362	1356	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	(E)-β-Caryophyllène	1421	1424	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
33	trans-α-Bergamotène	1429	1431	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4	0,3
38	β-Bisabolène	1498	1502	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	Monoterpènes hydrocarbonés			98,2	97,5	98,5	98,0	97,6	97,6	98,0	97,9	98,1
	Monoterpènes oxygénés			0,3	0,3	0,0	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,5
	Sesquiterpènes hydrocarbonés			0,7	0,9	0,8	0,8	0,9	0,8	0,8	0,9	0,8
	<b>Total</b>			<b>99,2</b>	<b>98,7</b>	<b>99,3</b>	<b>99,1</b>	<b>98,9</b>	<b>98,7</b>	<b>99,1</b>	<b>99,1</b>	<b>99,4</b>

Tableau A7 : Composition volatile de la macération E

n°	Composés	Ir L <sup>a</sup>	Ir A <sup>b</sup>	J <sub>1</sub>	J <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>10</sub>
1	α-Thujène	932	922	0,5	0,9	0,9	0,7	0,8	0,9	0,9	0,9	0,8
2	α-Pinène	936	931	1,4	2,6	2,6	1,9	2,3	2,5	2,6	2,4	2,3
4	Sabinène	964	969	0,1	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2
5	β-Pinène	978	970	1,5	1,8	1,9	1,4	1,7	2,0	1,9	1,8	1,7
6	Myrcène	987	979	1,4	2,0	2,0	1,5	1,9	2,1	2,0	2,1	1,8
8	p-Cymène	1015	1010	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,8	0,8	0,7	1,0
9	Limonène	1025	1020	68,8	68,9	69,4	66,1	69,6	63,7	65,1	67,6	66,8
12	(E)-β-Ocimène	1029	1024	2,8	2,4	2,3	2,8	2,4	2,9	2,7	2,6	2,0
13	γ-Terpinène	1051	1047	20,8	18,5	18,2	22,3	17,9	21,3	20,2	18,9	20,5
16	Terpinolène	1082	1078	0,8	0,7	0,6	1,0	0,8	0,9	0,9	0,8	1,1
26	Néral	1215	1212	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
28	Géranial	1244	1239	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
30	Acétate de néryle	1342	1339	tr	tr	0,1	tr	tr	0,1	0,1	tr	tr
31	Acétate de géranyle	1362	1356	tr	-	-	-	tr	tr	tr	tr	-
32	(E)-β-Caryophyllène	1421	1424	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,4	0,4	0,4	0,3
33	trans-α-Bergamotène	1429	1431	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,5	0,5	0,4	0,3
38	β-Bisabolène	1498	1502	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2
	Monoterpènes hydrocarbonés			98,6	98,6	98,6	98,4	98,2	97,4	97,4	98,0	98,2
	Monoterpènes oxygénés			0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2
	Sesquiterpènes hydrocarbonés			0,5	0,6	0,8	0,6	0,8	1,2	1,2	1,0	0,8
	<b>Total</b>			<b>99,3</b>	<b>99,4</b>	<b>99,7</b>	<b>99,2</b>	<b>99,2</b>	<b>98,9</b>	<b>98,9</b>	<b>99,2</b>	<b>99,2</b>

Tableau A8 : Composition volatile de la macération F

n°	Composés	Ir L <sup>a</sup>	Ir A <sup>b</sup>	J <sub>1</sub>	J <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>10</sub>
1	α-Thujène	932	922	0,6	1,0	0,9	0,8	1,0	1,1	1,0	0,8	0,9
2	α-Pinène	936	931	1,7	2,9	2,7	2,4	2,7	3,0	2,9	2,3	2,6
4	Sabinène	964	969	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2
5	β-Pinène	978	970	1,5	1,9	1,9	2,0	1,8	2,1	2,0	1,6	1,8
6	Myrcène	987	979	1,1	2,0	2,0	2,2	2,0	2,3	2,1	1,8	1,9
8	p-Cymène	1015	1010	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	0,7	0,7	0,7	0,8
9	Limonène	1025	1020	66,7	68,8	67,3	64,0	66,6	60,9	62,5	63,2	69,2
12	(E)-β-Ocimène	1029	1024	3,0	2,3	2,5	2,8	2,5	3,0	2,8	2,9	2,3
13	γ-Terpinène	1051	1047	22,8	17,7	19,7	22,4	19,9	23,3	22,4	23,7	17,8
16	Terpinolène	1082	1078	0,9	0,7	0,8	0,9	0,8	1,0	0,9	1,1	0,7
26	Néral	1215	1212	tr	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
28	Géranial	1244	1239	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
30	Acétate de néryle	1342	1339	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	0,1	tr	tr
31	Acétate de géranyle	1362	1356	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
32	(E)-β-Caryophyllène	1421	1424	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,3
33	trans-α-Bergamotène	1429	1431	0,2	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3
38	β-Bisabolène	1498	1502	0,1	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2
	Monoterpènes hydrocarbonés			99,0	98,1	98,6	98,2	98,1	97,7	97,6	98,3	98,2
	Monoterpènes oxygénés			0,1	0,2	0,0	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2
	Sesquiterpènes hydrocarbonés			0,5	1,0	1,0	0,9	0,9	1,1	1,1	0,8	0,8
	<b>Total</b>			<b>99,6</b>	<b>99,3</b>	<b>99,6</b>	<b>99,3</b>	<b>99,2</b>	<b>99,1</b>	<b>99,0</b>	<b>99,3</b>	<b>99,2</b>

Tableau A9 : Composition volatile de la macération G

n°	Composés	Ir L <sup>a</sup>	Ir A <sup>b</sup>	J <sub>1</sub>	J <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>10</sub>
1	$\alpha$ -Thujène	932	922	0,6	0,7	0,5	0,7	0,7	0,6	0,6	0,6	0,6
2	$\alpha$ -Pinène	936	931	1,6	1,9	0,6	1,8	1,8	1,7	1,7	1,6	1,7
4	Sabinène	964	969	-	0,3	-	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
5	$\beta$ -Pinène	978	970	1,3	1,4	1,6	1,3	1,3	1,3	1,3	1,2	1,3
6	Myrcène	987	979	2,5	2,4	0,6	2,2	2,1	2,0	2,0	2,2	2,1
8	p-Cymène	1015	1010	1,3	1,3	1,2	1,2	1,3	1,2	1,3	1,5	1,3
9	Limonène	1025	1020	67,5	65,9	69,5	66,1	68,3	66,9	66,6	69,4	68,4
12	(E)- $\beta$ -Ocimène	1029	1024	2,1	2,1	2,3	2,0	2,0	1,9	2,0	2,0	2,0
13	$\gamma$ -Terpinène	1051	1047	17,7	19,5	21,5	20,3	19,3	19,5	19,6	19,1	19,0
16	Terpinolène	1082	1078	0,5	0,7	0,7	0,6	0,6	0,7	0,7	0,6	0,7
26	Néral	1215	1212	-	0,2	-	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,3
28	Géranial	1244	1239	0,4	0,3	-	0,3	0,3	0,2	0,1	0,2	0,4
30	Acétate de néryle	1342	1339	-	-	-	-	0,2	0,3	0,3	-	-
31	Acétate de géranyle	1362	1356	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	(E)- $\beta$ -Caryophyllène	1421	1424	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	<i>trans</i> - $\alpha$ -Bergamotène	1429	1431	0,4	0,2	-	-	-	-	-	0,1	0,1
38	$\beta$ -Bisabolène	1498	1502	0,4	0,2	0,2	0,1	-	-	-	-	-
	Monoterpènes hydrocarbonés			95,1	96,2	98,5	96,4	97,6	96,0	96,0	98,4	97,3
	Monoterpènes oxygénés			0,4	0,5	0,0	0,5	0,7	0,6	0,5	0,3	0,7
	Sesquiterpènes hydrocarbonés			0,8	0,4	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1
	<b>Total</b>			<b>96,3</b>	<b>97,1</b>	<b>98,7</b>	<b>97,0</b>	<b>98,3</b>	<b>96,6</b>	<b>96,5</b>	<b>98,8</b>	<b>98,1</b>

Tableau A10 : Composition volatile de la macération H

n°	Composés	Ir L <sup>a</sup>	Ir A <sup>b</sup>	J <sub>1</sub>	J <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>10</sub>
1	$\alpha$ -Thujène	932	922	0,5	0,6	0,8	0,8	0,7	0,6	0,7	0,7	0,7
2	$\alpha$ -Pinène	936	931	0,9	1,6	2,2	2,0	1,8	1,6	1,8	1,8	1,9
4	Sabinène	964	969	-	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
5	$\beta$ -Pinène	978	970	1,1	1,5	1,5	1,4	1,4	1,2	1,3	1,3	1,4
6	Myrcène	987	979	1,1	2,1	2,1	2,0	1,9	1,7	1,8	2,0	2,0
8	p-Cymène	1015	1010	1,2	1,1	1,3	1,3	1,3	1,1	1,1	1,3	1,2
9	Limonène	1025	1020	68,9	68,2	68,2	67,5	67,7	67,1	67,0	68,8	68,6
12	(E)- $\beta$ -Ocimène	1029	1024	2,7	2,1	1,9	2,0	2,0	2,1	2,4	2,2	2,1
13	$\gamma$ -Terpinène	1051	1047	20,9	20,1	19,8	19,8	20,4	21,2	20,8	20,2	19,9
16	Terpinolène	1082	1078	0,8	0,7	0,6	0,9	0,7	0,7	0,7	0,5	0,7
26	Néral	1215	1212	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
28	Géranial	1244	1239	0,2	0,3	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
30	Acétate de néryle	1342	1339	-	-	-	0,1	-	0,1	0,2	-	-
31	Acétate de géranyle	1362	1356	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	(E)- $\beta$ -Caryophyllène	1421	1424	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
33	<i>trans</i> - $\alpha$ -Bergamotène	1429	1431	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
38	$\beta$ -Bisabolène	1498	1502	-	0,1	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	Monoterpènes hydrocarbonés			98,1	98,2	98,7	97,9	98,1	97,5	97,8	99,0	98,7
	Monoterpènes oxygénés			0,3	0,4	0,1	0,4	0,2	0,3	0,4	0,2	0,2
	Sesquiterpènes hydrocarbonés			0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
	<b>Total</b>			<b>98,6</b>	<b>98,8</b>	<b>99,0</b>	<b>98,5</b>	<b>98,6</b>	<b>98,1</b>	<b>98,5</b>	<b>99,5</b>	<b>99,2</b>

Tableau A11 : Composition volatile de la macération I

n°	Composés	Ir L <sup>a</sup>	Ir A <sup>b</sup>	J <sub>1</sub>	J <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>10</sub>
1	$\alpha$ -Thujène	932	922	0,6	0,5	1,0	0,5	0,5	0,8	0,7	0,7	0,7
2	$\alpha$ -Pinène	936	931	0,9	0,9	2,8	1,3	1,2	2,0	2,0	2,0	2,0
4	Sabinène	964	969	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2
5	$\beta$ -Pinène	978	970	1,1	1,4	2,0	1,3	1,6	1,7	1,6	1,6	1,6
6	Myrcène	987	979	1,7	1,8	2,2	1,7	1,9	1,9	1,8	1,9	1,8
8	p-Cymène	1015	1010	0,9	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1	1,3
9	Limonène	1025	1020	69,2	68,6	66,2	67,5	67,7	65,1	66,3	67,5	68,5
12	(E)- $\beta$ -Ocimène	1029	1024	2,2	2,4	1,9	2,4	2,1	2,3	2,2	2,2	2,0
13	$\gamma$ -Terpinène	1051	1047	21,3	21,3	19,6	22,3	21,8	22,5	21,9	21,4	19,7
16	Terpinolène	1082	1078	0,7	0,7	0,5	0,7	0,7	0,8	0,7	0,5	1,1
26	Néral	1215	1212	0,1	0,1	0,2	tr	0,1	0,1	tr	0,1	0,1
28	Géranial	1244	1239	0,2	0,2	0,3	tr	0,1	0,1	tr	0,2	0,1
30	Acétate de néryle	1342	1339	-	0,1	-	0,1	-	0,1	0,1	0,1	-
31	Acétate de géranyle	1362	1356	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	(E)- $\beta$ -Caryophyllène	1421	1424	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
33	<i>trans</i> - $\alpha$ -Bergamotène	1429	1431	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
38	$\beta$ -Bisabolène	1498	1502	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	tr	0,1	0,1
	Monoterpènes hydrocarbonés			98,8	98,9	97,5	98,9	98,8	98,4	98,5	99,1	98,9
	Monoterpènes oxygénés			0,3	0,4	0,5	0,1	0,2	0,3	0,1	0,4	0,2
	Sesquiterpènes hydrocarbonés			0,3	0,3	0,5	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3
	<b>Total</b>			<b>99,4</b>	<b>99,6</b>	<b>98,5</b>	<b>99,2</b>	<b>99,3</b>	<b>99,0</b>	<b>98,8</b>	<b>99,8</b>	<b>99,4</b>

Tableau A12 : Composition volatile de la liqueur C-S<sub>4</sub>

n°	Composés	Ir L <sup>a</sup>	Ir A <sup>b</sup>	J <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>	M <sub>7</sub>	M <sub>8</sub>	M <sub>9</sub>	M <sub>10</sub>	M <sub>11</sub>	M <sub>12</sub>
1	α-Thujène	932	922	2,4	1,5	2,2	2,4	1,3	1,3	2,0	1,4	1,8	2,2	1,9	1,9	1,6	2,0	1,5	1,4
2	α-Pinène	936	931	6,3	6,0	6,0	6,4	4,8	6,1	5,9	5,4	6,4	6,7	5,5	5,9	5,4	5,5	5,8	5,3
4	Sabinène	964	969	0,6	0,6	0,4	0,5	0,2	0,4	0,5	0,4	0,2	0,2	0,6	0,3	0,3	0,2	0,5	0,4
5	β-Pinène	978	970	4,6	4,9	4,6	4,6	2,8	4,5	4,7	4,7	5,1	5,2	3,7	4,0	5,3	4,2	3,6	3,7
6	Myrcène	987	979	3,1	2,3	2,8	2,9	2,2	2,4	3,0	2,7	3,1	3,4	3,0	2,6	2,7	2,6	2,8	3,2
8	p-Cymène	1015	1010	1,6	1,3	1,2	1,5	2,3	3,0	1,5	2,6	3,1	3,1	2,1	1,9	2,4	2,6	2,5	2,0
9	Limonène	1025	1020	63,9	64,4	64,2	65,9	66,2	66,3	64,2	62,0	63,2	61,8	64,2	61,5	66,0	63,8	64,4	62,1
12	(E)-β-Ocimène	1029	1024	1,7	1,3	1,6	1,4	1,9	1,1	1,7	1,0	1,6	1,6	1,8	2,0	1,2	1,4	1,4	1,8
13	γ-Terpinène	1051	1047	14,8	16,9	15,0	13,1	17,1	12,8	15,4	16,6	15,0	15,0	14,7	17,2	14,8	15,6	16,6	18,5
16	Terpinolène	1082	1078	0,3	0,3	0,4	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	0,1	0,3	0,1	0,4
26	Néral	1215	1212	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
28	Géranial	1244	1239	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
30	Acétate de néryle	1342	1339	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
31	Acétate de géranyle	1362	1356	tr	-	tr	tr	-	-	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	-	-	tr
32	(E)-β-Caryophyllène	1421	1424	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr
33	trans-α-Bergamotène	1429	1431	-	-	tr	tr	-	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
38	β-Bisabolène	1498	1502	tr	tr	-	tr	-	tr	tr	tr	-	tr	-	tr	tr	-	tr	tr
	Monoterpènes hydrocarbonés			99,5	99,3	98,4	99,0	99,1	98,0	99,0	99,4	99,6	99,4	97,8	97,5	99,8	98,2	99,2	98,8
	Monoterpènes oxygénés			tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Sesquiterpènes hydrocarbonés			tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	<b>Total</b>			<b>99,3</b>	<b>99,5</b>	<b>98,4</b>	<b>99,0</b>	<b>99,0</b>	<b>98,0</b>	<b>99,1</b>	<b>97,0</b>	<b>99,6</b>	<b>99,4</b>	<b>97,8</b>	<b>97,5</b>	<b>99,8</b>	<b>98,2</b>	<b>99,2</b>	<b>98,8</b>



Tableau A13 : Composition volatile de la liqueur C-S<sub>8</sub>

n°	Composés	Ir L <sup>a</sup>	Ir A <sup>b</sup>	J <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>	M <sub>7</sub>	M <sub>8</sub>	M <sub>9</sub>	M <sub>10</sub>	M <sub>11</sub>	M <sub>12</sub>
1	α-Thujène	932	922	2,0	2,1	2,3	1,6	1,5	2,0	2,2	1,5	1,6	1,6	1,6	1,9	2,0	1,6	2,1	1,7
2	α-Pinène	936	931	5,9	6,2	6,2	5,9	4,0	6,0	6,7	4,9	5,3	5,2	5,8	5,0	5,1	5,4	6,0	5,2
4	Sabinène	964	969	0,6	0,6	0,5	0,4	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,5	0,6	0,8	0,4	0,6	0,4
5	β-Pinène	978	970	5,2	5,0	4,8	3,0	3,1	4,8	5,6	4,6	5,0	3,9	5,2	4,0	4,3	4,2	3,8	3,7
6	Myrcène	987	979	3,1	3,0	3,1	2,5	1,7	3,2	3,8	2,9	3,0	3,7	2,6	2,7	2,2	3,3	2,4	2,0
8	p-Cymène	1015	1010	1,9	2,6	2,0	2,1	2,8	2,8	1,1	3,0	2,6	1,9	2,0	2,1	2,0	2,8	2,6	2,1
9	Limonène	1025	1020	63,4	63,2	64,2	65,8	68,5	64,1	61,4	67,0	62,3	65,3	61,8	62,7	66,8	66,3	64,9	62,5
12	(E)-β-Ocimène	1029	1024	1,7	1,6	1,6	1,6	1,8	1,7	1,8	1,5	1,4	1,6	1,5	1,7	1,5	1,3	1,4	1,6
13	γ-Terpinène	1051	1047	15,5	15,0	14,7	14,6	15,8	14,1	16,4	13,0	16,2	15,6	15,5	16,1	14,8	13,5	15,1	17,9
16	Terpinolène	1082	1078	0,2	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2
26	Néral	1215	1212	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
28	Géranial	1244	1239	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
30	Acétate de néryle	1342	1339	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
31	Acétate de géranyle	1362	1356	-	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	-	tr	-	-	tr	tr
32	(E)-β-Caryophyllène	1421	1424	-	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-
33	trans-α-Bergamotène	1429	1431	tr	tr	-	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr
38	β-Bisabolène	1498	1502	tr	tr	-	tr	-	tr	tr	-	-	tr	tr	tr	-	tr	tr	-
	Monoterpènes hydrocarbonés			99,4	99,5	99,6	97,7	99,5	99,2	99,8	99,3	97,9	99,3	96,8	97,0	99,6	98,9	99,1	97,3
	Monoterpènes oxygénés			tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Sesquiterpènes hydrocarbonés			tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	<b>Total</b>			<b>99,5</b>	<b>99,4</b>	<b>99,6</b>	<b>97,7</b>	<b>99,8</b>	<b>99,2</b>	<b>99,5</b>	<b>98,7</b>	<b>97,9</b>	<b>99,3</b>	<b>96,8</b>	<b>97,0</b>	<b>99,6</b>	<b>98,9</b>	<b>99,1</b>	<b>97,3</b>

Tableau A14 : Composition volatile de la liqueur C-S<sub>10</sub>

n°	Composés	Ir L <sup>a</sup>	Ir A <sup>b</sup>	J <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>	M <sub>7</sub>	M <sub>8</sub>	M <sub>9</sub>	M <sub>10</sub>	M <sub>11</sub>	M <sub>12</sub>
1	α-Thujène	932	922	2,0	2,1	1,6	2,0	2,3	2,4	1,8	1,6	2,2	2,2	2,4	2,0	2,0	1,7	1,6	1,4
2	α-Pinène	936	931	5,0	5,5	5,1	5,5	6,8	6,0	5,1	5,3	6,0	4,9	5,2	5,2	5,4	5,3	5,5	6,0
4	Sabinène	964	969	0,5	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4	0,2	0,4	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	0,3	0,4	0,4
5	β-Pinène	978	970	4,7	4,4	3,7	4,1	5,0	5,2	4,8	4,3	3,6	3,7	4,0	3,5	4,3	3,8	3,6	4,0
6	Myrcène	987	979	2,9	2,7	2,9	2,4	3,0	3,7	2,6	2,3	3,5	2,8	2,9	2,6	2,7	2,4	2,6	2,9
8	p-Cymène	1015	1010	1,9	2,6	2,2	4,0	1,1	4,2	3,8	3,4	3,2	1,6	1,3	0,8	1,9	1,6	2,7	2,4
9	Limonène	1025	1020	66,9	66,2	62,5	66,3	68,2	59,1	65,1	64,8	59,8	64,7	63,3	67,7	62,0	66,0	63,4	64,1
12	(E)-β-Ocimène	1029	1024	1,4	1,2	1,4	0,8	1,1	1,8	1,8	1,2	2,2	1,8	1,7	1,4	1,8	1,4	1,2	1,3
13	γ-Terpinène	1051	1047	12,5	12,9	18,1	13,2	11,2	13,2	14,0	15,2	16,9	16,8	18,1	15,0	17,6	16,2	17,9	16,7
16	Terpinolène	1082	1078	0,2	0,3	0,2	0,5	0,4	0,1	0,1	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2
26	Néral	1215	1212	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
28	Géranial	1244	1239	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
30	Acétate de néryle	1342	1339	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
31	Acétate de géranyle	1362	1356	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr
32	(E)-β-Caryophyllène	1421	1424	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr
33	trans-α-Bergamotène	1429	1431	-	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	-	tr	tr	tr
38	β-Bisabolène	1498	1502	-	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	-	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Monoterpènes hydrocarbonés			98,4	98,0	98,2	99,2	99,3	96,1	99,5	99,2	98,1	99,2	99,7	98,9	98,2	98,9	99,1	99,4
	Monoterpènes oxygénés			tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Sesquiterpènes hydrocarbonés			tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	<b>Total</b>			<b>98,0</b>	<b>98,4</b>	<b>98,2</b>	<b>99,2</b>	<b>99,5</b>	<b>96,1</b>	<b>99,3</b>	<b>98,9</b>	<b>98,1</b>	<b>99,2</b>	<b>99,7</b>	<b>98,9</b>	<b>98,2</b>	<b>98,9</b>	<b>99,1</b>	<b>99,4</b>

Tableau A15 : Composition volatile de la liqueur **B-S<sub>8</sub>**

n°	Composés	Ir L <sup>a</sup>	Ir A <sup>b</sup>	J <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>	M <sub>7</sub>	M <sub>8</sub>	M <sub>9</sub>	M <sub>10</sub>	M <sub>11</sub>	M <sub>12</sub>
1	α-Thujène	932	922	1,5	1,9	2,1	2,0	2,0	2,2	2,4	2,0	2,3	1,3	2,1	2,0	1,3	1,4	2,0	1,6
2	α-Pinène	936	931	6,0	5,3	5,5	5,5	5,6	6,2	6,4	6,2	6,1	4,8	5,5	5,2	6,6	6,4	5,3	5,5
4	Sabinène	964	969	0,6	0,5	0,6	0,5	0,5	0,4	0,5	0,3	0,7	0,2	0,6	0,5	0,4	0,5	0,3	0,2
5	β-Pinène	978	970	4,9	4,4	4,6	4,5	4,6	4,9	4,6	5,0	4,7	2,8	4,2	4,1	5,1	4,4	4,6	4,1
6	Myrcène	987	979	2,3	2,7	2,8	2,8	2,8	3,0	2,9	2,8	2,7	1,8	2,8	2,5	1,9	2,8	2,6	2,8
8	p-Cymène	1015	1010	1,3	0,8	1,9	1,8	1,3	2,7	1,5	4,4	1,5	2,3	1,0	0,8	0,9	1,0	2,0	1,7
9	Limonène	1025	1020	64,4	65,6	63,5	64,1	65,1	62,8	65,9	64,4	61,6	67,3	61,6	64,8	69,1	64,2	63,4	62,3
12	(E)-β-Ocimène	1029	1024	1,3	1,8	1,9	1,8	1,9	1,8	1,4	1,5	2,1	1,9	2,0	1,6	0,7	1,4	1,8	1,7
13	γ-Terpinène	1051	1047	16,9	16,3	16,3	16,0	15,4	15,1	13,1	12,8	17,1	16,8	18,4	17,6	13,0	16,3	16,3	18,8
16	Terpinolène	1082	1078	0,3	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1	0,4	0,2	0,3	0,4	0,1	0,2	0,2	0,5
26	Néral	1215	1212	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
28	Géranial	1244	1239	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
30	Acétate de néryle	1342	1339	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
31	Acétate de géranyle	1362	1356	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
32	(E)-β-Caryophyllène	1421	1424	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr
33	trans-α-Bergamotène	1429	1431	tr	tr	-	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr
38	β-Bisabolène	1498	1502	tr	-	-	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr
	Monoterpènes hydrocarbonés			99,5	99,4	99,4	99,3	99,5	99,4	99,0	99,5	99,2	99,4	98,5	99,5	99,1	98,6	98,5	99,2
	Monoterpènes oxygénés			tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Sesquiterpènes hydrocarbonés			tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	<b>Total</b>			<b>99,5</b>	<b>99,4</b>	<b>99,4</b>	<b>99,3</b>	<b>99,5</b>	<b>99,4</b>	<b>99,0</b>	<b>99,5</b>	<b>99,2</b>	<b>99,4</b>	<b>98,5</b>	<b>99,5</b>	<b>99,1</b>	<b>98,6</b>	<b>98,5</b>	<b>99,2</b>

Tableau A16 : Composition volatile de la liqueur commerciale

n°	Composés	Ir L <sup>a</sup>	Ir A <sup>b</sup>	J <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>	M <sub>7</sub>	M <sub>8</sub>	M <sub>9</sub>	M <sub>10</sub>	M <sub>11</sub>	M <sub>12</sub>
1	α-Thujène	932	922	2,2	2,2	2,1	2,0	2,2	2,1	1,3	2,0	2,2	2,0	2,0	2,1	2,3	2,6	1,7	2,0
2	α-Pinène	936	931	6,0	5,6	5,3	5,3	5,5	5,7	5,7	5,6	5,8	5,1	5,0	5,5	6,4	6,8	6,9	6,0
4	Sabinène	964	969	0,4	0,5	0,5	0,6	0,5	0,3	0,4	0,3	0,5	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4	0,3	0,5
5	β-Pinène	978	970	4,6	4,3	3,9	3,7	3,6	4,0	4,5	4,1	3,7	3,2	3,3	3,5	4,0	4,6	4,7	3,7
6	Myrcène	987	979	2,8	2,8	2,9	2,7	2,6	3,0	3,4	3,1	2,7	2,4	2,5	2,5	3,0	3,4	2,5	2,4
8	p-Cymène	1015	1010	1,2	0,8	1,1	0,9	0,2	1,2	1,7	2,0	0,8	0,4	0,5	0,7	1,1	0,3	1,7	1,8
9	Limonène	1025	1020	64,2	65,1	64,7	65,5	69,0	63,3	59,9	62,5	65,7	64,5	66,0	68,8	62,2	60,4	62,1	64,9
12	(E)-β-Ocimène	1029	1024	1,6	1,7	1,8	1,7	1,2	1,9	2,2	2,0	1,7	1,5	1,5	1,5	1,9	2,0	1,5	1,1
13	γ-Terpinène	1051	1047	15,0	15,6	16,6	16,7	14,1	17,3	18,2	17,3	16,2	19,6	17,4	14,4	17,8	18,2	18,0	15,1
16	Terpinolène	1082	1078	0,4	0,5	0,6	0,5	0,7	0,6	0,7	0,5	0,3	0,4	0,4	0,1	0,3	0,3	0,1	0,2
26	Néral	1215	1212	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
28	Géranial	1244	1239	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
30	Acétate de néryle	1342	1339	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
31	Acétate de géranyle	1362	1356	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
32	(E)-β-Caryophyllène	1421	1424	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr
33	trans-α-Bergamotène	1429	1431	tr	tr	-	tr	-	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
38	β-Bisabolène	1498	1502	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	-	tr	tr	tr
	Monoterpènes hydrocarbonés			98,4	99,1	99,5	99,6	99,6	99,4	98,0	99,4	99,6	99,5	99,1	99,5	99,4	99,0	99,5	97,7
	Monoterpènes oxygénés			tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Sesquiterpènes hydrocarbonés			tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	<b>Total</b>			<b>98,4</b>	<b>99,1</b>	<b>99,5</b>	<b>99,6</b>	<b>99,6</b>	<b>99,4</b>	<b>98,0</b>	<b>99,4</b>	<b>99,6</b>	<b>99,5</b>	<b>99,1</b>	<b>99,5</b>	<b>99,4</b>	<b>99,0</b>	<b>99,5</b>	<b>97,7</b>

## II.2. Compositions chimiques en polyphénols

La légende qui suit concerne les tableaux A17 à A30 :

Les n° des composés correspondent à ceux tableau 26 (ordre d'élution : temps de rétention (TR) croissant).

Les concentrations des composés dans l'extrait sont exprimées en mg/l.

tr : trace (<0,1 mg/l)

Les composés ont été identifiés à partir de la bibliothèque du laboratoire.

Tableau A17 : Composition phénolique de la macération A

n°	Composés	TR (mn)	J <sub>1</sub>	J <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>10</sub>
2	Ac. Shikimique	2,2	3,3	3,7	3,9	3,9	4,0	3,5	3,3	3,7	3,7
3	Ac. Quinique	2,4	153,6	168,2	145,5	164,7	169,3	144,9	152,5	155,4	166,4
4	Ac. Vanillique	3,3	1,5	1,2	1,3	1,3	1,3	1,1	1,4	1,4	1,3
5	Ac. p-Coumarique	6,7	3,2	3,1	3,2	3,2	3,3	3,1	3,3	3,2	2,9
6	Ac. Sinapique	7,2	0,4	0,4	0,3	0,6	0,5	0,2	0,5	0,5	0,4
7	Ac. Ferulique	7,4	0,6	0,6	0,4	0,5	0,4	0,7	0,6	0,5	0,6
8	Flavanomarine	7,7	0,9	0,9	0,9	0,9	1,0	0,9	0,9	0,8	0,9
9	Hyperoside	8,3	2,7	2,3	2,3	2,6	2,4	2,4	2,3	2,4	2,7
10	Narirutine	8,4	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr
11	Diosmine	8,5	0,1	0,1	0,2	0,4	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2
12	Néohesperidine	8,5	3,9	3,2	3,3	3,7	4,0	4,3	3,6	3,5	3,8
14	Rutine	8,6	9,7	12,3	14,0	9,5	15,1	8,5	10,2	13,7	15,1
16	Robinéatine triméthylether	8,7	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4
22	Lutéoline	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
23	Sinensétine	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
25	Casticine	11,2	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
27	Nobilétine	11,3	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
29	Tangéretine	11,8	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
30	Retusine	12,4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Acides phénoliques		5,7	5,5	5,2	5,6	5,5	5,2	5,7	5,6	5,1
	Dérivés acides organiques		156,9	171,9	149,4	168,6	173,3	148,4	155,8	159,1	170,1
	Flavones		tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Flavones glycosylées		0,1	0,1	0,2	0,4	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2
	Flavanones glycosylées		4,8	4,1	4,2	4,6	5,0	5,2	4,5	4,3	4,7
	Flavonols		0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4
	Flavonols glycosylés		12,4	14,5	16,3	12,1	17,5	10,8	12,5	16,1	17,8
	<b>Total</b>		<b>180,1</b>	<b>196,3</b>	<b>175,5</b>	<b>191,5</b>	<b>201,7</b>	<b>169,9</b>	<b>178,8</b>	<b>185,4</b>	<b>198,3</b>

Tableau A18 : Composition phénolique de la macération **B**

n°	Composés	TR (mn)	J <sub>1</sub>	J <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>10</sub>
2	Ac. Shikimique	2,2	4,2	4,6	4,7	4,6	4,1	4,2	4,9	4,8	4,8
3	Ac. Quinique	2,4	201,6	217,3	221,8	202,4	198,6	193,8	216,9	211,1	186,5
4	Ac. Vanillique	3,3	1,9	1,5	1,6	1,8	1,7	1,4	1,7	1,6	1,6
5	Ac. p-Coumarique	6,7	4,0	3,9	3,7	4,0	4,2	3,8	4,0	4,0	4,0
6	Ac. Sinapique	7,2	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,3	0,6	0,8	0,4
7	Ac. Ferulique	7,4	0,8	0,8	0,8	0,6	0,7	0,9	0,5	0,6	0,4
8	Flavanomaréine	7,7	1,1	1,1	1,1	1,0	1,1	1,0	1,2	1,1	1,1
9	Hyperoside	8,3	3,5	2,8	3,5	3,0	2,9	2,9	3,0	3,2	2,9
10	Narirutine	8,4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
11	Diosmine	8,5	0,1	0,2	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2	0,4	0,3
12	Néohepéridine	8,5	4,9	4,0	4,9	4,4	4,5	5,2	5,0	4,5	4,0
14	Rutine	8,6	11,9	15,1	17,2	11,7	18,5	10,4	12,5	16,8	18,6
16	Robinétine triméthylether	8,7	0,2	0,2	0,5	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2
22	Lutéoline	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
23	Sinensétine	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
25	Casticine	11,2	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
27	Nobilétine	11,3	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
29	Tangéretine	11,8	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
30	Retusine	12,4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Acides phénoliques		7,1	6,8	6,5	7,0	7,2	6,3	6,8	6,9	6,4
	Dérivés acides organiques		205,8	221,9	226,5	207,0	202,7	198,0	221,8	215,9	191,3
	Flavones		tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Flavones glycosylées		0,1	0,2	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2	0,4	0,3
	Flavanones glycosylées		6,0	5,1	6,0	5,4	5,6	6,3	6,2	5,7	5,1
	Flavonols		0,2	0,2	0,5	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2
	Flavonols glycosylés		15,4	17,9	20,7	14,7	21,4	13,3	15,5	20,0	21,4
	<b>Total</b>		<b>234,7</b>	<b>252,0</b>	<b>260,5</b>	<b>234,6</b>	<b>237,2</b>	<b>224,2</b>	<b>250,8</b>	<b>249,1</b>	<b>224,8</b>

Tableau A19 : Composition phénolique de la macération C

n°	Composés	TR (mn)	J <sub>1</sub>	J <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>10</sub>
2	Ac. Shikimique	2,2	5,5	5,4	5,2	5,9	6,0	6,1	4,9	5,6	5,1
3	Ac. Quinique	2,4	262,9	240,9	238,4	259,7	231,3	266,8	236,3	263,2	243,9
4	Ac. Vanillique	3,3	1,9	2,1	1,7	1,9	2,0	2,0	2,0	1,9	2,3
5	Ac. p-Coumarique	6,7	4,7	4,8	4,7	4,9	4,9	5,0	5,0	4,4	4,9
6	Ac. Sinapique	7,2	0,7	0,7	0,3	1,0	0,5	0,7	0,7	0,6	0,5
7	Ac. Ferulique	7,4	1,0	0,7	1,1	0,7	0,5	0,6	0,8	0,9	1,0
8	Flavanomarine	7,7	1,3	1,2	1,3	1,4	1,3	1,5	1,3	1,4	1,3
9	Hyperoside	8,3	3,4	3,6	3,5	4,0	3,5	3,6	3,4	4,2	4,2
10	Narirutine	8,4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
11	Diosmine	8,5	0,2	0,3	0,2	0,6	0,3	0,3	0,1	0,3	0,2
12	Néohespéridine	8,5	4,9	5,2	6,4	5,6	5,0	6,1	5,3	5,9	5,9
14	Rutine	8,6	18,3	13,9	12,8	20,7	23,0	20,4	22,0	20,6	14,4
16	Robinétine triméthylether	8,7	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,6	0,3
22	Lutéoline	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
23	Sinensétine	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
25	Casticine	11,2	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
27	Nobilétine	11,3	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
29	Tangéretine	11,8	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
30	Retusine	12,4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Acides phénoliques		8,2	8,3	7,7	8,4	7,9	8,3	8,5	7,8	8,6
	Dérivés acides organiques		268,4	246,3	243,6	265,6	237,3	272,9	241,2	268,8	249,0
	Flavones		tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Flavones glycosylés		0,2	0,3	0,2	0,6	0,3	0,3	0,1	0,3	0,2
	Flavanones glycosylées		6,2	6,4	7,7	7,0	6,4	7,6	6,6	7,2	7,2
	Flavonols		0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,6	0,3
	Flavonols glycosylés		21,7	17,5	16,3	24,6	26,6	24,0	25,5	24,8	18,6
	<b>Total</b>		<b>304,9</b>	<b>279,2</b>	<b>275,8</b>	<b>306,5</b>	<b>278,8</b>	<b>313,5</b>	<b>282,3</b>	<b>309,6</b>	<b>283,9</b>

Tableau A20 : Composition phénolique de la macération D

n°	Composés	TR (mn)	J <sub>1</sub>	J <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>10</sub>
2	Ac. Shikimique	2,2	3,6	3,8	3,4	3,1	3,5	3,5	3,9	3,9	3,3
3	Ac. Quinique	2,4	160,7	159,8	133,8	144,9	158,1	147,6	164,3	142,6	150,5
4	Ac. Vanillique	3,3	1,2	1,2	1,1	1,3	1,2	1,3	1,3	1,3	1,5
5	Ac. p-Coumarique	6,7	3,1	3,1	3,0	3,2	2,7	3,0	3,2	3,1	3,1
6	Ac. Sinapique	7,2	0,4	0,6	0,2	0,5	0,4	0,4	0,5	0,3	0,4
7	Ac. Ferulique	7,4	0,6	0,5	0,7	0,5	0,6	0,5	0,4	0,3	0,6
8	Flavanomarine	7,7	0,9	0,9	0,8	0,8	0,8	0,8	1,0	0,9	0,9
9	Hyperoside	8,3	2,2	2,5	2,3	2,2	2,6	2,3	2,3	2,3	2,7
10	Narirutine	8,4	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr
11	Diosmine	8,5	0,1	0,4	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1
12	Néohesperidine	8,5	3,2	3,6	4,2	3,4	3,6	3,3	3,9	3,2	3,8
14	Rutine	8,6	10,0	9,2	8,2	9,7	14,4	13,0	14,6	13,7	9,5
16	Robinétine triméthylether	8,7	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,3	0,2	0,2
22	Lutéoline	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
23	Sinensétine	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
25	Casticine	11,2	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
27	Nobilétine	11,3	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
29	Tangéretine	11,8	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
30	Retusine	12,4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Acides phénoliques		5,4	5,4	5,0	5,4	4,9	5,3	5,3	5,1	5,6
	Dérivés acides organiques		164,3	163,6	137,2	148,0	161,6	151,1	168,2	146,5	153,8
	Flavones		tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Flavones glycosylés		0,1	0,4	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1
	Flavanones glycosylées		4,0	4,5	5,0	4,2	4,5	4,1	4,9	4,1	4,7
	Flavonols		0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,3	0,2	0,2
	Flavonols glycosylés		12,2	11,8	10,5	11,9	16,9	15,3	16,9	16,0	12,2
	<b>Total</b>		<b>186,2</b>	<b>185,8</b>	<b>158,1</b>	<b>169,9</b>	<b>188,4</b>	<b>176,1</b>	<b>195,7</b>	<b>172,0</b>	<b>176,5</b>



Tableau A21 : Composition phénolique de la macération E

n°	Composés	TR (mn)	J <sub>1</sub>	J <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>10</sub>
2	Ac. Shikimique	2,2	4,6	4,5	4,6	4,0	4,1	4,0	4,4	4,6	4,3
3	Ac. Quinique	2,4	203,9	198,4	175,3	189,5	188,0	192,6	196,3	210,1	208,6
4	Ac. Vanillique	3,3	1,5	1,5	1,5	1,8	1,3	1,7	1,7	1,6	1,5
5	Ac. p-Coumarique	6,7	3,8	3,7	3,7	3,8	3,7	4,0	3,9	3,6	3,8
6	Ac. Sinapique	7,2	0,6	0,7	0,4	0,4	0,2	0,6	0,5	0,5	0,5
7	Ac. Ferulique	7,4	0,5	0,5	0,4	0,7	0,8	0,7	0,6	0,7	0,8
8	Flavanomaréine	7,7	1,1	1,1	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0	1,1	1,1
9	Hyperoside	8,3	2,8	3,0	2,7	3,3	2,8	2,8	2,9	3,4	2,7
10	Narirutine	8,4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
11	Diosmine	8,5	0,2	0,4	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
12	Néohespéridine	8,5	4,7	4,3	3,8	4,6	5,1	4,3	4,2	4,7	3,9
14	Rutine	8,6	11,8	15,8	17,5	11,2	10,1	18,0	11,4	14,7	13,5
16	Robinétine triméthylether	8,7	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,5	0,2
22	Lutéoline	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
23	Sinensétine	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
25	Casticine	11,2	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
27	Nobilétine	11,3	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
29	Tangéretine	11,8	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
30	Retusine	12,4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Acides phénoliques		6,3	6,5	6,0	6,7	6,1	6,9	6,7	6,3	6,6
	Dérivés acides organiques		208,5	202,9	179,9	193,5	192,1	196,6	200,8	214,7	212,9
	Flavones		tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Flavones glycosylés		0,2	0,4	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
	Flavanones glycosylées		5,8	5,3	4,8	5,6	6,1	5,4	5,2	5,8	5,0
	Flavonols		0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,5	0,2
	Flavonols glycosylés		14,6	18,8	20,2	14,4	12,9	20,8	14,3	18,0	16,2
	<b>Total</b>		<b>235,7</b>	<b>234,2</b>	<b>211,3</b>	<b>220,6</b>	<b>217,5</b>	<b>230,1</b>	<b>227,6</b>	<b>245,6</b>	<b>241,1</b>

Tableau A22 : Composition phénolique de la macération F

n°	Composés	TR (mn)	J <sub>1</sub>	J <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>10</sub>
2	Ac. Shikimique	2,2	5,0	5,2	4,8	4,9	4,6	4,8	4,9	4,9	4,6
3	Ac. Quinique	2,4	225,8	226,6	213,3	209,5	220,0	230,6	218,3	219,3	220,5
4	Ac. Vanillique	3,3	1,7	1,8	1,8	2,1	1,8	2,0	2,0	1,8	1,8
5	Ac. p-Coumarique	6,7	4,4	4,4	4,4	4,5	4,4	5,0	4,6	4,2	4,5
6	Ac. Sinapique	7,2	0,7	0,9	0,4	0,5	0,3	0,7	0,6	0,6	0,6
7	Ac. Ferulique	7,4	0,5	0,7	0,5	0,9	1,0	0,8	0,7	0,9	0,9
8	Flavanomarine	7,7	1,3	1,4	1,2	1,2	1,2	1,3	1,2	1,3	1,3
9	Hyperoside	8,3	3,3	3,5	3,2	3,9	3,3	3,4	3,5	4,0	3,2
10	Narirutine	8,4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
11	Diosmine	8,5	0,2	0,5	0,3	0,2	0,2	0,1	0,3	0,3	0,2
12	Néohespéridine	8,5	5,5	6,0	4,5	5,5	6,1	5,8	5,0	5,6	4,6
14	Rutine	8,6	15,8	18,5	20,8	15,3	16,0	21,7	16,4	19,8	17,4
16	Robinétine triméthylether	8,7	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,6	0,2
22	Lutéoline	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
23	Sinensétine	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
25	Casticine	11,2	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
27	Nobilétine	11,3	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
29	Tangéretine	11,8	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
30	Retusine	12,4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Acides phénoliques		7,4	7,8	7,2	8,0	7,5	8,5	8,0	7,6	7,8
	Dérivés acides organiques		230,9	231,8	218,1	214,4	224,6	235,4	223,2	224,2	225,0
	Flavones		tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Flavones glycosylés		0,2	0,5	0,3	0,2	0,2	0,1	0,3	0,3	0,2
	Flavanones glycosylées		6,8	7,4	5,7	6,7	7,3	7,0	6,2	7,0	5,9
	Flavonols		0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,6	0,2
	Flavonols glycosylés		19,0	22,0	24,0	19,2	19,3	25,1	19,9	23,8	20,7
	<b>Total</b>		<b>264,7</b>	<b>269,9</b>	<b>255,5</b>	<b>248,6</b>	<b>259,2</b>	<b>276,6</b>	<b>257,9</b>	<b>263,4</b>	<b>259,8</b>

Tableau A23 : Composition phénolique de la macération G

n°	Composés	TR (mn)	J <sub>1</sub>	J <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>10</sub>
2	Ac. Shikimique	2,2	3,1	3,2	3,1	3,5	3,4	2,9	3,2	3,6	3,6
3	Ac. Quinique	2,4	140,0	147,0	124,4	148,6	153,3	134,8	137,3	152,8	132,6
4	Ac. Vanillique	3,3	1,3	1,1	1,0	1,1	1,1	1,2	1,2	1,2	1,2
5	Ac. p-Coumarique	6,7	2,9	2,5	2,8	2,9	2,9	2,9	2,8	3,0	2,9
6	Ac. Sinapique	7,2	0,3	0,4	0,2	0,6	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3
7	Ac. Ferulique	7,4	0,6	0,5	0,6	0,4	0,6	0,5	0,4	0,4	0,3
8	Flavanomaréine	7,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,7	0,9	0,8
9	Hyperoside	8,3	2,5	2,4	2,1	2,4	2,1	2,0	2,1	2,2	2,1
10	Narirutine	8,4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
11	Diosmine	8,5	0,1	0,2	0,1	0,3	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
12	Néohespéridine	8,5	3,5	3,4	3,9	3,3	3,0	3,2	3,1	3,6	3,0
14	Rutine	8,6	8,8	13,3	7,6	8,6	11,2	9,0	12,1	13,6	12,7
16	Robinétine triméthylether	8,7	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
22	Lutéoline	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
23	Sinensétine	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
25	Casticine	11,2	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
27	Nobilétine	11,3	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
29	Tangéretine	11,8	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
30	Retusine	12,4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Acides phénoliques		5,2	4,5	4,7	5,0	5,0	5,1	4,9	4,9	4,7
	Dérivés acides organiques		143,0	150,3	127,6	152,1	156,6	137,7	140,5	156,4	136,2
	Flavones		tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Flavones glycosylés		0,1	0,2	0,1	0,3	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
	Flavanones glycosylées		4,3	4,2	4,7	4,2	3,8	3,9	3,8	4,5	3,8
	Flavonols		0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	Flavonols glycosylés		11,3	15,8	9,8	11,0	13,3	11,0	14,2	15,8	14,8
	<b>Total</b>		<b>164,1</b>	<b>175,2</b>	<b>147,0</b>	<b>172,8</b>	<b>178,9</b>	<b>158,0</b>	<b>163,8</b>	<b>182,0</b>	<b>160,0</b>

Tableau A24 : Composition phénolique de la macération H

n°	Composés	TR (mn)	J <sub>1</sub>	J <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>10</sub>
2	Ac. Shikimique	2,2	3,7	3,9	3,9	4,0	3,5	3,5	3,9	4,1	4,3
3	Ac. Quinique	2,4	169,4	179,9	153,1	169,4	167,1	170,6	165,4	175,9	168,4
4	Ac. Vanillique	3,3	1,6	1,3	1,3	1,3	1,2	1,5	1,5	1,3	1,5
5	Ac. p-Coumarique	6,7	3,5	3,1	3,5	3,3	3,1	3,6	3,4	3,4	3,5
6	Ac. Sinapique	7,2	0,4	0,4	0,2	0,7	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4
7	Ac. Ferulique	7,4	0,7	0,6	0,8	0,5	0,6	0,6	0,5	0,4	0,4
8	Flavanomarine	7,7	1,0	1,0	1,0	0,9	0,9	0,9	0,9	1,0	1,0
9	Hyperoside	8,3	3,0	2,9	2,6	2,7	2,2	2,5	2,6	2,5	2,6
10	Narirutine	8,4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
11	Diosmine	8,5	0,1	0,2	0,1	0,4	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
12	Néohesperidine	8,5	4,3	4,1	4,8	3,8	3,2	3,9	3,7	4,1	3,6
14	Rutine	8,6	10,7	14,2	9,4	9,8	12,2	11,0	14,5	15,5	15,4
16	Robinétine triméthylether	8,7	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2
22	Lutéoline	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
23	Sinensétine	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
25	Casticine	11,2	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
27	Nobilétine	11,3	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
29	Tangéretine	11,8	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
30	Retusine	12,4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Acides phénoliques		6,2	5,5	5,8	5,7	5,4	6,2	5,9	5,6	5,7
	Dérivés acides organiques		173,0	183,8	156,9	173,4	170,5	174,1	169,3	180,0	172,8
	Flavones		tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Flavones glycosylés		0,1	0,2	0,1	0,4	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
	Flavanones glycosylées		5,2	5,0	5,7	4,7	4,1	4,8	4,6	5,2	4,6
	Flavonols		0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2
	Flavonols glycosylés		13,7	17,1	12,0	12,5	14,4	13,5	17,0	18,0	18,0
	<b>Total</b>		<b>198,6</b>	<b>212,0</b>	<b>180,8</b>	<b>197,0</b>	<b>194,8</b>	<b>198,9</b>	<b>197,3</b>	<b>209,2</b>	<b>201,5</b>

Tableau A25 : Composition phénolique de la macération I

n°	Composés	TR (mn)	J <sub>1</sub>	J <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>10</sub>
2	Ac. Shikimique	2,2	4,1	4,2	4,8	4,7	4,0	4,1	4,4	4,0	4,0
3	Ac. Quinique	2,4	191,3	193,7	194,3	199,9	193,8	201,6	189,9	186,7	184,3
4	Ac. Vanillique	3,3	1,8	1,4	1,6	1,5	1,4	1,7	1,7	1,4	1,6
5	Ac. p-Coumarique	6,7	4,0	3,3	4,4	3,9	3,6	4,1	3,8	3,7	3,6
6	Ac. Sinapique	7,2	0,4	0,5	0,3	0,8	0,5	0,6	0,5	0,5	0,4
7	Ac. Ferulique	7,4	0,8	0,7	1,0	0,6	0,7	0,7	0,6	0,4	0,4
8	Flavanomarine	7,7	1,1	1,0	1,2	1,1	1,0	1,1	1,0	1,1	1,1
9	Hyperoside	8,3	3,4	3,1	3,6	3,2	2,6	2,9	2,9	2,7	2,8
10	Narirutine	8,4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
11	Diosmine	8,5	0,1	0,2	0,2	0,4	0,1	0,1	0,2	0,2	0,3
12	Néohesperidine	8,5	4,8	4,4	6,0	4,5	3,7	4,4	4,2	4,5	4,0
14	Rutine	8,6	12,0	16,4	11,7	11,6	14,2	12,6	16,4	16,2	15,9
16	Robinétine triméthylether	8,7	0,2	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2
22	Lutéoline	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
23	Sinensétine	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
25	Casticine	11,2	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
27	Nobilétine	11,3	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
29	Tangéretine	11,8	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
30	Retusine	12,4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Acides phénoliques		7,0	5,9	7,2	6,8	6,3	7,1	6,7	6,1	6,0
	Dérivés acides organiques		195,5	198,0	199,2	204,6	197,8	205,7	194,3	190,6	188,3
	Flavones		tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Flavones glycosylés		0,1	0,2	0,2	0,4	0,1	0,1	0,2	0,2	0,3
	Flavanones glycosylées		5,9	5,4	7,2	5,6	4,7	5,5	5,2	5,6	5,1
	Flavonols		0,2	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2
	Flavonols glycosylés		15,4	19,6	15,3	14,7	16,8	15,5	19,3	18,9	18,7
	<b>Total</b>		<b>224,0</b>	<b>229,6</b>	<b>229,3</b>	<b>232,4</b>	<b>225,9</b>	<b>234,2</b>	<b>225,9</b>	<b>221,8</b>	<b>218,6</b>

Tableau A26 : Composition phénolique de la liqueur C-S<sub>4</sub>

n°	Composés	TR (mn)	J <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>	M <sub>7</sub>	M <sub>8</sub>	M <sub>9</sub>	M <sub>10</sub>	M <sub>11</sub>	M <sub>12</sub>
2	Ac. Shikimique	2,2	2,2	2,3	2,4	2,2	2,2	2,1	2,4	2,4	2,4	2,0	2,3	2,1	2,5	2,0	2,2	2,1
3	Ac. Quinique	2,4	103,9	103,8	92,5	106,0	97,1	96,1	104,7	93,3	107,6	99,3	107,3	98,3	108,7	96,3	96,0	100,4
4	Ac. Vanillique	3,3	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9	0,8	0,8	0,8	0,7
5	Ac. p-Coumarique	6,7	1,9	1,9	2,0	1,9	1,9	1,9	2,0	2,0	2,0	2,0	1,8	2,0	2,0	2,0	1,9	1,8
6	Ac. Sinapique	7,2	0,3	0,4	0,2	0,3	0,3	0,1	0,4	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,1
7	Ac. Ferulique	7,4	0,4	0,3	0,2	0,4	0,3	0,4	0,3	0,2	0,2	0,3	0,4	0,4	0,2	0,3	0,3	0,4
8	Flavanomarine	7,7	0,5	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,5	0,5
9	Hyperoside	8,3	1,3	1,6	1,4	1,4	1,5	1,4	1,6	1,4	1,5	1,4	1,7	1,7	1,5	1,4	1,4	1,4
10	Narirutine	8,4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
11	Diosmine	8,5	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1
12	Néohespéridine	8,5	1,9	2,2	2,0	2,0	2,1	2,6	2,3	2,0	2,5	2,1	2,4	2,4	2,5	2,2	2,1	2,5
14	Rutine	8,6	7,2	8,3	9,2	7,4	5,6	5,2	8,3	9,3	6,2	8,9	8,3	5,8	6,3	9,0	7,6	8,1
16	Robinétine triméthylether	8,7	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1
22	Lutéoline	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
23	Sinensétine	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
25	Casticine	11,2	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Acides phénoliques		3,2	3,4	3,3	3,3	3,3	3,1	3,2	3,2	3,4	3,2	3,3	3,4	3,2	3,5	3,4	3,5
	Dérivés acides organiques		106,1	106,1	110,0	108,2	99,3	98,2	94,9	95,7	107,1	95,7	110,0	101,3	109,6	100,4	111,2	98,3
	Flavones		tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Flavones glycosylés		0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0
	Flavanones glycosylés		2,4	2,8	2,5	2,5	2,6	3,1	2,8	2,6	3,1	2,7	2,9	2,9	3,1	2,7	2,5	3,0
	Flavonols		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1
	Flavonols glycosylés		8,6	9,8	7,7	8,7	7,1	6,6	10,6	10,7	9,9	10,7	7,7	10,3	10,0	7,5	7,8	10,4
	<b>Total</b>		<b>120,5</b>	<b>122,5</b>	<b>111,5</b>	<b>122,9</b>	<b>112,6</b>	<b>111,2</b>	<b>123,6</b>	<b>112,4</b>	<b>124,4</b>	<b>117,9</b>	<b>126,0</b>	<b>114,5</b>	<b>125,7</b>	<b>115,0</b>	<b>113,3</b>	<b>118,2</b>

Tableau A27 : Composition phénolique de la liqueur C-S<sub>8</sub>

n°	Composés	TR (mn)	J <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>	M <sub>7</sub>	M <sub>8</sub>	M <sub>9</sub>	M <sub>10</sub>	M <sub>11</sub>	M <sub>12</sub>
2	Ac. Shikimique	2,2	2,3	2,4	2,2	2,1	2,3	2,0	2,3	2,5	2,7	2,6	2,4	2,0	2,4	1,8	2,4	2,1
3	Ac. Quinique	2,4	109,5	114,3	105,2	95,4	103,7	93,7	94,0	96,4	105,1	100,4	97,6	97,1	103,3	106,7	107,9	102,5
4	Ac. Vanillique	3,3	0,8	0,8	0,7	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,9	0,6	0,7	0,7	0,7	0,8	0,7	0,8
5	Ac. p-Coumarique	6,7	2,0	2,0	1,9	1,9	2,0	1,8	1,9	2,0	2,2	2,0	1,9	2,0	1,9	2,1	1,9	1,8
6	Ac. Sinapique	7,2	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,4
7	Ac. Ferulique	7,4	0,4	0,4	0,3	0,4	0,5	0,4	0,2	0,2	0,2	0,3	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	0,4
8	Flavanomaréine	7,7	0,6	0,6	0,5	0,5	0,6	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,5	0,6	0,6	0,5
9	Hyperoside	8,3	1,4	1,5	1,4	1,4	1,5	1,4	1,4	1,5	1,6	1,6	1,4	1,5	1,5	1,7	1,6	1,6
10	Narirutine	8,4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
11	Diosmine	8,5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
12	Néohespéridine	8,5	2,0	2,1	1,9	2,6	2,8	2,5	1,9	2,1	2,3	2,0	2,3	2,0	2,6	2,4	2,3	2,5
14	Rutine	8,6	7,6	7,9	7,3	5,6	5,6	5,2	8,9	9,6	10,2	6,4	6,9	5,8	7,4	7,6	7,2	8,0
16	Robinétine triméthylether	8,7	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
22	Lutéoline	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
23	Sinensétine	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
25	Casticine	11,2	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Acides phénoliques		3,4	3,6	3,6	3,1	3,4	3,1	3,2	3,3	3,1	3,3	3,6	3,2	3,3	3,4	3,3	3,6
	Dérivés acides organiques		111,8	116,7	107,9	97,4	105,9	95,7	107,4	98,9	96,3	98,9	107,9	103,0	100,0	99,1	105,7	108,5
	Flavones		tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Flavones glycosylées		0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1
	Flavanones glycosylées		2,6	2,7	2,5	3,1	3,4	3,0	2,4	2,6	2,9	2,6	2,9	2,6	3,1	3,0	2,9	3,0
	Flavonols		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	Flavonols glycosylés		9,0	9,4	11,8	7,0	7,1	6,6	8,7	11,1	10,2	11,1	11,8	8,0	8,3	7,3	8,9	9,3
	<b>Total</b>		<b>127,1</b>	<b>132,6</b>	<b>121,9</b>	<b>110,8</b>	<b>120,1</b>	<b>108,5</b>	<b>112,4</b>	<b>116,1</b>	<b>126,5</b>	<b>117,0</b>	<b>114,8</b>	<b>112,7</b>	<b>121,2</b>	<b>124,6</b>	<b>125,5</b>	<b>120,8</b>

Tableau A28 : Composition phénolique de la liqueur C-S<sub>10</sub>

n°	Composés	TR (mn)	J <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>	M <sub>7</sub>	M <sub>8</sub>	M <sub>9</sub>	M <sub>10</sub>	M <sub>11</sub>	M <sub>12</sub>
2	Ac. Shikimique	2,2	2,3	2,2	2,2	2,3	2,3	2,5	2,1	2,0	2,4	2,6	2,1	2,5	1,8	2,0	1,9	2,3
3	Ac. Quinique	2,4	105,6	96,8	104,7	98,0	102,6	94,8	95,2	103,9	101,6	100,8	102,4	96,2	99,8	95,9	108,4	107,3
4	Ac. Vanillique	3,3	0,6	0,8	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,7	0,7	0,6	0,8	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8
5	Ac. p-Coumarique	6,7	2,0	1,8	2,0	1,9	2,0	2,0	1,9	1,8	1,9	2,0	2,1	2,2	1,9	2,1	1,9	2,0
6	Ac. Sinapique	7,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2
7	Ac. Ferulique	7,4	0,5	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	0,5	0,2	0,2	0,5	0,3	0,4	0,4	0,4
8	Flavanomaréine	7,7	0,6	0,6	0,6	0,6	0,5	0,5	0,6	0,6	0,5	0,5	0,6	0,6	0,5	0,6	0,6	0,6
9	Hyperoside	8,3	1,4	1,5	1,4	1,3	1,3	1,4	1,5	1,7	1,6	1,6	1,4	1,5	1,3	1,5	1,6	1,6
10	Narirutine	8,4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
11	Diosmine	8,5	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
12	Néohespéridine	8,5	2,6	2,2	1,8	2,3	2,4	2,6	2,4	2,7	2,1	2,8	2,3	1,9	2,6	2,0	2,5	2,4
14	Rutine	8,6	5,9	6,8	7,2	6,3	5,8	5,9	8,0	7,2	6,3	7,0	9,7	6,3	7,1	8,2	7,6	7,5
16	Robinétine triméthylether	8,7	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
22	Lutéoline	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
23	Sinensétine	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
25	Casticine	11,2	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Acides phénoliques		3,3	3,0	3,5	2,9	3,3	3,2	3,3	2,9	3,1	2,9	3,5	3,0	3,3	3,6	3,1	3,6
	Dérivés acides organiques		107,9	99,0	104,0	100,3	104,9	97,3	106,9	105,9	97,3	105,9	104,0	103,4	104,5	98,7	101,6	97,9
	Flavones		tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Flavones glycosylées		0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
	Flavanones glycosylées		3,2	2,8	2,4	2,9	2,9	3,1	3,0	3,3	2,6	3,3	2,9	2,5	3,1	2,6	3,1	3,0
	Flavonols		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	Flavonols glycosylés		7,3	8,3	7,9	7,6	7,1	7,3	8,6	8,9	9,5	8,9	7,9	8,6	11,1	7,8	8,4	9,7
	<b>Total</b>		<b>121,8</b>	<b>113,4</b>	<b>121,5</b>	<b>113,9</b>	<b>118,4</b>	<b>111,1</b>	<b>113,1</b>	<b>121,2</b>	<b>118,3</b>	<b>118,6</b>	<b>122,1</b>	<b>112,8</b>	<b>116,4</b>	<b>114,0</b>	<b>126,1</b>	<b>125,3</b>



Tableau A29 : Composition phénolique de la liqueur **B-S<sub>8</sub>**

n°	Composés	TR (mn)	J <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>	M <sub>7</sub>	M <sub>8</sub>	M <sub>9</sub>	M <sub>10</sub>	M <sub>11</sub>	M <sub>12</sub>
2	Ac. Shikimique	2,2	1,5	1,7	1,7	1,7	1,9	1,9	1,7	1,9	2,0	1,8	1,7	1,8	1,5	1,9	2,0	2,0
3	Ac. Quinique	2,4	80,9	80,2	85,4	83,5	77,2	89,2	81,2	76,8	81,8	87,1	78,6	84,4	79,7	88,6	76,5	85,3
4	Ac. Vanillique	3,3	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	0,6	0,7	0,6	0,6	0,6	0,5	0,6	0,7	0,6	0,7	0,6
5	Ac. p-Coumarique	6,7	1,7	1,6	1,6	1,6	1,6	1,5	1,6	1,5	1,6	1,6	1,5	1,6	1,7	1,6	1,6	1,5
6	Ac. Sinapique	7,2	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2
7	Ac. Ferulique	7,4	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3
8	Flavanomaréine	7,7	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,5	0,4	0,3	0,4	0,5	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,5
9	Hyperoside	8,3	1,1	1,4	1,1	1,3	1,1	1,4	1,2	1,2	1,2	1,4	1,2	1,3	1,2	1,1	1,2	1,4
10	Narirutine	8,4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
11	Diosmine	8,5	tr	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	tr	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	0,1
12	Néohespéridine	8,5	1,8	1,7	1,6	1,7	1,6	1,9	1,8	2,0	2,0	2,0	2,1	1,8	1,8	1,9	1,7	2,0
14	Rutine	8,6	6,9	4,9	5,8	6,3	6,2	7,3	4,8	4,2	5,1	4,9	4,2	6,4	7,3	6,9	6,7	7,0
16	Robinétine triméthylether	8,7	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
22	Lutéoline	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
23	Sinensétine	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
25	Casticine	11,2	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Acides phénoliques		2,8	2,6	2,7	2,8	2,6	2,6	2,7	2,5	2,8	2,5	2,7	2,7	2,6	2,7	2,9	2,8
	Dérivés acides organiques		82,4	81,9	83,8	85,2	79,1	91,1	87,1	78,7	82,9	78,7	83,8	88,9	80,3	86,2	81,2	90,5
	Flavones		tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Flavones glycosylées		tr	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	tr	tr	0,1	0,1	0,1	tr	0,1
	Flavanones glycosylées		2,2	2,1	2,0	2,1	1,9	2,4	2,2	2,3	2,4	2,5	2,5	2,2	2,1	2,2	2,1	2,5
	Flavonols		0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	Flavonols glycosylés		8,0	6,3	6,3	7,6	7,3	8,7	6,9	5,3	6,0	5,3	6,3	6,3	5,4	7,7	8,5	8,0
	<b>Total</b>		<b>95,6</b>	<b>93,1</b>	<b>98,9</b>	<b>98,0</b>	<b>91,2</b>	<b>105,0</b>	<b>94,1</b>	<b>89,1</b>	<b>95,3</b>	<b>100,6</b>	<b>91,0</b>	<b>99,0</b>	<b>94,8</b>	<b>103,6</b>	<b>91,4</b>	<b>101,1</b>

Tableau A30 : Composition phénolique de la liqueur commerciale

n°	Composés	TR (mn)	J <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>	M <sub>7</sub>	M <sub>8</sub>	M <sub>9</sub>	M <sub>10</sub>	M <sub>11</sub>	M <sub>12</sub>
2	Ac. Shikimique	2,2	1,6	1,7	1,7	1,6	1,5	1,4	1,5	1,6	2,1	1,6	1,9	2,0	1,7	1,6	1,8	1,6
3	Ac. Quinique	2,4	79,4	81,3	83,4	85,7	86,0	81,9	78,2	82,0	77,6	82,0	78,4	86,9	84,5	88,3	84,7	86,1
4	Ac. Vanillique	3,3	0,5	0,7	0,8	0,8	0,6	0,6	0,5	0,7	0,7	0,5	0,5	0,7	0,7	0,7	0,7	0,6
5	Ac. p-Coumarique	6,7	1,8	1,4	1,5	1,7	1,7	1,6	1,6	1,7	1,6	1,7	1,6	1,4	1,7	1,5	1,6	1,7
6	Ac. Sinapique	7,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2
7	Ac. Ferulique	7,4	0,2	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2
8	Flavanomarine	7,7	0,5	0,4	0,4	0,4	0,3	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4
9	Hyperoside	8,3	1,0	1,1	1,3	1,3	1,2	1,4	1,3	1,3	1,2	1,2	1,4	1,3	1,1	1,0	1,3	1,2
10	Narirutine	8,4	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
11	Diosmine	8,5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	tr
12	Néohesperidine	8,5	1,9	2,0	1,8	2,0	1,5	1,6	1,9	1,7	2,0	1,8	1,6	1,6	2,1	1,9	2,0	1,8
14	Rutine	8,6	5,7	5,0	7,0	5,9	5,5	6,8	5,4	6,0	5,6	5,2	5,5	6,3	6,9	5,6	6,6	5,5
16	Robinétine triméthylether	8,7	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
22	Lutéoline	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
23	Sinensétine	11,0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
25	Casticine	11,2	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Acides phénoliques		2,7	2,6	2,9	3,2	2,7	2,7	2,8	2,5	2,9	2,5	2,9	2,7	2,6	2,6	2,9	2,7
	Dérivés acides organiques		81,0	83,0	79,7	87,3	87,5	83,3	85,1	79,7	83,6	79,7	79,7	83,6	80,3	88,9	86,2	89,9
	Flavones		tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Flavones glycosylées		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	tr
	Flavanones glycosylées		2,4	2,4	2,2	2,4	1,8	2,1	2,1	2,4	2,4	2,2	2,0	2,0	2,4	2,2	2,4	2,2
	Flavonols		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	Flavonols glycosylés		6,7	6,1	6,8	7,2	6,7	8,2	8,3	6,7	7,3	6,7	6,8	6,4	6,9	7,6	8,0	6,6
	<b>Total</b>		<b>93,0</b>	<b>94,3</b>	<b>98,7</b>	<b>100,4</b>	<b>98,9</b>	<b>96,4</b>	<b>91,5</b>	<b>96,1</b>	<b>91,9</b>	<b>95,1</b>	<b>92,0</b>	<b>101,3</b>	<b>99,6</b>	<b>101,5</b>	<b>99,7</b>	<b>99,4</b>

---

## Abstract

---

This thesis, developed in partnership with Mavela Company and INRA of Corsica, focuses on the study of two plants traditionally used in Corsica for spirit preparations (Liqueur and Eau-de-vie): common myrtle (*Myrtus communis* L.) and citron (*Citrus medica* L.).

The thesis is divided into two main parts:

- A fundamental part; the aim is to establish a methodology for the analysis of phenolic composition of alcoholic beverages by liquid chromatography coupled with mass spectrometry of the one hand, and to identify the flavonoid fragmentation rules, on the other hand.
- An applied part; the objective is the quality definition of Corsican spirits using chemical markers. For this purpose, the intraspecific chemical variability of *M. communis* berries and the characterisation of several citron varieties are studied in terms of volatile and phenolic compositions.

The volatile composition of *M. communis* is dominated by  $\alpha$ -pinene and 1,8-cineole whereas the phenolic composition is rich in myricetin, myricetin-3-*O*-arabinoside, myricetin-3-*O*-galactoside and epigallocatechin. These terpenic and phenolic “fingerprint” of *M. communis* berries are also reported in corresponding liqueurs and eau-de-vie. Furthermore, essential oil of myrtle berries is homogeneous in all sample locations.

Morphological, genetic and chemical characteristics of 24 citron cultivars are used to differentiate “ancestral” varieties from “hybrid” varieties. Based on morphological and genetic diversity analysis, 13 cultivars included Corsican citron (*Citrus medica* L. var. *corsican*) are considered like ancestral citrons while the other 11 varieties are hybrids between citrons and other species of *Citrus* genus. Essential oils from ancestral citrons are distinguished from other varieties by limonene/neral/geranial or limonene/nerol/geraniol for leaf chemotypes and limonene/ $\gamma$ -terpinene or limonene/neral/geranial for peel chemotypes. The distinction between ancestral and hybrid citrons could not be demonstrated using phenolic composition.

The chemical analysis of liqueurs produced from Corsican citron is also investigated to study the influence of fruit maturity on spirit qualities. It appears that the harvest date has no impact on the volatile compositions. In contrast, the phenolic acid concentrations and their derivatives decreased sharply during fruit development. In addition, the quality assessment of alcoholic beverages depends on the experimental conditions of preparation.

Finally, this thesis is the first step to establish by official designations a program for the protection of geographical and botanical origins of these Corsican productions.

---

### DISCIPLINE:

**Organic and Analytic Chemistry**

---

### KEY WORDS

*Myrtus communis* L., *Citrus medica* L., essential oil, liqueur, GC, GC/MS, SPME, HPLC/MS-ESI, flavonoid, chemical variability.

---

---

## Résumé

---

Ce travail de thèse, développé en partenariat avec la Société Mavela et l'INRA de Corse, est axé autour de l'étude de deux plantes traditionnellement utilisées en Corse pour la préparation de spiritueux (liqueur et eau de vie) : le myrte commun (*Myrtus communis* L.) et le cédrat (*Citrus medica* L.).

Le mémoire de thèse se décline en deux parties principales :

- Une partie fondamentale visant à établir une méthodologie d'analyse des spiritueux par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, d'une part, et à définir et à réunir en un même corpus les règles de fragmentation des flavonoïdes, d'autre part.
- Une partie appliquée dont l'objectif est de contribuer à la définition d'une qualité en termes de compositions volatile et phénolique. Ainsi, nous avons étudié la variabilité intraspécifique des baies de myrte récoltées en Corse et nous avons caractérisé différentes variétés de cédrats.

La composition volatile des baies de myrte est dominée par le couple  $\alpha$ -pinène/1,8-cinéole alors que la composition phénolique est riche en myricétine, myricétine-3-*O*-arabinoside, myricétine-3-*O*-galactoside et en épigallocatechine. Cette « empreinte » chimique des baies est retrouvée dans les liqueurs et les eaux de vie correspondantes. En outre, les huiles essentielles ont une composition homogène pour l'ensemble des lieux d'échantillonnage.

L'étude des caractéristiques morphologiques, génétiques, et chimiques de 24 variétés de cédrat a permis de différencier les variétés « ancestrales » et les variétés « hybrides ». Sur la base de l'analyse de la diversité morphologique et génétique, 13 variétés dont le cédrat de Corse (*Citrus medica* var. *corsican*) sont considérées comme des cédrats ancestraux alors que les 11 autres cultivars sont assimilés à des hybrides entre les cédratiers et d'autres espèces du genre *Citrus*. Au niveau de la composition chimique des huiles essentielles, les cédratiers ancestraux se distinguent des autres variétés par des chimiotypes à limonène/néral/géranial ou limonène/nérol/géranol pour les feuilles et à limonène/ $\gamma$ -terpinène ou limonène/néral/géranial pour les zestes. Au niveau des composés phénoliques, la distinction entre les cédrats ancestraux et hybrides n'a pas pu être mise en évidence.

L'étude de la composition chimique des liqueurs élaborées à partir du cédrat de Corse a permis d'étudier l'influence de la maturité des fruits sur la qualité des spiritueux. Il apparaît que la date de récolte n'a pas d'impact sur la composition en volatils. A contrario, les concentrations en acides phénoliques et en leurs dérivés diminuent fortement au cours du développement du fruit. En outre, nous avons défini la qualité de la liqueur en fonction des conditions expérimentales de sa préparation.

Enfin, ce travail de doctorat est la première étape de la mise en place d'un programme de protection de l'origine géographique et botanique de ces productions identitaires.

---

### DISCIPLINE :

**Chimie Organique et Analytique**

---

### MOTS CLES

*Myrtus communis* L., *Citrus medica* L., huile essentielle, liqueur, CPG, CPG/SM, MEPS, CLHP/SM-ESI, flavonoïde, variabilité chimique.

---

