



**HAL**  
open science

**Contribution de la RMN 13C à l'analyse des huiles végétales, huiles essentielles et résines (*Olea europaea*, *Pinus halepensis* et *Cedrus atlantica*)**

A.-M. Nam

► **To cite this version:**

A.-M. Nam. Contribution de la RMN 13C à l'analyse des huiles végétales, huiles essentielles et résines (*Olea europaea*, *Pinus halepensis* et *Cedrus atlantica*). Chimie analytique. Université Pascal Paoli, 2014. Français. NNT : 377 . tel-00978825

**HAL Id: tel-00978825**

**<https://theses.hal.science/tel-00978825>**

Submitted on 8 May 2014

**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**  
Centre de recherche UMR CNRS 6134 (SPE)



**Thèse présentée pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR EN CHIMIE**  
**Mention : chimie théorique, physique, analytique**

**Soutenue publiquement par  
ANNE-MARIE NAM**

le 21 mars 2014

---

**Contribution de la RMN  $^{13}\text{C}$  à l'analyse  
des huiles végétales, huiles essentielles et résines  
(*Olea europaea*, *Pinus halepensis* et *Cedrus atlantica*)**

---

**Directeurs :**

M. Ange Bighelli, Professeur, Université de Corse  
M. Félix Tomi, Professeur, Université de Corse

**Rapporteurs :**

M. Pierre Giampaoli, Professeur, Centre de Massy AgroParisTech  
M. Hichem Ben Jannet, Professeur, Université de Monastir

**Jury**

M. Nicolas Baldovini, MC, Université de Nice Sophia Antipolis  
M. Joseph Casanova, Professeur émérite, Université de Corse  
M. Pierre Giampaoli, Professeur, Centre de Massy AgroParisTech  
M. Hichem Ben Jannet, Professeur, Université de Monastir  
M. Ange Bighelli, Professeur, Université de Corse  
M. Félix Tomi, Professeur, Université de Corse

*« Même un voyage de mille lieues commence par un pas »*

*Lao-Tseu*

---

## AVANT-PROPOS

---

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse, associée au CNRS (UMR 6134 « Sciences pour l'Environnement »), sous la direction de Messieurs Ange Bighelli et Félix Tomi (Professeurs, Université de Corse).

Je tiens à leur exprimer ma profonde reconnaissance. Ils m'ont permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions, grâce à leur disponibilité et leur expérience. Je vous remercie de m'avoir fait confiance. Qu'ils veuillent bien trouver ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

Je suis également sensible à l'honneur que me font M. Pierre Giampaoli (Professeur, Centre de Massy AgroParisTech) et M. Hichem Ben Jannet (Professeur, Université de Monastir) en acceptant d'être les rapporteurs de ce travail. Je suis très heureux de bénéficier de leurs recommandations et je tiens à leur exprimer ma sincère reconnaissance pour cette marque d'intérêt.

Que M. Nicolas Baldovini (MC, Université de Nice Sophia Antipolis) qui a accepté de participer à cette Commission d'Examen, trouve ici l'expression de mes sincères remerciements pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail.

Je tiens également à remercier M. Joseph Casanova (Professeur émérite, Université de Corse) pour sa grande disponibilité, son enthousiasme et l'attention qu'il a portée à ce travail. Son expérience et sa rigueur scientifique m'ont été plus que bénéfiques au cours de mes années de Doctorat.

Je remercie la Collectivité Territoriale de Corse de m'avoir attribué un contrat doctoral, qui m'a permis de réaliser cette thèse.

Je tiens à remercier l'école doctorale pour leur disponibilité et leur patience : M. Jean Costa (Professeur et directeur de l'ED, Université de Corse) et M. David Mounzar (Responsable Administratif de l'ED).

Mes remerciements vont également à M. Vincent Castola (Professeur, Université de Corse), mon directeur de stage de Master 2, pour ses nombreux conseils et son soutien mais également à Mesdames Pascale Bradesi et Dominique de Rocca Serra (MC, Université de Corse) pour leur gentillesse.

Que les agents de l'ONF de Corse trouvent ici l'expression de ma gratitude pour avoir participé à la récolte et à l'identification du cèdre de l'Atlas localisés en Corse. Je tiens également à remercier M. Patrick Paquet (*Corsica essences*) et M. Jean-Marie Desjobert (Ingénieur, Université de Corse) pour les analyses en spectrométrie de masse, Mme Marie-Laure Pozzo di Borgo (Responsable de l'unité Façade littorale, Tre Padule di Suartone) et M. Romain Bastien (Ingénieur en exploitation marine, Stella Mare) pour l'aide apportée lors de l'échantillonnage du pin d'Alep, Mme Joelle Henneman (Chambre d'Agriculture de Haute-Corse) et Antoine et Babeth Santoni pour les huiles d'olives fournies et le Dr. Mohamed Ghanmi (Centre de Recherche

Forestière de Rabat, Maroc) pour l'huile essentielle et les huiles pyrolytiques de cèdre de l'Atlas envoyées.

Un grand merci aux deux jeunes docteurs de notre laboratoire : M. Sylvain Sutour pour sa disponibilité et sa gentillesse (à toutes heures !) et pour m'avoir fait découvrir le monde du surf (malheureusement ta passion n'aura pas suffi à me mettre à l'eau !) et M. Mathieu Paoli pour ma formation pratique aux techniques analytiques durant mon stage de Master 2 et pour le travail réalisé ensemble sur le cèdre de l'Atlas (on aura perdu quelques cheveux sur ce sujet !).

Un merci tout particulier à deux personnes qui ont marqué ma vie dans ce laboratoire. Mme Cathy Lugrezi, nos débats politiques houleux vont me manquer, mais je garderai de toi des valeurs fortes que sont le respect, l'ouverture d'esprit et un peu (beaucoup) d'esprit rebelle. Et également un grand merci à Mme Ophélie Bazzali, « ma lucette » j'ai trouvé ici une confidente et une amie de tous les instants. L'aventure n'aurait pas été la même sans toi...

Merci également à mes camarades de l'équipe « Chimie et Biomasse » : Gaby (roi des gâteaux aux yaourts imaginaires), Tao, Zana, Thierry, Emilie, Joséphine, Khadija, Delphin et tant d'autres. Votre présence et votre soutien m'ont permis, tout au long de cette thèse, de sortir un peu la tête de l'eau dans les moments de découragements et surtout de partager de grands moments de fou rire.

A Mesdames Marie-Christine Bosquets et Françoise Pietri, ainsi qu'à tous les membres de l'équipe « Système à Sources Renouvelables d'Energie » une vive reconnaissance pour leur soutien moral, leur disponibilité et leur gentillesse, en particulier à Guillaume, Brice, Manu, Julien et Flo pour m'avoir permis de décompresser autour d'un café à la fin de ma thèse. Je remercie également tous mes collègues doctorants et docteurs de Corte. Un grand merci en particulier à Candice, Jean-Christophe et Marie.

Je ne saurais terminer sans remercier mes parents pour leur bienveillance de tous les instants, merci à vous deux de m'avoir permis de réaliser de longues études et d'accepter mes choix sans jamais me juger. Merci à ma sœur qui est avant tout mon amie. Ma vie aurait été bien vide sans toi, merci d'avoir toujours cru en moi !! J'embrasse très fort tous les membres de ma famille : cousines, cousins, oncles, tantes et grands-mères, beau-frère et belle famille (la liste est trop longue pour tous vous citer !). Je pense aussi à mes amies de toujours, Laetitia et Paula avec qui j'ai partagé tellement d'aventures depuis le lycée. Tans de belles choses encore à venir ensemble j'en suis sûre... Enfin, des remerciements affectueux mais surtout un grand bravo à mon homme qui a réussi l'exploit de me supporter au moment le plus critique de ma thèse. Rien que pour cela, je te serai éternellement reconnaissante !!

---

## SOMMAIRE

---

<b><u>INTRODUCTION</u></b> .....	<b>8</b>
<b><u>CHAPITRE I : IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DES CONSTITUANTS D'UN MELANGE NATUREL</u></b> .....	<b>13</b>
<b>I. ANALYSE PAR LES COUPLAGES « EN LIGNE » : VOIE A</b> .....	<b>16</b>
I.1. LA CPG ASSOCIEE AUX INDICES DE RETENTION .....	16
I.2. LES COUPLAGES DE LA CPG AVEC LA SM : CPG-SM, CPG-SM(ICP), CPG-SM(ICN) ET CPG-SM/SM .....	18
I.3. LES COUPLAGES DE LA CLHP ET DE LA UCLHP AVEC LES TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES.....	20
<b>II. IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS APRES PURIFICATION : VOIE B</b> .....	<b>23</b>
<b>III. METHODE D'IDENTIFICATION PAR RMN : VOIE C</b> .....	<b>25</b>
III.1. INTERET DE LA RMN <sup>13</sup> C .....	26
III.2. IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS EN MELANGE .....	27
III.3. OBSERVATION DES SIGNAUX .....	27
III.4. INDIVIDUALISATION DES SIGNAUX.....	28
III.5. ATTRIBUTION DES SIGNAUX .....	29
<b>IV. METHODE D'ANALYSE DEVELOPEE AU LABORATOIRE</b> .....	<b>32</b>
IV.1. PRINCIPE DE LA METHODE.....	32
IV.2. LES DOMAINES D'APPLICATION DE LA RMN <sup>13</sup> C.....	35
<b>V. QUANTIFICATION PAR RMN</b> .....	<b>39</b>
V.1. LA QUANTIFICATION PAR RMN <sup>13</sup> C.....	39
V.2. LA QUANTIFICATION PAR RMN <sup>1</sup> H.....	48
<b><u>CHAPITRE II : QUANTIFICATION DU SQUALENE DANS L'HUILE D'OLIVE PAR RMN</u></b> .....	<b>49</b>
<b>I. DONNEES RMN DU SQUALENE ET DE L'HUILE D'OLIVE</b> .....	<b>53</b>
I.1. LE SQUALENE.....	53
I.2. L'HUILE D'OLIVE.....	56
I.2.1 <i>Le spectre RMN <sup>13</sup>C d'une huile d'olive</i> .....	56

I.2.2 Le spectre RMN <sup>1</sup> H d'une huile d'olive.....	57
<b>II. MISE AU POINT ET EVALUATION DE LA METHODE DE QUANTIFICATION DU SQUALENE PAR RMN .....</b>	<b>58</b>
II.1 QUANTIFICATION DU SQUALENE PAR RMN <sup>13</sup> C .....	58
II.1.1 Détermination des paramètres d'enregistrement.....	59
II.1.2. Validation de la méthode de quantification .....	62
II.2. QUANTIFICATION DU SQUALENE PAR RMN <sup>1</sup> H .....	64
II.2.1. Détermination des paramètres d'enregistrement des spectres .....	64
II.2.2. Validation de la méthode de quantification .....	67
<b>III. APPLICATION A L'ANALYSE DU SQUALENE DANS L'HUILE D'OLIVE DE CORSE.....</b>	<b>69</b>
<b><u>CHAPITRE III</u> : CARACTERISATION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>PINUS HALEPENSIS</i> DE CORSE .....</b>	<b>72</b>
<b>I. LES METABOLITES SECONDAIRES DE <i>PINUS HALEPENSIS</i> : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>76</b>
I.1. L'ESSENCE DE TEREBENTHINE .....	76
I.2. L'OLEORESINE .....	77
I.3. LES EXTRAITS .....	77
I.4. LES HUILES ESSENTIELLES .....	78
<b>II. COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE CONES DE <i>PINUS HALEPENSIS</i> .....</b>	<b>82</b>
II.1 ANALYSE DETAILLEE D'UN ECHANTILLON D'HUILE ESSENTIELLE DE CONES.....	83
II.2. VARIABILITE CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE CONES .....	88
<b>III. ÉTUDE DE LA VARIABILITE CHIMIQUE DES AIGUILLES DE <i>PINUS HALEPENSIS</i> .....</b>	<b>90</b>
III.1 ANALYSE DE TROIS HUILES ESSENTIELLES D'AIGUILLES .....	91
III.2 VARIABILITE CHIMIQUE DES AIGUILLES DE <i>PINUS HALEPENSIS</i> DE CORSE .....	93

<b>CHAPITRE IV : ANALYSE D’HUILES ESSENTIELLES, D’HUILES PYROLYTIQUES ET DE RESINE DE <i>CEDRUS ATLANTICA</i> M. ....</b>	<b>102</b>
<b>I. LES METABOLITES SECONDAIRES DE <i>CEDRUS ATLANTICA</i> : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>105</b>
I.1 LES EXTRAITS DE <i>CEDRUS ATLANTICA</i> .....	105
I.2 LES HUILES ESSENTIELLES DE <i>CEDRUS ATLANTICA</i> .....	106
<b>II. ANALYSE DETAILLEE D’UN ECHANTILLON D’HUILE ESSENTIELLE COMMERCIALE DE BOIS DE <i>CEDRUS ATLANTICA</i> .....</b>	<b>110</b>
<b>III. IDENTIFICATION DES COMPOSES ABSENTS DE LA BANQUE « TERPENES » .....</b>	<b>114</b>
III.1. L’OXYDE DE $\beta$ -HIMACHALENE .....	114
III.2. L’OXYDOHIMACHALENE .....	115
III.3. LE 4-ACETYL-1-METHYLCYCLOHEXENE .....	116
III.4. LA (4R,8R)-DEODARONE ET LA (4R,8S)-DEODARONE .....	117
III.5. LA (Z)- $\gamma$ ET LA (E)- $\gamma$ -ATLANTONE .....	118
<b>IV. ANALYSE D’UN ECHANTILLON D’HUILE ESSENTIELLE ET DEUX ECHANTILLONS D’HUILE PYROLYTIQUE DE BOIS DE <i>CEDRUS ATLANTICA</i> DU MAROC.....</b>	<b>122</b>
<b>V. ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES RESINES DE <i>CEDRUS ATLANTICA</i> PAR RMN <math>^{13}\text{C}</math> ET <math>^1\text{H}</math>.....</b>	<b>124</b>
V.1 ANALYSE QUALITATIVE DES RESINES DE <i>CEDRUS ATLANTICA</i> PAR RMN $^{13}\text{C}$ .....	124
V.2 ANALYSE QUANTITATIVE DES RESINES DE <i>CEDRUS ATLANTICA</i> PAR RMN $^{13}\text{C}$ ET $^1\text{H}$ .....	133
V.2.1 <i>Quantification par RMN <math>^{13}\text{C}</math></i> .....	133
V.2.2 <i>Quantification par RMN <math>^1\text{H}</math></i> .....	138
<b><u>CONCLUSION</u> .....</b>	<b>144</b>
<b><u>PARTIE EXPERIMENTALE</u>.....</b>	<b>150</b>
<b><u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>.....</b>	<b>160</b>
<b><u>ANNEXES</u> .....</b>	<b>177</b>





# Introduction

Ce travail de thèse, financé par la Collectivité Territoriale de Corse, est réalisé dans le cadre des recherches auxquelles se consacre, depuis une vingtaine d'années, l'équipe « Chimie et biomasse » de l'Université de Corse Pascal Paoli. Il s'inscrit dans le thème « Ressources naturelles » de l'UMR-CNRS 6134 « Sciences pour l'environnement ».

Depuis la fin du XXe siècle, les produits biosourcés offrent de nouveaux débouchés de valorisation de la biomasse dans le domaine de la chimie fine (notamment dans les secteurs de la cosmétique, de la parfumerie, de l'agroalimentaire et de la phytothérapie/aromathérapie). La réglementation REACH concernant les substances chimiques tend également à favoriser les produits biosourcés. L'objectif principal est donc de valoriser la biomasse végétale en caractérisant les composés qui en sont issus. Néanmoins, un produit naturel (huile essentielle, résine, extrait végétal) se présente presque toujours sous la forme d'un mélange complexe pouvant renfermer une centaine (voire plus) de composés, appartenant ou non à une même famille chimique. Or, la valorisation de ces produits nécessite une connaissance précise de leur composition chimique, que ce soit pour leur caractérisation, le contrôle de la qualité ou bien encore pour la mise en évidence d'une éventuelle spécificité. L'analyse de ces composés est donc une étape fondamentale. En ce qui concerne les produits originaires d'une région insulaire telle que la Corse, l'accent doit être mis sur la qualité du produit. L'existence d'un particularisme peut ainsi constituer un atout lors de la commercialisation.

De manière conventionnelle, l'identification des constituants de mélanges naturels peut être réalisée à l'aide de différentes techniques analytiques, en fonction de l'objectif fixé (analyse de routine ou étude approfondie), de la nature des constituants et de la complexité du mélange. En général, deux voies sont privilégiées :

- la première voie repose sur le couplage en ligne d'une ou plusieurs techniques chromatographiques avec une ou plusieurs techniques spectroscopiques, conduisant

à l'identification des constituants par comparaison de leurs données spectrales avec celles de produits de référence contenues dans une bibliothèque de spectres. La Chromatographie en Phase Gazeuse-Spectrométrie de Masse (CPG-SM), associée aux indices de rétention (Ir), est devenue sans conteste la technique analytique la plus utilisée dans les laboratoires pour l'analyse de routine des huiles essentielles. Cependant, cette technique montre ses limites lorsque les constituants ont des structures très proches (stéréoisomères notamment), des indices de rétention très voisins ou encore des spectres de masse insuffisamment différenciés ;

- la seconde voie consiste à purifier chacun des constituants avant de les identifier, par comparaison de leurs données spectrales avec celles de référence : SM, Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN  $^1\text{H}$ ) et surtout RMN du carbone-13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ) dans le but d'apporter des informations extrêmement précieuses sur le squelette carboné de la molécule et ses fonctions chimiques.

Ainsi, l'utilisation de la RMN  $^{13}\text{C}$  comme outil analytique a connu ces dernières années un essor important dans plusieurs domaines. A la suite des travaux de Formáček et Kubeczka (utilisation de la RMN  $^{13}\text{C}$  afin de confirmer l'identification d'un composé suggéré par la spectrométrie de masse), l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse a mis au point et développé une nouvelle méthode d'analyse basée sur la RMN  $^{13}\text{C}$ , permettant l'identification des constituants des mélanges complexes sans purification préalable. Le principe de cette méthode repose sur la comparaison, grâce à un logiciel d'aide à l'identification, des raies de résonance du spectre du mélange avec celles de composés purs contenues dans une bibliothèque de spectres de référence. Bien que moins sensible que d'autres techniques spectroscopiques, la RMN permet d'obtenir des informations uniques concernant directement le squelette carboné (déplacements chimiques des carbones). Cette technique est donc complémentaire des méthodes conventionnelles et permet l'identification sans ambiguïté des principaux constituants d'un mélange, quelles que soient leur masse moléculaire, leur structure et leur fonctionnalisation, à condition néanmoins d'adapter le protocole d'enregistrement des spectres.

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

- d'un point de vue académique, il s'agit de contribuer au développement des méthodes d'identification et de quantification des constituants des mélanges naturels par RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  sans séparation au préalable ;
- d'un point de vue appliqué, nous nous sommes proposés d'utiliser les méthodes analytiques mises au point à l'étude de divers produits naturels, en complément des techniques traditionnelles lorsque cela était nécessaire (CPG-SM et CPG(Ir)). Ainsi, nous avons étudié l'huile d'olive de Corse en nous concentrant sur la mesure de sa teneur en squalène. Nous nous sommes également intéressés à la caractérisation de deux conifères (pin d'Alep et cèdre de l'Atlas) à travers la composition chimique de l'huile essentielle du pin d'Alep de Corse, de l'huile essentielle et de l'huile pyrolytique du cèdre de l'Atlas du Maroc et enfin de la résine du cèdre de l'Atlas de Corse.

Dans le premier chapitre nous réaliserons une synthèse bibliographique des différentes techniques analytiques, utilisées pour la caractérisation chimique d'un mélange naturel (huile essentielle, extrait, résine, huile végétale, etc.). Nous mettrons en évidence, à travers divers exemples, les avantages et les limites de ces techniques. Nous présenterons également la méthode analytique développée au laboratoire (RMN  $^{13}\text{C}$ ), en précisant son rôle dans l'identification et la quantification de composés en mélanges naturels ainsi que sa complémentarité avec les différentes techniques d'analyse.

Dans le second chapitre, nous nous intéresserons à l'élaboration d'une méthode de quantification du squalène (triterpène linéaire) dans l'huile d'olive par RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  sans séparation au préalable. Pour cela, nous décrirons tout d'abord la mise au point et la validation (justesse, linéarité et précision des mesures) de la méthode par la quantification du squalène en mélange dans la trioléine (triglycéride majoritaire de l'huile d'olive) Nous appliquerons ensuite notre procédure quantitative à 25 échantillons d'huile d'olive de Corse.

Le travail présenté dans le troisième chapitre s'inscrit dans la caractérisation du pin d'Alep (*Pinus halepensis*) de Corse à travers la composition chimique de son huile essentielle. Nous décrirons ainsi l'analyse détaillée par la combinaison des techniques (CPG(Ir), CPG-SM et RMN  $^{13}\text{C}$ ) d'un échantillon d'huile essentielle de cônes. Nous détaillerons ensuite la composition chimique de 15 échantillons d'huile essentielle de cônes. Nous étudierons enfin, à travers l'analyse de 47 échantillons, la variabilité chimique de l'huile essentielle d'aiguilles. Pour cela, nous utiliserons l'analyse en composantes principales (ACP) et l'analyse factorielle discriminante (AFD) comme outils d'interprétation statistique.

Enfin, le quatrième chapitre sera consacré au cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica*) du Maroc et de Corse :

- dans une première partie, nous reporterons l'analyse par CPG(Ir), CPG-SM et RMN  $^{13}\text{C}$  d'un échantillon d'huile essentielle commerciale de bois du Maroc ;
- dans une seconde partie nous décrirons, par les techniques habituelles, l'analyse d'une huile essentielle et deux huiles pyrolytiques de bois du Maroc artisanales ;
- enfin la troisième partie sera consacrée à la caractérisation de la résine de *C. atlantica* de Corse. Nous exposerons l'analyse qualitative et quantitative par RMN  $^{13}\text{C}$  des constituants (majoritairement diterpéniques) des 28 échantillons de résines de cèdres, sans partition préalable. Nous montrerons également la mise au point d'une méthode de quantification par RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  de composés d'intérêt médical (lignanes) en mélange avec les diterpènes acides et neutres.

# Chapitre I

Identification et quantification  
des constituants d'un mélange naturel

Les produits naturels issus de la biomasse végétale (huiles essentielles, huiles végétales, extraits, résines, etc.) se présentent généralement sous forme d'un mélange complexe constitué de plusieurs dizaines, voire de plus d'une centaine de composés en proportions variables. Par exemple, les huiles essentielles, obtenues par entraînement à la vapeur d'eau par hydrodistillation de diverses parties des plantes ou par expression à froid de certains fruits (agrumes), renferment des mono-, sesqui- et parfois diterpènes ainsi que des phénylpropanoïdes de structures et de fonctions chimiques très variées. Le secteur des PAM, dont font partie les huiles essentielles, fait l'objet de nombreuses applications dans l'industrie du parfum et de la cosmétique ainsi que dans l'aromathérapie/phytothérapie.

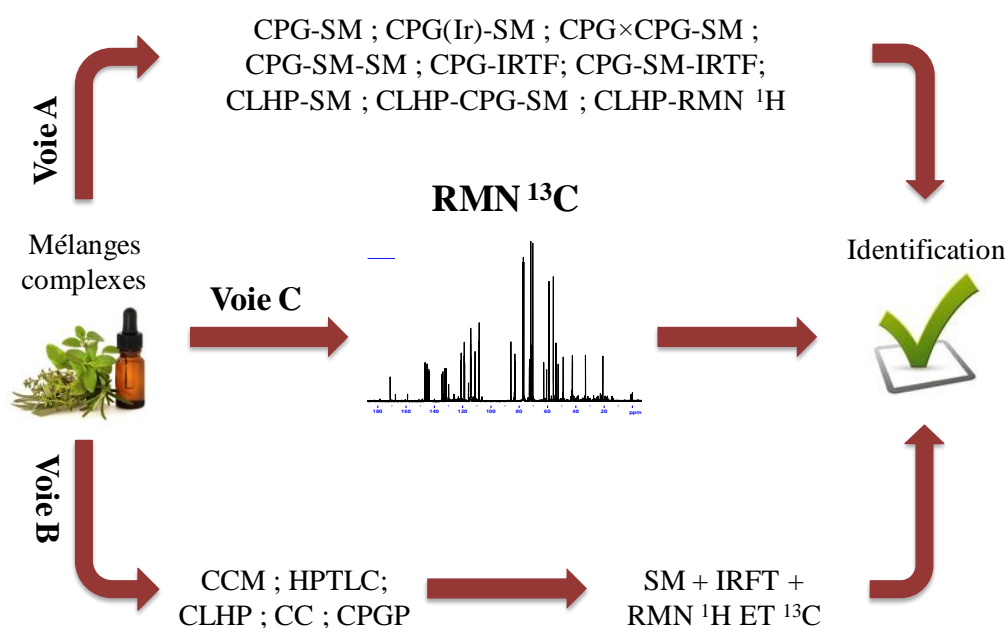
D'autres produits naturels tels que les oléorésines (obtenues à partir des conifères résineux en particulier les pins) fournissent par distillation à la vapeur d'eau de l'essence de térébenthine, utilisée comme solvant ou matière première pour la synthèse d'arômes (Schantz et Hitunen, 1983) et de la colophane (résidu solide de distillation). Cette dernière entre généralement dans la composition d'adhésifs, de peintures et de vernis.

Nous pouvons également citer le cas des huiles végétales employées à des usages alimentaires, domestiques, industriels, pharmaceutiques et aussi en qualité de biocarburant sous la forme d'esters méthyliques. Elles sont constituées d'une partie dite saponifiable (représentant de 95 % à 98 % de l'huile végétale) et d'une partie dite insaponifiable. La partie saponifiable est en grande majorité constituée de triglycérides, tandis que la partie insaponifiable est constituée de composés de différentes natures (triterpènes, stérols, tocophérols, composés phénoliques et aliphatiques, phospholipides, etc.) en proportions très variables.

La valorisation et la commercialisation de ces produits naturels quelle que soit leur application, est en général précédée d'une étape de caractérisation (analyse chimique). Ce travail délicat nécessite de disposer d'outils analytiques rapides et fiables, chacun d'eux possédant sa spécificité et son domaine d'application.

Cependant, l'identification et la quantification des constituants d'un mélange naturel demeurent toujours des opérations délicates qui nécessitent souvent l'utilisation conjointe de plusieurs techniques analytiques complémentaires (Coleman et Lawrence 1997 ; Joulain, 1994). L'analyse de la composition chimique d'un mélange naturel s'effectue de manière conventionnelle selon les voies A ou B (Figure I.1).

Figure I.1 : Les méthodes d'analyse d'un mélange complexe



CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse ; SM : Spectrométrie de Masse ; IRTF : Infra-Rouge à Transformée de Fourier ; CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Performance ; RMN : Résonance Magnétique Nucléaire ; CCM : Chromatographie sur Couche Mince ; CC : Chromatographie sur Colonne ; CPGP : Chromatographie en Phase Gazeuse Préparative ; HPTLC : Chromatographie sur Couche Mince Haute Performance.

L'analyse peut également être menée selon la voie C (Figure I.1) qui met en œuvre la Résonance Magnétique Nucléaire du carbone-13 (RMN <sup>13</sup>C) pour l'identification des composés en mélange sans séparation préalable ou précédée d'une étape de fractionnement réduite au minimum. Cette technique peut en outre être employée pour la quantification des constituants si nécessaire.



## I. Analyse par les couplages « en ligne » : VOIE A

L'analyse « en ligne » d'un mélange naturel associe schématiquement une technique chromatographique et spectroscopique (voire plusieurs).

### I.1. La CPG associée aux indices de rétention

La CPG est une technique d'analyse très répandue, utilisée depuis le milieu du siècle dernier. Elle s'est rapidement imposée dans les laboratoires de chimie analytique de par son coût modéré, son automatisation et sa robustesse. Elle présente un fort potentiel pour réaliser l'individualisation des constituants volatils présents dans les mélanges complexes, comme les huiles essentielles par exemple. La CPG présente également une bonne adaptabilité, grâce à un grand choix de phases stationnaires, de modes de température (isotherme ou programmée) et de phases mobiles (hélium, argon, azote ou encore hydrogène).

La CPG est également utilisée pour l'analyse d'huiles végétales contenant majoritairement des triglycérides. Cependant, une trans-estérification (transformation des esters glycériques en esters méthyliques ou éthyliques) doit être généralement effectuée avant la mise en œuvre de la CPG. Ainsi, cette technique a permis de déterminer la composition en acides gras de nombreuses huiles végétales, chaque composé étant caractérisé par son temps de rétention ( $t_r$ ) (Ucciani, 1995 ; Hussein *et al.*, 2001 ; Armougom *et al.*, 1998).

La CPG, mettant en œuvre des colonnes capillaires, est couramment utilisée dans le domaine des huiles essentielles. Elle permet l'individualisation d'un grand nombre de constituants et leur détection même quand ils sont présents dans un échantillon en quantité inférieure au nanogramme. En CPG, chaque composé peut être caractérisé par son temps de rétention ( $t_r$ ). Néanmoins, celui-ci est fortement dépendant des conditions opératoires (nature de la phase stationnaire, programmation de la température) et de la colonne (vieillessement), ce qui rend l'identification des

constituants difficilement réalisable uniquement par CPG sur la base des temps de rétention. C'est pourquoi, dans le domaine des huiles essentielles, les indices de rétention sont privilégiés pour l'analyse qualitative. Pour chaque composé, deux indices de rétention ( $I_r$ ) (plus fiable que les temps de rétention) peuvent être obtenus sur colonne polaire et apolaire. Ils sont calculés à partir d'une gamme étalon d'alcane linéaires à température constante (Indice de Kováts,  $I_K$ ) (Kováts, 1965) ou en programmation de température (Indices de Rétention,  $I_r$ ) (Van den Dool et Kratz, 1963). Les indices de rétention expérimentaux sont alors comparés avec ceux de produits de référence, mesurés au laboratoire ou décrit dans la littérature.

Bien que la CPG reste l'une des techniques analytiques les plus utilisées, la caractérisation chimique d'une huile essentielle est difficilement réalisable uniquement par CPG. En effet nous pouvons observer des différences d'indices (valeur calculée par rapport à la valeur de référence) faibles sur colonne apolaire et plus importantes sur colonne polaire, en particulier pour les composés qui sont élués en dernier. Un composé ne peut donc être identifié uniquement par l'examen de ses indices de rétention sur deux colonnes, sauf dans le cas d'analyses répétitives pour des contrôles de qualité par exemple (screening). D'ailleurs, Joulain (1994) a précisé qu'il y a 230 sesquiterpènes de même masse moléculaire qui possèdent des indices de rétention compris dans un intervalle de 300 unités. Il est donc aisé d'admettre que les indices de rétention ne constituent pas en soit une base suffisante pour l'identification des constituants d'un mélange naturel.

Ainsi, dans le but de rendre plus fiable l'identification des constituants d'un mélange naturel, divers couplages de la CPG associés à des techniques spectroscopiques ont été développés.

## I.2. Les couplages de la CPG avec la SM : CPG-SM, CPG-SM(ICP), CPG-SM(ICN) et CPG-SM/SM

### I.2.1. Le couplage CPG-SM

Le couplage de la CPG avec la spectrométrie de masse (SM) en mode impact électronique (IE) est probablement le plus répandu dans les laboratoires d'analyses. Ce couplage a l'avantage, dans la majorité des cas, d'obtenir des informations concernant la masse molaire d'un composé et d'autre part d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux contenus dans des bibliothèques informatisées. De nombreuses bibliothèques de spectres de masse sont commercialisées telles que Adams (1989, 2001, 2007), McLafferty et Stauffer (1994), NIST (1999) et König *et al.* (2001). En règle générale, l'utilisation de la bibliothèque de spectres réalisée au sein du laboratoire permet d'obtenir des résultats plus fiables car les spectres de masse de l'huile essentielle à analyser et ceux des composés de référence sont enregistrés dans des conditions expérimentales strictement identiques. La CPG-SM est également utilisée en routine pour déterminer la composition en acides gras (Tzakou *et al.*, 2001) et en stérols libres et estérifiés (Cunha *et al.*, 2006) des huiles végétales et de certains extraits végétaux, généralement après dérivatisation.

Des informations complémentaires peuvent être obtenues avec des techniques « d'ionisation douce » telles que l'ionisation chimique positive (ICP) ou l'ionisation chimique négative (ICN) (Lange et Schultze, 1988 ; Schultze *et al.*, 1992 ; Paolini *et al.*, 2005). L'ICP et l'ICN produisent des ions quasimoléculaires dont l'observation donne accès à la masse molaire des composés. Ainsi, la SM-ICP a permis de différencier les quatre stéréoisomères de l'isopulégol (Lange et Schultze, 1988). Toutefois, cette technique a montré ses limites pour l'identification de molécules possédant des structures très proches. C'est le cas par exemple du géraniol et du nérol, qui ne diffèrent que par la stéréochimie d'une des doubles liaisons. En effet, ils possèdent des spectres de masse ICN identiques (Bruins, 1979). Il faut également prendre en compte la difficulté d'obtenir des spectres, en SM(ICN) ou en SM(ICP),

reproductibles d'un laboratoire à l'autre. C'est pourquoi, cette technique doit surtout être considérée comme une technique complémentaire de la SM(IE) pour l'identification des constituants des huiles essentielles (Zupanc *et al.*, 1992).

La SM en tandem (SM/SM) est reconnue pour sa sélectivité clairement supérieure à celle obtenue avec un seul spectromètre de masse (Cambon, 1989 ; Rangunathan *et al.*, 1995). Cette technique consiste à sélectionner les ions correspondant à un rapport  $m/z$  choisi au moyen d'un premier analyseur qui joue ainsi le rôle de filtre et à les envoyer sur un deuxième analyseur. Les fragments de l'ion secondaire constituent un deuxième spectre de masse qui diffère en fonction de l'origine de l'ion primaire (Rouessac et Rouessac, 2004). Tout comme la SM classique, il existe plusieurs types d'analyseurs. Les plus communs sont les quadrupoles, les trappes d'ions et les temps de vols (TOF). Plusieurs spectromètres de masse peuvent ainsi être branchés en série avec des analyseurs différents. Cette méthode a été utilisée en particulier pour détecter des traces de pesticides dans l'eau (Gonçalves et Alpenduradaa, 2004), de cocaïne dans les cheveux et la salive en toxicologie (Cognard *et al.*, 2005, 2006), d'insecticides dans les huiles végétales (Esteve-Turrillas *et al.*, 2005) et des flavonoïdes dans l'huile essentielle de bergamote (*Citrus bergamia*) (Donato *et al.*, 2013).

La CPG bidimensionnelle (CPG×CPG) est également une technique particulièrement intéressante. En effet, l'utilisation de deux séparations consécutives sur deux colonnes de natures différentes, entraîne une diminution, voir une suppression, des coélutions contrairement à la CPG-1D. Grâce à cette technique chromatographique, Filippi *et al.* (2013) ont pu identifier 135 composés dans l'huile essentielle de Vétiver, réputée pour être l'une des plus complexes d'un point de vue analytique.

### I.2.2. Le couplage CPG-IRFT

En complément de l'utilisation de la CPG-SM, un spectrophotomètre Infra Rouge par Transformée de Fourier (IRTF) peut également être couplé à la CPG. La spectroscopie infrarouge renseigne sur les fonctions chimiques présentes dans les molécules et permet également de différencier les isomères par l'examen de la partie de spectre dite « des empreintes digitales ». En effet, elle est particulièrement instructive en ce qui concerne la stéréochimie des molécules (stéréochimie des doubles liaisons ou dans certains cas, celle des jonctions de cycles). Par exemple, le couplage CPG-IRFT a permis l'identification du germacrène B qui subit une transposition de Cope sous l'effet de l'impact électronique et se transforme partiellement en  $\gamma$ -élémane dans les huiles essentielles d'orange et de pamplemousse (Chamblee *et al.*, 1997).

### I.3. Les couplages de la CLHP et de la UCLHP avec les techniques spectroscopiques

La Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) est une technique d'analyse performante, polyvalente et très répandue. Elle est destinée habituellement à des substances peu ou pas volatiles et parfois thermolabiles ou polaires. Dans le cas d'extraits végétaux complexes, les temps nécessaires à la séparation des composés peuvent être très longs, il est alors intéressant d'utiliser une Chromatographie Ultra Haute Performance (UCLHP) plutôt qu'une CLHP. En UCLHP, le diamètre des particules est inférieur à 2  $\mu\text{m}$  alors qu'en CLHP il est de 3 à 5  $\mu\text{m}$ . Cette diminution de granulométrie engendre un accroissement de la perte de charge subie par l'éluant lors de la percolation de la phase stationnaire ce qui nécessite donc de faire appel à des pressions de travail bien supérieures en UCLHP (de 600 à 1000 bars) qu'en CLHP (de 150 à 400 bars). Il est ainsi possible d'augmenter le débit et donc la vitesse d'analyse, cela sans altérer la séparation chromatographique (Fernandez et Chemat, 2012).

La détection a également beaucoup évolué dans le domaine de la CLHP. En effet, le Détecteur Évaporatif à Diffusion de Lumière (DEDL) s'est développé ces dernières

années, au détriment du détecteur à barrettes de diodes (DAD). Mais c'est surtout le couplage de la CLHP avec la spectrométrie de masse qui s'est démocratisé.

### I.3.1 Le couplage CLHP-SM

Le couplage CLHP-SM nécessite de contourner certains problèmes dus aux conditions opératoires des deux techniques comme la haute pression, la température ambiante et la phase liquide pour la CLHP et le vide poussé, la haute température et la phase gazeuse pour la SM.

Le couplage CLHP-SM a permis par exemple l'identification de phytostérols dans l'huile d'olive (Cañabate-Díaz *et al.*, 2007), de coumarines et de flavones dans les huiles essentielles de *Citrus* (Dugo *et al.*, 2000) et de composés phénoliques dans le vin rouge (La Torre *et al.*, 2006). La UCLPH-SM a permis, quant à elle, de doser les composés polyphénoliques contenus dans la pomme (Ceymann *et al.*, 2011).

La CLHP couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CLHP-SM/SM) a été utilisée pour :

- l'analyse de la nicotine et de la caféine dans l'urine (Tuomi *et al.*, 1999) ;
- le dosage de phospholipides dans le sang pour le dépistage du syndrome de Barth (cardiomyopathie) (Kulik *et al.*, 2008) ;
- la quantification de l'arsénobétaïne (dérivés organiques de l'arsenic) dans les algues marines (Nischwitz et Pergantis, 2005) ;
- la quantification du bergaptène et de la bergamotine (furocoumarines) dans des huiles essentielles de zestes de fruit du genre *Citrus* (mandarine, pamplemousse, bergamote et citron vert) (Prosen et Kočar, 2008).

### I.3.2 Le couplage CLHP-RMN <sup>1</sup>H

La RMN <sup>1</sup>H apporte des informations extrêmement précieuses sur la structure des molécules, mais présente l'inconvénient d'être beaucoup moins sensible que les

techniques spectroscopiques décrites précédemment (IR et surtout SM). Néanmoins, la mise en œuvre de couplage CLHP-RMN  $^1\text{H}$  a été rendu possible grâce au développement d'aimants supraconducteurs de plus en plus puissants (jusqu'à 23,5 Tesla), permettant ainsi d'abaisser le seuil de détection des composés (de l'ordre du nanogramme). En parallèle, le développement de colonnes capillaires de petits diamètres, à faible consommation en éluant, a permis d'employer des solvants deutérés, évitant ainsi d'avoir recours à des techniques d'irradiations sélectives (Victoria et Elipe, 2003 ; Wolfender *et al.*, 1998 ; Albert *et al.*, 1999).

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

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

### I.3.3 Le couplage CLHP-RMN $^1\text{H}$ -SM

Le couplage CLHP-RMN $^1\text{H}$ -SM permet de détecter et d'identifier des composés présents dans des échantillons biologiques complexes, dans des extraits de plantes (Corcoran et Spraul, 2003 ; Yang, 2006) ou encore de détecter des impuretés dans un médicament (Lindon *et al.*, 2000). Même si ce couplage présente quelques inconvénients (utilisation de solvants deutérés comme  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$  par exemple), l'utilisation conjointe des deux techniques spectroscopiques facilite toutefois l'identification de composés.

Nous avons pu constater que les couplages en ligne d'une technique chromatographique (individualisation des composés) avec une technique spectroscopique (identification) se sont rapidement développés. Ces couplages se révèlent performant pour divers types d'analyses, que ce soit pour des analyses de routine et de contrôle de qualité ou pour des analyses fines. En ce qui concerne plus spécifiquement les huiles essentielles, l'utilisation conjointe de la CPG-SM avec les indices de rétention sur deux colonnes de polarité différentes ne donne pas toujours entière satisfaction. En effet, des erreurs d'interprétation, provenant d'une utilisation abusive des banques informatisées, ont été soulignées (Joulain, 1994). La quantification relative obtenue par CPG est également remise en cause. En effet, l'utilisation notamment de détecteurs à ionisation de flamme (DIF), ne donne pas un facteur de réponse unique. Le squelette et surtout la composition élémentaire des constituants organiques influent sur le facteur de réponse (FR). Les oléfines, par exemple, présentent un facteur de réponse proche de 1. Leurs quantifications conduisent donc à une faible erreur relative. A l'inverse, pour certaines familles de composés chimiques, il peut y avoir une erreur relative pouvant atteindre 60 %. C'est le cas, par exemple, des esters qui possèdent un facteur de réponse de 1,59. Aujourd'hui, la prise en compte des indices de rétention avec des facteurs de correction (FR) est donc vivement recommandée (Bicchi *et al.*, 2008 ; Costa *et al.*, 2008).

Face à la complexité de certains mélanges, il est nécessaire de procéder en deux étapes : la purification des constituants de mélanges particulièrement complexes puis leur identification, illustrée par la voie B ci-dessous.

## **II. Identification des constituants après purification : VOIE B**

La voie B est constituée principalement de deux étapes. Le mélange est d'abord fractionné à l'aide de différentes techniques chromatographiques, telles que la chromatographie sur colonne (CC), la chromatographie sur couche mince (CCM) ou la



chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC), la CLHP et la CPG préparative (CPGP), précédées ou non d'une distillation fractionnée ou d'une cristallisation. Les différents constituants isolés dans des fractions enrichies sont ensuite identifiés par comparaison de leurs données spectrales avec celles des composés de référence (spectre de masse, spectre IR, spectres de RMN  $^1\text{H}$  ou  $^{13}\text{C}$ , éventuellement RMN bidimensionnelle). Cette voie est extrêmement fiable mais elle peut s'avérer coûteuse en temps particulièrement lorsque les molécules isolées sont déjà décrites dans la littérature.

Cette voie d'analyse en deux étapes (purification-identification) a été la première à être utilisée dans le domaine des huiles essentielles. L'analyse par les couplages en ligne (voie A), plus rapide, s'est ensuite imposée. Cette voie est néanmoins toujours utilisée dans le cas d'huiles essentielles complexes car sa grande fiabilité compense l'investissement en temps qu'elle requiert. Les travaux de Weyerstahl *et al.* (1996, 1997a, 1997b, 1998, 1999a, 1999b, 2000a, 2000b, 2000c) illustrent parfaitement l'intérêt pour cette séquence à travers l'étude de la composition chimique de diverses huiles essentielles très complexes. C'est le cas de l'huile essentielle de Vétiver d'Haïti, qui est composée de nombreux sesquiterpènes aux propriétés physico-chimiques et spectroscopiques voisines. Une partition acido-basique a alors été réalisée. La partie neutre a été soumise à une distillation fractionnée qui a permis de séparer les produits lourds des produits légers, puis les différents constituants ont été séparés par CC répétitives, puis éventuellement par CCM. Ces constituants ont ensuite été analysés par CPG-SM, RMN  $^1\text{H}$  et parfois par RMN  $^{13}\text{C}$ . La partie acide a été soumise à une réaction d'estérification ou de réduction avant la séparation des constituants. Près de 170 composés sesquiterpéniques (mono- ou polyfonctionnalisés) ont ainsi été identifiés. Certains de ces composés possèdent des squelettes originaux et rares tels que prézizaane, zizaane, khusiane, cyclopacamphane, spirovétivane, épi-, seco- et nor-eudesmanes, oppositane, etc.

On peut également citer les travaux de Bicchi *et al.* (1998) qui ont identifié 108 composés par CPG-SM après fractionnement de l'huile essentielle d'*Artemisia*

*roxburghiana*. La RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  a permis, quant à elle, l'identification de 23 composés, en majorité des isomères sesquiterpéniques.

Plus récemment, Delort et Jacquier (2009) ont analysé par CPG-SM et par RMN  $^{13}\text{C}$  chaque fraction obtenue après séparation par chromatographies répétitives de l'huile essentielle de fruits de *Citrus australasica*. Les auteurs ont identifié 195 composés (majoritairement le limonène et l'isomenthone) dont 4 nouveaux esters menthaniques.

Si la voie A, grâce à sa rapidité, est particulièrement adaptée aux analyses de routine, la voie B garantit l'identification des composés. Cependant, les diverses étapes de fractionnement et de purification demandent souvent un important investissement en temps. Une troisième voie (Voie C) a été initiée au début des années 1980 puis développée au laboratoire depuis une vingtaine d'années. C'est une voie intermédiaire, par rapport aux précédentes, puisqu'elle est basée sur l'identification et/ou la quantification par RMN  $^{13}\text{C}$  des principaux composés des mélanges naturels (huiles essentielles, extraits végétaux, résines, huiles végétales, etc.), sans séparation préalable.

### III. Méthode d'identification par RMN : VOIE C

Les premiers travaux relatifs à l'utilisation de la RMN  $^{13}\text{C}$  en tant qu'outil analytique des mélanges naturels ont été réalisés par Formàcek et Kubeczka (1982a ; 1984, 1988). En général, la RMN  $^{13}\text{C}$  a été utilisée pour confirmer l'identification des constituants préalablement identifiés par une autre technique analytique, la CPG-SM usuellement. Dans ce contexte, dès le début des années 80, l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse a initié, puis mis au point et développé, une véritable méthode d'analyse des mélanges complexes naturels par RMN  $^{13}\text{C}$  impliquant inévitablement une informatisation de la recherche. Cette méthode est

efficace, fiable et complémentaire des techniques conventionnelles (Tomi *et al.*, 1995 ; Bradesi *et al.*, 1996 ; Tomi et Casanova 2006 ; Bighelli et Casanova, 2009).

### III.1. Intérêt de la RMN $^{13}\text{C}$

En dépit de sa faible abondance isotopique naturelle (1,1 %) et d'un rapport gyromagnétique 5700 fois moins sensible que celui du proton (Günther, 1994), le  $^{13}\text{C}$  est malgré tout préféré aux autres noyaux dans le domaine de l'analyse des mélanges complexes :

- le carbone constitue le squelette de toutes les molécules organiques et les différents atomes présents sont, à quelques exceptions près, magnétiquement non équivalents. Le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$ , présente donc, dans la grande majorité des cas, autant de raies de résonance qu'il y a de carbones dans la molécule. De plus, la fréquence de résonance des carbones étant très sensible aux environnements électronique et stérique, la moindre modification structurale se traduit par une variation plus ou moins importante mais en général mesurable des déplacements chimiques de tous les carbones de la molécule. C'est pourquoi, il est possible d'identifier par RMN  $^{13}\text{C}$  la plupart des molécules organiques, même dans le cas où les molécules ont des structures très proches ;
- les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  peuvent être simplifiés par irradiation par découplage total des noyaux d'hydrogène, ce qui permet de n'observer dans le spectre qu'une seule raie de résonance par carbone (Williamsion et Neuhaus, 1989) ;
- le temps de relaxation transversal  $T_2$  (temps de relaxation spin-spin) est plus important pour le carbone que pour le proton. La largeur à mi-hauteur du signal de résonance étant inversement proportionnelle à  $T_2$ , il en résulte un gain dans la finesse des pics et donc en résolution ;
- le domaine de résonance du carbone s'étend sur une plage beaucoup plus vaste que celle du proton (240 ppm par rapport à 12 ppm), ce qui améliore notablement la résolution effective c'est-à-dire la dispersion spectrale (Günther, 1994) et évite un nombre rédhibitoire de superpositions des signaux dans le spectre du mélange ;

- l'enregistrement des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  est réalisé à température ambiante ce qui préserve les molécules thermosensibles d'une dégradation ou d'une transformation éventuelle ;
- la RMN étant une technique non destructive, l'échantillon peut être récupéré et éventuellement soumis à d'autres analyses.

### III.2. Identification des constituants en mélange

L'identification des constituants d'un mélange par RMN  $^{13}\text{C}$  est réalisée par comparaison des déplacements chimiques des carbones du mélange avec ceux des composés de référence contenus dans une ou plusieurs bibliothèques de spectres. Avec cette méthode, les composés ne sont pas préalablement purifiés, contrairement aux précédentes techniques de couplage entre un chromatographe et un spectromètre. Pour identifier un composé au sein d'un mélange, il faut donc être à même de pouvoir observer les signaux qui lui appartiennent et de les individualiser, puis d'attribuer les déplacements chimiques à une molécule donnée. Pour cela, les conditions expérimentales d'enregistrement des spectres doivent être optimisées et standardisées de façon à permettre une bonne reproductibilité des résultats obtenus.

### III.3. Observation des signaux

L'observation des signaux dans le spectre d'une molécule dépend de la quantité de produit disponible, de sa solubilité et de sa viscosité dans un solvant choisi ainsi que de la sensibilité de l'appareil qui s'exprime par le rapport signal sur bruit (S/B). Le manque de produit ou de sensibilité (S/B) peut être pallié par :

- une augmentation du nombre d'acquisitions. Il en découle un temps d'expérimentation plus long. D'ailleurs, il faut noter que le temps d'utilisation de l'appareil devient très vite prohibitif par rapport au gain escompté, S/B étant proportionnel à la racine carrée du nombre d'acquisitions ;

- l'utilisation d'une cryosonde (sonde à antennes refroidies) reliée à une unité cryogénique à l'hélium. Elle permet de multiplier par 4 la sensibilité et donc de diminuer d'un facteur 16 la durée des expériences ;
- de plus, la RMN voit sa sensibilité augmenter avec l'intensité des aimants supraconducteurs (23,5 Tesla pour les plus performants) ;
- enfin, l'utilisation de convertisseurs numériques performants améliore le traitement des données, tout comme l'utilisation de multiplications exponentielles effectuées directement sur le signal de la FID (Free Induction Decay ou décroissance libre d'induction) avant la transformée de Fourier (Williamson et Neuhaus, 1989 ; Günther, 1994 ; Hesse *et al.*, 2008 ; Claridge, 1999).

#### III.4. Individualisation des signaux

L'individualisation des signaux dépend de la résolution de l'appareil de RMN, elle-même fonction de la puissance de l'aimant et des caractéristiques du système informatique permettant l'acquisition du signal. De la même manière que pour la sensibilité, la résolution est meilleure quand on utilise un appareil à haut champ.

Divers paramètres influent sur la résolution :

- le champ magnétique : plus il est élevé, plus la séparation des signaux de résonance des différents noyaux est importante. Il en résulte une interprétation plus facile des spectres, ce qui est primordial dans le cas des études réalisées sur les composés ayant une masse moléculaire élevée (oligomères et protéines par exemple, polymère en RMN du solide), dont les spectres sont très complexes ;
- l'application d'une fonction exponentielle de Lorentz-Gauss (qui consiste à multiplier l'interférogramme par deux fonctions exponentielles de signe opposés) effectuée sur la FID préalablement à la transformée de Fourier peut également accroître la résolution des spectres (Günther, 1994 ; Claridge, 1999) ;
- la résolution digitale peut aussi être améliorée de manière considérable par l'utilisation de fenêtres spectrales réduites qui permettent d'enregistrer le spectre sur une largeur correspondant uniquement à la zone d'intérêt ou en plusieurs portions.

Dans le domaine des lipides, du fait des nombreuses superpositions situées autour de 25, 29, 34 et 130 ppm, l'utilisation de fenêtres réduites est fréquente. Ainsi, divers auteurs ont appliqué cette méthode à l'analyse de mélanges naturels contenant des composés lipidiques (mono-, di-, triglycérides) (Blaise *et al.*, 1997 ; Sacchi *et al.*, 1992). Cependant, le temps nécessaire à l'acquisition des données étant inversement proportionnel à la largeur de la fenêtre spectrale, l'enregistrement de ce type de spectres augmente considérablement le temps d'analyse.

### III.5. Attribution des signaux

L'identification d'un composé par RMN  $^{13}\text{C}$  dans un mélange repose essentiellement sur l'attribution des déplacements chimiques des carbones qui le composent. Contrairement à la majorité des autres techniques spectroscopiques, il est très peu probable que deux composés de structure différente présentent des spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  superposables ou insuffisamment différenciés. Effectivement, la fréquence de résonance des carbones étant très sensible à l'environnement électronique et stérique, la moindre modification structurale se traduit par des variations plus ou moins importantes (mais généralement mesurables) des signaux de quasiment tous les carbones de la molécule.

En conséquence, chaque molécule sera définie par une série de déplacements chimiques qui constitue son spectre (pour ainsi dire son empreinte digitale), à partir duquel elle peut être identifiée. Il est donc très important d'avoir une excellente reproductibilité des valeurs des déplacements chimiques, dans le spectre du mélange par rapport aux spectres des composés de référence. Divers paramètres doivent être pris en compte :

- la valeur du déplacement chimique (exprimée en ppm) est indépendante du champ magnétique  $B_0$  de l'appareil utilisé, des séquences impulsionnelles, des paramètres d'acquisition et de traitement du signal ;

- par contre, en fonction de la fonctionnalisation des molécules, les valeurs de déplacements chimiques peuvent être influencées par la nature du solvant, les liaisons hydrogènes, la concentration et la présence d'autres molécules.

Ainsi, il est donc préférable, de se référer aux déplacements chimiques de ses carbones tels qu'ils sont reportés dans une (des) bibliothèque(s) de spectres construite(s) au laboratoire, avec des paramètres expérimentaux parfaitement définis. Toutefois, il est possible de se référer aux données de la littérature pour l'identification des composés en mélange à condition que les paramètres d'analyse (dilution, nature du solvant, température) soient strictement identiques. La mise sur le marché d'aimants supraconducteurs de plus en plus sensibles du fait des champs magnétiques élevés, permet d'utiliser de faibles quantités de produit, donc de travailler à des concentrations faibles et de minimiser ainsi les liaisons hydrogènes susceptibles d'influer sur le déplacement chimique.

La RMN  $^{13}\text{C}$  a été appliquée avec succès à l'identification des constituants présents dans divers types de mélanges, dans des domaines très variés.

- L'agroalimentaire :

La RMN  $^{13}\text{C}$  peut être utilisée pour l'analyse de certains composés minoritaires de l'huile d'olive, tels que les acides gras libres, les glycérides partiels (mono- et diglycérides) ainsi que les constituants présents dans la fraction insaponifiable tels que les polyphénols, le squalène et le  $\beta$ -sitostérol (Sacchi *et al.*, 1997 ; Vlahov, 1999 ; Hidalgo et Zamora, 2003). D'autre part, dans le cadre de l'analyse par RMN  $^{13}\text{C}$  du vin, Kosir et Kidric (2001) ont identifié 17 acides aminés, présentés comme des constituants minoritaires, grâce à l'utilisation de séquences 1D et 2D. Ces auteurs ont donc montré l'intérêt de la RMN  $^{13}\text{C}$  dans le cadre d'un contrôle de qualité, pour la vérification d'éventuelles adultérations du vin.

- Les huiles essentielles :

Les précurseurs de l'utilisation de la RMN  $^{13}\text{C}$  pour l'identification des constituants majoritaires sont Formáček et Kubeczka (1982a, 1982b, 1984, 1988, 2002). D'autres travaux sur l'analyse des huiles essentielles par cette technique ont été décrits. Encore aujourd'hui, la plupart des auteurs utilisent la RMN  $^{13}\text{C}$  pour confirmer la présence des composés précédemment identifiés par CPG-SM :

- en 1999, Núñez et Roque ont identifié des sesquiterpènes (notamment le  $\beta$ -caryophyllène et le germacrène D) dans une fraction de chromatographie de l'huile essentielle de bois de *Guarea guidonia* ;
- en 2006, Radulovic *et al.* ont mis en évidence la présence de nombreux terpènes dans l'huile essentielle d'*Equisetum arvense* L., tels que l'hexahydrofarnésyl acétone, la cis-géranyl acétone, le thymol et le trans-phytol ;
- en 2008, Fatope *et al.* ont différencié les huiles essentielles d'*Ocimum forskolei* Benth de celles d'*Ocimum basilicum* L.

Par ailleurs, Ferreira *et al.* (2001) ont mis au point une méthode d'identification des constituants d'une huile essentielle, fondée sur l'étude du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du mélange et sa comparaison avec des spectres de mono- et sesquiterpènes décrits dans la littérature. Un logiciel informatique prend en compte simultanément la valeur des différents déplacements chimiques observés dans le mélange et la multiplicité de chacun des carbones, préalablement déterminée par des séquences DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfert). Après consultation de la banque de spectres décrits dans la littérature, le logiciel propose une identification. Cette méthode a été appliquée à l'étude de la composition chimique de *Piper cernuum* et *Piper regnellii* (10 et 5 composés identifiés, respectivement).

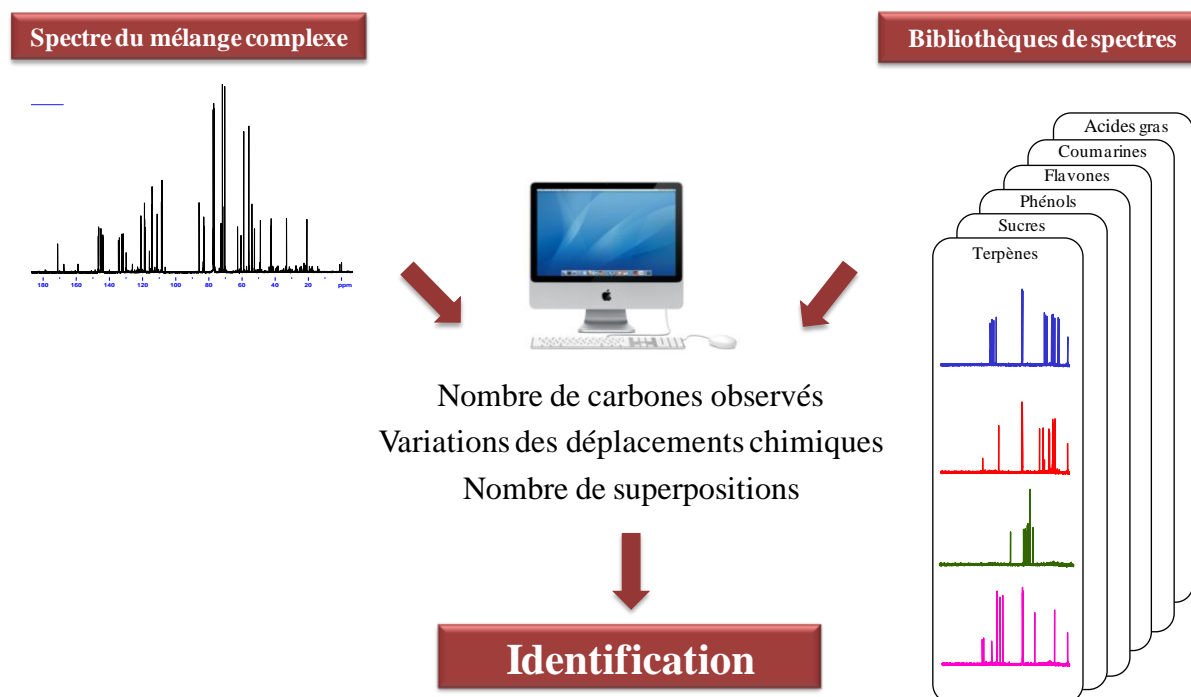


## IV. Méthode d'analyse développée au laboratoire

### IV.1. Principe de la méthode

Depuis la fin des années 80, l'équipe « Chimie et biomasse » met à profit la RMN  $^{13}\text{C}$  comme outil d'analyse des mélanges naturels complexes. Cette méthode est basée sur l'identification (voire la quantification) des constituants d'un mélange, à partir de son spectre RMN  $^{13}\text{C}$ , sans séparation au préalable (ou du moins en limitant les étapes de séparation).

Figure I.2 : Identification des constituants d'un mélange complexe par RMN  $^{13}\text{C}$



La particularité de cette méthode réside dans l'informatisation du traitement des données spectroscopiques, grâce à un logiciel d'aide à l'identification spécialement élaboré au laboratoire. Effectivement, les déplacements chimiques du mélange sont directement comparés avec ceux de composés de référence présents dans des bibliothèques de spectres (Figure I.2). L'enregistrement des spectres de référence et des mélanges est réalisé dans les mêmes conditions expérimentales (nature du solvant, concentration, paramètres d'enregistrement des spectres).

L'identification des composés présents dans le mélange est rendue possible par la prise en compte de trois paramètres directement accessibles par le logiciel :

- le nombre de pics observés par rapport au nombre de pics attendus pour chaque molécule ;
- le nombre de superpositions des signaux qui peuvent se produire quand les différents effets stériques et/ou électroniques font que deux carbones appartenant à deux molécules différentes présentent fortuitement le même déplacement chimique ou lorsque les composés présents ont une partie de leur squelette et de leur fonctionnalisation très proche ;
- les variations des déplacements chimiques des carbones dans le spectre du mélange par rapport aux valeurs de référence ( $\Delta\delta$ ).

Cette méthode d'analyse a été appliquée à différentes familles de molécules (terpènes, coumarines, sucres, lipides, flavonoïdes, etc.) selon un protocole expérimental spécifiquement adapté à chaque famille (nature du solvant, dilution, paramètres d'enregistrement des spectres).

Parallèlement des bibliothèques de spectres de composés de référence adaptées aux différentes familles de composés ont été constituées avec des composés commerciaux et sont régulièrement enrichies avec des composés isolés à partir de mélanges naturels ou encore préparés par hémi-synthèse. A l'heure actuelle, la bibliothèque de spectres la plus importante est celle comprenant des composés terpéniques. Elle contient plus d'un millier de molécules (mono-, sesqui- et diterpènes ainsi que des phénylpropanoïdes que l'on trouve dans les huiles essentielles). D'autres bibliothèques de spectres ont été construites : composés linéaires, sucres, coumarines, lignanes, acides gras, flavonoïdes, etc. Par ailleurs, pour chaque famille de composés, une seconde bibliothèque comprenant les données spectrales publiées dans la littérature récente a été élaborée, permettant ainsi de disposer d'un très grand nombre de spectres de référence.

L'avantage de la RMN  $^{13}\text{C}$  est que pour chaque molécule nouvelle isolée et caractérisée structuralement, son spectre est décrit dans sa totalité, contrairement à la description des autres spectres SM ou IR (seuls les principaux fragments ou les raies d'absorption les plus importantes sont décrits) ou encore RMN  $^1\text{H}$  (divers signaux apparaissant sous forme de multiplets). De plus, les spectres étant actuellement enregistrés à partir d'une quantité minimale (quelques milligrammes en général) de produit purifié, la concentration est faible et la reproductibilité des déplacements chimiques très bonne.

L'intérêt de la RMN  $^{13}\text{C}$ , c'est sa complémentarité avec des techniques conventionnelles (voies A et B) tout en alliant rapidité et fiabilité. Ainsi, l'identification des constituants des mélanges a été appliquée avec succès au laboratoire à différentes familles de produits naturels (huiles essentielles, huiles végétales, extraits végétaux, résines). Après l'enregistrement et le traitement de plusieurs milliers de spectres, nous pouvons faire le bilan suivant :

- la teneur minimale des composés identifiables avec notre spectromètre (9,4T) est de l'ordre de 0,3-0,4 % ;
- en général, tous les carbones des molécules identifiées sont observés, à l'exception de certains carbones quaternaires appartenant aux composés minoritaires ;
- le nombre de superpositions est assez limité et n'empêche donc pas l'identification d'un composé ;
- dans un même mélange, deux à trois douzaines de composés peuvent être identifiés. Par exemple, dans l'huile essentielle de *Piper bavinum*, 38 composés présents à des teneurs comprises entre 0,5 % et 10 % ont été identifiés (Lesueur, 2005) ;
- les variations des déplacements chimiques ( $\Delta\delta$ ) sont inférieures à 0,05 ppm dans la très grande majorité des cas. Il existe cependant quelques exceptions, en particulier avec les composés phénoliques (thymol et carvacrol) ou les composés carbonylés  $\alpha,\beta$ -insaturés, dont certains carbones  $\text{sp}^2$  présentent des variations de déplacement chimique plus importantes selon la polarité, la fonctionnalisation et l'abondance des autres constituants (Castola *et al.*, 1997).

## IV.2. Les domaines d'application de la RMN <sup>13</sup>C

Au sein du laboratoire, divers protocoles expérimentaux ont été développés en fonction de la famille de composés naturels à identifier (voire quantifier) et de l'appareillage dont nous disposons (appareil de RMN 4,7 Tesla puis 9,4 Tesla).

### IV.2.1. Les huiles essentielles

L'étude de la composition chimique d'une huile essentielle peut s'avérer parfois complexe. Nous avons vu que ni la complexité ni la fonctionnalisation de la structure ne constitue un handicap pour l'identification des constituants d'un mélange naturel par RMN <sup>13</sup>C. Au laboratoire, la méthode d'analyse basée sur la RMN <sup>13</sup>C, utilisée en complément de la CPG(Ir) ou en combinaison avec la CPG(Ir) et CPG-SM, a permis de caractériser un grand nombre d'huiles essentielles. Nous pouvons citer, à titre d'exemple, l'identification de :

- quatre-vingt neuf composés, dont trois acides, présentant le squelette eudesmane (acide costique, isocostique et 4-èn-ilicique) dans l'huile essentielle des parties aériennes d'*Inula graveolens* (Blanc *et al.*, 2004) ;
- quatre terpènes tricycliques (longibornéol, sesquithuriférol, ferruginol, Juniper cédro) dans l'huile essentielle de racines de *Juniperus communis* ssp. *alpina* (Gonny *et al.*, 2006) ;
- sept diterpènes pour la première fois dans l'huile essentielle d'aiguilles de *Pinus pinaster* Ait. de Corse (palustradiène, levopimaradiène, néoabiétadiène, labda-8(17),13(E)-dièn-19-al, etc.) (Ottavioli *et al.*, 2008) ;
- divers lactones *p*-menthaniques (mintlactone, isomintlactone, hydroxymintlactone, menthofurolactone et épimenthofurolactone) dans l'huile essentielle de *Mentha aquatica* de Corse (Sutour *et al.*, 2011).

Nous avons pu voir que la RMN <sup>13</sup>C est une technique analytique de choix adaptée à l'étude des huiles essentielles, mais elle est également intéressante pour

l'analyse délicate de mélanges naturels par les techniques conventionnelles, telles que les extraits végétaux, les résines et les huiles végétales.

#### IV.2.2. Les extraits végétaux et les résines (composés lourds, acides ou polaires)

La méthode développée au laboratoire a été également utilisée pour l'analyse de composés peu volatils présents dans des mélanges naturels très variés :

- les triterpènes contenus dans des extraits de *Quercus suber* L (Castola *et al.*, 1999, 2002, 2005) et dans un extrait de *Santolina corsica* (Ferrari *et al.*, 2005b) ;
- les taxanes dans des extraits d'aiguilles de *Taxus baccata* (Duquesnoy *et al.*, 2009) ;
- les sucres contenus dans les miels de Corse (Mazzoni *et al.*, 1997) et dans les extraits de *Pinus nigra* ssp. *laricio* et *Abies alba* M. (Duquesnoy *et al.*, 2008) ;
- les diterpènes acides et neutres présents dans les oléorésines de *Pinus nigra* ssp. *laricio* (Rezzi *et al.*, 2002, 2005 ; Cannac *et al.*, 2009) ;
- les coumarines dans un extrait dichlorométhanique de *Peudeudanum paniculatum* de Corse (Vellutini *et al.*, 2005).

Ces quelques exemples montrent le fort potentiel d'adaptation de la RMN  $^{13}\text{C}$  pour l'analyse de mélanges naturels, généralement constitués de nombreuses molécules (volatiles ou non) de familles chimiques différentes.

#### IV.2.3. Les huiles végétales

Nous avons vu précédemment que la RMN  $^{13}\text{C}$  est utilisée pour l'identification de composés minoritaires dans l'huile d'olive (paragraphe III.6). Cette technique permet également, au sein des huiles végétales, d'accéder à :

- la classe lipidique, obtenue à partir de l'examen des régions des carbones glycériques et des carbonyles (mise en évidence de triglycérides, de 1,2-diglycérides et de 1,3- diglycérides) ;

- l'identification, la quantification et la distribution (sur l'entité glycérique) des différentes chaînes grasses mono et poly insaturées ;
- et enfin, l'évaluation des proportions des chaînes grasses isomères de position telles que la chaîne grasse oléique (C18:1  $\Delta$ 9) et vaccénique (C18:1  $\Delta$ 11), souvent superposées en CPG ainsi que la stéréochimie Z ou E de la double liaison.

Dans les paragraphes suivants, nous allons développer quelques cas particuliers qui confirment l'intérêt de la RMN et sa complémentarité avec les autres techniques.

#### IV.2.4. L'identification de stéréoisomères

La RMN  $^{13}\text{C}$  constitue un bon moyen d'identification de certains stéréoisomères dont l'analyse par les techniques conventionnelles est délicate. A titre d'exemple, nous pouvons citer l'identification :

- des isomères géométriques des sesquiterpènes linéaires (farnésol, acétate de farnésyle et farnésal) qui ont pu être différenciés malgré la similitude des structures (Bradesi *et al.*, 1994) ;
- des couples  $\alpha$ -cédrène/ $\alpha$ -funébrène et  $\beta$ -cédrène/  $\beta$ -funébrène, qui ne diffèrent que par la stéréochimie des jonctions de cycles. Ils sont difficilement différenciables deux à deux car leur indices de rétention sont très proches et leurs spectres de masse quasiment superposables. Par contre, les spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  de ces quatre composés sont suffisamment différents pour pouvoir les identifier sans difficulté dans des échantillons d'huile essentielle de bois de cèdre (Tomi *et al.*, 1995) ;
- de quatre stéréoisomères du dihydroagarofurane dans l'huile essentielle d'écorces de *Cedrelopsis grevei* (Cavalli *et al.*, 2004a) ;
- de deux isomères des vinylcyclohexènes superposés sur colonne polaire et apolaire (4,4-diméthyl-2-vinylcyclohex-1-ène du 3,3-diméthyl-1-vinylcyclohex-1-ène) dans l'huile essentielle de racines de *Xylopiya aethiopica* de Côte d'Ivoire (Yapi *et al.*, 2012) ;
- de quatre stéréoisomères présentant le squelette 3,6;6,9-bisépoxyfarnés-1,7(14),10-triène dans l'huile essentielle de *Dittrichia viscosa* ssp. *viscosa* (Blanc *et al.*, 2006) ;

- de deux isomères sesquiterpéniques à squelette guaiane (furanoguaia-1,4-diène et furanoguaia-1,3-diène) dans l'huile essentielle de *Xylopi rubescens* (Yapi *et al.*, 2013).

#### IV.2.5. L'identification de molécules thermosensibles

L'identification par RMN  $^{13}\text{C}$  a été utilisée au laboratoire pour l'analyse qualitative et quantitative des composés thermosensibles. A titre d'exemple, la RMN  $^{13}\text{C}$  a permis d'identifier et de quantifier :

- l'ascaridole et son isomère (isoascaridole) dans l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* de Madagascar (Cavalli *et al.*, 2004b). En effet une partie de l'ascaridole s'isomérisse thermiquement en isoascaridole au cours de l'analyse en CPG.
- le furanodiène et le furanoélémente dans l'huile essentielle de rhizomes et fleurs de *Smyrniolum olustrum* de Corse (Baldochini *et al.*, 2001). Le furanodiène se transforme thermiquement au cours de l'analyse CPG en furanoélémente. Les deux composés ont donc les mêmes indices de rétention et ne sont pas différenciables en CPG(Ir) et en CPG-SM.
- les germacrènes A, B, C dans les huiles essentielles de *Cleistopholis patens* de Côte d'Ivoire. Le germacrène A subit une transformation thermique en  $\beta$ -élémente, rendant difficile leur quantification par CPG(Ir) dans l'huile essentielle de feuilles de *C. patens*. Il a été également observé que les germacrènes B et C se transforment respectivement en  $\gamma$ - et  $\delta$ -élémente dans l'huile essentielle d'écorces. L'examen de l'intensité des signaux dans le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  confirme la dégradation ou la transformation thermique partielle ou totale des germacrènes en éléments. La teneur erronée des germacrènes quantifiés par CPG est corrigée par la RMN  $^{13}\text{C}$  (Ouattara *et al.*, 2013).

#### IV.2.6. La variabilité chimique

Associée généralement à la CPG(Ir), la RMN  $^{13}\text{C}$  est une méthode tout à fait adaptée à la caractérisation d'une huile essentielle et plus particulièrement à la mise en évidence d'une variabilité intra et interspécifique, puisqu'elle permet l'identification des constituants présents à une teneur de 0,3-0,4 % dans l'huile essentielle à partir des spectres uniques du mélange. Cependant, l'étude de la variabilité chimique nécessite l'analyse d'un nombre important d'échantillons.

Cette technique a permis notamment l'étude de la variabilité chimique de l'huile essentielle d'aiguilles de *Juniperus communis* ssp. *alpina* de Corse. Les compositions des 109 échantillons ont été soumises à une partition par la méthode *k*-means et à une ACP, ce qui a mis en évidence la présence de deux groupes : un groupe important dominé par le limonène et le  $\beta$ -phellandrène, alors que le second contient essentiellement le sabinène à côté du limonène et du  $\beta$ -phellandrène. Plusieurs autres études ont été menées sur d'autres espèces parmi lesquelles, les extraits de liège (*Quercus suber* L.) (Corse, Sardaigne, Castola *et al.*, 2002) et de *Ferula communis* (Corse, Ferrari *et al.*, 2005a), les oléorésines de *Pinus nigra* ssp. *laricio* (Corse, Rezzi *et al.*, 2005), de *Juniperus oxycedrus* (Corse, Boti *et al.*, 2006), d'*Abies alba* (Corse, Duquesnoy *et al.*, 2007a) et de *Juniperus communis* ssp. *alpina* (Corse, Ottavioli *et al.*, 2009) et les huiles essentielles de *Mentha suaveolens* (Corse, Sutour *et al.*, 2010) et de *Xylopiya aethiopica* (Côte d'Ivoire, Yapi *et al.*, 2012).

### **V. Quantification par RMN**

#### V.1. La quantification par RMN $^{13}\text{C}$

##### V.1.1 Les différentes méthodes de quantification par RMN $^{13}\text{C}$

En RMN, les conditions expérimentales sont quantitatives lorsqu'elles permettent d'obtenir une magnétisation restaurée équivalente de l'ensemble des



noyaux ( $^{13}\text{C}$  ou  $^1\text{H}$ ) et donc une réponse homogène. Il est alors possible de quantifier chacun des constituants identifiés dans un mélange par l'intégration de leurs signaux, puisque la valeur de l'aire de chaque signal est directement proportionnelle au nombre de noyaux qui résonnent.

La quantification de composés en mélange peut être réalisée selon trois méthodes d'étalonnage :

- **l'étalonnage interne** : il nécessite la mise au point des conditions expérimentales qui permettent d'éliminer toute erreur systématique et d'obtenir une mesure expérimentale exacte (à l'erreur aléatoire près) de la quantité (masse ou nombre de moles) du composé. Cette méthode implique donc de contrôler la justesse, la précision et la linéarité des mesures en vue de sa validation. Une fois validée à l'aide de composés modèles purs et/ou en mélange, la méthode pourra être extrapolée à toute autre molécule présentant les mêmes caractéristiques vis à vis du système de détection (RMN, SM, IR, UV, etc.). Un des inconvénients de cette méthode est la préparation de la solution étalon. En effet, cette étape est celle qui génère la plus grande source d'erreur dans cette méthode de quantification ;
- **l'étalonnage externe** : il est généralement réalisé en évaluant la quantité pesée d'un composé en fonction de l'aire d'un ou plusieurs de ses signaux. Après une série de mesures, il est possible de déterminer l'équation de la droite représentative de la série (généralement par régression linéaire, *i.e.* méthode des moindres carrés), ainsi que le coefficient de détermination linéaire  $R^2$  (dont la valeur doit être proche de 1). Le coefficient directeur de la droite est utilisé comme facteur correctif. Par conséquent, la justesse de chaque mesure individuelle ayant servi à l'étalonnage est indépendante de la justesse des mesures ultérieures. Cette méthode présente l'avantage d'éliminer toutes les erreurs systématiques et l'inconvénient de ne s'appliquer qu'à la molécule qui a fait l'objet d'un étalonnage ;
- **la méthode ERETIC** (Electronic REference To access In vivo Concentrations) : elle permet de disposer d'un signal de référence généré électroniquement, ce qui évite l'addition d'une substance et une pollution de l'échantillon (Akoka *et al.*, 1999). Cette méthode est utilisée lorsque la complexité du milieu d'analyse rend

l'utilisation d'une référence interne délicate ou impossible (*in vivo*). Elle a par exemple été appliquée au dosage par RMN  $^1\text{H}$  des métabolites lors de la fermentation des bactéries lactiques (Silvestre *et al.*, 2005).

Les trois méthodes quantitatives par RMN ont été comparées en termes de précision (à court terme et à long terme), de robustesse et de linéarité. La quantification par étalonnage interne a été la plus précise et la plus stable dans le temps (Cullen *et al.*, 2013).

En ce qui concerne l'étalonnage interne, la quantification des composés d'un mélange requiert l'utilisation d'un signal de référence, conséquence de l'ajout d'une quantité connue de référence interne dans l'échantillon. Ainsi, la comparaison des aires des signaux des composés et de la référence interne permet de calculer la masse de chacun des constituants du mélange selon la formule [1] :

$$m_c = \frac{A_C \times M_C \times m_R}{A_R \times M_R} \quad [1]$$

$m_c$  : masse calculée du composé,  $A_R$  et  $A_C$  : aires du ou des signaux des noyaux pris en compte respectivement pour la référence interne et pour le composé considéré,  $m_R$  : quantité ajoutée (mg) de référence interne,  $M_R$  et  $M_C$  : masses molaires de la référence interne et du composé considéré respectivement.

En général, en RMN  $^{13}\text{C}$ , deux facteurs sont responsables de la réponse non uniforme des noyaux, c'est-à-dire de la magnétisation restaurée non équivalente des noyaux :

- les temps de relaxation longitudinale ( $T_1$ ) des carbones qui varient notamment en fonction de la taille et de la conformation des molécules. Les échanges d'énergie entre le milieu environnant et les atomes sont généralement moindres lorsque les molécules sont petites, et par conséquent les  $T_1$  sont plus importants (Pagelot, 1982) ;
- les variations d'effet NOE lequel représente les interactions magnétiques entre dipôles. En général, cet effet permet une amélioration du rapport S/B d'environ 200 % pour les signaux des carbones protonés par rapport à ceux des carbones

quaternaires lorsque l'on procède à l'irradiation des protons (spectre  $^{13}\text{C}$  découplé du  $^1\text{H}$ ).

Compte tenu de ces facteurs et de la possibilité d'utiliser plusieurs signaux d'une même molécule afin de calculer la moyenne des aires intégrées (minimiser les erreurs liées à l'intégration), diverses techniques ont été développées pour quantifier les constituants en mélange par RMN  $^{13}\text{C}$  :

- un angle d'impulsion de  $90^\circ$ , combiné à un délai d'attente entre deux impulsions successives égal à cinq fois le plus long  $T_1$ , permet d'obtenir une quantité de signal (rapport S/B) maximale et une magnétisation restaurée maximale de tous les carbones (relaxation totale) (Günther, 1994). L'application simultanée de ces paramètres et du découplage des protons en créneaux inverses (suppression de l'effet NOE) est reconnue comme étant la séquence standard de quantification par RMN  $^{13}\text{C}$  (Derome, 1987 ; Mooney, 1989 ; Evilia, 2001). Cependant, en dépit de son temps d'analyse extrêmement long, l'avantage principal de cette séquence est sa grande fiabilité. Cette séquence a donc été modifiée dans le but d'obtenir des spectres quantitatifs en un temps moindre (Giraudeau *et al.*, 2006). En effet, en calculant l'aimantation longitudinale optimale permettant d'accélérer la relaxation une fois le découplage stoppé, les auteurs ont quantifié la N,N-diméthylacétamide en un temps réduit d'un facteur 4 par rapport à la séquence conventionnelle ;
- l'addition d'un réactif de relaxation paramagnétique comme le  $\text{Cr}(\text{acac})_3$  ou le  $\text{Fe}(\text{acac})_3$  provoque, au moyen d'un mécanisme de relaxation électronique, une diminution des valeurs de  $T_1$  et l'élimination de l'effet NOE. Néanmoins, l'utilisation d'un tel réactif est connue pour induire à certaines concentrations un élargissement des raies de résonance, phénomène préjudiciable pour l'analyse des constituants de mélanges complexes (Mooney, 1989). L'utilisation de ces réactifs, qui avait quasiment été abandonnée, a été reprise plus récemment, par exemple par Jinping *et al.* (2002) qui ont utilisé le  $\text{MgCl}_2$  pour quantifier certains acides aminés et acides carboxyliques ;
- en opposition aux techniques précédentes, la quantification par RMN  $^{13}\text{C}$  peut également être réalisée en utilisant une séquence mettant en œuvre une série rapide

d'impulsions courtes (Blunt et Munro, 1976 ; Kalinowski *et al.*, 1991 ; Gröne *et al.*, 1998). Cette dernière est basée sur le fait que, lorsque la valeur de l'angle d'impulsion  $\alpha$  est petit, les différences d'aimantation entre des noyaux de  $T_1$  différents est moindre. L'utilisation d'angles d'impulsion petits diminue le délai entre deux impulsions successives et donc le temps d'analyse. Par exemple, 30 minutes sont suffisantes pour évaluer le rapport acides gras libres sur triglycérides dans l'huile de soja (Gröne *et al.*, 1998). Cependant, la diminution de l'angle d'impulsion s'accompagne systématiquement d'une baisse du rapport S/B qui, au-delà d'un certain seuil, ne permet plus l'identification et, *a fortiori*, la quantification des composés (notamment des composés minoritaires) ;

- enfin, l'utilisation d'une méthode intermédiaire constitue une bonne approche de l'analyse quantitative d'un mélange complexe contenant des noyaux de  $T_1$  différents. Dans ce cas, les conditions optimales de la séquence seront celles qui permettront de réduire au maximum les différences d'aimantation entre les noyaux de  $T_1$  différents, tout en permettant d'obtenir un rapport S/B suffisant dans un laps de temps aussi court que possible. La détermination de ces conditions peut être appréhendée par un calcul théorique suivant l'équation [2] qui permet de calculer, pour des valeurs de  $T_1$  et du délai de relaxation donnés, l'aimantation restaurée (S/B) d'un noyau (Becker *et al.*, 1979).

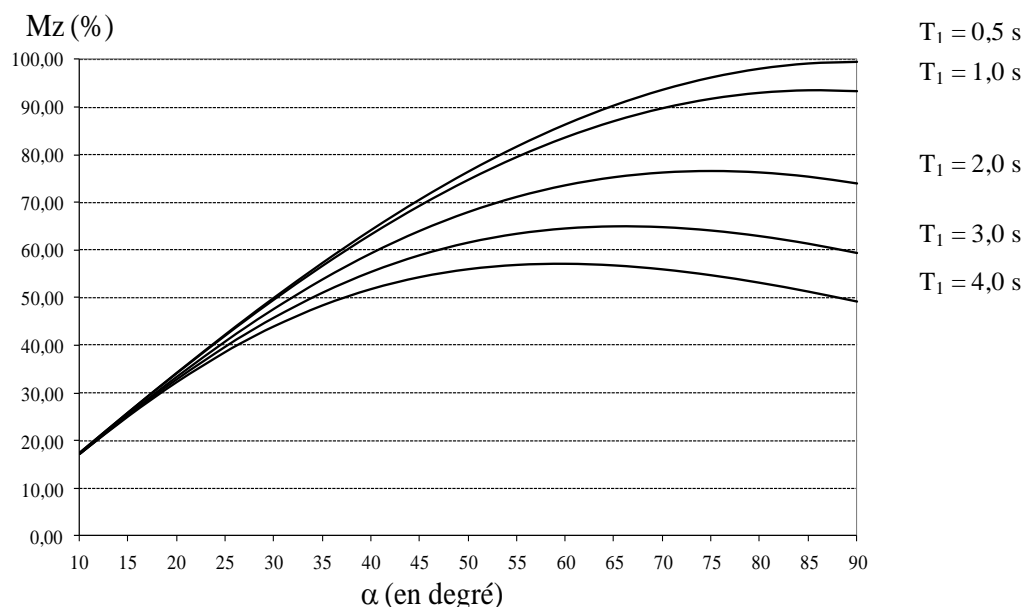
$$\frac{S}{B} = \frac{M_0 \sin \alpha (1 - e^{(-D/T_1)})}{\sqrt{D} (1 - e^{(-D/T_1)}) \cos \alpha} \quad [2]$$

S/B : rapport signal sur bruit ;  $M_0$  : aimantation initiale ; D : délai de relaxation en secondes ;  $T_1$  : temps de relaxation longitudinal exprimé en secondes ;  $\alpha$  : angle d'impulsion exprimé en degrés.

À titre d'exemple, l'application de la formule [2] pour différentes valeurs de  $T_1$  de noyau  $^{13}\text{C}$  comprises entre 0,5 s et 4,0 s ( $T_1$  mesurés dans les molécules de taille moyenne comme les terpènes notamment) et pour un délai de relaxation de 2,8 s (somme du temps d'acquisition de 2,7 s d'un appareil de routine opérant à 100 MHz et d'un délai d'attente de 0,1s), permet de tracer les courbes de variation de l'aimantation « Mz » restaurée (S/B) en fonction de  $\alpha$  (Figure I.3). Dans le cas présent, l'utilisation d'un angle d'impulsion de  $90^\circ$  induit une différence de l'ordre de 50 % entre les deux valeurs extrêmes de  $T_1$ . En revanche, la réduction de l'angle d'impulsion

s'accompagne d'une diminution des différences d'aimantation, mais également du rapport S/B qui ne doit pas être trop faible pour permettre l'observation des signaux des constituants d'un mélange complexe.

Figure I.3 : Courbes de restitution de la magnétisation (Mz) d'un noyau  $^{13}\text{C}$  en fonction de l'angle d'impulsion ( $\alpha$ ), pour un délai entre deux impulsions de 2,7 s et des valeurs de  $T_1$  comprises entre 0,5 s et 4,0 s



### V.1.2 La méthode développée et appliquée au laboratoire

Au laboratoire, plusieurs études quantitatives par RMN  $^{13}\text{C}$  ont été réalisées sur des mélanges plus ou moins complexes en utilisant un spectromètre opérant à 4,7 Tesla ou 9,4 Tesla et mettant en œuvre diverses séquences impulsionnelles.

Ainsi, la séquence classique de quantification utilisant le « découplage en créneaux inverses » et un délai d'attente de 5 fois le  $T_1$  le plus long, a été mise en œuvre pour des applications ponctuelles :

- la quantification de l'ascaridole (composé thermosensible) et l'isoascaridole dans l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* de Madagascar (Cavalli *et al.*, 2004b) ;

- 
- de même, deux lactones sesquiterpéniques biologiquement actives, la costunolide et la déhydrocostuslactone, ont été quantifiées dans des huiles végétales de *Laurus novacanariensis* de Madère, en présence de triglycérides majoritaires (Ferrari *et al.*, 2005c) ;
  - enfin, le 10,11-dihydroxy-(2E,6E)-farnésoate de méthyle, composé très polaire non élué en CPG, a été quantifié dans l'huile essentielle de *Cleistopholis patens* de Côte d'Ivoire (Ouattara, 2012).

Cependant, s'il est nécessaire de réaliser des analyses avec un temps raisonnable d'occupation de l'appareil dans le but d'analyser un nombre important d'échantillons par exemple, la quantification par RMN  $^{13}\text{C}$  nécessite la mise au point d'un protocole expérimental adapté à chaque famille de composés. Au laboratoire, la procédure suivie pour réaliser l'analyse quantitative est identique quelle que soit la famille de composés étudiée et peut se résumer sommairement comme suit :

- choix du solvant ;
- mesure des temps de relaxation  $T_1$  des carbones de la molécule à étudier (ou d'une molécule représentative d'une famille) ;
- choix de la référence interne ;
- choix de la séquence impulsionnelle ;
- validation de la procédure (justesse, linéarité et précision des mesures) ;
- application à la quantification de constituants de mélanges naturels (huiles essentielles, extraits végétaux, résines etc.).

La RMN  $^{13}\text{C}$  a notamment été mise en œuvre pour la quantification du furanodiène qui se transpose, sous l'effet de la chaleur, en furanoélémente. Ces deux molécules ont été quantifiées directement dans l'huile essentielle de *Smyrniolum olusatrum*, en utilisant une séquence impulsionnelle « qualitative » (angle d'impulsion de  $45^\circ$ , temps d'acquisition AQ de 1,3 s et délai de relaxation  $D_1$  de 2 s). La quantification a pu être réalisée en prenant en compte l'intensité, directement pour certains pics, en utilisant un facteur correctif pour d'autres. Ainsi, il a été possible

d'obtenir une bonne linéarité, une bonne précision et la justesse de la mesure (Baldovini *et al.*, 2001).

La quantification des sucres a pu être réalisée par RMN  $^{13}\text{C}$  dans différents miels de Corse. La séquence utilisait un angle d'impulsion de  $30^\circ$ , un délai  $D_1$  de 2 s, un temps d'acquisition de 1,3 s, et le 1,4-dioxane comme référence interne dans un mélange  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (75/25 ; v/v). Il a été ainsi possible de quantifier et de différencier les monosaccharides majoritaires (fructose et glucose) ainsi que le 8 di- et trisaccharides minoritaires (Mazzoni *et al.*, 1997). Ce protocole a aussi été utilisé pour quantifier les sucres anhydres (lévoglucosane, lévoglactosane et lévomanosane) contenus dans la fraction glucidique des liquides de pyrolyse de la biomasse (Castola *et al.*, 2000).

La quantification de diterpènes (acides ou neutres) a également été réalisée par RMN  $^{13}\text{C}$  dans les résines de pin laricio de Corse. Cette séquence est caractérisée par une taille mémoire de 32K, un angle d'impulsion  $\alpha$  de  $30^\circ$ , un délai  $D_1$  de 0,1 s, un temps d'acquisition de 1,3 s pour un appareil opérant à 4,7 T et le diglyme comme référence interne (Rezzi *et al.*, 2002). Dans ce cas encore, la rapidité et l'efficacité de la méthode ont permis d'étudier la variabilité de la composition chimique de 18 échantillons. Les résines de *Pinus nigra* ssp. *laricio* de Corse sont caractérisées par deux types chimiques en fonction des teneurs en acide lévopimarique et en acide déhydroabiétique. Le même protocole a été mis en œuvre pour identifier et quantifier trois triterpènes pentacycliques dans un sous-produit de l'extraction industrielle de feuilles d'olivier (*Olea europaea*) (Duquesnoy *et al.*, 2007b).

D'autre part, les triterpènes (possédant différents squelettes : friedélane, lupane et stéroïde) ont été quantifiés directement par RMN  $^{13}\text{C}$  dans 38 extraits dichlorométhaniques de liège provenant de Corse et de Sardaigne. Afin de réaliser l'analyse quantitative, les auteurs ont choisi une séquence de découplage permanent des protons (powergate) permettant de bénéficier de l'effet NOE pour accroître le rapport S/B, un angle d'impulsion standard de  $45^\circ$  et un temps d'acquisition de 1,3 s

(taille mémoire de 32 k) associé à un délai  $D_1$  de 2,0 s. La justesse, la précision et la linéarité des mesures ont été validées à partir de plusieurs expériences menées sur des composés purs puis sur des mélanges artificiels avant l'application à d'authentiques extraits de liège. Trois compositions ont été mises ainsi en évidence en fonction des teneurs en fridéline, acide bétulinique et 3- $\alpha$ -hydroxyfridélan-2-one (Castola *et al.*, 2002).

La quantification du dipropylène glycol (diol utilisé notamment dans les produits cosmétique et dans les parfums), présent sous la forme de trois isomères, a été réalisée dans deux « extraits de parfum » commerciaux de cèdre rouge et de cyprès (Ottavioli *et al.*, 2011). La quantification par CPG, dans les conditions expérimentales utilisées au laboratoire, était rendue délicate dans la mesure où le dipropylène glycol se présente sous forme de plusieurs signaux larges et mal définis sur le chromatogramme. Les auteurs ont mis en œuvre et validé (justesse, linéarité et précision des mesures) une séquence quantitative par RMN  $^{13}\text{C}$  (spectromètre opérant à 9,4 T) caractérisée par une taille mémoire de 128K, un angle d'impulsion de  $45^\circ$ , un temps d'acquisition de 2,7 s, un délai  $D_1$  de 0,1 s et l'hexane-1,6-diol comme référence interne. Ils ont ainsi quantifié le dipropylène glycol dans les extraits de cèdre rouge et cyprès à une teneur de 70,2 % et de 16,8 % respectivement.

Plus récemment, les taxanes (employés dans les traitements cliniques du cancer) ont été quantifiés par RMN  $^{13}\text{C}$  après fractionnement de l'extrait de *Taxus baccata* de Corse. Afin de réaliser l'analyse quantitative, les auteurs ont choisi une séquence de découplage permanent des protons (powergate), un angle d'impulsion standard de  $45^\circ$ , un temps d'acquisition de 2,7 s, un délai  $D_1$  de 0,1 s et l'hexane-1,6-diol comme référence interne. Ainsi, ils ont quantifié 6 taxanes représentant 52,7 % de la masse totale de la fraction (Paoli *et al.*, 2013).



## V.2. La quantification par RMN $^1\text{H}$

La quantification par RMN  $^1\text{H}$  est très utilisée depuis une dizaine d'années dans le domaine des produits naturels. Les travaux relatifs à cette technique ont été passés en revue par Pauli *et al.* (2005), qui fournissent un aperçu général théorique de la quantification par RMN  $^1\text{H}$  avant d'énoncer ses applications possibles pour l'analyse des produits naturels dans différents domaines :

- dans le domaine de la **phytochimie** (huiles essentielles), Hile *et al.* (2004) ont quantifié 16 constituants soufrés d'une huile essentielle d'ail, utilisée dans des granulés ayant un effet répulsif sur les oiseaux (Étourneau sansonnet) ;
- dans le domaine de l'**agroalimentaire**, Almeida *et al.* (2006) ont étudié, par RMN  $^1\text{H}$  associée à un traitement statistique des données (ACP), la composition chimique de bières. Par ailleurs, Berregi *et al.* (2003) ont quantifié l'épicatéchine (composé phénolique antioxydant) dans du cidre de pomme par RMN  $^1\text{H}$  ;
- dans le domaine **pharmaceutique et médical**, Li *et al.* (2004) ont développé une méthode permettant la quantification simultanée des trilactones terpéniques et des flavonols dans des préparations pharmaceutiques commerciales et dans des extraits au méthanol de feuilles de *Ginkgo biloba* (utilisé notamment pour traiter la toux et l'asthme). Enfin, Hazekamp *et al.* (2004) quantifient des cannabinoïdes (utilisés en tant qu'analgésique et antiémétique) dans des extraits de *Cannabis sativa*.

En conclusion, il ressort de ces études que l'analyse qualitative et quantitative des mélanges complexes peut être réalisée efficacement par RMN  $^{13}\text{C}$ , y compris au moyen d'un appareil de routine opérant à champ moyen (4,7 T ou 9,4 T). Ce type d'analyse a ainsi pu être appliqué à une grande variété de mélanges naturels : huiles essentielles, huiles végétales ou encore résines. Cependant, il est important de souligner que l'utilisation de cette technique d'analyse implique une optimisation et une adaptation des conditions expérimentales à chaque famille de molécule.

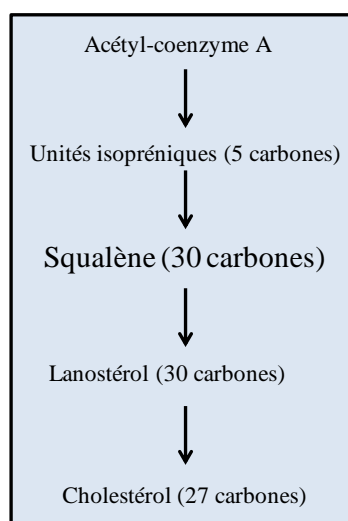
# Chapitre II

Quantification du squalène dans  
l'huile d'olive par RMN

Le squalène ((*E*)-2,6,10,15,19,23-hexaméthyltétracos-2,6,10,14,18,22-hexène) est un triterpène linéaire naturel, précurseur de l'ensemble des triterpènes, qui présente 6 unités isopréniques. C'est un intermédiaire clé dans la voie de biosynthèse des stérols dans le règne animal (Psomiadou et Tsimidou, 1999). La plus importante source de squalène d'origine animale connue est le requin (Deprez *et al.*, 1990). Selon les espèces, ce composé représente jusqu'à 80 % de son huile de foie (Wetherbee et Nichols, 2000). Pendant longtemps, l'huile de foie de requin a été considérée comme l'unique source de squalène adaptée à une exploitation industrielle. L'utilisation excessive de cette ressource marine a d'ailleurs entraîné la diminution de certaines espèces de requins.

Chez l'humain, le squalène est synthétisé dans la plupart des tissus puis converti rapidement en cholestérol (Figure II.1). Il est présent à la surface de la peau où il joue un rôle capital dans la physiologie de celle-ci. En effet, dans le sébum il agit comme une barrière protectrice contre les radiations UV et aide à l'hydratation et la réparation de la peau (Auffray, 2007).

Figure II.1 : Voie de biosynthèse simplifiée du cholestérol



Le squalène est une molécule très répandue chez les végétaux. En effet, il est présent au sein de nombreux oléagineux, ainsi que dans les fruits à coques, les graines et les légumes (Maguire *et al.*, 2004 ; Ryan *et al.*, 2007). Il représente de 0,2 % à 0,7 %

de la masse totale de l'huile d'olive (Liu *et al.*, 1976). D'ailleurs, le squalène est le composé majoritaire de la fraction insaponifiable de l'huile d'olive (60-75%) ce qui confère à celle-ci une grande stabilité oxydative, que ce soit dans le noir (auto-oxydation) ou lors d'exposition à la lumière (photo-oxydation) (Grigoriadou *et al.*, 2007).

En médecine, le squalène joue un rôle majeur dans la réduction des risques de cancer, en particulier dans le cas des cancers pancréatiques et du côlon chez les rongeurs. Son activité inhibitrice est liée à son activité antioxydante, associée à l'inhibition de l'HMG-CoA réductase, ainsi qu'à la réduction de la prénylation de l'oncoprotéine Ras (dont la mutation est rencontrée dans 50 % des cancers du côlon). Cette inhibition entraîne donc un blocage de la transduction du signal, limitant ainsi le développement et la croissance de la tumeur (Smith *et al.*, 1998 ; Newmark, 1997 ; Rao *et al.*, 1998). Le squalène est également utilisé pour la stabilité de certaines émulsions, tels que les vaccins et les formulations pharmaceutiques (Reddy et Couvreur, 2009 ; Fox, 2009).

En cosmétique, la forme hydrogénée du squalène (le squalane) est appréciée comme agent émollissant, apportant un toucher soyeux à la formulation (Jame *et al.*, 2010). Cet actif est donc très apprécié dans les crèmes, les laits et les sérums capillaires.

La méthode officielle pour extraire le squalène d'une matrice naturelle est proposée par l'Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1999). Celle-ci préconise l'extraction du squalène en plusieurs étapes : saponification des esters (majoritairement les triglycérides), extractions répétées aux solvants de la fraction insaponifiable, fractionnement par colonne chromatographique et divers traitements jusqu'au titrage.

L'analyse du squalène dans les huiles végétales est généralement réalisée par deux techniques chromatographiques :

- la CPG : l'utilisation de cette technique nécessite en général, la saponification des triglycérides (De Leonardis *et al.*, 1998 ; Giacometti, 2001) puis l'extraction de la partie insaponifiable par l'éther diéthylique, enfin l'isolement de la fraction hydrocarbonnée par CCM (Basti'c *et al.*, 1978 ; Bondioli *et al.*, 1993). Ponctuellement, l'huile d'olive a été diluée dans de l'éther diéthylique et injectée directement sur une colonne courte (3 mètres) (Owen *et al.*, 2000). Néanmoins, les auteurs précisent que la colonne chromatographique doit être changée toutes les 10 analyses ;
- la CLHP en phase inverse est généralement utilisée pour l'identification et la quantification des triglycérides et des diglycérides dans les huiles végétales (Mottram *et al.*, 1997). Elle est également adaptée pour l'analyse du squalène. L'huile végétale est préalablement traitée soit par centrifugation (Murkovic *et al.*, 2004), par digestion alcaline/saponification (Manzi *et al.*, 1998 ; He *et al.*, 2002 ; Oueslati *et al.*, 2009), par cristallisation fractionnée (Nenadis et Tsimidou, 2002) ou bien par extraction en phase solide (SPE) (Grigoriadou *et al.*, 2007). Dans de rares cas, l'huile végétale est injectée sans aucun traitement (CLHP couplée à la CPG) (Villèn *et al.*, 1998).

Ces techniques chromatographiques requièrent en général un investissement couteux en temps car elles nécessitent plusieurs étapes d'extraction du squalène. De plus, la succession des extractions peut entraîner une perte de la quantité totale de squalène. Rarement, des auteurs choisissent d'analyser le squalène sans aucune extraction. Ils soulignent toutefois l'usure rapide du matériel utilisé.

Contrairement aux précédentes techniques, la RMN a la capacité de mesurer simultanément et sélectivement les composés présents dans l'huile d'olive. L'analyse par RMN <sup>1</sup>H des huiles d'olives permet notamment :

- d'évaluer la teneur relative en squalène comparativement à d'autres composés (triglycérides, acides gras libres, stérols, etc.). Ainsi les résultats obtenus, soumis à une analyse statistique, permettent de déterminer la qualité, l'authenticité ou

l'origine géographique de l'huile d'olive (Mannina *et al.*, 2001 ; Mannina et Segre, 2002 ; Mannina *et al.*, 2009 ; Mannina et Sobolev, 2011) ;

- d'identifier, à partir des sous-fractions de la fraction insaponifiable (fractions des stérols, alcools et hydrocarbures notamment), des molécules dont la présence (ou l'absence) peut être corrélée avec l'origine géographique. Cette méthode utilise la technique des « empreintes digitales » (Alonso-Salces *et al.*, 2010).

Une étude porte sur la quantification du squalène dans le sébum humain. La concentration de squalène mesurée, avec un appareil de 600 MHz muni d'une cryosonde peut atteindre 20  $\mu\text{M}$  (Robosky *et al.*, 2008). Néanmoins, le sébum ne contient qu'une faible quantité de triglycérides.

L'objectif de notre travail est de mettre au point et développer une méthode de quantification du squalène dans l'huile d'olive, en évitant tout fractionnement et en utilisant un appareil RMN de routine, équipé d'un aimant de 9,4 Tesla (fréquence = 400 MHz en  $^1\text{H}$ ).

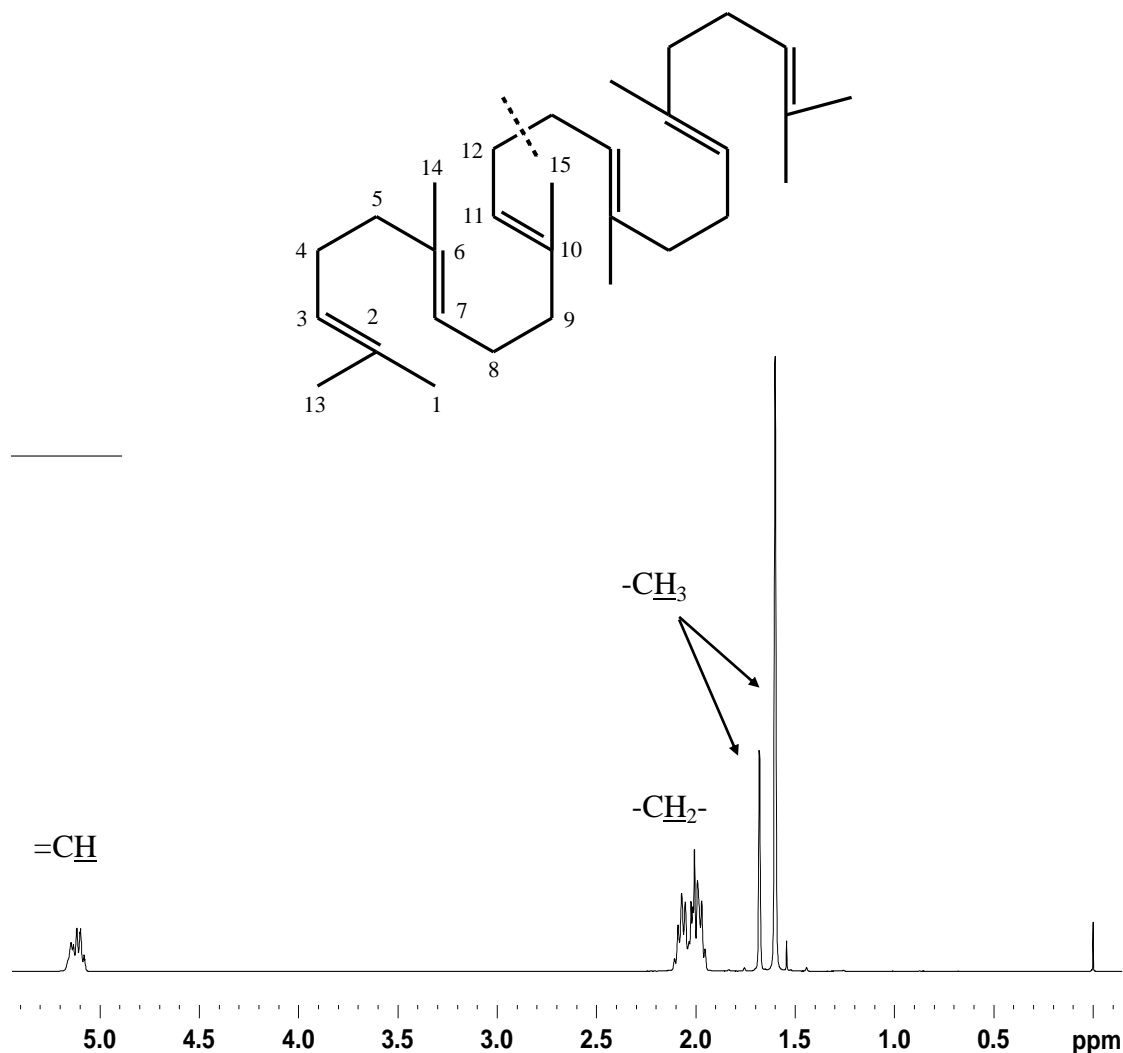
## I. Données RMN du squalène et de l'huile d'olive

### I.1. Le squalène

Nous avons enregistré les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du squalène pur dans les conditions standard d'analyse. Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du squalène présente 4 signaux (Figure II.2). En faisant référence à la moitié de la molécule (symétrie), nous observons :

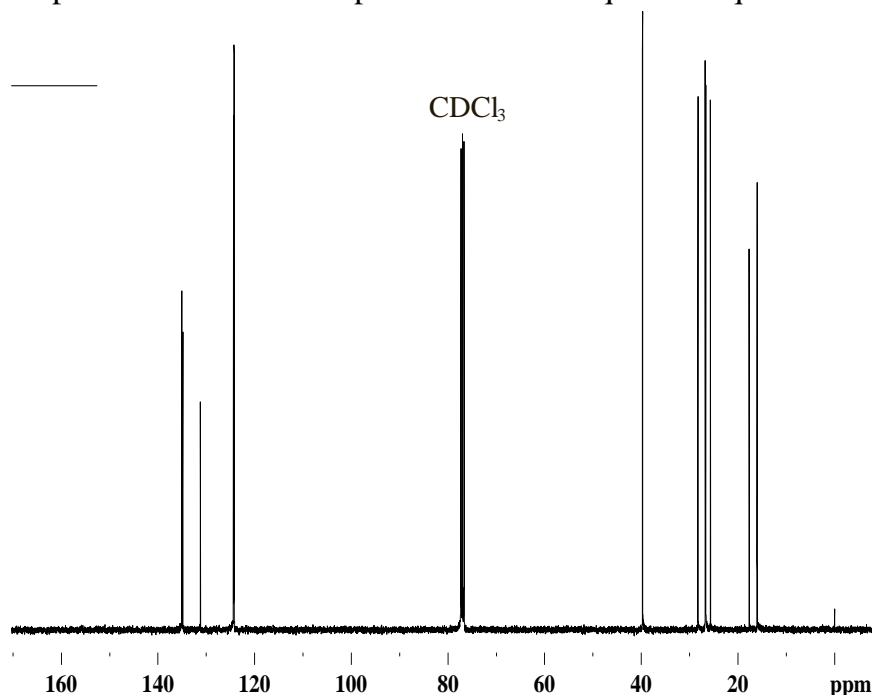
- deux singulets à 1,60 ppm et 1,68 ppm correspondant aux 12 protons portés par les carbones n<sup>os</sup>1, 13, 14 et 15 (méthyles) ;
- un multiplet à 2,00 ppm correspondant aux 10 protons allyliques portés par les carbones n<sup>os</sup>4, 5, 8, 9 et 12 ( $\text{CH}_2$ ) ;

- un multiplet à 5,10 ppm correspondant aux 3 protons portés par les carbones n<sup>os</sup> 3, 7 et 11 (CH éthyléniques).

Figure II.2 : Structure et spectre RMN <sup>1</sup>H du squalène

Le spectre RMN <sup>13</sup>C du squalène présente 15 signaux (Tableau II.1) :

- 3 signaux appartenant à des carbones quaternaires éthyléniques : 135,11 ; 134,90 et 131,26 ppm ;
- 3 signaux appartenant à des carbones éthyléniques : 124,42 ; 124,32 et 124,28 ppm ;
- 5 signaux appartenant à des carbones allyliques : 39,77 ; 39,74 ppm d'une part, 28,29 ; 26,78 ; 26,67 ppm d'autre part ;
- 4 signaux appartenant à des méthyles : 25,71 ; 17,69 ; 16,05 et 16,01 ppm.

Tableau II.1 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  et déplacements chimiques du squalène

C	$\delta(\text{litt})$	$\delta(\text{SQ})$	$\Delta\delta$	C	$\delta(\text{litt})$	$\delta(\text{SQ})$	$\Delta\delta$
1	25,63	25,71	0,08	9	39,76*	39,77°	0,01
2	131,01	131,26	0,25	10	134,94	135,11	0,17
3	125,45	124,42	-1,03	11	124,34 <sup>#</sup>	124,32 <sup>§</sup>	-0,02
4	26,79	26,78	-0,01	12	28,28	28,29	0,01
5	39,74*	39,74°	0,00	13	17,60	17,69	0,09
6	134,74	134,90	0,16	14	15,98 <sup>^</sup>	16,05 <sup>§</sup>	0,07
7	124,30 <sup>#</sup>	124,28 <sup>§</sup>	-0,02	15	15,93 <sup>^</sup>	16,01 <sup>§</sup>	0,08
8	26,66	26,67	0,01				

$\delta(\text{litt})$  : déplacements chimiques décrits dans la littérature selon Pogliani *et al.* (1994);  $\delta(\text{SQ})$  : déplacements chimiques observés dans le spectre;  $\Delta\delta$  : variation des déplacements chimiques entre les valeurs du spectre du squalène pur et les valeurs décrites dans la littérature. <sup>^</sup>, <sup>#</sup> et \* : déplacements chimiques pouvant être interchangeables; <sup>§</sup>, ° et <sup>§</sup> : superpositions de déplacements chimiques dans le spectre du squalène.

L'attribution des déplacements chimiques des carbones a été réalisée par Pogliani *et al.* (1994) (Tableau II.1). Les variations entre les valeurs des déplacements chimiques décrites par ces auteurs et celles du spectre que nous avons enregistré sont faibles (0,00-0,09 ppm) pour l'ensemble des carbones allyliques (9 carbones) ainsi que pour 2 carbones éthyléniques (sur 3) et elles sont plus élevées pour les 3 carbones éthyléniques quaternaires 0,16; 0,17 et 0,25 ppm. Enfin, pour le troisième carbone éthylénique (non quaternaire) nous observons une différence de déplacement chimique supérieure à 1 ppm. Ayant soigneusement vérifié cette valeur sur notre spectre RMN, nous concluons que le déplacement chimique du carbone C3 décrit par Pogliani *et al.*



(1994) résulte d'une malencontreuse erreur typographique. Il faut donc lire 124,45 ppm plutôt que 125,45 ppm.

## I.2. L'huile d'olive

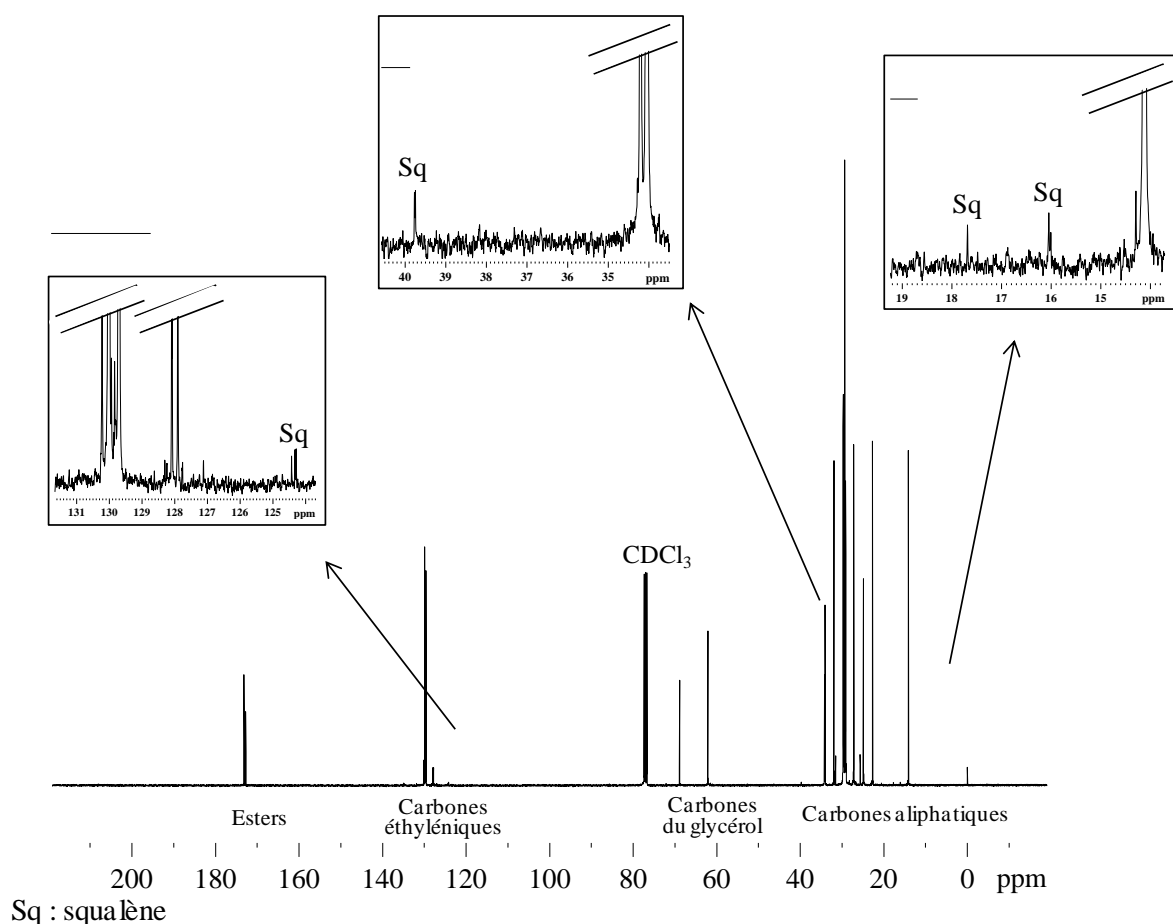
Nous avons enregistré les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  d'une huile d'olive commerciale.

### I.2.1 Le spectre RMN $^{13}\text{C}$ d'une huile d'olive

Sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  d'une huile d'olive, on distingue quatre régions spectrales qui contiennent les signaux des carbones correspondants (Figure II.3) :

- 172-174 ppm : carbones des fonctions esters ;
- 124-134 ppm : carbones éthyléniques ;
- 60-72 ppm : carbones du glycérol ;
- 13-35 ppm : carbones aliphatiques.

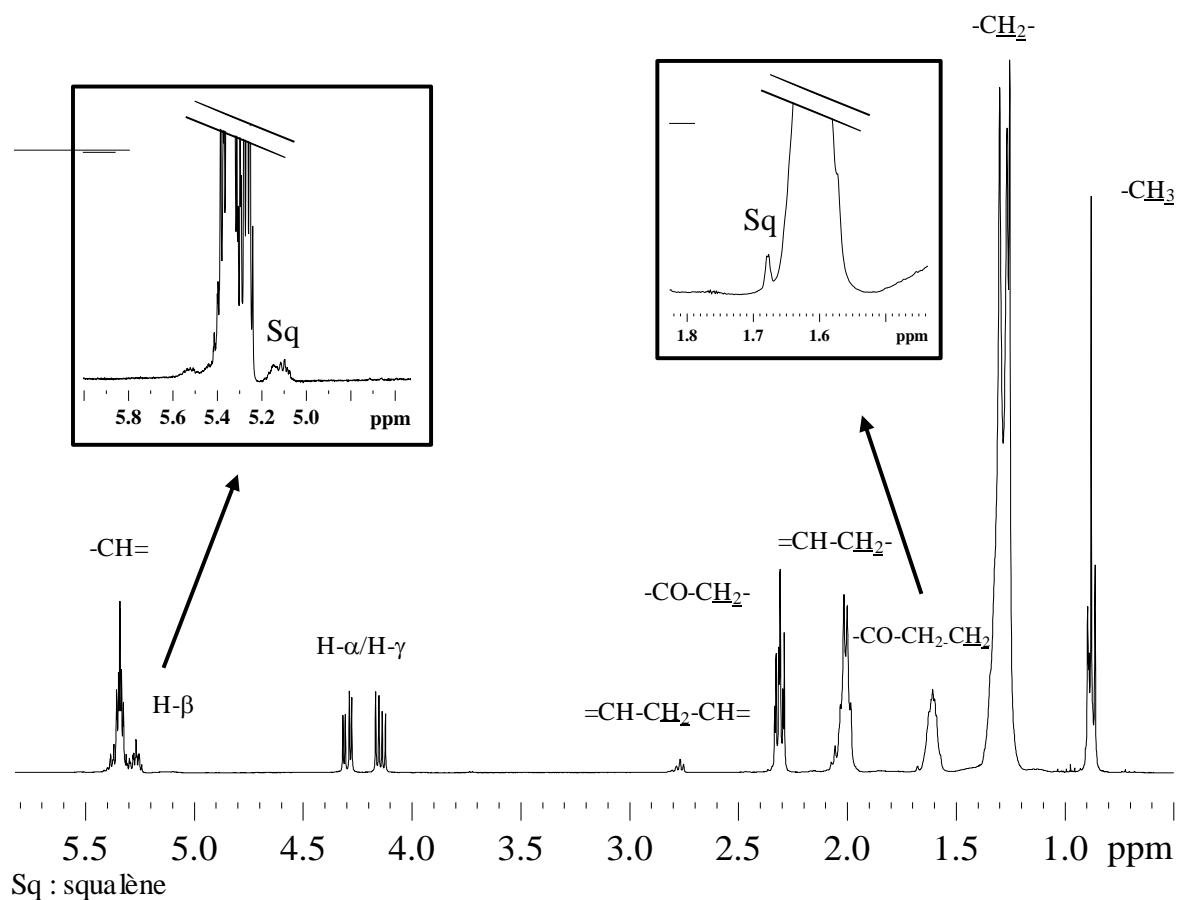
Dans le spectre RMN  $^{13}\text{C}$ , la totalité des signaux (d'intensité importante) correspondent aux carbones des triglycérides (la trioléine étant le composé majoritaire de l'huile d'olive). Nous distinguons aussi 12 signaux (sur 15) parfaitement résolus du squalène (Figure II.3). Les trois signaux non observés correspondent aux signaux des trois carbones quaternaires.

Figure II.3 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  d'une huile d'olive commerciale

### I.2.2 Le spectre RMN $^1\text{H}$ d'une huile d'olive

Les signaux des triglycérides présents dans l'huile d'olive sont décrits en RMN  $^1\text{H}$  par Vlahov (1999). Ainsi, nous distinguons diverses régions spectrales qui contiennent les signaux des hydrogènes correspondants (Figure II.4) :

- 5,3-5,4 ppm : hydrogènes éthyléniques ;
- 5,2 ppm : hydrogènes du motif glycérique (H- $\beta$ ) ;
- 4,1 et 4,3 : hydrogènes du motif glycérique (H- $\alpha$  et H- $\gamma$ ) ;
- 2,7-2,8 ppm : hydrogènes bis-allyliques ;
- 2,3 ppm : hydrogènes en position  $\alpha$  du carbonyle ;
- 2,0 ppm : hydrogènes allyliques ;
- 1,6 ppm : hydrogènes en position  $\beta$  du carbonyle ;
- 1,2-1,4 ppm : hydrogènes aliphatiques ;
- 0,8-0,9 ppm : hydrogènes des méthyles.

Figure II.4 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  d'une huile d'olive commerciale

## II. Mise au point et évaluation de la méthode de quantification du squalène par RMN

### II.1 Quantification du squalène par RMN $^{13}\text{C}$

Dans cette partie de l'étude, nous nous proposons de mettre au point une méthode de quantification du squalène dans la trioléine (triglycéride majoritaire de l'huile d'olive). Plusieurs séquences impulsionsnelles peuvent être employées pour la quantification des constituants d'un mélange par RMN  $^{13}\text{C}$ . Un angle d'impulsion de  $90^\circ$  associé à un délai d'attente entre deux impulsions de cinq fois le  $T_1$  le plus long, permet d'obtenir à la fois une quantité de signal maximale et la relaxation de tous les carbones. À l'opposé, la quantification peut être réalisée grâce à une série rapide d'impulsions courtes. Ces techniques ont été détaillées dans le chapitre I.

Nous choisissons, pour la quantification du squalène, la méthode par étalonnage interne. L'utilisation de cette méthode nécessite d'obtenir une réponse homogène des noyaux de  $^{13}\text{C}$  des composés et de la référence interne. Il est alors possible de quantifier chacun des constituants identifiés dans un mélange par l'intégration de leurs signaux, puisque la valeur de l'aire est proportionnelle au nombre de noyaux qui résonnent (Günther, 1994).

Les conditions optimales de séquence sont celles qui permettent de réduire au maximum les différences d'aimantation entre les noyaux des carbones de  $T_1$  différents, tout en permettant d'obtenir un rapport S/B suffisant dans un laps de temps aussi court que possible. La détermination de ces conditions peut être appréhendée par un calcul théorique suivant l'équation [2] qui permet de calculer l'aimantation restaurée d'un noyau, pour des valeurs de  $T_1$  et du délai de relaxation donnés (Becker *et al.*, 1979).

$$\frac{S}{B} = \frac{M_o \sin \alpha [1 - e^{(-D/T_1)}]}{\sqrt{D} [1 - e^{(-D/T_1)} \cos \alpha]} \quad [2]$$

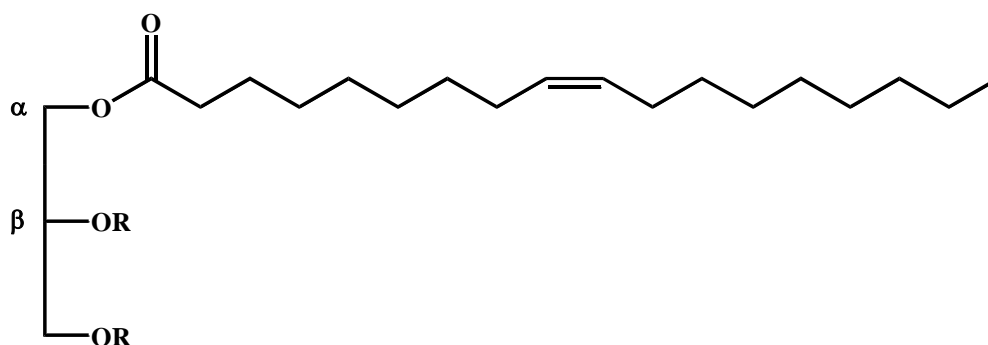
S/B : rapport signal sur bruit ;  $M_o$  : aimantation initiale ; D : délai entre deux impulsions exprimé en secondes ;  $T_1$  : temps de relaxation longitudinal exprimé en secondes ;  $\alpha$  : angle d'impulsion exprimé en degrés.

Une fois la méthode définie de façon théorique, elle doit être validée (justesse, précision et linéarité des mesures) par l'analyse du squalène pur, avant d'être appliquée à la quantification du squalène dans l'huile d'olive.

### II.1.1 Détermination des paramètres d'enregistrement

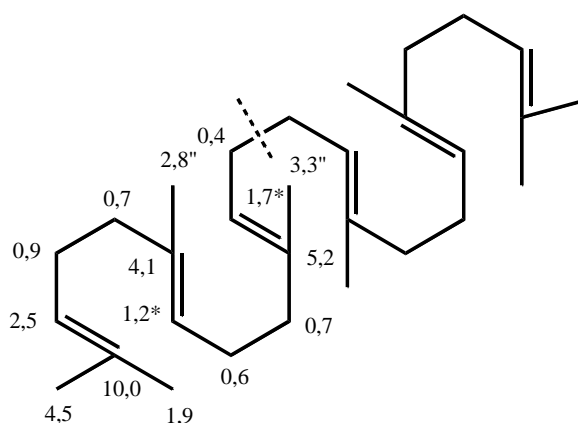
Afin de mettre au point et de valider l'analyse quantitative par la méthode de l'étalonnage interne, nous avons conservé le  $\text{CDCl}_3$  comme solvant et nous avons mené les expériences en présence de trioléine (environ 130 mg) comme modèle de l'huile d'olive (Figure II.5). Ce triglycéride est le composé majoritaire de l'huile d'olive, on peut donc considérer qu'il est représentatif de cette huile.

Figure II.5 : Structure chimique de la trioléine



Les temps de relaxation longitudinale ( $T_1$ ) des carbones du squalène ont été mesurés par la méthode d'inversion-récupération. Ils sont compris entre 0,4 et 10,0 s (Figure II.6). Comme attendu, les carbones quaternaires présentent les  $T_1$  les plus longs (4,1-10,0 s). Les carbones éthyléniques (non quaternaires) et allyliques ont des  $T_1$  compris entre 1,2 et 2,5 s et entre 0,4 et 0,9 s respectivement. Enfin, les  $T_1$  des quatre groupements méthyles varient de 1,9 à 4,5 s.

Pour la quantification, nous avons choisi d'intégrer uniquement les signaux des carbones dont les  $T_1$  sont compris entre 0,7 s et 4,5 s (carbones éthyléniques, allyliques et méthyliques quand ils sont non superposés et parfaitement résolus).

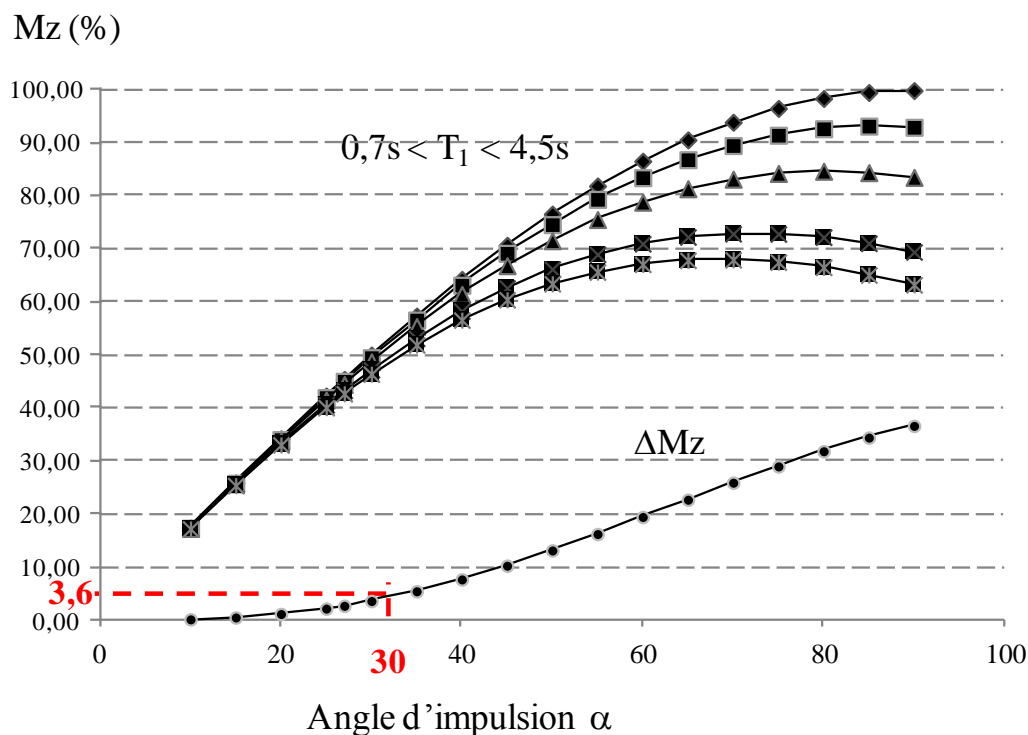
Figure II.6 :  $T_1$  (s) des carbones du squalène

L'oxyde de di-méthoxyéthyle ou diglyme ( $T_1$  des méthylènes = 3,8 s) a été choisi comme référence interne car il s'agit d'une molécule symétrique (faible nombre de signaux et utilisation d'une faible quantité de produit pour obtenir un signal

mesurable) dont les carbones résonnent à des fréquences peu susceptibles de provoquer des superpositions de pics avec les constituants de l'huile d'olive.

Nous avons ensuite déterminé les paramètres de la séquence impulsionnelle en appliquant la formule [2] pour différentes valeurs de  $T_1$  (0,7 à 4,5 s) et pour un délai entre deux impulsions de 3,8 s (temps d'acquisition = 2,7 s ; délai de relaxation = 1,0 s). Les courbes de variation de magnétisation restaurée (S/B) en fonction de l'angle d'impulsion  $\alpha$  ainsi obtenu, indiquent que dans ces conditions un angle d'impulsion de  $30^\circ$  permet à la fois d'obtenir une quantité de signal maximum et une différence de magnétisation restaurée faible (3,6%) entre les carbones du squalène et ceux du diglyme (Figure II.7).

Figure II.7 : Courbes de restitution de l'aimantation (S/B) d'un noyau en fonction de l'angle d'impulsion  $\alpha$ , pour un délai entre deux impulsions de 3,8 s et des valeurs de  $T_1$  comprises entre 0,7 s et 4,5 s



### II.1.2. Validation de la méthode de quantification

Nous avons testé la justesse de notre procédure quantitative en comparant les quantités pesées de squalène (0,37-1,66 mg), avec celles déterminées par RMN (Tableau II.2). La masse du composé a été calculée selon la formule [3].

$$m_{SQ} = \frac{A_{SQ} \times M_{SQ} \times m_D}{A_D \times M_D} \times p_{SQ} \quad [3]$$

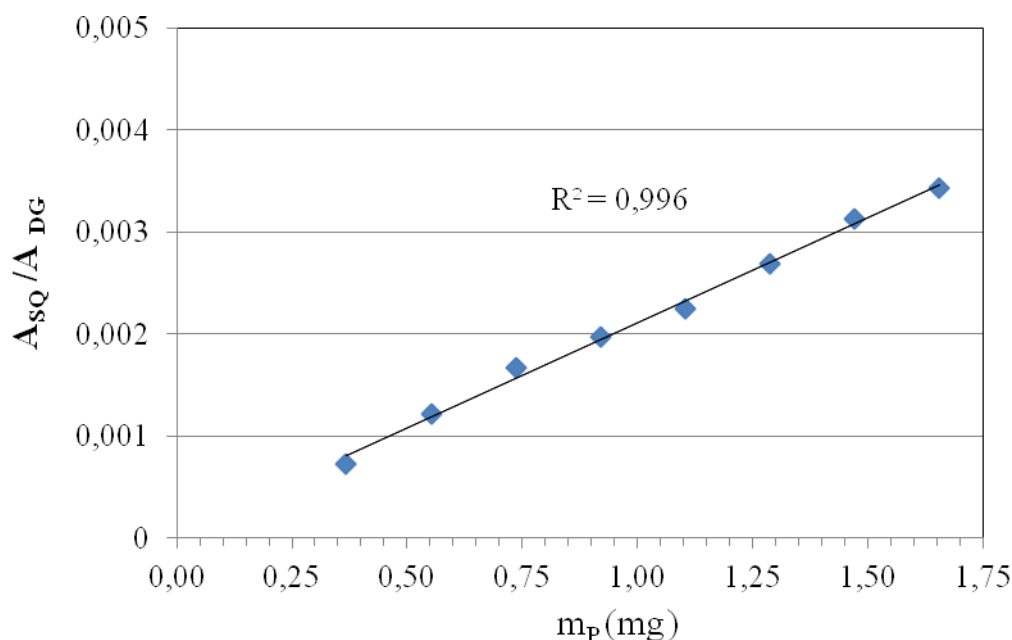
$A_{SQ}$  : moyenne des aires des signaux correspondant aux carbones protonés ;  $M_{SQ}$  : masse molaire du squalène ;  $m_D$  : quantité en mg de diglyme ;  $A_D$  : moyenne des aires des 2 signaux correspondant au diglyme ;  $p_{SQ}$  : pureté du squalène.

Tableau II.2 : Quantification du squalène par RMN  $^{13}C$

Squalène								
$A_D$	0,9901	0,9955	0,9959	1,0074	1,0011	0,9845	1,0168	1,0139
$A_{SQ}$	0,0734	0,1220	0,1668	0,1970	0,2253	0,2689	0,3129	0,3431
$m_p$ (mg)	0,37	0,55	0,74	0,92	1,10	1,29	1,47	1,66
$m_c$ (mg)	0,33	0,56	0,74	1,00	1,03	1,22	1,44	1,58
ER (%)	10,3	-0,7	0,0	-9,1	6,8	5,5	2,2	4,8

Masse moléculaire du squalène :  $410,7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  ; Masse de diglyme ( $m_D$ ) : 1,49 mg ;  $A_D$  et  $A_{SQ}$  : aire moyenne des signaux sélectionnés du diglyme et du squalène ;  $m_p$  et  $m_c$  : quantité de squalène (mg) pesée et quantité calculée selon la formule [3] ; ER : erreur relative (en %) entre  $m_c$  et  $m_p$ .

Les erreurs relatives entre les masses pesées et calculées sont comprises entre 0,0% et 10,3% pour l'ensemble des mesures, ce qui indique une bonne justesse (Tableau II.2). En exprimant le rapport de l'aire moyenne des carbones protonés du squalène ( $A_{SQ}$ ) avec celle du diglyme ( $A_D$ ), en fonction de la quantité pesée de squalène ( $m_p$ ), nous avons tracé la droite d'étalonnage du squalène (Figure II.8). Ainsi, nous avons observé une bonne linéarité des mesures puisque le coefficient de détermination ( $R^2$ ) est de 0,996.

Figure II.8 : Droite d'étalonnage de la quantification par RMN  $^{13}\text{C}$  du squalène

Enfin, nous avons enregistré cinq fois le spectre de l'échantillon contenant 0,55 mg de produit et calculé la répétabilité avec un intervalle de confiance de 99% (test de Student, coefficient bilatéral = 5,84). La répétabilité est de 0,56 mg +/- 0,04 mg soit 0,56 mg +/- 6,8 % ce qui indique une bonne précision des mesures.

La méthode que nous avons mise au point présente donc justesse, précision et linéarité des mesures. Le temps d'analyse est assez court puisque les 3000 accumulations, généralement nécessaires pour l'analyse d'un mélange naturel, sont réalisées en environ 3 heures alors que la même analyse dans les conditions standard de quantification (angle d'impulsion de  $90^\circ$  et délai  $D_1$  de 5 fois le  $T_1$  le plus long) durerait approximativement 5 heures 40 minutes.



## II.2. Quantification du squalène par RMN $^1\text{H}$

Notre objectif est de mettre au point une méthode de quantification par RMN  $^1\text{H}$  du squalène présent naturellement dans l'huile d'olive, qui soit fiable, rapide et applicable à un grand nombre d'échantillons dans le cadre d'analyses de routine.

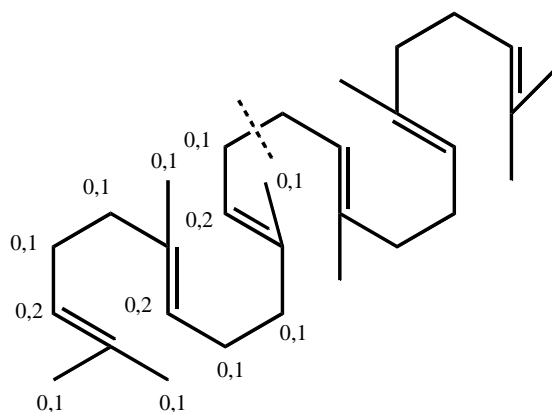
Pour réaliser l'analyse quantitative, nous avons suivi la même démarche que celle appliquée à la quantification par RMN  $^{13}\text{C}$  :

- détermination des paramètres d'enregistrement des spectres ;
- validation de la méthode de quantification.

### II.2.1. Détermination des paramètres d'enregistrement des spectres

La première étape d'une quantification par RMN  $^1\text{H}$  est le choix du signal. A partir du spectre de RMN d'une huile d'olive commerciale (paragraphe I.2.1) nous devons choisir pour l'intégration un signal non superposé aux signaux des protons des autres constituants de l'huile d'olive (Figure II.4). Le choix s'est porté sur un multiplet correspondant aux 6 protons éthyléniques (5,10 ppm). Ce signal a l'avantage de n'être superposé à aucun signal contrairement au signal à 1,68 ppm qui n'est pas parfaitement résolu (Figure II.4).

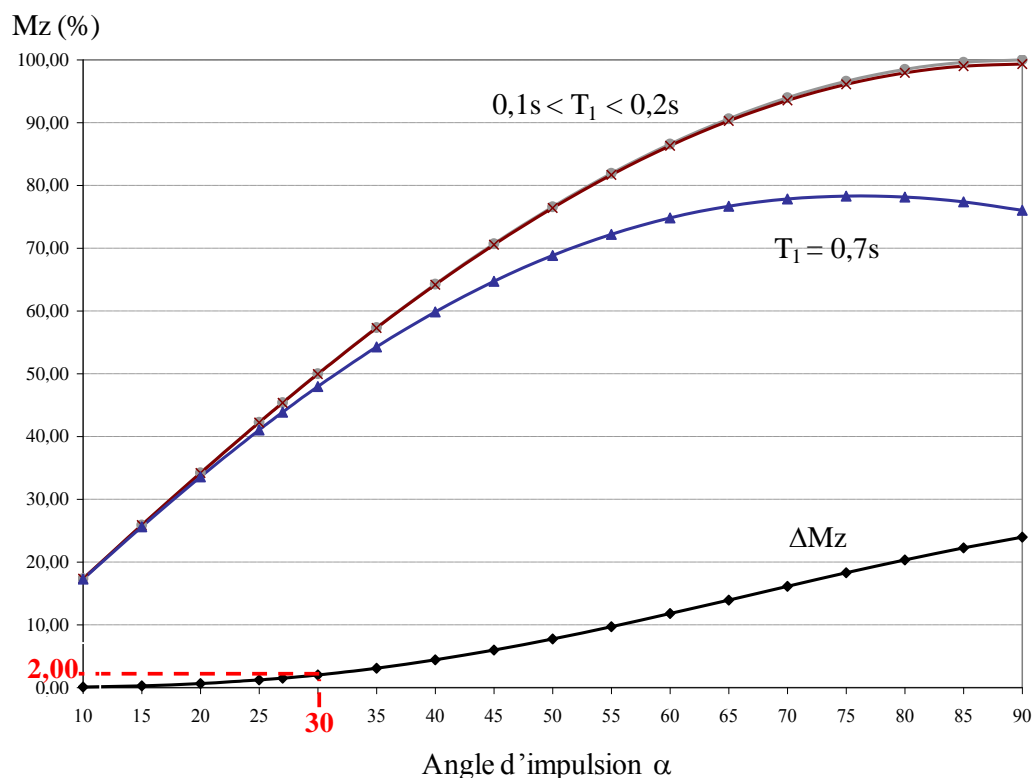
Afin de déterminer les paramètres de la séquence impulsionnelle, nous avons mesuré, les valeurs des  $T_1$  des protons du squalène par la technique d'inversion-récupération. Les valeurs des  $T_1$  sont comprises entre 0,1 s (méthyles et méthylènes) et 0,2 s (méthines éthyléniques) (Figure II.9).

Figure II.9 :  $T_1$  (s) des protons du squalène

L'anisole (méthoxybenzène) a été choisi comme référence interne car il s'agit ici aussi d'une molécule symétrique dont les signaux des protons aromatiques ne sont pas superposés à ceux des protons éthyléniques du squalène et des triglycérides insaturés. De même, le signal des protons du groupe méthoxy (singulet à 3,80 ppm) est parfaitement résolu et n'est superposé à aucun autre signal. De plus la valeur du  $T_1$  de ces protons (0,7 s) n'est pas très différente de celle des  $T_1$  des groupements éthyléniques (0,2 s), groupements correspondant au signal choisi pour l'intégration du squalène.

Nous constatons que pour un angle d'impulsion de  $30^\circ$  et pour un délai de relaxation  $D_1$  de 1,0 s, les courbes de variation de magnétisation restaurée (S/B) permettent à la fois d'obtenir une quantité de signal maximum et une différence de magnétisation restaurée, entre les protons du squalène et ceux de l'anisole, relativement faible (2%) (Figure II.10). Ces résultats permettent de conclure que la séquence impulsionnelle standard peut théoriquement être appliquée à la quantification du squalène en utilisant l'anisole comme référence interne.

Figure II.10 : Courbes de restitution de l'aimantation (S/B) d'un noyau en fonction de l'angle d'impulsion  $\alpha$ , pour un délai entre deux impulsions de 3,56 s et des valeurs de  $T_1$  comprises entre 0,1 s et 0,7 s.



La mise en œuvre de la séquence standard, qui utilise un temps de répétition entre deux impulsions de 3,56 s (temps d'acquisition  $A_q$  : 2,56 s ; délai de relaxation  $D_1$  : 1,0 s), permet l'enregistrement d'un spectre de RMN  $^1H$  de 16 accumulations (suffisant pour obtenir un spectre exploitable) en moins d'une minute. Ces résultats sont parfaitement adaptés à l'analyse d'un grand nombre d'échantillons d'huile d'olive.

Le choix de cette séquence a ensuite été validé avec du squalène pur commercial par diverses expériences en présence de trioléine (justesse, précision et linéarité des mesures).

### II.2.2. Validation de la méthode de quantification

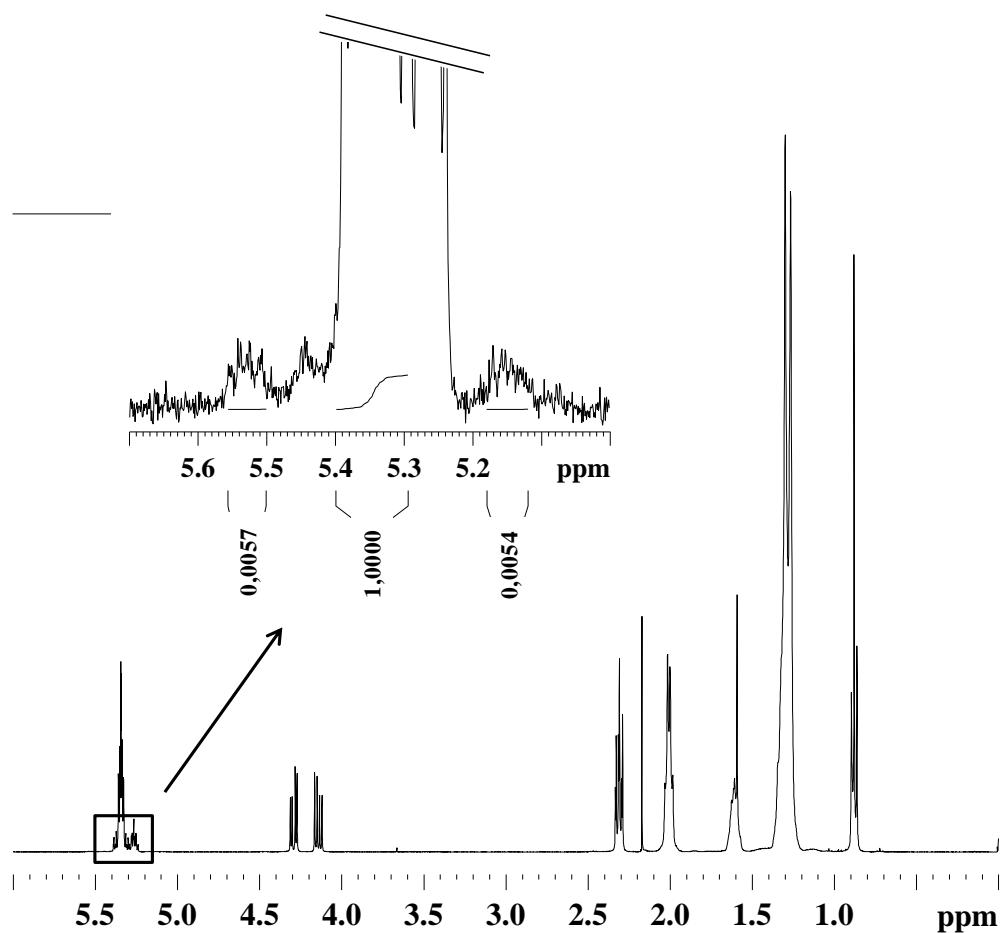
Nous avons tout d'abord mesuré la justesse de la procédure quantitative. Pour cela, nous avons comparé les quantités pesées de squalène (de 0,38 mg à 1,56 mg) avec celles quantifiées par RMN  $^1\text{H}$  ( $m_{\text{SQ}}$ ), selon la formule [4]. Pour cela, nous avons pris en compte l'aire des signaux correspondant aux protons éthyléniques (5,10 ppm) du squalène ( $A_{\text{SQ}}$ ) et l'aire du signal correspondant aux protons du groupement méthoxy (3,80 ppm) de l'anisole ( $A_{\text{A}}$ ).

$$m_{\text{SQ}} = \frac{3A_{\text{SQ}} \times M_{\text{SQ}} \times m_{\text{A}}}{n \times A_{\text{A}} \times M_{\text{A}} \times m} \times p_{\text{SQ}} \quad [4]$$

Le facteur 3 est dû à l'intégration des 3 protons du méthoxy de l'anisole ;  $m_{\text{SQ}}$  : masse du squalène ;  $A_{\text{SQ}}$  : aire du signal correspondant aux protons du squalène ;  $M_{\text{SQ}}$  : masse molaire du squalène ;  $m_{\text{A}}$  : quantité en mg d'anisole ;  $n$  : nombre de protons intégrés appartenant au squalène ;  $A_{\text{A}}$  : aire du signal des 3 protons du méthoxy de l'anisole ;  $M_{\text{A}}$  : masse molaire de l'anisole ;  $m$  : masse totale de l'échantillon en mg ;  $p_{\text{SQ}}$  : pureté du squalène.

Nous constatons que les masses de squalène quantifiées par RMN du  $^1\text{H}$  sont toutes surestimées par rapport aux masses pesées (environ 25%). Cette surévaluation de l'aire mesurée sur le spectre protonique, est due au couplage hétéronucléaire entre le carbone et le proton. En effet le carbone est constitué de deux isotopes stables  $^{12}\text{C}$  et  $^{13}\text{C}$  (abondances naturelles respectives de 98,9% et 1,1%), dont seul l'isotope  $^{13}\text{C}$  possède un moment magnétique et un spin  $I = 1/2$ .

Dans notre cas, l'un des signaux satellites résonne, sur le spectre proton, dans la même zone (5,10-5,20 ppm environ) que le signal du squalène (Figure II.11). Par conséquent, on observe une surestimation de l'aire du signal du squalène sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  (et donc de la masse de celui-ci). La démarche à suivre est donc d'estimer l'aire de ces signaux satellites, afin de pouvoir ensuite la déduire de l'aire totale.

Figure II.11 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  de la trioléine pure Sigma-Aldrich

La somme des aires des deux signaux satellites, présents de part et d'autre du pic central (correspondant aux protons du triglycéride), représente 1,1% de l'aire totale de ce pic central. L'aire du pic satellite qui induit la surestimation du squalène est donc de l'ordre de 0,56% de celle du pic central (Figure II.11).

Nous avons repris les 6 expériences précédentes et nous avons recalculé la masse de squalène en tenant compte de l'aire du pic à 5,15 ppm corrigée. Nous avons également voulu vérifier la reproductibilité de la méthode en répétant trois fois l'analyse (Tableau II.3).

Tableau II.3 : Quantification du squalène par RMN  $^1\text{H}$ 

Masse pesée (mg)	Masse calculée (mg)	ER
0,38	0,39	2,6
	0,40	5,3
	0,49	29,0
0,62	0,62	0,0
	0,58	-6,5
	0,51	-17,7
0,86	0,87	1,2
	0,82	-4,7
	0,75	-12,8
1,08	1,07	-0,9
	1,13	4,6
	1,19	10,2
1,32	1,33	0,8
	1,40	6,1
	1,45	9,9
1,56	1,57	0,6
	1,63	4,5
	1,68	7,7

Masse pesée et masse calculée selon la formule [4] ; ER : erreur relative (en %) entre  $m_c$  et  $m_p$ .

Nous constatons alors que la quantification du squalène par RMN  $^1\text{H}$  ne présente pas une bonne reproductibilité. En effet, si les erreurs relatives sont acceptables pour les masses pesées de squalène à 1,56 mg, 1,32 mg et 1,08 mg (10% au maximum pour les 3 expériences), elles deviennent rapidement importantes pour les masses de 0,38 mg (30% au maximum) et 0,62 mg (17% au maximum) notamment. Il serait donc hasardeux d'utiliser la RMN  $^1\text{H}$  (appareil 9,4 Tesla, 400 MHz) pour quantifier le squalène dans l'huile d'olive.

### III. Application à l'analyse du squalène dans l'huile d'olive de Corse

Nous avons enfin appliqué la méthode par RMN  $^{13}\text{C}$  à la quantification du squalène contenu dans l'huile d'olive de Corse. Pour cela, nous avons enregistré, dans les conditions quantitatives précédemment décrites, un spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  de 25

huiles d'olives. Nous repérons, dans les spectres des huiles d'olives, la plupart des signaux protonés (8/12 signaux) correspondant au squalène sans superposition et dont les  $T_1$  des carbones sont compris entre 0,7 s et 4,5 s. À l'aide de la formule [5], nous avons ainsi calculé la masse (mg) du squalène dans ces huiles d'olives, en prenant en compte l'aire moyenne de l'ensemble de ses signaux. Ensuite, nous avons calculé les pourcentages massiques du squalène selon la formule [5], que nous avons reportés dans le tableau II.5.

$$\%C = \frac{m_{SQ}}{m} \times 100 \quad [5]$$

%C : pourcentage du squalène ;  $m_{SQ}$  : masse calculée (en mg) à partir de la formule [3]; m : masse totale de l'échantillon.

Tableau II.5 : Quantification du squalène dans l'huile d'olive de Corse par RMN  $^{13}C$

n° HO	Variétés d'olive	Localités	Squalène (%)
1	Germaine/Zinzale/Picholine	Ghisonnaccia	<b>0,26</b>
2	Zinzala	Porto-Vecchio	<b>0,35</b>
3	Sabine	Volpajola	<b>0,35</b>
4	Sabine	Figari	<b>0,35</b>
5	Picholine/Germaine	Plaine orientale	<b>0,37</b>
6	Zinzala	Olmeto village	<b>0,37</b>
7	Picholine	Novella	<b>0,38</b>
8	Germaine	Saint-Florent	<b>0,40</b>
9	Sabine	Ota	<b>0,40</b>
10	Zinzala	Bonifacio	<b>0,41</b>
11	Sabine	Santo-Pietro-di-Tenda	<b>0,42</b>
12	Cortenaïse	Pietraserana	<b>0,42</b>
13	Germaine	Folelli	<b>0,43</b>
14	Germaine	Taglio-Isolaccio	<b>0,44</b>
15	Capannacce/Germaine	Sisco	<b>0,44</b>
16	Sabine/Picholine	Muro	<b>0,46</b>
17	Germaine/sabine	Sari-d'Orcino	<b>0,47</b>
18	Cortenaïse	Corte	<b>0,47</b>
19	Germaine	La porta	<b>0,49</b>
20	Germaine/Sabine	Aghione	<b>0,49</b>
21	Germaine	Lento	<b>0,51</b>
22	Germaine	Cervione	<b>0,51</b>
23	Capannacce	Cardo	<b>0,52</b>
24	Capannacce/Germaine	Cagnano	<b>0,67</b>
25	Germaine	Sainte-Lucie-de-Tallano	<b>0,83</b>

\* : pourcentages calculés selon la formule [5]

Au sein de l'huile d'olive corse, la quantité de squalène est comprise entre 0,26 % et 0,83% pour l'ensemble des échantillons (25 au total) et comprise entre 0,35% et 0,52% pour 22 d'entre eux. Ces résultats correspondent avec ceux indiqués dans la littérature (0,2 à 0,7%) (Liu *et al.*, 1976).

En conclusion, nous avons tenté de mettre au point 2 méthodes de quantification du squalène par RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ . En ce qui concerne la quantification par RMN  $^1\text{H}$ , les résultats ne sont pas reproductibles pour les masses le plus basses (notamment à 0,38mg). Toutefois, en ce qui concerne les masses plus élevées (à partir de 1,08mg), les résultats sont homogènes. La quantification du squalène par RMN  $^1\text{H}$  dans l'huile d'olive ne peut donc pas être réalisée avec un appareil de routine (400MHz). Parallèlement, nous avons mis au point et validé une méthode de quantification du squalène par RMN  $^{13}\text{C}$  en 3 heures environ. Nous avons ensuite appliqué cette méthode à la quantification du squalène présent dans l'huile d'olive de Corse. S'il s'avère qu'un screening soit nécessaire, dans le cas d'étude concernant un grand nombre d'échantillons, une sonde de 10 mm peut être utilisée. Ce changement de sonde permettrait ainsi d'augmenter la masse d'huile d'olive (d'un facteur 4) et par conséquent de diminuer le temps d'analyse.

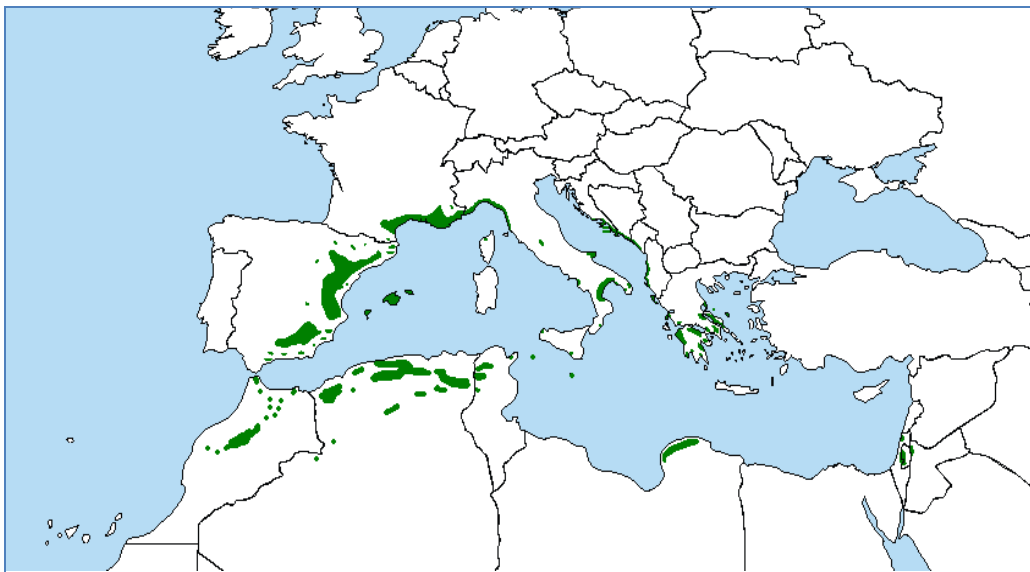


# Chapitre III

Caractérisation chimique de l'huile essentielle  
de *Pinus halepensis* de Corse

Le pin d'Alep ou pin blanc de Provence (*Pinus halepensis* Mill.) est un conifère de la famille des Pinacées qui regroupe environ 250 espèces. Il fût à l'origine appelé à tort pin d'Alep, par son descripteur (Philip Miller), qui croyait probablement que cet arbre était endémique à cette région. En réalité, il s'agit du pin de Calabre (*Pinus brutia*) qui pousse principalement dans la région d'Alep. La répartition géographique de *P. halepensis* est circumméditerranéenne. Cet arbre est l'un des plus communs dans la partie ouest du bassin méditerranéen, où il occupe environ 3,5 millions d'hectares. C'est d'ailleurs en Espagne et en Afrique du Nord (notamment en Algérie) que se constituent les massifs les plus importants. En France, il est présent essentiellement dans la région Provence-Alpes-Côte d'Azur et dans le Languedoc-Roussillon, jusqu'à 800 mètres d'altitude (Figure III.1).

Figure III.1 : Aire de diffusion du pin d'Alep, *Pinus halepensis*



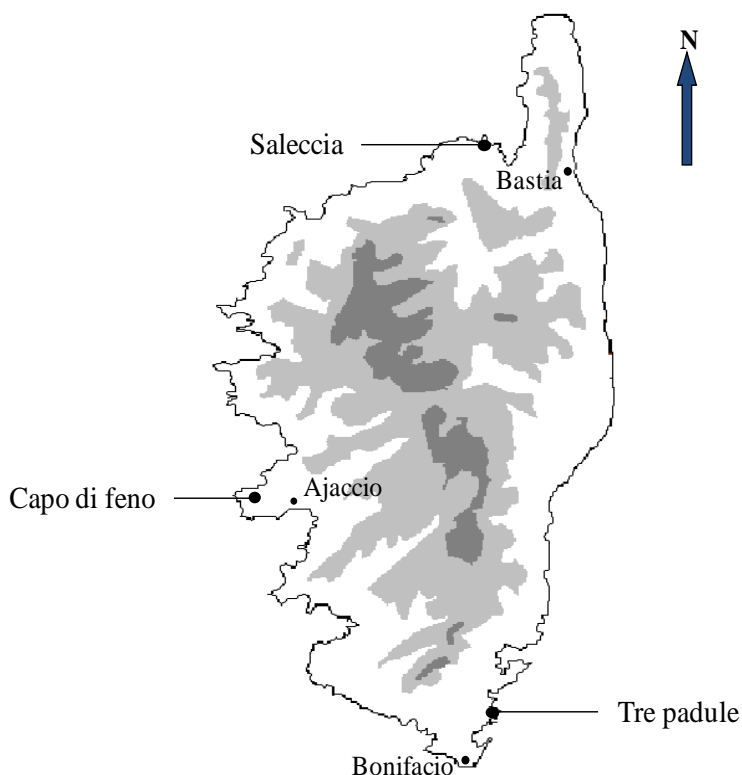
Le pin d'Alep est un conifère résineux de taille moyenne pouvant atteindre 25 mètres de hauteur. Il présente un port souvent penché et tortueux à la cime irrégulière et son feuillage est clair et léger. Les aiguilles sont très fines, réunies par deux, de 5 à 10 cm de long et de couleur vert-jaunâtre. L'écorce, d'abord lisse et grise argentée, devient crevassée, épaisse et d'un brun foncé à l'âge adulte. Arbre monoïque (fleurs mâles et femelles sur un même pied), il donne naissance tous les deux ans à des cônes ovoïdes

longs de 8 à 12 cm, d'un rouge-brun luisant, à pédoncule très épais. Ses graines sont abondantes et possèdent une grande aile persistante qui permet une dissémination rapide, éloignée et efficace (Figure III.2).

Figure III.2 : Le pin d'Alep (*Pinus halepensis*)



Souvent associé au chêne vert, le pin d'Alep est très abondant sur les terrains calcaires des massifs littoraux et des contreforts montagneux. Il montre d'assez faibles exigences écologiques et s'accommode de stations souvent ingrates. En effet, il pousse naturellement dans la roche calcaire et sèche du littoral méditerranéen, face aux embruns (Malcuit et Deleuil, 1957).

Figure III.3 : Stations de *Pinus halepensis* en Corse

En 1946, Litardière et Malcuit affirment que le pin d'Alep est présent à l'état spontané en Corse. Cette hypothèse est balayée en 1992, grâce à l'analyse du pollen du pin de Saleccia qui indique que cette espèce a été introduite en Corse sous le second empire (Reille, 1992). Actuellement, le pin d'Alep est présent en Corse dans trois localités (Saleccia, Tre Padule et Capo di Feno) (Figure III.3). La station de Saleccia (nord-ouest de l'île, près de Saint-Florent) est située à proximité de la région des Agriates. L'espèce y a été introduite pour la première fois au XIXe siècle, par les services forestiers, afin d'éviter l'ensablement des terres en arrière de la dune. Le pin d'Alep s'y est ensuite naturalisé. Dans les stations de Tre padule de Suartone (Extrême sud-est de l'île, près de Bonifacio) et de Capo di Feno (Centre ouest de l'île, près d'Ajaccio), cet arbre a été introduit au XXe siècle dans une démarche de reboisement du littoral.

Le pin d'Alep est employé pour la production d'essence de térébenthine à partir de l'oléorésine. Son bois sinueux est peu utilisé pour la menuiserie. Il est généralement utilisé pour la fabrication de palettes et de caisseries. Toutefois, en Corse le bois du pin

d'Alep n'est pas commercialisé contrairement à celui du pin laricio (*Pinus nigra* ssp *laricio*) et du pin maritime (*Pinus pinaster*).

## I. Les métabolites secondaires de *Pinus halepensis* : étude bibliographique

### I.1. L'essence de térébenthine

L'essence de térébenthine, issue de la distillation de la résine, est un liquide incolore dont l'odeur est caractéristique du pin. Elle entre dans la formulation de nombreux produits (peintures et vernis, insecticides, parfums, etc.).

Les premières études réalisées sur les extractibles du pin d'Alep concernent la composition chimique de l'essence de térébenthine, très riche en monoterpènes ( $\alpha$ - et  $\beta$ -pinène essentiellement). Ainsi, dès 1922, [Vézes et Dupont](#) soulignent la présence de l' $\alpha$ -pinène (supérieur à 95 %) dans l'essence de térébenthine de *P. halepensis* provenant de France. Depuis le début du XXe siècle, plusieurs articles décrivent une composition chimique largement dominée par l' $\alpha$ -pinène :

- teneur supérieure à 95 % dans l'essence de térébenthine d'Espagne, d'Algérie, d'Italie et de Grèce ([Lacrué, 1928](#)) ;
- 87 % dans la gomme de térébenthine d'Israël ([Mirov et Iloff, 1955](#));
- 90 % dans l'essence de térébenthine de Grèce ([Sandermann, 1962](#)) ;
- 96 % dans la gomme de térébenthine de Grèce ([Iconomou et al., 1964](#)) ;
- 94 % dans l'essence de térébenthine du pin d'Alep provenant de trois pays méditerranéens : France, Israël et Grèce ([Mirov et al., 1966](#)) ;
- 86 % à 89 % dans l'essence de térébenthine du Maroc ([Ghanmi et al., 2005, 2007](#)).

La composition de l'essence de térébenthine, obtenue à partir du pin d'Alep, se différencie peu de celle obtenue à partir d'autres espèces de pins, tel que le pin maritime (*Pinus pinaster*) par exemple. En effet, l'essence de térébenthine de *P. pinaster*,

provenant du Maroc par exemple, contient de 76,9 % à 78,6 % d' $\alpha$ -pinène (Ghanmi *et al.*, 2005, 2007).

### I.2. L'oléorésine

À notre connaissance, seules deux publications font état de la composition chimique de l'oléorésine de *P. halepensis* (échantillons provenant de Grèce) :

- Mita *et al.* (2005) ont réalisé le suivi de la composition chimique de 10 oléorésines durant une année. Ainsi, ils ont observé que la teneur en  $\alpha$ -pinène, constituant ultra-majoritaire, ne variait pas au cours du temps (92,10-93,43 %) ;
- en 2010, Karanikas *et al.* ont constaté que la composition chimique de l'oléorésine présentait des variations quantitatives en fonction du rendement et de la provenance géographique. Les composés majoritaires relevés sont l' $\alpha$ -pinène (4,47-33,29 %), l'abiétate de méthyle et l'acide abiétique réunis (3,20-41,28 %), l'acide palustrique (0,77-10,09 %), l'acide isopimarique (1,77-6,94 %) et l'acide néoabiétique (0,64-5,71 %).

### I.3. Les extraits

Différentes études ont été réalisées sur la composition chimique des extraits de *P. halepensis*. Deux types de solvants ont été utilisés. L'utilisation du cyclohexane ou de l'hexane permet l'extraction de terpènes et d'acides résiniques, tandis que le mélange acétone/eau et/ou de l'eau acidifiée par une solution d'HCl, permet d'extraire les flavonoïdes. Ainsi,

- Ormeño *et al.* (2007) ont mis en évidence la présence de terpènes contenus et émis par diverses espèces du pourtour méditerranéen (dont *P. halepensis*). Par extraction des aiguilles au cyclohexane, ils ont obtenu trois composés majoritaires : l' $\alpha$ -pinène (1488  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène (650  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) et le  $\delta$ -3-carène (285  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) ;
- des travaux récents réalisés sur six espèces de pins de Turquie (Kilic *et al.*, 2011) ont décrit les extractibles de cônes obtenus avec de l'hexane. On retrouve majoritairement

des acides résiniques (19,6 %) tels que les acides abiétique (7,5 %), néoabiétique (3,9 %) et palustrique (2,6 %) ;

- [Kaundun et al. \(1998\)](#) ont étudié la variabilité géographique des flavonoïdes contenus dans les aiguilles de *P. halepensis* de plusieurs pays européens. Cette étude a été menée sur 215 arbres. Le solvant utilisé est de l'eau acidifiée par HCl. Deux types de flavonoïdes sont extraits, d'une part des anthocyanes (pigments naturels des feuilles), telles que la prodéphinidine et la procyanidine (93,6 % et 6,4 % respectivement) et d'autre part des flavonols tels que la quercétine, l'isorhamnétine et le kaempférol (pourcentages moyens respectifs : 26,2 % ; 26,2 % et 23,2 %).

Les études environnementales menées par [Pasqualini et al. \(2003\)](#) ont permis d'établir que les composés phénoliques présents dans les aiguilles de *P. halepensis* étaient des bio-indicateurs de la qualité de l'air (degré de pollution par dioxyde de soufre et oxyde d'azote). Les solvants d'extraction utilisés sont le méthanol aqueux à 70 % acidifié par HCl pour les phénols totaux, puis l'éther diéthylique pour les phénols simples. Les trois acides phénoliques majoritaires sont les acides protocatéchique (jusqu'à 71  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), vanilique (jusqu'à 24  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) et coumarique (jusqu'à 18  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

Enfin, une seule étude porte sur l'activité biologique des extraits de *P. halepensis*. Très récemment, [Ustun et al. \(2012\)](#) ont testé l'activité antioxydante et anticholinestérase des extraits d'aiguilles et de branches de différentes espèces de pins de Turquie. Trois solvants ont été choisis (acétate d'éthyle, acétone et éthanol) afin d'extraire les phénols et les flavonoïdes. L'extrait d'aiguilles de *P. halepensis* à l'éthanol est l'extrait de pin qui présente la plus importante activité inhibitrice contre l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase parmi les cinq espèces de pins étudiées (82,5 % d'activité inhibitrice par rapport à la galanthamine, molécule de référence indiquée dans le traitement de la maladie d'Alzheimer).

#### I.4. Les huiles essentielles

De nombreuses études ont été réalisées sur la composition chimique de l'huile essentielle de *Pinus halepensis*. En général, elles concernent la composition de l'huile essentielle de diverses parties du végétal (aiguilles, cônes ou branches) soit d'un seul individu, soit d'un échantillon collectif. Une seule étude porte sur le suivi de la composition d'huiles essentielles d'aiguilles et de branches sur une période de récolte définie.

- L'huile essentielle de branches

À notre connaissance, quatre publications font état de la composition chimique d'huiles essentielles de branches de *P. halepensis* dominée par les monoterpènes :

- en Espagne, le composé majoritaire est le sabinène (57,7-69,4 %), suivi de l' $\alpha$ -pinène (24,7-31,8 %). La composition chimique varie légèrement durant les neuf mois de récolte (Zafra et Garcia, 1976) ;
- en Italie centrale, deux compositions ont été mises en évidence. La première est nettement dominée par l' $\alpha$ -pinène (61,8 %) suivi du myrcène (20,1 %) tandis que ce dernier composé est le constituant majoritaire (42,1 %) du deuxième échantillon à côté de l' $\alpha$ -pinène (27,9 %). Le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène est présent dans les deux échantillons à une teneur appréciable (respectivement 8,5 % et 14,3 %) (Macchioni et al., 2002, 2003) ;
- en Turquie, l'huile essentielle de branches est dominée par le  $\beta$ -pinène et le limonène à des teneurs identiques (18,7 %), suivi de l' $\alpha$ -pinène (16,4 %) et du  $\delta$ -3-carène (16,3 %) (Ustun et al., 2012).

- L'huile essentielle de cônes

Seulement deux études concernent l'huile essentielle de cônes de *Pinus halepensis* (Macchioni et al., 2003 ; Tumen et al., 2010). Ces études, réalisées en Italie et en Turquie, font état d'une composition chimique dominée par l' $\alpha$ -pinène (53,6 % en Italie, 47,1 % en Turquie), suivi par le myrcène (13,7 % et 6,2 %) et le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène (6,7



% et 11,2 %). On note également la présence de l'oxyde de caryophyllène (7,5 %) dans l'huile essentielle de Turquie ([Tumen et al., 2010](#)).

- L'huile essentielle d'aiguilles

En ce qui concerne le genre *Pinus*, l'huile essentielle d'aiguilles est celle qui généralement fait l'objet du plus grand nombre de travaux. C'est également le cas pour l'huile essentielle de *Pinus halepensis* puisque onze articles ont été publiés. De nombreux composés, ainsi que leurs associations, sont à l'origine d'une grande diversité des compositions chimiques décrites dans la littérature. Néanmoins, dans la majorité des cas, les 3 constituants discriminants sont l' $\alpha$ -pinène, le myrcène et le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène. Dans certains échantillons, le composé principal est nettement majoritaire, tandis que d'autres échantillons sont caractérisés par la présence de divers composés à des teneurs assez proches.

Ainsi, pour ce qui est des compositions dominées par un seul ou deux composés, on peut citer l'huile essentielle d'aiguilles provenant :

- de la forêt de Sidi Feradj (Nord de l'Algérie) dont le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène est le composé largement majoritaire (40,3 %). D'autres sesquiterpènes sont également présents à des teneurs appréciables : l' $\alpha$ -humulène (7,9 %) et l'aromadendrène (7,1 %) ([Dob et al. 2005](#)) ;
- de la forêt de Ghazaouet, au nord-ouest de l'Algérie qui contient majoritairement de l'oxyde de caryophyllène (48,1 %), suivi du thumbergol (8,3 %). Ce dernier est un diterpène dont la présence dans l'huile essentielle d'aiguilles de *P. halepensis* n'est signalée que dans cet article. L'oxyde d'humulène II (6,7 %) et le valérate de 2-phényléthyle (5,8 %) sont présents à des teneurs appréciables tandis que le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène ne représente que 2,9 % de la composition totale ([Abi-Ayad et al., 2011](#)) ;
- de Turquie dont le produit largement majoritaire est le  $\beta$ -pinène (46,8 %), suivi de l' $\alpha$ -pinène (18,4 %) ([Ustun et al., 2012](#)) ;

- d'Espagne qui se distingue par la présence de deux constituants majoritaires, le sabinène (33,5-38,4 %) et l' $\alpha$ -pinène (28,9-36,2 %). Les pourcentages de ces composés varient peu durant la période de récolte (9 mois) (Zafra *et al.*, 1976).

En ce qui concerne les compositions caractérisées par la présence de divers composés à des teneurs relativement proches, on peut citer l'huile essentielle d'aiguilles provenant :

- de deux régions d'Algérie dont l'étude porte sur la CPG-SM en mode impact électronique et en mode ionisation chimique positive. Dans la région de Djelfa (1350 mètres d'altitude), l'huile essentielle de pin d'Alep est dominée par l' $\alpha$ -pinène (17,6 %), le 2-méthylbutyrate de phényléthyle (10,3 %) et l'isovalérate de 2-phényléthyle (8,4 %). Dans la région de Tissemsil (1100 mètres d'altitude), l'huile essentielle est dominée par le myrcène (8,6 %) suivi de l'isovalérate de 2-phényléthyle (7,4 %) et du (*E*)- $\beta$ -caryophyllène (7,1 %) (Tazerouti *et al.*, 1993). Dans trois régions d'Algérie (Sidi Feradj, Djelfa et Saïda) la composition chimique de l'huile essentielle d'aiguilles est dominée par le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène (19,8-25,8 %), suivi de l' $\alpha$ -humulène (6,2-10,5 %), de l'aromadendrène (4,2-8,5 %), de l' $\alpha$ -pinène (5,2-6,4 %) et du  $\beta$ -pinène (5,0-5,6 %) (Dob *et al.*, 2007) ;
- du Maroc, qui est constituée majoritairement d' $\alpha$ -pinène (23,3 %), de myrcène (16,3 %) et de (*E*)- $\beta$ -caryophyllène (14,2 %) (Hmamouchi *et al.*, 2001) ;
- de Pise (Italie), qui est dominée par le myrcène (27,9 %), l' $\alpha$ -pinène (18,1 %), et le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène (16,4 %) (Macchioni *et al.*, 2003). Un autre échantillon d'Italie contient principalement le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène (26,3 %), qui précède le myrcène (12,4 %), le p-cymène (11,4 %) et l' $\alpha$ -pinène (8,5 %) (Vidrich *et al.*, 1988) ;
- de Grèce, qui est également dominée par le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène à 19,0 %. Ce composé est accompagné de l' $\alpha$ -pinène (13,4 %) et du cembrène (7,6 %) (Roussis *et al.*, 1995) ;
- de Tunisie, dont le matériel végétal a été prélevé sur 15 arbres. Elle contient majoritairement le  $\beta$ -élémente (22,1 %) ainsi que l' $\alpha$ -humulène (14,7 %), le  $\beta$ -pinène (11,6 %) et l' $\alpha$ -pinène (10,2 %). Par contre, le composé majoritaire de l'huile

essentielle d'aiguilles de 15 autres arbres, situés dans la même région, mais à 50 mètres d'une usine de ciment, est le  $\beta$ -pinène (29,5 %) (Dziri et Hosni, 2012).

- L'huile essentielle des parties aériennes (aiguilles, branches et bourgeons)

Récemment, une étude a été réalisée sur l'huile essentielle des parties aériennes de 10 échantillons de *P. halepensis* provenant de la région de Tlemcen (Algérie). Les auteurs ont distingué deux groupes : l'un riche en myrcène (Moy : 23,94 %),  $\alpha$ -pinène (Moy : 13,4 %), terpinolène (Moy : 11,5 %) et isovalérate de 2-phényléthyle (Moy : 10,1 %), l'autre dominé par le myrcène (Moy : 27,15 %), l' $\alpha$ -pinène (Moy : 21,8 %), et le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène (Moy : 14,15 %) (Fekih *et al.*, 2014).

Pour conclure, la composition chimique des huiles essentielles de *Pinus halepensis* a fait l'objet de diverses études. Dans la plupart des cas, les huiles essentielles d'aiguilles sont dominées soit par le couple  $\alpha$ -pinène/myrcène, soit par le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène. Nous relevons également des huiles essentielles dominées par des composés cités ponctuellement. En règle générale, ces études concernent seulement un échantillon par pays et en conséquence, la composition reportée n'est pas forcément représentative de l'huile essentielle de pin d'Alep du pays mentionné. En effet, à ce jour aucune étude n'a été mise en œuvre sur la variabilité chimique de l'huile essentielle d'aiguilles de *Pinus halepensis* dans une région donnée.

Compte tenu de ces observations, nous nous sommes proposés de caractériser le pin d'Alep poussant en Corse à travers la composition chimique des huiles essentielles de cônes et d'aiguilles. En exploitant la complémentarité des techniques analytiques (CC, CPG(Ir), CPG-SM et RMN  $^{13}\text{C}$ ), nous détaillerons l'analyse d'un mélange de deux échantillons d'huile essentielle de cônes, ainsi qu'une étude globale sur 15 échantillons. Nous présenterons ensuite l'étude de la variabilité chimique de l'huile essentielle d'aiguilles de *P. halepensis* de Corse.

## II. Etude de la composition et de la variabilité chimique de l'huile essentielle de cônes de *Pinus halepensis*

Afin de déterminer la composition chimique des huiles essentielles de cônes de *P. halepensis* de Corse, nous avons analysé 15 échantillons provenant d'arbres adultes situés dans les trois stations de l'île (Capo di fenò : n<sup>os</sup> C1, C4, C10-C13 et C18 ; Saleccia : n<sup>o</sup> S1, S4, S7, S14 et Tre padule : n<sup>os</sup> T2, T7-T9) (Figure III.3). Le protocole d'échantillonnage sera développé dans le paragraphe II.2. Nous présentons tout d'abord, à titre d'exemple, l'analyse détaillée d'un mélange constitué de deux échantillons d'huile essentielle au profil chromatographique similaire (Capo di Fenò : n<sup>os</sup> C13 et C18). La réalisation de ce mélange nous a permis d'obtenir une masse suffisamment importante pour procéder au fractionnement. Ce nouvel échantillon est noté C13/18.

### II.1 Analyse détaillée d'un échantillon d'huile essentielle de cônes

L'échantillon C13/18 a été analysé par CPG(Ir), CPG-SM et RMN <sup>13</sup>C, sans séparation préalable des constituants. Pour les 22 composés identifiés par RMN <sup>13</sup>C, après interrogation de notre bibliothèque de spectre « Terpènes » constituée au laboratoire :

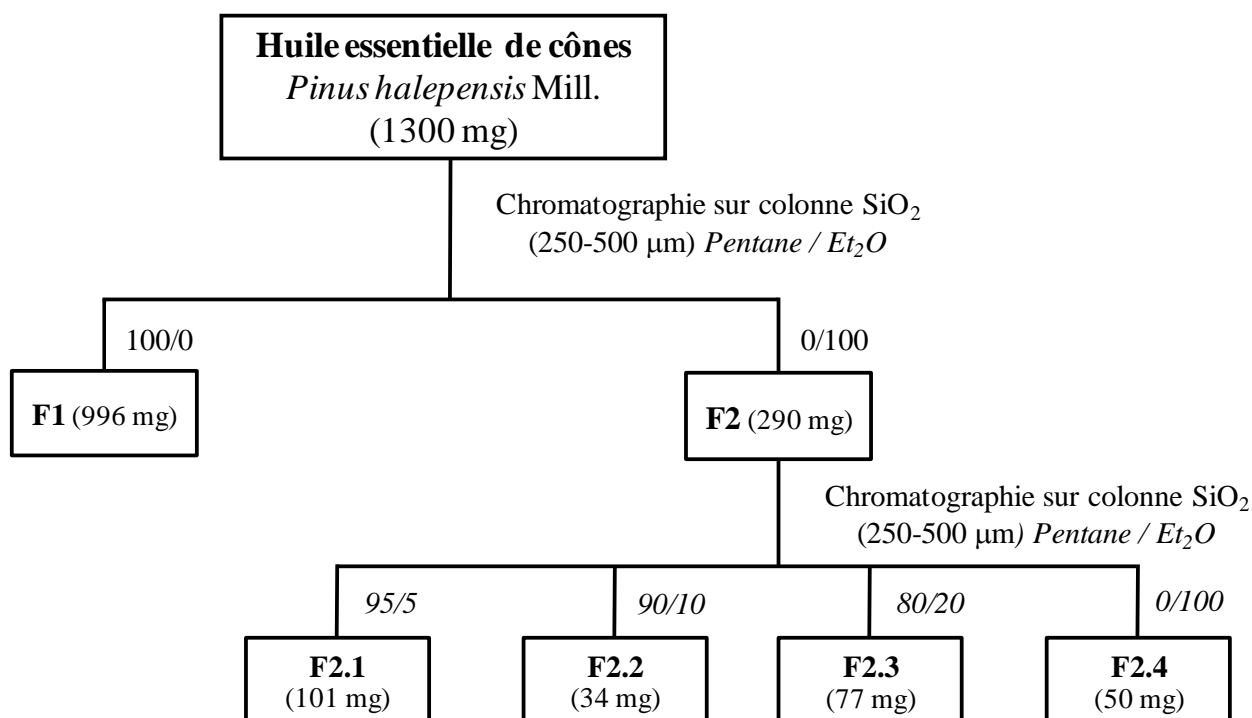
- tous les signaux des carbones ont été observés, à l'exception des carbones quaternaires des composés dont la teneur est inférieure à 1 %, ce qui ne gêne en rien leur identification ;
- les variations de déplacements chimiques ( $\Delta\delta$ ) entre les signaux de ces carbones et les valeurs de référence sont faibles : inférieures ou égales à 0,05 ppm pour 76 % des signaux et comprises entre 0,05 et 0,08 ppm pour les autres signaux ;
- le nombre de superpositions de signaux est limité (inférieur ou égal à 4) et ne gêne en rien l'identification des constituants, chacun d'entre eux étant identifié au minimum à partir de 60 % des signaux lui appartenant en propre.

Si la plupart des constituants présentaient, en SM, une note de concordance correcte pour les composés majoritaires, par comparaison avec les spectres de référence, pour les

composés minoritaires cette note était moins bonne. Enfin, l'identification de quelques constituants s'est avérée délicate voire impossible en CPG, en particulier quand ces constituants minoritaires coéluient.

Nous avons donc soumis 1,3 g d'huile essentielle à un fractionnement sur colonne ouverte de gel de silice de type « flash » (250-500  $\mu\text{m}$ ). Nous avons ainsi obtenu deux fractions : la fraction hydrocarbonée éluée au pentane (F1) et la fraction oxygénée éluée à l'oxyde de diéthyle (F2). La fraction oxygénée F2 est de nouveau chromatographiée sur colonne ouverte avec le même type de silice en utilisant un gradient d'élution pentane/oxyde de diéthyle (P/Et<sub>2</sub>O). Quatre fractions sont alors obtenues (F2.1 à F2.4) (Figure III.4 ; Tableau III.1). Toutes ces fractions sont analysées par CPG(Ir) et RMN <sup>13</sup>C.

Figure III.4 : Schéma du fractionnement appliqué à l'échantillon C13/18 d'huile essentielle de cônes de *P. halepensis*



- Étude de la fraction hydrocarbonée

La fraction hydrocarbonée est la plus importante, elle représente plus de 75 % de la masse de l'huile essentielle totale (Tableau III.1). Les composés majoritaires de cette fraction sont l' $\alpha$ -pinène et le (E)- $\beta$ -caryophyllène (34,2 % et 20,4 % respectivement). Nous avons pu confirmer, par RMN  $^{13}\text{C}$ , l'identification de 4 composés supplémentaires par rapport à l'analyse de l'huile essentielle brute : le p-cymène (0,4 %), le limonène (0,5 %), l' $\alpha$ -copaène (0,8 %) et l'abiétatriène (1,3 %). Nous constatons la présence inattendue de l'oxyde de caryophyllène (10,0 %), en raison probablement de sa très faible polarité et de sa quantité. Nous observons également que le pourcentage de certains monoterpènes dans la fraction F1 ( $\alpha$ -pinène, myrcène, etc.) est inférieur à celui dans l'huile essentielle totale. Cette différence s'explique par une évaporation prolongée du pentane de la fraction hydrocarbonée qui peut entraîner une partie des composés volatils.

Tableau III.1 : Fractionnement de l'échantillon C13/18 de *Pinus halepensis*

Fractions	HE	F1	F2	F2.1	F2.2	F2.3	F2.4	Identification		
Pentane/oxyde de diéthyle	100/0	0/100	95/5	90/10	80/20	0/100				
Masse (mg)	1300	996	290	101	34	77	50			
Composés	Ir a	Ir p								
Tricyclène	921	1015	0,3	0,1	-	-	-	-	Ir, SM : HE	
$\alpha$ -Pinène	932	1015	51,6	34,2	-	-	-	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : HE	
Camphène	944	1064	1,0	0,7	-	-	-	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : HE	
Verbénène	947	1127	0,7	0,4	-	-	-	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : HE	
$\beta$ -Pinène	971	1112	1,3	1,2	-	-	-	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : HE	
Myrcène	981	1161	10,6	8,3	-	-	-	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : HE	
$\delta$ -3-Carène	1005	1149	0,6	0,7	-	-	-	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : HE	
<i>p</i> -Cymène	1012	1271	0,3	0,4	-	-	-	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : F1	
Limonène*	1021	1199	0,1	0,5	-	-	-	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : F1	
$\beta$ -Phellandrène*	1021	1202	0,5	0,1	-	-	-	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : HE	
<i>p</i> -Cyménène	1072	1436	0,1	0,3	-	-	-	-	Ir, SM : HE	
Terpinolène	1078	1283	0,1	0,1	-	-	-	-	Ir, SM : HE	
$\alpha$ -Campholénal	1104	1514	0,6	-	2,1	1,9	-	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : HE	
Camphre	1120	1514	0,5	-	1,3	1,8	-	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : HE	
<i>trans</i> -Pinocarvéol	1123	1651	1,2	-	5,6	-	37,8	3,7	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : HE	
<i>trans</i> -Verbénol	1127	1673	0,8	-	3,8	-	-	8,5	37,0	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : HE
<i>cis</i> -Verbénol	1129	1658	0,4	-	1,8	-	2,3	2,8	1,4	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : HE
Pinocarvone	1138	1578	0,5	-	1,3	1,4	-	-	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : HE
<i>p</i> -Mentha-1,5-dièn-8-ol	1145	1721	1,2	-	5,8	-	-	8,4	2,0	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : HE
Terpinéol-4	1159	1597	0,1	-	1,1	-	3,4	-	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : F2
<i>p</i> -Cymèn-8-ol	1161	1843	0,1	-	0,7	-	-	6,1	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : F2
<i>cis</i> -Pinocarvéol*	1169	1789	tr	-	tr	-	-	1,7	-	Ir, RMN <sup>13</sup> C : F2.3
Myrténal*	1169	1626	0,5	-	1,7	2,3	-	-	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : HE
$\alpha$ -Terpinéol	1171	1691	0,5	-	0,8	-	-	8,1	2,8	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : HE
Myrténol*	1179	1787	tr	-	1,0	-	-	6,5	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : F2
Verbénone*	1179	1700	0,7	-	3,1	-	-	8,2	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : HE
<i>trans</i> -Carvéol	1199	1830	0,3	-	1,1	-	-	3,7	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : F2
Carvone	1214	1741	0,1	-	0,5	0,8	0,9	-	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : F2
Acétate de bornyle	1268	1575	0,5	-	2,4	3,2	-	-	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : HE
$\alpha$ -Copaène	1375	1491	0,2	0,8	-	-	-	-	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : F1
( <i>E</i> )- $\beta$ -Caryophyllène	1418	1597	10,7	20,4	-	-	-	-	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : HE
$\alpha$ -Humulène	1450	1667	2,0	5,2	-	-	-	-	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : HE
Isovalérate de phényléthyle	1462	1985	0,1	-	0,6	0,8	-	-	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C : F2
Cubébol	1505	1929	tr	-	0,2	-	-	0,9	-	Ir, RMN <sup>13</sup> C : F2.3

$\delta$ -Cadinène	1513	1754	0,2	0,2	-	-	-	-	-	-	Ir, SM	: HE
$\beta$ -Elémol	1534	2082	tr	-	0,4	-	-	1,0	-	-	Ir, RMN $^{13}\text{C}$	: F2.3
Palustrol	1566	1915	tr	-	0,8	-	-	-	-	1,4	Ir, RMN $^{13}\text{C}$	: F2
Oxyde de caryophyllène	1569	1977	4,7	10,0	32,0	53,8	1,2	-	-	-	Ir, SM, RMN $^{13}\text{C}$	: HE
Guaiol	1583	2082	0,1	-	0,7	-	1,4	1,0	0,2	-	Ir, RMN $^{13}\text{C}$	: F2
Oxyde d'humulène	1593	2032	0,7	-	4,8	8,2	0,2	-	-	-	Ir, SM, RMN $^{13}\text{C}$	: HE
Caryophylla-4(14),8(15)-dièn-5 $\beta$ -ol	1628	2282	tr	-	0,2	-	0,7	3,1	-	-	Ir, SM, RMN $^{13}\text{C}$	: F2.3
Caryophylla-3,8(15)-dièn-5 $\beta$ -ol	1657	2367	0,3	-	2,6	-	0,4	18,9	-	-	Ir, SM, RMN $^{13}\text{C}$	: F2
Oxyde de manoylé	1983	2337	0,1	-	1,0	1,6	0,1	-	-	-	Ir, RMN $^{13}\text{C}$	: F2
Abiétatriène	2033	2487	0,3	1,3	-	-	-	-	-	-	Ir, SM, RMN $^{13}\text{C}$	: F1
8,12-Époxy-14-labdèn-13-ol	2090	2473	0,1	-	0,7	-	-	1,4	7,2	-	Ir, RMN $^{13}\text{C}$	: F2.4
<i>cis</i> -Abiérol	2108	2640	tr	-	0,5	-	28,5	-	-	-	Ir, RMN $^{13}\text{C}$	: F2
Isopimaral	2203		tr	-	1,9	1,5	-	-	-	-	Ir, RMN $^{13}\text{C}$	: F2
Déhydroabiétal	2219		0,2	-	2,6	4,5	-	-	-	-	Ir, RMN $^{13}\text{C}$	: F2
Total			95,1	84,9	85,1	81,8	77,9	86,1	52,0			

L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire (BP-1) ; \* : pourcentages donnés sur colonne polaire (BP-20) ; HE : huile essentielle.

- Étude des fractions oxygénées

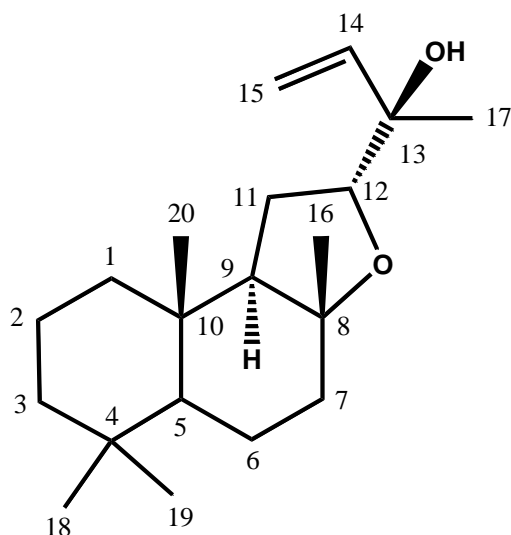
Dans le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de la fraction F2, en plus de l'oxyde de caryophyllène majoritaire (32,0 %), nous avons pu confirmer l'identification de 13 composés supplémentaires (Tableau III.1). Il s'agit de 8 alcools (terpinéol-4, *p*-cymèn-8-ol, myrténol, *trans*-carvéol, palustrol, caryophylla-3,8(15)-dièn-5 $\beta$ -ol, guaiol et *cis*-abiérol), d'une cétone (carvone), de deux aldéhydes (isopimaral et déhydroabiétal), d'un oxyde (oxyde de manoylé) et d'un ester (isovalérate de phényléthyle).

L'étude par RMN  $^{13}\text{C}$  des fractions F2.1 et F2.2 ne nous a pas permis d'identifier de composés supplémentaires. En revanche, au sein de la fraction F2.3, nous identifions 3 alcools supplémentaires : le cubébol, le  $\beta$ -élémol et le caryophylla-4(14),8(15)-dièn-5 $\beta$ -ol. Enfin, nous n'avons pu mettre en évidence, lors de l'analyse du spectre RMN de la fraction F2.4, la présence de composés supplémentaires. Néanmoins, nous observons une série de 20 signaux d'intensité relativement importante non attribués. Les valeurs d'indices de rétention de ce composé (Ira/Irp : 2090/2473) indiquent qu'il s'agit



probablement d'un diterpène oxygéné présent à 7,2 % dans cette fraction et qui n'a pas été identifié par SM dans l'huile essentielle brute. Nous avons déjà détecté ce composé dans les fractions F2 (0,7 %) et F2.3 (1,4 %), mais les 20 signaux correspondant n'avaient pas pu être tous repérés dans le spectre RMN de ces mélanges, notamment ceux appartenant aux carbones quaternaires. En revanche, dans cette fraction F2.4, nous pouvons repérer avec certitude l'ensemble des signaux appartenant à cette molécule. Ainsi, en interrogeant notre bibliothèque de spectres « Littérature », nous identifions le (12*R*,13*R*)-8,12-époxy-14-labdèn-13-ol (**1**). Les déplacements chimiques de ce composé relevés sur le spectre de la fraction F2.4 correspondent parfaitement avec ceux décrits par [Wahlberg et al. \(1977\)](#) (Tableau III.2). A notre connaissance, ce composé n'a jamais été signalé dans l'huile essentielle de *P. halepensis*. Néanmoins, il a déjà été signalé dans l'huile essentielle de *Polymnia sonchifolia* ([Miyazawa et Tamura, 2008](#)).

Tableau III.2 : Structure et valeurs des déplacements chimiques (ppm) du (12*R*,13*R*)-8,12-époxy-14-labdèn-13-ol (**1**) (stéréochimie relative)



C	$\delta$ (litt)	$\delta$ ( <b>1</b> )
1	39,8	39,77
2	18,4	18,35
3	42,4	42,42
4	33,1	33,15
5	57,3	57,27
6	20,6	20,64
7	39,6	39,58
8	81,4	81,51
9	60,2	60,19
10	36,3	36,32
11	24,0	24,01
12	81,6	81,64
13	74,5	74,56
14	143,1	143,02
15	112,9	113,00
16	23,5	23,39
17	21,3	21,24
18	33,5	33,54
19	21,1	21,11
20	14,8	14,77

$\delta$  (litt) : déplacements chimiques décrits dans la littérature ([Wahlberg et al., 1977](#));  $\delta$ (**1**) : déplacements chimiques observés dans le spectre de la fraction F2.4.

Le fractionnement de l'échantillon C13/18 de *P. halepensis* de Corse et l'analyse des fractions de chromatographie par RMN  $^{13}\text{C}$  et CPG(Ir) a conduit à l'identification de 44 composés (26 monoterpènes, 11 sesquiterpènes, 6 diterpènes, ainsi qu'un ester aromatique) représentant 94,5 % de la composition globale. Dix d'entre eux n'ont pu être identifiés par SM dans l'huile essentielle brute. Certains composés étaient absents des banques de spectres de masse tels que le cubébol, l'oxyde de manoyle, le *cis*-abiénole, l'isopimaral, le déhydroabiétal et le (12*R*,13*R*)-8,12-époxy-14-labdène-13-ol.

L'analyse par CPG-SM de l'échantillon brut C13/18 a permis l'identification de 4 composés minoritaires supplémentaires (entre 0,4 % et 1 % chacun). Parmi eux, nous dénombrons 3 monoterpènes (tricyclène, *p*-cymène, terpinolène) et un sesquiterpène oléfinique ( $\delta$ -cadinène).

Au terme de cette étude, nous avons identifié, par combinaison de la CC, la CPG(Ir), la RMN  $^{13}\text{C}$  et la CPG-SM, 48 composés représentant 95,1 % de la composition chimique globale de l'échantillon C13/18. Ce dernier est largement dominé par les monoterpènes et les sesquiterpènes oléfiniques avec l' $\alpha$ -pinène comme constituant majoritaire (51,6 %), suivi du (E)- $\beta$ -caryophyllène (10,7 %) et du myrcène (10,6 %). Parmi les diterpènes identifiés, l'un d'entre eux, le (12*R*,13*R*)-8,12-époxy-14-labdène-13-ol (**1**) était absent de notre bibliothèque de spectres RMN « Terpènes ». Il a pu être caractérisé par comparaison de ses données spectrales avec celles décrites dans la littérature. Ce composé est décrit, à notre connaissance, pour la première fois dans l'huile essentielle de pin d'Alep.

## II.2 Variabilité chimique de l'huile essentielle de cônes

Dans le but de mettre en évidence une homogénéité ou une éventuelle variabilité chimique de l'huile essentielle de cônes de *P. halepensis*, nous avons étudié la composition chimique de 15 échantillons. Le prélèvement a été réalisé dans les trois stations de l'île : 7 échantillons pour la station de Capo di Feno, 4 échantillons pour la

station de Saleccia et 4 autres pour la station de Tre Padule (Figure III.3). Chaque échantillon est constitué de cônes récoltés autour de l'arbre de manière homogène, qui mesurent en moyenne 10 cm de long et qui sont en général de couleur rouge-brun (aspect sec), plus rarement de couleur vert (aspect frais). Les rendements en huile essentielle sont très variables, variant entre 0,06 % et 0,30 % en fonction de l'échantillon.

Tous les échantillons ont été analysés par CPG(Ir) et en fonction du profil chromatographique, 6 d'entre eux ont également été analysés par RMN <sup>13</sup>C. Au sein de cette étude, la quantification des constituants par CPG (exprimée en g/100g) a été réalisée en utilisant les facteurs de réponses (FR) donnés par Bicchi *et al.* (2008) (partie expérimentale). Ces derniers peuvent être assimilés à des facteurs de correction pour quantifier par CPG (g/100g) des constituants préalablement identifiés et améliorer ainsi la fiabilité des résultats obtenus. En appliquant cette méthode de quantification, nous avons pu observer (dans de rares cas) des pourcentages d'identification supérieurs à 100 g/100g.

Au total, nous identifions 46 composés (27 monoterpènes, 12 sesquiterpènes, 1 ester aromatique et 6 diterpènes), représentant de 65 % à près de 100 % de la composition chimique totale des échantillons (Annexe D). L'huile essentielle de cônes de *P. halepensis* de Corse est globalement dominée par des composés hydrocarbonés. Toutefois, nous observons une variation quantitative au niveau des composés majoritaires, aussi bien monoterpéniques comme l' $\alpha$ -pinène (18,0-56,8 %) et le myrcène (7,6-44,6 %), que sesquiterpéniques comme le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène (1,2-19,0 %) par exemple. Trois autres composés, fréquemment identifiés, sont présents en proportion appréciable : le  $\delta$ -3-carène (jusqu'à 9,6 %), l'oxyde de caryophyllène (jusqu'à 6,2 %) et l' $\alpha$ -humulène (jusqu'à 3,2 %) (Tableau III.3). Au regard des résultats, il nous est possible de différencier trois groupes de composition chimique :

- **le groupe I** dominé par l' $\alpha$ -pinène (34,6-56,8 %) (8 échantillons : n° C1, C4, C10-C13, C18 et T9) ;
- **le groupe II** dominé par le myrcène (33,8-44,6 %) (4 échantillons : n° T8, S1, S4 et S7) ;

- et enfin **le groupe III** dominé par le couple  $\alpha$ -pinène/myrcène à des teneurs similaires, respectivement 19,5-23,6 % et 18,0-25,9 % (3 échantillons : n° T2, T7 et S4).

Tableau III.3 : Principaux constituants des échantillons de cônes de *Pinus halepensis* (% corrigé : g/100 g)

Composés	Groupe I				Groupe II				Groupe III			
	Moy	ET	Min	Max	Moy	ET	Min	Max	Moy	ET	Min	Max
<b><math>\alpha</math>-Pinène</b>	<b>45,0</b>	<b>5,5</b>	<b>34,6</b>	<b>56,8</b>	26,0	1,3	24,9	27,6	<b>22,8</b>	<b>4,1</b>	<b>18,0</b>	<b>25,9</b>
$\beta$ -Pinène	1,6	0,4	0,9	2,5	1,4	0,2	1,1	1,6	1,3	0,5	0,9	1,9
<b>Myrcène</b>	9,7	1,5	6,2	15,2	<b>36,8</b>	<b>5,3</b>	<b>33,8</b>	<b>44,6</b>	<b>21,6</b>	<b>2,1</b>	<b>19,5</b>	<b>23,6</b>
$\delta$ -3-Carène	2,4	5,1	0,3	9,6	2,2	1,3	0,3	2,9	4,9	4,1	0,1	7,7
( <i>E</i> )- $\beta$ -Caryophyllène	6,5	2,4	1,2	10,3	13,9	3,5	11,0	19,0	11,2	0,3	11,0	11,5
$\alpha$ -Humulène	1,1	0,4	0,3	1,8	2,4	0,6	1,9	3,2	1,9	0,1	1,9	2,0
Oxyde de caryophyllène	4,7	1,1	2,6	6,5	3,2	0,9	1,8	3,8	2,0	1,8	0,0	3,3

% Moyens : Moy ; Écart type : ET ; % moyens minimum : Min ; % moyens maximum : Max.

La comparaison de nos résultats avec les données de la littérature nous a permis de constater que les huiles essentielles dominées par l' $\alpha$ -pinène (groupe I) sont comparables à celles de *P. halepensis* d'Italie (Macchioni *et al.*, 2003 ; Tumen *et al.*, 2010). Par contre, aucune publication n'a mis en évidence, à ce jour, le myrcène ou le couple  $\alpha$ -pinène/myrcène (respectivement groupe II et III) comme composés majoritaires dans l'huile essentielle de cônes de *P. halepensis*. Le myrcène est uniquement signalé comme composé minoritaire (de 6,2 % à 13,7 %) d'un échantillon de Turquie et d'Italie (Macchioni *et al.*, 2003 ; Tumen *et al.*, 2010).

### III. Étude de la composition et de la variabilité chimique de l'huile essentielle d'aiguilles de *Pinus halepensis*

Nous avons analysé 47 échantillons d'huile essentielle provenant d'aiguilles récoltées sur des pins adultes dans les trois stations de Corse où ce végétal est présent : les stations de Capo di feno (C1-C19), de Saleccia (S1-S15) et de Tre padule (T1-T15). Dans chaque cas, les aiguilles ont été récoltées tout autour de l'arbre de manière

homogène entre 0,5 et 2,0 mètres de hauteur. Les huiles essentielles sont obtenues par hydrodistillation pendant trois heures avec un appareil de type Clevenger. Les rendements sont compris entre 0,12 et 0,93 % par rapport à la masse de végétal frais. Au sein de cette étude, la quantification par CPG (g/100g) a également été réalisée en utilisant les facteurs de réponses (FR) donnés par [Bicchi \*et al.\* \(2008\)](#). Les résultats d'analyses des 47 échantillons sont rassemblés dans [l'annexe II](#).

Nous présenterons, dans un premier temps, la composition chimique de trois échantillons, choisis en fonction de leur profil chromatographique. Dans un second temps, nous présenterons les résultats de l'étude sur l'ensemble de l'échantillonnage de l'huile essentielle d'aiguilles.

### III.1 Analyse de trois huiles essentielles d'aiguilles

Nous avons analysé trois échantillons d'huile essentielle d'aiguilles de pin d'Alep de Corse (C5, T12 et S4), sans séparation préalable. Nous identifions, par combinaison des trois techniques habituelles, CPG(Ir), RMN  $^{13}\text{C}$  et CPG-SM, 36 composés qui représentent de 90 % à près de 100 % de la composition chimique des échantillons. Vingt-sept de ces trente-six composés ont été identifiés par RMN  $^{13}\text{C}$  dans au moins un des trois échantillons, lorsque leur teneur le permet (égale ou supérieure à 0,4 %).

Parmi ces 36 composés, nous dénombrons 19 monoterpènes dont 5 oxygénés, 10 sesquiterpènes dont 2 oxygénés, 2 esters aromatiques et 5 diterpènes dont 2 oxygénés ([Tableau III.4](#)). La composition chimique de l'échantillon C5 est dominée par le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène (30,5 %), les 2 autres constituants importants étant l' $\alpha$ -pinène (9,8 %) et l' $\alpha$ -humulène (8,0 %). Le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène est également le principal constituant de l'échantillon T12 (49,7 %), suivi de l' $\alpha$ -pinène (22,2 %) et à des teneurs plus faibles, de l'isovalérate de phényléthyle (5,7 %) et de l' $\alpha$ -humulène (5,0 %). En revanche, la composition de l'échantillon S4 est dominée par le myrcène (39,5 %) alors que ce composé n'atteint que 4,3 % et 3,5 % dans les échantillons C5 et T12 respectivement.

Toutefois, l' $\alpha$ -pinène (12,7 %) et le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène (16,2 %) sont de nouveau parmi les constituants importants de cet échantillon.

Tableau III.4 : Composition chimique de trois huiles essentielles d'aiguilles de *Pinus halepensis* de Corse ( % corrigé : g/100 g)

Composés	Ir a	Ir p	FR	C5	T12	S4	Identification
$\alpha$ -Thujène	922	1014	1,03	0,5	0,6	0,5	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
$\alpha$ -Pinène	931	1014	1,03	9,8	22,2	12,7	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
Camphène	943	1065	1,03	0,1	0,2	0,1	Ir, SM
Sabinène	965	1124	1,03	0,7	0,4	6,4	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
$\beta$ -Pinène	970	1113	1,03	0,8	1,6	1,7	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
Myrcène	981	1164	1,03	4,3	3,5	39,5	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
$\delta$ -3-Carène	1005	1150	1,03	0,4	2,1	1,5	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
$\alpha$ -Terpinène	1009	1182	1,03	0,1	0,2	0,3	Ir, SM
<i>p</i> -Cymène	1012	1272	0,99	0,2	0,3	0,2	Ir, SM
Limonène*	1021	1203	1,03	0,4	0,8	0,9	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
$\beta$ -Phellandrène*	1021	1212	1,03	0,3	0,5	0,9	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimène	1036	1250	1,03	1,1	2,1	0,5	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
$\gamma$ -Terpinène	1048	1246	1,03	0,2	0,6	0,7	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
Terpinolène	1079	1284	1,03	1,1	2,8	7,3	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
Linalol	1083	1542	1,30	0,2	0,3	0,1	Ir, SM
<i>p</i> -Cymèn-8-ol	1159	1803	1,30	0,1	0,1	0,1	Ir, SM
Terpinéol-4	1161	1598	1,30	0,3	0,9	1,1	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
$\alpha$ -Terpinéol	1172	1690	1,30	0,1	0,3	0,2	Ir, SM
Acétate de géranyle	1359	1752	1,59	0,1	1,3	0,5	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
$\alpha$ -Copaène	1375	1491	0,98	0,8	1,1	0,3	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
( <i>E</i> )- $\beta$ -Caryophyllène	1419	1598	0,98	49,7	30,5	16,2	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
( <i>E</i> )- $\beta$ -Farnésène	1446	1663	0,98	0,3	0,3	0,2	Ir, SM
$\alpha$ -Humulène	1450	1667	0,98	8,0	5,0	2,7	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
2-Méthylbutyrate de phényléthyle*	1463	1965	1,59	0,2	0,6	0,4	Ir, SM
Isovalérate de phényléthyle *	1463	1984	1,59	2,7	5,7	3,3	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
Germacrène D	1475	1710	0,98	0,2	0,4	0,9	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
$\alpha$ -Muuroène	1492	1720	0,98	0,5	0,9	0,2	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
$\delta$ -Cadinène	1513	1752	0,98	0,6	2,0	0,5	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
( <i>E</i> )- $\alpha$ -Bisabolène	1531	1770	0,98	0,2	0,1	0,1	Ir, SM
Oxyde de caryophyllène	1569	1975	1,53	3,1	1,6	0,7	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
Guaïol	1583	2080	1,30	0,5	0,1	0,3	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
Cembrène	1926	2176	0,98	0,6	2,5	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
Géranyl $\alpha$ -terpinène	1939	2203	0,98	0,3	0,7	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
Cembrène A	1955	2242	0,98	0,2	0,3	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
4- <i>épi</i> -Isocembrol *	2030	2558	1,30	0,6	1,5	-	Ir, RMN <sup>13</sup> C
Isocembrol*	2030	2563	1,30	0,4	1,1	-	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
Total				89,7	95,2	101,0	

L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire (BP-1) ; \* : pourcentages donnés sur colonne polaire (BP-20) ; FR : facteurs de réponses de [Bicchi et al. \(2008\)](#).

### III.2 Variabilité chimique des aiguilles de *Pinus halepensis* de Corse

L'ensemble des 47 échantillons d'huile essentielle d'aiguilles ont été analysés par CPG (quantification vraie). En fonction de leur profil chromatographique, 17 échantillons ont été ensuite analysés par RMN  $^{13}\text{C}$  dont trois également par CPG-SM (étude détaillée dans le paragraphe précédent III.1). Au total, nous identifions 36 composés, les mêmes que ceux déjà identifiés lors de l'étude présentée dans le paragraphe précédent, représentant de 76,8 % à près de 100 % de la composition chimique globale. La synthèse des résultats des analyses qualitatives et quantitatives (CPG : g/100g) des 47 échantillons est reporté dans le [tableau III.5](#). Ainsi, nous constatons que :

- ces huiles essentielles sont riches en monoterpènes et sesquiterpènes hydrocarbonés ;
- les monoterpènes sont caractérisés par la prédominance du myrcène (2,1-39,5 %), suivi de l' $\alpha$ -pinène (6,9-22,2 %), du terpinolène (0,3-13,2 %), du  $\delta$ -3-carène (0,2-8,7 %) et du sabinène (tr-8,2 %). La totalité des monoterpènes oléfiniques et oxygénés sont présents dans tous les échantillons ;
- les sesquiterpènes majoritaires sont le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène (jusqu'à 49,7 %), l' $\alpha$ -humulène (jusqu'à 8,3 %), et le (*E*)- $\beta$ -farnésène (jusqu'à 6,2 %). Tous les sesquiterpènes identifiés, à une exception près (germarcrène D ; fréquence observée 44/47) sont présents dans la totalité des échantillons ;
- enfin, les diterpènes, composés minoritaires, sont essentiellement représentés par le 4-*épi*-isocembrol (0,2-6,3 %) et l'isocembrol (0,1-3,9 %). Aucun diterpène n'est identifié dans les échantillons provenant de la station de Saleccia.



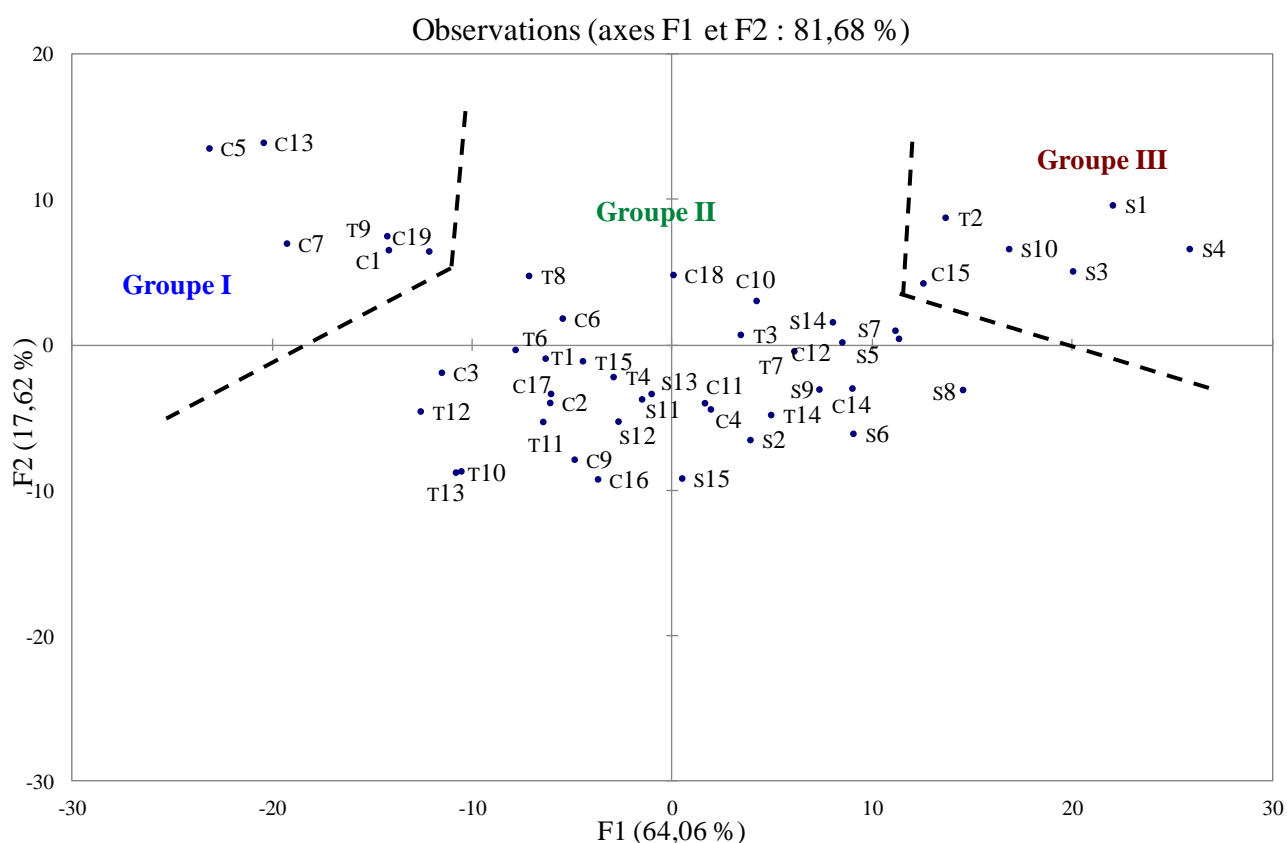
Tableau III.5 : Composés identifiés dans les 47 échantillons d'huile essentielle d'aiguilles de *Pinus halepensis* (% corrigé : g/100 g)

Composés	Ir a	Ir p	% minimal	% maximal	Fréquence	Identification
$\alpha$ -Thujène	923	1014	0,2	1,4	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
$\alpha$ -Pinène	932	1014	6,9	22,2	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
Camphène	944	1065	0,1	0,2	47	Ir, SM
Sabinène	965	1124	tr	8,2	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
$\beta$ -Pinène	970	1113	0,6	1,9	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
Myrcène	981	1164	2,1	39,5	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
$\delta$ -3-Carène	1005	1150	0,2	8,7	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
$\alpha$ -Terpinène	1009	1182	tr	1,1	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
<i>p</i> -Cymène	1012	1272	tr	1,3	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
Limonène*	1021	1203	0,4	1,7	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
$\beta$ -Phellandrène*	1021	1212	0,2	1,2	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimène	1036	1250	0,1	2,4	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
$\gamma$ -Terpinène	1048	1246	0,1	1,8	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
Terpinolène	1079	1284	0,3	13,2	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
Linalol	1083	1542	0,1	1,2	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
<i>p</i> -Cymèn-8-ol	1159	1803	tr	0,5	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
Terpinéol-4	1161	1598	0,3	3,5	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
$\alpha$ -Terpinéol	1172	1690	0,1	1,0	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
Acétate de géranyle	1359	1752	0,1	1,6	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
$\alpha$ -Copaène	1375	1491	tr	1,1	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
( <i>E</i> )- $\beta$ -Caryophyllène	1419	1598	16,2	49,7	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
( <i>E</i> )- $\beta$ -Farnésène	1446	1663	0,2	6,2	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
$\alpha$ -Humulène	1450	1667	tr	8,3	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
2-Méthylbutyrate de phényléthyle*	1463	1965	0,1	1,8	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
Isovalérate de phényléthyle*	1463	1984	0,3	11,4	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
Germacrène D	1475	1710	0,1	1,2	44	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
$\alpha$ -Muuroène	1492	1720	0,1	1,5	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
$\delta$ -Cadinène	1513	1752	0,2	2,0	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
( <i>E</i> )- $\alpha$ -Bisabolène	1531	1770	tr	0,7	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
Oxyde de caryophyllène	1569	1975	0,3	8,1	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
Guaiol	1583	2080	0,1	2,1	47	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
Cembrène	1926	2176	tr	8,4	32	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
Géranyl $\alpha$ -terpinène	1939	2204	tr	2,3	32	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
Cembrène A	1955	2243	tr	1,1	32	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C
4- <i>épi</i> -Isocembrol*	2029	2559	0,2	6,3	32	Ir, RMN <sup>13</sup> C
Isocembrol*	2029	2563	0,1	3,9	32	Ir, SM, RMN <sup>13</sup> C

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

Ayant observé des variations importantes des teneurs des trois composés majoritaires ((*E*)- $\beta$ -caryophyllène, myrcène et  $\alpha$ -pinène) au sein de l'échantillonnage, nous avons soumis les résultats à une Analyse en Composante Principale (ACP) (Figure III.5) dans le but de mettre en évidence une éventuelle variabilité chimique des aiguilles de *P. halepensis*.

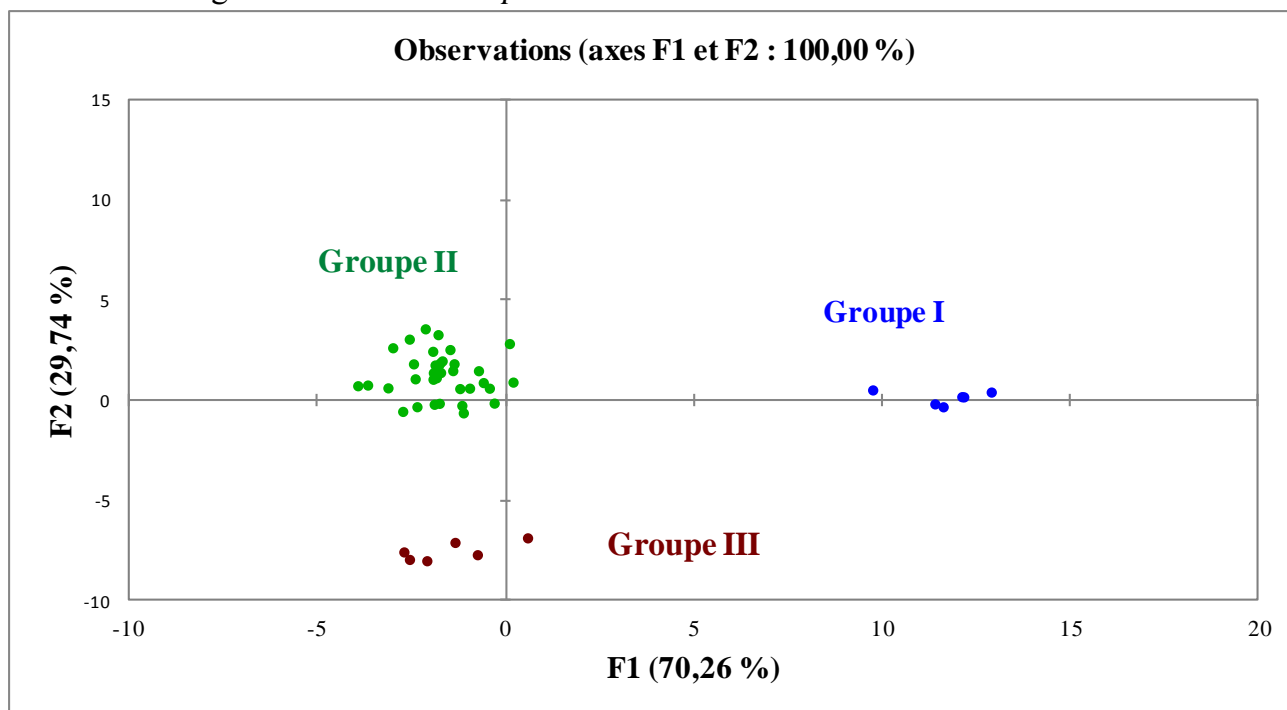
Figure III.5 : Analyse en composante principale (ACP) de 47 échantillons d'huile essentielle d'aiguilles de *Pinus halepensis* de Corse.



La représentation graphique des 47 échantillons sur le plan de l'ACP défini par les deux premières composantes principales, qui décrivent respectivement 64,1 % et 17,6 % de la variance totale, suggère une répartition en trois groupes d'inégale importance. De manière à confirmer ou infirmer cette hypothèse, nous avons mis en œuvre une Analyse Factorielle Discriminante (AFD). Contrairement à l'ACP qui est une projection d'un tableau dans un graphique, l'AFD est une méthode de discrimination des échantillons qui permet de confirmer ou d'infirmer un préclassement établi par une autre méthode (telle que l'ACP) ou par classification hiérarchique ascendante, par exemple. Effectivement, dans notre cas l'AFD (Figure III.6) indique clairement que les échantillons se répartissent

bien en trois groupes (les mêmes que ceux définis par l'ACP) et ce en fonction des teneurs en (*E*)- $\beta$ -caryophyllène et myrcène.

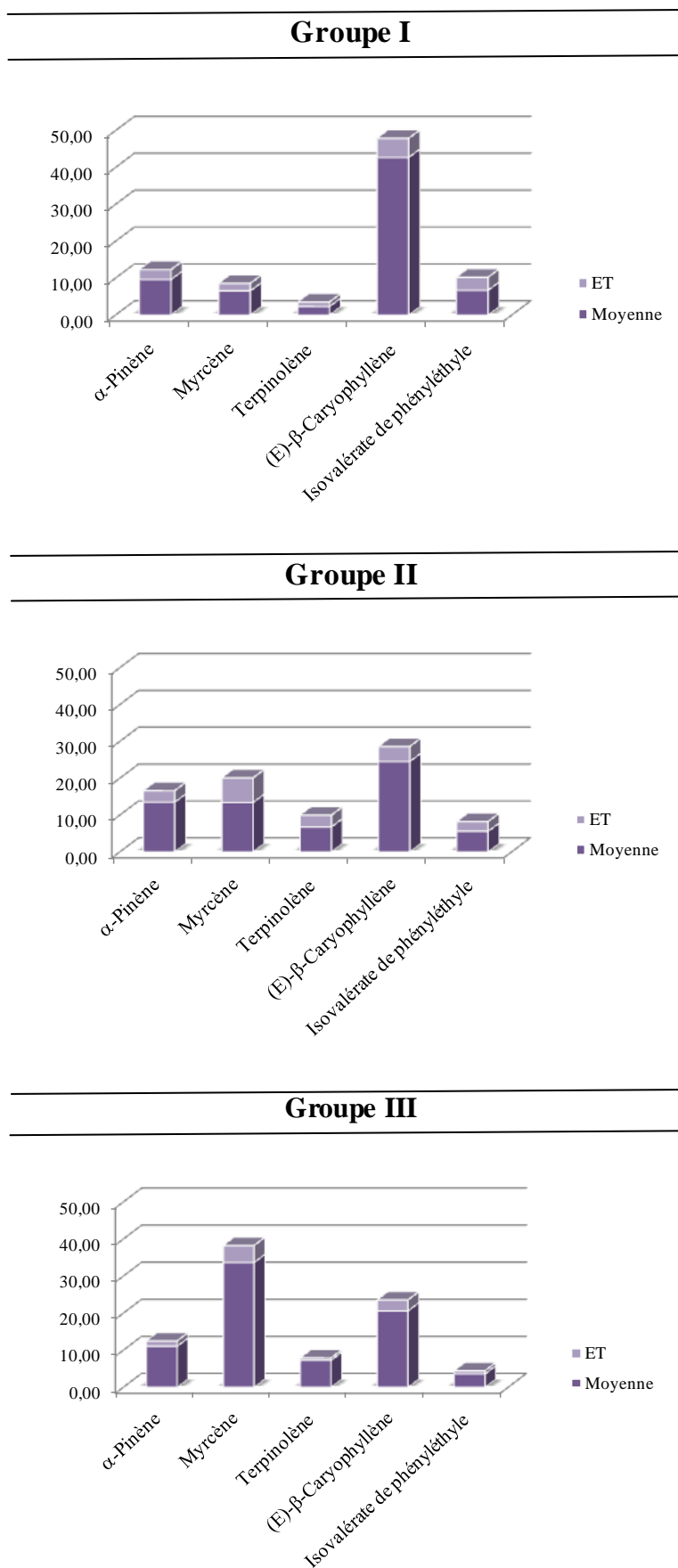
Figure III.6 : Analyse Factorielle Discriminante (AFD) de 47 échantillons d'huile essentielle d'aiguilles de *Pinus halepensis* de Corse.



Les pourcentages moyens ainsi que les écarts types des différents constituants sont présentés dans la [figure III.7](#). Ainsi :

- **le groupe I** est constitué de 6 échantillons (n° T9, C1, C5, C7, C13 et C19) caractérisés par le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène qui domine la composition chimique (Moy = 42,8 % ; ET = 5,2 %). Les échantillons de ce groupe contiennent l' $\alpha$ -pinène (Moy = 9,6 % ; ET = 2,7 %), l'isovalérate de phényléthyle (Moy = 6,7 % ; ET = 2,7 %) et le myrcène (Moy = 6,5 % ; ET = 2,0 %) à une teneur appréciable dans la majorité des cas ;
- dans les échantillons **du groupe II**, qui est le plus important (35 arbres : n° S2, S5-S9, S11-14, S15, T1, T3-4, T6-8, T10-15, C2-4, C6, C9-12, C14 et C16-18), les constituants majoritaires sont le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène (Moy = 25,0 % ; ET = 4,0 %), suivi de l' $\alpha$ -pinène (Moy = 13,4 % ; ET = 3,3 %) et du myrcène (Moy = 12,0 % ; ET = 5,8 %). Le terpinolène est également présent en proportions non négligeables dans la plupart des échantillons (Moy = 6,8 % ; ET = 3,2 %) ;

- les échantillons **du groupe III** (6 échantillons : n° S1, S3, S4, S10, T2 et C15) sont discriminés par le myrcène (Moy= 30,7 % ; ET = 5,8 %), suivi du (*E*)- $\beta$ -caryophyllène (M = 20,3 % ; ET = 2,8 %). L' $\alpha$ -pinène et le terpinolène sont de nouveau présents à des taux appréciables (jusqu'à 15,6 % et 9,8 % respectivement).

Figure III.7 : Histogrammes des trois groupes chimiques de l'huile essentielle d'aiguilles de *P. halepensis*

Ainsi, l'huile essentielle d'aiguilles de *P. halepensis* de Corse présente une variabilité chimique avec trois types de compositions : (*E*)- $\beta$ -caryophyllène, (*E*)- $\beta$ -caryophyllène/ $\alpha$ -pinène/myrcène et myrcène/(*E*)- $\beta$ -caryophyllène. Ces différentes compositions sont retrouvées dans toutes les stations de récolte. La variabilité chimique de *P. halepensis* semble donc être indépendante des conditions pédoclimatiques. Par ailleurs, ce travail est la première étude réalisée sur l'huile essentielle d'aiguilles de *P. halepensis* avec un échantillonnage important (47 échantillons) dans une région bien définie.

La comparaison de nos résultats avec les données de la littérature révèle que la composition chimique des échantillons du groupe II ((*E*)- $\beta$ -caryophyllène/ $\alpha$ -pinène/myrcène) est proche de celles reportées pour les huiles essentielles de *P. halepensis* d'Italie, de Grèce et du Maroc ([Vidrich et al., 1988](#) ; [Roussis et al., 1995](#) ; [Hmamouchi et al., 2001](#)). Néanmoins dans l'échantillon du Maroc, le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène n'est que le troisième composé en importance, contrairement aux échantillons d'Italie et de Grèce, où il est toujours le composé majoritaire.

La composition chimique des échantillons du groupe III (myrcène majoritaire) ressemble à celle d'un échantillon d'Italie (27,9 %) ([Macchioni et al., 2003](#)) et de dix échantillons d'Algérie provenant de la région de Tlemcen (jusqu'à 32 %), bien que dans ce dernier cas il s'agisse d'huile essentielle de parties aériennes ([Fekih et al., 2014](#)).

Enfin, les huiles essentielles de *P. halepensis* dominées par le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène (groupe I) sont assez rares en dehors de celles de Corse. En effet, ce sesquiterpène est reporté comme étant le composé majoritaire d'un seul échantillon provenant d'Algérie (40,3 %) ([Dob et al., 2005](#)).

# Chapitre IV

Analyse d'huiles essentielles, d'huiles pyrolytiques  
et de résine de *Cedrus atlantica* M.

Le genre *Cedrus*, famille des *Pinaceae*, comprend plusieurs espèces dont la valeur taxonomique a été longtemps controversée. Tout d'abord intégrés sous une seule espèce (*Cedrus libotamica*), les cèdres ont évolué vers une distinction en quatre espèces (Agrawal et Rastogi, 1984) :

- le cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica* M.) ;
- le cèdre du Liban (*Cedrus libani* R.) ;
- le cèdre de l'Himalaya (*Cedrus deodora* L.) ;
- le cèdre de Chypre (*Cedrus bravifolia* H.).

Le cèdre de l'Atlas est une espèce endémique de l'Atlas marocain, du Rif et de l'Atlas algérien. Il représente en Afrique du Nord une superficie totale de 170 000 hectares et il s'adapte à un large éventail de climats variés, s'étendant du subhumide au per-humide de l'étage montagnard méditerranéen, entre 1500 mètres et 2400 mètres d'altitude. En France, l'espèce a été introduite par le pépiniériste Sénéclauze, dès la seconde moitié du XIXe siècle, dans les basses et moyennes montagnes méridionales.

Figure IV.1 : Le cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica* M.)





Symbole de longévité, le cèdre de l'Atlas peut vivre plus d'un millier d'années et atteindre 40 mètres de hauteur. Son feuillage est persistant, de couleur vert bleuté à vert sombre, avec de denses bouquets dressés de 20 à 30 petites aiguilles courtes (25 mm en moyenne) et piquantes. Le cèdre de l'Atlas possède des cônes femelles ovoïdes et oblongs (6 à 10 cm de long) dont les écailles ligneuses se désarticulent après maturité. Ce conifère résineux a toujours été apprécié pour la qualité de son bois, utilisé principalement dans la menuiserie et dans la construction. Précieux et de grande valeur, son bois à cœur rouge et odorant, permet d'éloigner les insectes et les vers.

Le cèdre de l'Atlas ne pousse pas à l'état spontané en Corse, mais a été introduit il y a 40 ans par l'Office National des Forêts (ONF). En effet, cet organisme a entrepris la plantation de cinq cédraies (forêts de Bavella, Bonifato, Ospedale, Pineta et Vizzavona) (Figure IV.2) en tant qu'expérience de reboisement, dans le but de tester la résistance de cette espèce aux incendies, et d'étudier sa vitesse de pousse par rapport au pin laricio, espèce endémique de Corse.

Figure IV.2 : Stations de *Cedrus atlantica* en Corse



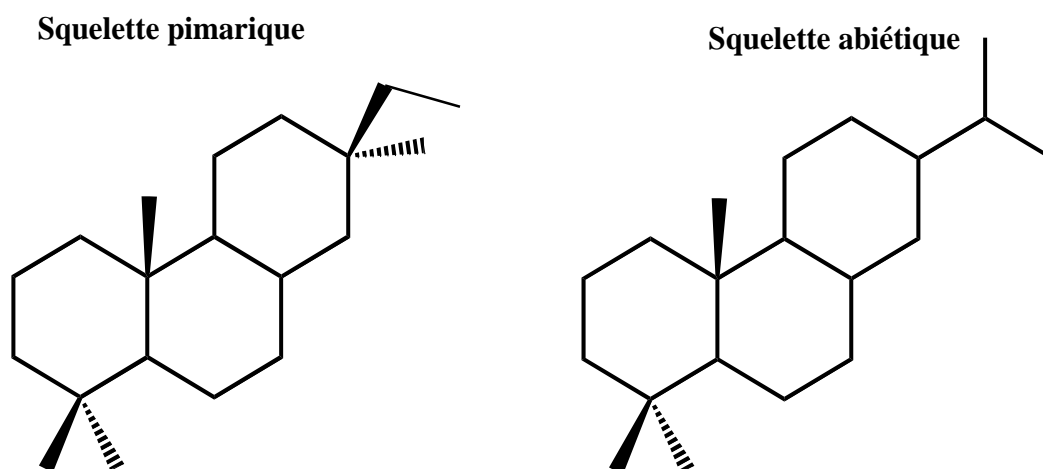
## I. Les métabolites secondaires de *Cedrus atlantica* : étude bibliographique

Les extractibles de *Cedrus atlantica* ont fait l'objet de diverses études, que se soit au niveau de l'isolement et de l'élucidation structurale de nouvelles molécules (extraits et huiles essentielles) qu'au niveau de la composition chimique des huiles essentielles. Nous les résumons ci-dessous.

### I.1 Les extraits de *Cedrus atlantica*

Quelques études portent sur les extraits aux solvants de cônes de *C. atlantica*. L'extrait à l'éther diéthylique de cônes provenant d'Angleterre est constitué en majorité d'acides résiniques (les acides sandaracopimarique, abiétique, isopimarique, lévopimarique, palustrique, déhydroabiétique et néoabiétique) (Norin et Winell, 1971) (Figure IV.3).

Figure IV.3 : Deux des principaux squelettes des acides résiniques



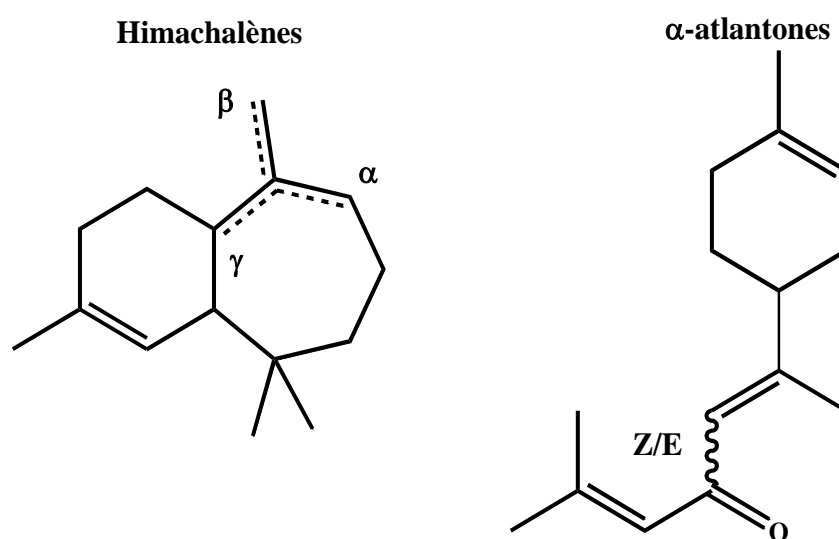
Un extrait à l'hexane, provenant de la région d'Ifrane dans le moyen Atlas (Maroc), est constitué principalement de diterpènes possédant le squelette abiétane tel que l'abiétinal, le déhydroabiétinal, le déhydroabiétinol, le 7-oxo-déhydroabiétinol, le 15-hydroxydéhydroabiétinol, le 13 $\beta$ ,18-diacétoxyabiét-8(14)-èn-7-one et le 7 $\alpha$ -déhydroabiétinol (Barrero *et al.*, 2005).

Neuf nouvelles molécules diterpéniques (squelette abiétane polysubstitué) ont également été isolées et leurs structures élucidées dans l'extrait de cônes de *C. atlantica* : le 18-norabiéta-8,11,13-trièn-4-ol, le 7-oxodéhydroabiétinol, le 8,11,13-abiétatriène-15,18-diol, le 7 $\alpha$ -hydroxydéhydroabiétinol, le 9 $\alpha$ ,13 $\alpha$ -épidioxiabiét-8(14)-èn-18-ol, le 7 $\alpha$ ,18-diacétoxyabiét-8(14)-èn-13 $\beta$ -ol, le 9 $\beta$ ,13 $\beta$ -épidioxiabiét-8(14)-ène, le 7 $\alpha$ ,18-diacétoxyabiét-8(14)-en-13 $\beta$ -ol, le 7 $\alpha$ ,18-diacétoxy-13 $\beta$ -méthoxyabiét-8(14)-ène et le 13 $\beta$ -hydroxyabiét-8(14)-èn-7-one (Barrero *et al.*, 2005 ; Dakir *et al.*, 2005).

### I.2 Les huiles essentielles de *Cedrus atlantica*

La composition chimique des huiles essentielles de *C. atlantica* a fait l'objet de plusieurs études. Une thèse et une revue rassemblent les principaux articles relatifs à la composition chimique et à l'activité biologique des différentes espèces de cèdres (Affane-Nguema, 1984 ; Agrawal et Rastogi, 1984). Ainsi dès le début du XXe siècle, divers sesquiterpènes (squelette bisabolane) ont été identifiés parmi lesquels les isomères  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -himachalène, l'himachalol ainsi que l' $\alpha$ - et la  $\gamma$ -atlantone (Figure IV.4).

Figure IV.4 : Structure des himachalènes ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) et des  $\alpha$ -atlantones (Z et E)



- L'huile essentielle d'aiguilles de *C. atlantica* a fait l'objet de trois publications :
- la composition d'un échantillon en provenance de Rabat (Maroc) est dominée par les monoterpènes oléfiniques, l' $\alpha$ -pinène (34 %), le  $\beta$ -pinène (32 %) et le myrcène (17 %) (Lahlou, 2003) ;
  - l'huile essentielle en provenance de la forêt de Bainem (Algérie) est, quant à elle, composée de monoterpènes tels que l' $\alpha$ -pinène (18 %) et l' $\alpha$ -terpinéol (7 %) et de sesquiterpènes tels le  $\beta$ -caryophyllène (9 %) et l'oxyde de caryophyllène (10 %) (Boudarene *et al.*, 2004a) ;
  - enfin un échantillon provenant de Tichoukt (Maroc) est également dominée par l' $\alpha$ -pinène (14,85 %), suivi de l'himachalène (10,14 %) (stéréochimie non précisée), du  $\beta$ -himachalène (9,89 %), du  $\sigma$ -himachalène (7,62 %) et de la cis- $\alpha$ -atlantone (6,78 %) (Derwich *et al.*, 2010).

Une seule étude a été réalisée sur deux échantillons d'huile essentielle de graines (provenant d'Algérie) (Boudarene *et al.*, 2004b). L' $\alpha$ -pinène (37,1 %) est le constituant majoritaire de l'échantillon provenant du nord-est de l'Algérie, alors que celui provenant d'Algérie centrale a pour composé majoritaire le manoylène (20,7 %). C'est la première fois qu'un diterpène est signalé comme composé majoritaire d'une huile essentielle de cèdre de l'Atlas.

Par ailleurs, la composition chimique d'une huile essentielle de *C. atlantica* provenant du Maroc, mais dont la partie de la plante étudiée n'est pas précisée, est dominée par des hydrocarbures monoterpéniques tel que le limonène (29,2 %), le myrcène (16,9 %), l'ocimène (18,6 %, isomère non précisé), l' $\alpha$ -pinène (18,6 %) et le  $\beta$ -pinène (6,4 %) (Lamiri *et al.*, 2001).

L'huile essentielle obtenue à partir du bois (souvent la sciure de bois) de *C. atlantica* est celle qui a été la plus étudiée. Les principaux travaux ont été recensés par Lawrence en 2009. Cette huile essentielle est connue pour posséder des propriétés antiseptiques, astringentes, diurétiques, antifongiques, sédatives et stimulantes (Hammer *et al.*, 1999 ; Bouchra *et al.*, 2003 ; Prabuseenivasan *et al.*, 2006).

L'huile essentielle de bois de cèdre provenant du Maroc est en général largement dominée par les himachalènes, le  $\beta$ -himachalène étant l'isomère majoritaire (41,3 %-46,0 %), suivi de l' $\alpha$ -himachalène (14,4-16,9 %) et du  $\gamma$ -himachalène (10,1-11,2 %) (Chalchat *et al.*, 1994). D'autres sesquiterpènes ont également été signalés comme la (*E*)- $\alpha$ -atlantone (jusqu'à 30,8 %), la déodarone (jusqu'à 7,7 %), l'himachalol (jusqu'à 7,1 %), la (*Z*)- $\alpha$ -atlantone (jusqu'à 5,9 %) et la (*E*)- $\gamma$ -atlantone (jusqu'à 4,2 %) (Aberchane *et al.*, 2001, 2003, 2004 ; Satrani *et al.*, 2006).

L'huile essentielle de bois de cèdre d'Algérie est également riche en sesquiterpènes. En effet, au nord de l'Algérie dans la région de Chréa, le  $\beta$ -himachalène (13,6 %), la (*E*)- $\alpha$ -atlantone (10,8 %) et l'époxyhimachalène (8,7 %) sont les composés majoritaires (Dahoun *et al.*, 1993). Dans la forêt de Bainem, près d'Alger, l'himachalol (28,1 %) est le composé majoritaire, à côté du  $\beta$ -caryophyllène (6,0 %), de l' $\alpha$ -pinène (5,6 %), du  $\beta$ -himachalène (3,7 %), du  $\gamma$ -himachalène (2,3 %) et de l' $\alpha$ -himachalène (2,1 %) (Boudarene *et al.*, 2004a).

Il ressort de cette étude bibliographique que l'huile essentielle de bois de *C. atlantica* est préparée de manière industrielle ou semi-industrielle. La commercialisation de cette huile essentielle constitue en fait une valorisation des résidus de bois de cèdre et tout particulièrement la sciure récupérée dans les scieries. La plupart des analyses publiées démontrent qu'il s'agit d'une huile essentielle riche en sesquiterpènes oléfiniques, notamment en  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -himachalène. Toutefois, la (*E*)- $\alpha$ -atlantone et l'himachalol respectivement, ont été signalés parmi les composés majoritaires dans un échantillon du Maroc et d'Algérie.

Dans un précédent travail réalisé au laboratoire, l'analyse détaillée d'un échantillon d'huile essentielle isolée à partir du bois de *C. atlantica* poussant en Corse a été réalisée par combinaison des techniques chromatographiques (CC, CPG(Ir)) et spectroscopiques (SM, RMN  $^{13}\text{C}$ ) (Paoli *et al.*, 2011). Cette analyse a permis l'identification de 24 constituants représentant plus de 90 % de la composition totale de l'huile essentielle, parmi lesquels l'himachalol, l'allohimachalol ainsi que les (*Z*)- et

(*E*)- $\alpha$ -atlantones, dont les données n'étaient pas présentes dans notre bibliothèque de spectres de RMN  $^{13}\text{C}$ . Il faut souligner que l'enrichissement de la bibliothèque de spectres à partir de molécules présentes dans divers mélanges naturels est crucial pour assurer un bon fonctionnement de la méthode d'analyse développée au laboratoire (décrite dans le premier chapitre). Nous avons également examiné la variabilité chimique du bois de cèdre de Corse. L'analyse de 48 échantillons d'huile essentielle, préparés à partir de bois récolté dans les cinq forêts référencées par l'ONF et dans quelques stations isolées, suivie d'un traitement statistique des données, a mis en évidence deux types chimiques caractérisés respectivement par la prédominance de l' $\alpha$ -pinène et de l'himachalol. Les autres composés présents à des teneurs appréciables sont le  $\beta$ -pinène, le (*E*)- $\beta$ -farnésène, les trois himachalènes isomères ainsi que l'(*E*)- $\alpha$ -atlantone (Paoli *et al.*, 2011).

Afin de parfaire notre connaissance des extractibles du bois de *C. atlantica*, nous nous sommes proposés d'analyser deux échantillons d'huile pyrolytique préparés au Maroc de manière artisanale ainsi qu'un échantillon d'huile essentielle provenant du même bois de cèdre. Nous avons également souhaité nous intéresser à la résine du cèdre de l'Atlas dont la composition n'a fait, à notre connaissance, l'objet d'aucune étude. Pour ce faire, nous utiliserons la RMN  $^{13}\text{C}$  pour l'identification et la quantification des constituants de la résine. Auparavant, nous décrirons l'analyse détaillée d'un échantillon commercial d'huile essentielle de bois de cèdre, cette analyse ayant été réalisée dans le but d'enrichir notre bibliothèque de spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  avec les données de molécules que nous avons jusqu'à présent identifiées par CPG(Ir) et par SM.

## II. Analyse détaillée d'un échantillon d'huile essentielle commerciale de bois de *Cedrus atlantica* M.

L'analyse d'un échantillon d'huile essentielle commerciale (Aroma-zone) de bois de *Cedrus atlantica* par CPG(Ir) et par RMN  $^{13}\text{C}$  a permis l'identification des composés majoritaires, à partir de la bibliothèque de spectres du laboratoire (Tableau IV.1). Il s'agit des trois himachalènes qui représentent plus des deux tiers de la composition globale de l'huile essentielle : le  $\beta$ -himachalène (42,7 %), l' $\alpha$ -himachalène (15,1 %) et le  $\gamma$ -himachalène (9,5 %). La (*E*)- $\alpha$ -atlantone (4,1 %) et la (*Z*)- $\alpha$ -atlantone (0,8 %) sont également identifiées de même que le longifolène (0,6 %), l' $\alpha$ -calacorène (0,5 %) et l'épi-cubénol (0,8 %).

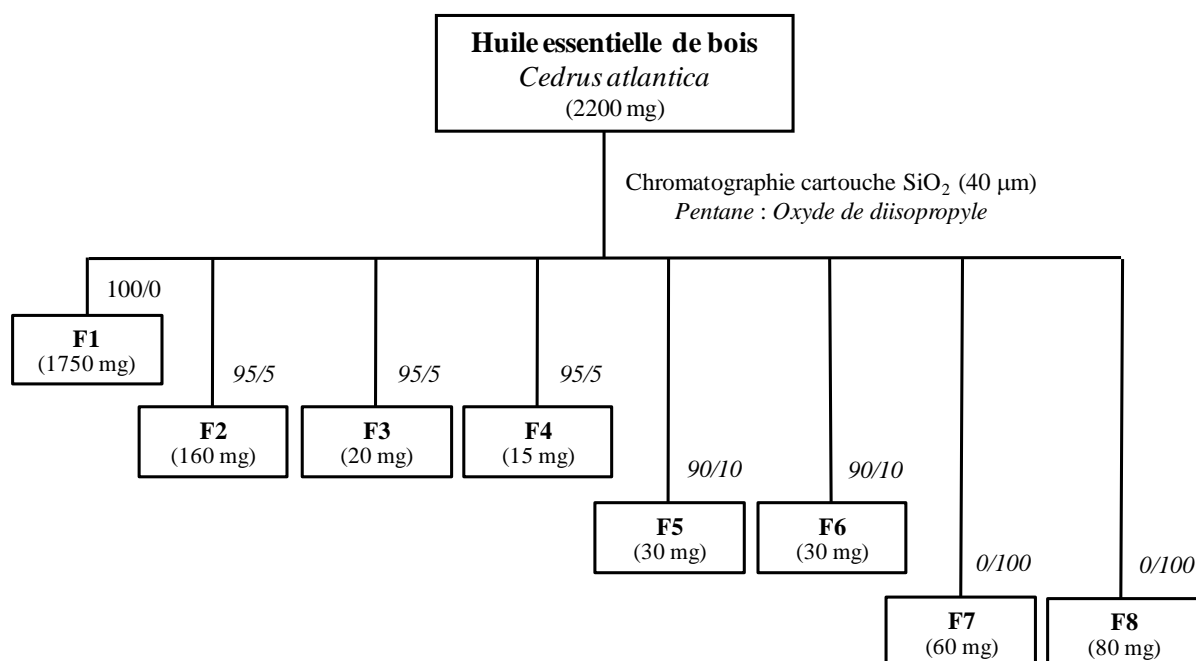
Tableau IV.1 : Composition chimique de l'huile essentielle de bois de *C. atlantica* commerciale

Composés	Ir a	Ir p	%
Longifolène	1405	1580	0,6
$\alpha$ -Himachalène	1448	1641	15,1
$\gamma$ -Himachalène	1475	1691	9,5
$\beta$ -Himachalène	1500	1710	42,7
$\alpha$ -Calacorène	1531	1917	0,5
épi-Cubénol	1618	2061	0,8
( <i>Z</i> )- $\alpha$ -Atlantone	1685	2235	0,8
( <i>E</i> )- $\alpha$ -Atlantone	1747	2316	4,1
Total			74,1

L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire (BP-1) ; Ir a et Ir p = indices de rétention mesurés sur colonne polaire et polaire, respectivement.

L'huile essentielle commerciale a été fractionnée car de nombreux composés n'ont pas été identifiés (dont certains à des teneurs avoisinant 1 %). A cet effet, nous avons soumis 2,2 g d'huile essentielle à un fractionnement chromatographique en utilisant un gradient d'élution pentane/oxyde de diisopropyle (partie expérimentale). Huit fractions ont été éluées : la fraction F1 est éluée au pentane, les fractions F2-F6 sont éluées avec un mélange pentane/oxyde de diisopropyle et les fractions F7 et F8 sont éluées à l'oxyde de diisopropylique (Figure IV.5). Toutes les fractions ont ensuite été analysées par CPG(Ir) et RMN  $^{13}\text{C}$  (Tableau IV.2).

Figure IV.5 : Schéma du fractionnement appliqué à un échantillon commercial d'huile essentielle de bois de *Cedrus atlantica* M.



La comparaison des déplacements chimiques dans les spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  de chaque fraction avec ceux des composés de référence contenus dans notre bibliothèque de spectres a bien entendu confirmé l'identification des composés majoritaires déjà identifiés dans l'huile essentielle, à savoir, les trois himachalènes isomères, le longifolène et l' $\alpha$ -calacorène dans la fraction F1, la (*Z*)- $\alpha$ -atlantone et la (*E*)- $\alpha$ -atlantone dans la fraction F2 et l'épi-cubénol dans la fraction F6. L'analyse des fractions a aussi permis l'identification de quelques composés minoritaires : le muurola-4,10(14)-diène-8 $\beta$ -ol (8,9 % dans la fraction F6), l'himachalol (13,5 % dans la fraction F7), ainsi que l' $\alpha$ -terpinéol, l'allohimachalol et l'épi-cédrol (2,2 %, 1,2 % et 7,9 % respectivement, dans la fraction F8).

D'autres composés ont été identifiés par comparaison des données spectrales des fractions de chromatographie sur colonne avec celles des composés décrits dans la littérature et contenues dans une seconde bibliothèque de spectres construite au laboratoire. Il s'agit précisément du 4-acétyl-1-méthylcyclohexène (39,7 % dans F5), de l'oxydohimachalène (33,9 % dans F6), de l'oxyde de  $\beta$ -himachalène (61,7 % dans F4), ou encore de la (4*R*,8*R*)-déodarone et de la (4*R*,8*S*)-déodarone (32,6 et 24,5 % respectivement, dans F7). L'identification de la (*Z*)- $\gamma$ -atlantone et de la (*E*)- $\gamma$ -atlantone



(27,4 % et 30,5 % respectivement dans F3) s'est révélée plus délicate car les données RMN  $^{13}\text{C}$  ne sont pas décrites dans la littérature. Nous détaillerons l'identification de ces molécules dans le paragraphe III.

L'utilisation de la RMN  $^{13}\text{C}$  et de la CPG(Ir) a donc permis d'identifier au total 20 constituants qui représentent 80,8 % de la composition chimique globale de cette huile essentielle. Les composés majoritaires appartiennent à la famille des himachalènes. Ainsi, le  $\beta$ -himachalène est le constituant majoritaire (42,7 %), suivi de l' $\alpha$ -himachalène (15,1 %) et du  $\gamma$ -himachalène (9,5 %). Les monoterpènes ne constituent que 1,6 % de la composition chimique totale de cet échantillon.

Tableau IV.2 : Fractionnement de l'huile essentielle de bois de *C. atlantica* commerciale Aroma-zone

Fractions			HE	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Pentane/Oxyde de diéthyle				100/0	95/5	95/5	95/5	90/10	90/10	0/100	0/100
Masse (mg)			2200	1750	160	20	15	30	30	60	80
Composés	Ir a	Ir p									
4-Acétylel-1-méthylcyclohexène	1108	1554	1,0	-	-	-	5,4	39,7	1,2	-	-
$\alpha$ -Terpinéol	1174	1692	tr	-	-	-	-	-	-	-	2,2
Longifolène	1405	1580	0,6	1,3	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Himachalène	1448	1641	15,1	18,5	-	-	-	-	-	-	-
$\gamma$ -Himachalène	1475	1691	9,5	11,7	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -Himachalène	1500	1710	42,7	52,2	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Calacorène	1531	1917	0,5	0,8	-	-	-	-	-	-	-
Oxydohimachalène	1561	1978	0,7	-	-	-	-	-	33,9	2,2	-
Oxyde de $\beta$ -himachalène	1600	2008	0,8	-	-	-	61,7	18,7	1,3	-	-
Muurola-4,10(14)-diène-8 $\beta$ -ol	1614	2143	0,2	-	-	-	-	-	8,9	0,3	-
<i>épi</i> -Cédrol	1615	2168	0,1	-	-	-	-	-	-	-	7,9
<i>épi</i> -Cubénol	1618	2061	0,8	-	-	-	-	-	23,1	7,3	3,4
Himachalol	1647	2235	0,4	-	-	-	-	-	-	13,5	34,2
Allohimachalol	1653	2269	0,1	-	-	-	-	-	-	-	1,2
( <i>Z</i> )- $\gamma$ -Atlantone	1663	2198	0,8	-	3,9	27,4	-	-	-	-	-
(4 <i>R</i> ,8 <i>R</i> )-Déodarone*	1670	2226	1,1	-	-	-	-	-	2,6	32,6	1,1
(4 <i>R</i> ,8 <i>S</i> )-Déodarone*	1670	2231	1,0	-	-	-	-	-	2,0	24,5	4,6
( <i>E</i> )- $\gamma$ -Atlantone	1675	2221	1,0	-	4,6	30,5	1,0	-	-	-	-
( <i>Z</i> )- $\alpha$ -Atlantone	1685	2235	0,8	-	9,9	0,4	-	-	-	-	-
( <i>E</i> )- $\alpha$ -Atlantone	1747	2316	4,1	-	52,3	20,1	0,8	-	-	-	-
Total			80,8	84,6	70,6	78,4	68,9	58,4	72,9	80,8	54,5

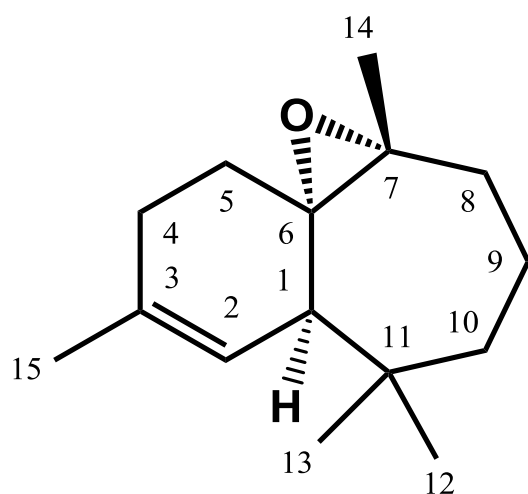
L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire (BP-1) ; \* : pourcentages donnés sur colonne polaire (BP-20) ; HE : huile essentielle.

### III. Identification des composés absents de la banque « Terpènes »

Nous avons identifié sept composés absents de notre bibliothèque de données spectrales enregistrées au laboratoire. Pour cinq d'entre eux, l'identification a été effectuée par comparaison des déplacements chimiques des carbones contenus dans le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  des fractions de la CC avec ceux de composés purs, décrits dans la littérature, et contenus dans une seconde bibliothèque de spectres informatisée construite au laboratoire. Nous rappelons qu'il s'agit du 4-acétyl-1-méthylcyclohexène, de l'oxydohimachalène, de l'oxyde de  $\beta$ -himachalène, et de la (4*R*,8*R*)- et (4*R*,8*S*)-déodarone. L'identification de la (*Z*)- et (*E*)- $\gamma$ -atlantone a nécessité, quant à elle, l'utilisation de la RMN bidimensionnelle.

#### III.1. L'oxyde de $\beta$ -himachalène

L'oxyde de  $\beta$ -himachalène (**2**) a été identifié dans la fraction F4 (Ira/Irp = 1600/2008) par comparaison des déplacements chimiques du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de cette fraction avec ceux décrits par [Weyerstahl et al. \(1987\)](#). En effet, ces auteurs ont isolé cette molécule à partir de l'huile essentielle d'aiguilles et de branches d'*Artemisia vestisia* ([Tableau IV.3](#)). Par ailleurs, l'indice de rétention sur colonne apolaire (Ira=1600) concorde avec la valeur d'indice décrite dans la littérature (Ira=1607) ([Boudarene et al., 2004a](#)). Néanmoins, sur colonne polaire, nous mesurons une valeur supérieure (Irp=2008) à celle décrite par [Chaudhary et al \(2011\)](#) (Irp=1923). Les composés oxygénés comportant le squelette himachalane sont courants dans le genre *Cedrus*. L'oxyde de  $\beta$ -himachalène a déjà été identifié par divers auteurs dans l'huile essentielle de bois de *Cedrus atlantica* ([Aberchane et al., 2004 : Ira=1611 ; Boudarene et al., 2004a : Ira=1607](#)).

Tableau IV.3 : Structure et valeurs des déplacements chimiques (ppm) de l'oxyde de  $\beta$ -himachalène (**2**)

C	$\delta(\text{litt})$	$\delta(\mathbf{2})$
1	48,9	48,80
2	121,5	121,42
3	134,3	134,29
4	27,7	27,60
5	24,9	24,85
6	65,7*	65,13 <sup>s</sup>
7	65,7*	65,13 <sup>s</sup>
8	44,2	44,44
9	20,8	20,75
10	36,4	36,30
11	36,6	36,54
12	23,9	23,88
13	29,9	29,94
14	18,7	18,64
15	25,5	25,42

$\delta(\text{litt})$  : déplacements chimiques décrits dans la littérature selon [Weyerstahl et al., \(1987\)](#) ; numérotation des carbones du squelette selon [Joulain et König \(1998\)](#) ;  $\delta(\mathbf{2})$  : déplacements chimiques observés dans le spectre de la fraction F4 ; \* : déplacements chimiques pouvant être interchangeés ; <sup>s</sup> : superpositions de déplacements chimiques dans le spectre de la fraction F4.

### III.2. L'oxydohimachalène

L'oxydohimachalène (**3**) a également été identifié dans l'huile essentielle d'*Artemisia vestisia* ([Weyerstahl et al., 1987](#)) et les déplacements chimiques en RMN <sup>13</sup>C du composé majoritaire (33,9 %) de la fraction F6 sont conformes à ceux de ces auteurs ([Tableau IV.4](#)). Par ailleurs, son indice de rétention sur colonne apolaire (Ira=1561) concorde avec la valeur d'indice (Ira=1573 ou 1574) décrite dans la littérature ([Satrani et al., 2006](#) ; [Boudarene et al., 2004a](#)). Il a déjà été décrit dans l'huile essentielle de bois de *C. atlantica* ([Satrani et al., 2006](#) ; [Aberchane et al., 2003, 2004](#) ; [Boudarene et al., 2004a](#) ; [Chalchat et al., 1994](#)).

Tableau IV.4 : Structure et valeurs des déplacements chimiques (ppm) de l'oxydohimachalène (**3**)

C	$\delta(\text{litt})$	$\delta(\mathbf{3})$
1	87,9	87,97
2	121,1	121,09
3	135,0	135,00
4	30,8	30,83
5	22,0	22,11
6	129,9	129,96
7	139,9	139,96
8	83,9	83,90
9	22,8	22,90
10	33,9	33,91
11	34,6	34,63
12	22,5	22,56
13	27,4	27,53
14	10,2	10,31
15	24,0	24,07

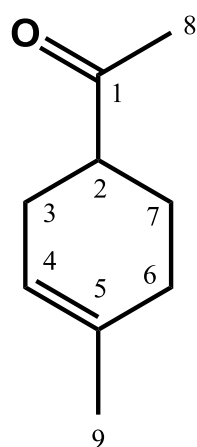
$\delta(\text{litt})$  : déplacements chimiques décrits dans la littérature selon [Weyerstahl et al., \(1987\)](#) ; numérotation des carbones du squelette selon [Joulain et König \(1998\)](#) ;  $\delta(\mathbf{3})$  : déplacements chimiques observés dans le spectre de la fraction F6.

### III.3. Le 4-acétyl-1-méthylcyclohexène

La fraction F5 contient deux composés majoritaires, l'un d'eux étant l'oxyde de  $\beta$ -himachalène (18,7 %). Les indices de rétention (Ira/Irp=1108/1554) du composé majoritaire (39,7 %) laissent suspecter qu'il ne s'agit pas d'un sesquiterpène mais plutôt d'un monoterpène oxygéné. Dans le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$ , il est aisé de repérer par leurs intensités, les signaux des 9 carbones appartenant avec certitude au composé majoritaire. Un signal à 119,28 ppm induit la présence d'un autre signal appartenant à un second carbone vinylique, probablement quaternaire, effectivement présent à 133,88 ppm. On note aussi la présence d'un signal appartenant à une fonction carbonyle non conjuguée (211,93 ppm). L'ensemble de ces données nous orientent vers la structure du 4-acétyl-1-méthylcyclohexène (**4**), déjà identifié dans l'huile essentielle de bois de *C. atlantica* du Maroc ([Gildemeister et Hoffman, 1956](#) ; [Platier et Teisseire, 1972](#) ; [Aberchane et al., 2004](#)). D'ailleurs, les déplacements chimiques des carbones de ce composé présent dans l'huile essentielle correspondent à ceux décrits par la banque de données en ligne SDBS (National Institute of Advanced

Industrial Science and Technology) (Japan) (Tableau IV.5). La valeur de l'indice de rétention sur colonne apolaire (Ira = 1108) est en parfait accord avec la valeur mesurée dans l'huile essentielle d'*Achillea ligustica* (Filippi *et al.*, 2006 : Ira = 1105). Par contre, elle diffère considérablement de celle reportée par Aberchane *et al.* (2004) (Ira = 1031) dans une huile essentielle de bois de cèdre du Maroc.

Tableau IV.5: Structure et valeurs des déplacements chimiques (ppm) du 4-acétyl-1-méthylcyclohexène (**4**)



C	$\delta(\text{litt})$	$\delta(\mathbf{4})$
1	211,63	211,93
2	47,31	47,27
3	27,15	27,08
4	119,36	119,28
5	133,79	133,88
6	29,58	29,52
7	25,03	24,93
8	27,86	27,99
9	23,35	23,42

$\delta(\text{litt})$  : déplacements chimiques décrits dans la littérature selon SDBS ;  $\delta(\mathbf{4})$  : déplacements chimiques observés dans le spectre de la fraction F5.

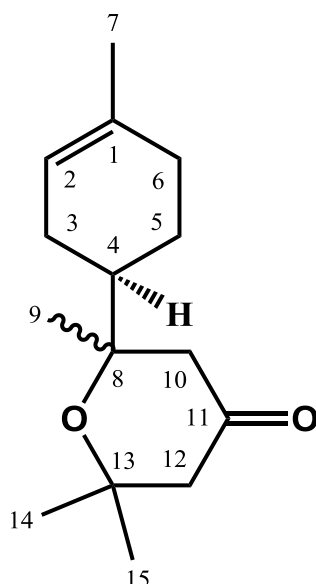
#### III.4. La (4*R*, 8*R*)-déodarone et la (4*R*, 8*S*)-déodarone

La déodarone est présente dans l'huile essentielle de bois de *Cedrus atlantica* sous forme de deux diastéréoisomères : (4*R*,8*R*) et (4*R*,8*S*) (stéréochimie relative). La déodarone a déjà été identifiée dans l'huile essentielle du Maroc à plusieurs reprises néanmoins seuls Chalchat *et al.* (1994) ont évoqué la présence d'un isomère (sans pour autant l'identifier). Les deux diastéréoisomères sont présents dans un rapport 3/2 dans la fraction F7, nous pouvons donc repérer deux séries de signaux. Les valeurs des déplacements chimiques de la (4*R*,8*S*)-déodarone (**5a**) et la (4*R*,8*R*)-déodarone (**5b**) observées dans l'huile essentielle de bois sont très proches de celles décrites par Villecco *et al.* (2001) (Tableau IV.6). Néanmoins, nous observons une différence de déplacement chimique de 1 ppm sur l'un des méthyles de la (4*R*,8*S*)-déodarone (carbone n°15). Ayant soigneusement vérifié cette valeur sur notre spectre RMN, nous concluons que le déplacement chimique du carbone C15 décrit par Villecco *et al.*

(2001) résulte d'une malencontreuse erreur typographique. Il faut donc lire 32,2 ppm plutôt que 33,2 ppm. La valeur d'indice de rétention sur colonne apolaire ( $I_{ra} = 1670$ ) de ces deux diastéréoisomères est identique (co-élution). Elle concorde avec la valeur d'indice ( $I_{ra} = 1694$ ) décrite dans la littérature par [Aberchane \*et al.\* \(2003, 2004\)](#) et [Satrani \*et al.\* \(2006\)](#). Nous utiliserons les indices de rétention sur colonne polaire pour la quantification des déodarones par CPG(Ir).

Tableau IV.6 : Structure et valeurs des déplacements chimiques (ppm) de la (4*R*,8*S*)-déodarone (**5a**) et la (4*R*,8*R*)-déodarone (**5b**) (stéréochimie relative).

	C	$\delta$ (litt)	$\delta$ ( <b>5a</b> )	$\delta$ (litt)	$\delta$ ( <b>5b</b> )
<b>5a</b> : 4 <i>R</i> ,8 <i>S</i>					
<b>5b</b> : 4 <i>R</i> ,8 <i>R</i>					
	1	133,9	133,93	134,1	134,05
	2	120,5	120,51	120,4	120,36
	3	26,3	26,31	26,5	26,46
	4	46,0	45,97	45,9	45,84
	5	23,8	23,77	23,6	23,56
	6	31,0	30,97	31,0	30,94
	7	23,3	23,29	23,3	23,32
	8	78,4	78,45	78,4	78,45
	9	26,1	26,06	25,4	25,44
	10	47,0	47,01	47,7	47,71
	11	209,3	209,36	209,3	209,39
	12	51,4	51,40	51,6	51,57
	13	74,2	74,23	74,3	74,35
	14	30,7	30,69	30,7	30,73
	15	33,2	32,17	32,2	32,19



$\delta$ (litt) : déplacements chimiques décrits dans la littérature selon [Villecco \*et al.\*, \(2001\)](#) ; numérotation des carbones du squelette selon [Villecco \*et al.\*, \(2001\)](#) ;  $\delta$ (**5a**) et  $\delta$ (**5b**) : déplacements chimiques observés dans le spectre de la fraction F7.

### III.5. La (*Z*)- et la (*E*)- $\gamma$ -atlantone

La fraction F3 contient deux composés majoritaires qui représentent 27,4%, ( $I_{ra}/I_{rp}$  : 1663/2198) et 30,5% ( $I_{ra}/I_{rp}$  : 1675/2221) de la fraction, à côté de la (*E*)- $\alpha$ -atlantone (20,1%) et d'autres composés très minoritaires. Les données spectrales des deux composés sont absentes de nos bibliothèques de spectres (Laboratoire et Littérature), contrairement à celles de la (*E*)- $\alpha$ -atlantone, qui elles sont donc attribuées. Sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de cette fraction, nous observons 20 raies de résonance de forte intensité et 10 autres raies de résonance d'intensité plus faible, ce qui nous laisse

supposer que nous sommes en présence de deux sesquiterpènes qui possèdent chacun cinq carbones quaternaires.

La première opération a consisté en l'attribution d'une série de 15 raies de résonance à chacune des molécules. Pour cela, nous avons enregistré un nouveau spectre de la fraction en utilisant la séquence classique de quantification par RMN  $^{13}\text{C}$ , à savoir, le découplage en créneaux inverses et un temps de répétition entre deux impulsions égal à 5 fois le  $T_1$  des carbones protonés (classiquement évalué à 20 s pour les sesquiterpènes). Malgré la faible différence de teneur des deux composés, cette expérience a effectivement permis de distinguer deux séries de raies de résonance. Les déplacements chimiques caractéristiques de deux fonctions cétones ( $\delta$  : 199,36 ppm et 199,39 ppm) sont observés. Il s'avère que les autres carbones quaternaires sont des carbones oléfiniques. Le spectre DEPT nous permet d'envisager la présence d'une double liaison tétrasubstituée et de deux doubles liaisons trisubstituées. D'après le spectre DEPT (5 C, 2 CH, 4 CH<sub>2</sub>, 4 CH<sub>3</sub>), chacune des deux molécules présente 5 centres d'insaturation et donc un cycle à côté de la fonction cétone et des trois doubles liaisons.

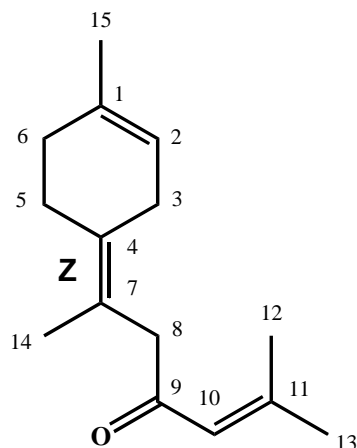
A ce stade de l'analyse, nous observons que les deux séries de déplacements chimiques sont très proches, de même que les indices de rétention sur colonne apolaire et polaire (Ira/Irp : 1663/2198 et 1675/2221). Nous observons également que les données RMN sont proches de celles des (*E*)- et (*Z*)- $\alpha$ -atlantones, données que nous possédons dans notre bibliothèque de spectres. Ces observations orientent notre recherche vers deux autres atlantones isomères, à savoir la (*Z*)- $\gamma$ -atlantone et la (*E*)- $\gamma$ -atlantone (Figure IV.7 et IV.8). Les données spectrales (SM et RMN  $^1\text{H}$ ) de ces deux stéréoisomères sont décrites (Weyerstahl *et al.*, 1987), mais pas les données RMN  $^{13}\text{C}$ . D'ailleurs, sur le RMN  $^1\text{H}$  de la fraction, les déplacements chimiques caractéristiques des  $\gamma$ -atlantones sont observés mais leur identification sur cette seule base est délicate.

Afin de confirmer la structure de nos deux molécules inconnues et d'attribuer les déplacements chimiques des carbones, nous avons réalisé en complément des



séquences de RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et DEPT), les séquences 2D (HSQC, HMBC, COSY). Toutes les corrélations sont décrites dans les tableaux IV.7 et IV.8.

Tableau IV.7 : Structure et données RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de la (Z)- $\gamma$ -atlantone (**6**)



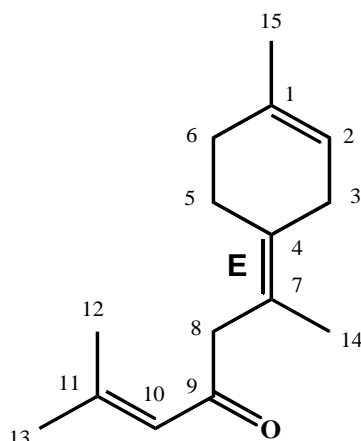
C	$\delta(\underline{6})$	DEPT	$\delta(^1\text{H})$	Multiplicité (Hz)	HMBC	COSY	$\delta(\text{litt})$	Hz(litt)
1	134,44	C	-	-	-	-	-	-
2	120,21	CH	5,35	m	-	C3	5,35/5,37	oct (2)
3	30,03	CH <sub>2</sub>	2,75	large s	C1	-	2,75/2,80	s
4	119,89	C	-	-	-	-	-	-
5	27,22	CH <sub>2</sub>	2,39	t (7)	C1 ; C6 ; C4 ; C7	-	2,38	t (7)
6	31,39	CH <sub>2</sub>	2,05	m	C1 ; C2	C5	2,32	t (7)
7	132,33	C	-	-	-	-	-	-
8	50,19	CH <sub>2</sub>	3,15	s	C4 ; C7 ; C10 ; C9 ; C14	-	3,15/3,15	s
9	199,36	C	-	-	-	-	-	-
10	123,01	CH	6,05	t (1,2)	C9 ; C12 ; C13	C12 ; C13	6,04	q (2)
11	155,42	C	-	-	-	-	-	-
12	20,71	CH <sub>3</sub>	2,16	d (1,2)	C13	-	2,12/2,13	d
13	27,75	CH <sub>3</sub>	1,86	d (1,2)	C10 ; C11 ; C12	-	1,86/1,87	d
14	18,65	CH <sub>3</sub>	1,71	large s	C4 ; C7 ; C8	-	1,68/1,71	t (1)
15	23,33	CH <sub>3</sub>	1,67	m	C1 ; C2 ; C6	-	1,66	s

$\delta(\text{litt})$  : déplacements chimiques ( $^1\text{H}$ ) décrits dans la littérature selon [Weyerstahl., \(1987\)](#) ;  $\delta(\underline{6})$  et  $\delta(^1\text{H})$  : déplacements chimiques observés dans le spectre de la fraction F3.

A titre d'exemple, nous voyons que les corrélations longues distances des hydrogènes H8 et H10 avec les différents carbones permettent de construire la chaîne C8-C12. Ainsi, l'attribution des méthyles allyliques C12 (20,71 ppm) et C14 (18,65 ppm) est réalisée grâce à l'observation des corrélations longues distances entre H12 (2,16 ppm) avec C13 d'une part et H14 (1,71 ppm) avec C8 (carbone méthylénique en  $\alpha$  du carbonyle (50,19 ppm) d'autre part. De même, le cycle cyclohexanique est construit à partir des hydrogènes H5 et H15. A titre d'exemple, les déplacements chimiques des carbones méthyléniques allyliques C3 (30,03ppm) et C6 (31,39 ppm)

pour la (*Z*)- $\gamma$ -atlantone sont séparés par 1 ppm environ. Cependant, les protons H3 et H6, dont les déplacements chimiques (2,75 vs 2,05ppm) sont très différents et la multiplicité très discriminante (large singulet vs multiplet), permettent à l'aide de la séquence HSQC de réaliser l'attribution.

Tableau IV.8 : Structure et données RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de la (*E*)- $\gamma$ -atlantone (**7**)



C	$\delta(\mathbf{7})$	DEPT	$\delta(\text{1H})$	Multiplicité (Hz)	HMBC	COSY	$\delta(\text{litt})$	H $\mathbf{z}(\text{litt})$
1	134,18	C	-	-	-	-	-	-
2	120,38	CH	5,37	m	-	C5	5,35/5,37	oct (2)
3	29,77	CH <sub>2</sub>	2,8	large s	C1	-	2,75/2,80	s
4	119,96	C	-	-	-	-	-	-
5	27	CH <sub>2</sub>	2,34	t (7)	C1 ; C3 ; C4 ; C6	-	2,38	t (7)
6	31,41	CH <sub>2</sub>	2,05	m	C1 ; C2	C3	2,32	t (7)
7	132,26	C	-	-	-	-	-	-
8	49,8	CH <sub>2</sub>	3,19	s	C4 ; C7 ; C9 ; C10 ; C14	-	3,15/3,15	s
9	199,39	C	-	-	-	-	-	-
10	123,01	CH	6,05	t (1,2)	C9 ; C12 ; C13	C12 ; C13	6,04	q (2)
11	155,49	C	-	-	-	-	-	-
12	20,74	CH <sub>3</sub>	2,13	d (1,2)	C9 ; C10 ; C11 ; C13	-	2,12/2,13	d
13	27,78	CH <sub>3</sub>	1,87	d (1,2)	C10 ; C11 ; C12	-	1,86/1,87	d
14	19,13	CH <sub>3</sub>	1,68	large s	C4 ; C7 ; C8	-	1,68/1,71	t (1)
15	23,35	CH <sub>3</sub>	1,67	m	C1 ; C2 ; C6	-	1,66	s

$\delta(\text{litt})$  : déplacements chimiques ( $^1\text{H}$ ) décrits dans la littérature selon [Weyerstahl., \(1987\)](#) ;  $\delta(\mathbf{7})$  et  $\delta(^1\text{H})$ : déplacements chimiques observés dans le spectre de la fraction F3.

Nous remarquons que l'attribution des déplacements chimiques en RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  du cycle menthanique est conforme à celle décrite pour le terpinolène et les (*Z*)- et (*E*)- $\gamma$ -bisabolènes. Par ailleurs, sur la base des indices de rétention de [Konig et al. \(2006\)](#), qui montrent que la (*Z*)- $\gamma$ -atlantone (Ira =1669) est éluée avant la (*E*)- $\gamma$ -atlantone (Ira=1681), nous constatons que le stéréoisomère E est le composé majoritaire.

#### IV. Analyse d'un échantillon d'huile essentielle et deux échantillons d'huile pyrolytique de bois de *Cedrus atlantica* du Maroc.

Dans la continuité des travaux menés sur l'huile essentielle de bois de *Cedrus atlantica* de Corse (Paoli *et al.*, 2011), nous nous sommes proposés d'analyser la composition chimique d'une huile essentielle et de deux huiles pyrolytiques de bois réalisées et provenant du Maroc, issus du même arbre.

Ces trois échantillons ont été analysés par CPG(Ir) et RMN  $^{13}\text{C}$ . Treize composés ont été identifiés par la combinaison de ces deux techniques d'analyse. La composition chimique globale est largement dominée par les sesquiterpènes (Tableau IV.9). En effet pour l'ensemble des échantillons, le  $\beta$ -himachalène est le constituant majoritaire (22,0-33,8 %), suivi de la (*E*)- $\alpha$ -atlantone (9,8-11,0 %), de l' $\alpha$ -himachalène (9,4-10,8 %) et du  $\gamma$ -himachalène (6,8-8,3 %).

Tableau IV.9 : Composition chimique d'une huile essentielle et de deux huiles pyrolytiques de bois de *Cedrus atlantica* du Maroc

Composés	Ir a	Ir p	HE	HP1	HP2	Identification
4-Acétyle-1-méthylcyclohexène	1108	1554	2,2	0,5	0,7	Ir, RMN $^{13}\text{C}$
Longifolène	1405	1580	0,6	0,6	0,7	Ir, RMN $^{13}\text{C}$
$\alpha$ -Himachalène	1448	1641	10,8	10,5	9,4	Ir, RMN $^{13}\text{C}$
$\gamma$ -Himachalène	1475	1691	8,3	7,3	6,8	Ir, RMN $^{13}\text{C}$
$\beta$ -Himachalène	1500	1710	22,0	33,8	32,2	Ir, RMN $^{13}\text{C}$
Oxyde de $\beta$ -himachalène	1600	2008	9,4	1,4	0,5	Ir, RMN $^{13}\text{C}$
Muurola-4,10(14)-diène-8 $\beta$ -ol	1614	2143	-	0,4	0,3	Ir, RMN $^{13}\text{C}$
<i>épi</i> -Cubénol	1618	2061	1,5	2,6	2,4	Ir, RMN $^{13}\text{C}$
Himachalol	1647	2235	0,8	0,7	0,4	Ir, RMN $^{13}\text{C}$
Allohimachalol	1653	2269	0,2	0,6	0,3	Ir, RMN $^{13}\text{C}$
( <i>Z</i> )- $\gamma$ -Atlantone	1663	2198	0,6	1,7	2,0	Ir, RMN $^{13}\text{C}$
(4 <i>R</i> ,8 <i>R</i> )-Déodarone*	1670	2226	2,8	1,9	1,6	Ir, RMN $^{13}\text{C}$
(4 <i>R</i> ,8 <i>S</i> )-Déodarone*	1670	2231	3,0	1,9	1,7	Ir, RMN $^{13}\text{C}$
( <i>E</i> )- $\gamma$ -Atlantone	1675	2221	1,1	1,6	0,9	Ir, RMN $^{13}\text{C}$
( <i>Z</i> )- $\alpha$ -Atlantone	1685	2235	1,4	1,6	1,7	Ir, RMN $^{13}\text{C}$
( <i>E</i> )- $\alpha$ -Atlantone	1747	2316	10,1	9,8	11,0	Ir, RMN $^{13}\text{C}$
Total			75,7	76,9	74,0	

L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire (BP-1) ; \* : pourcentages donnés sur colonne polaire (BP-20) ; HE : huile essentielle ; HP : huile pyrolytique.

L'analyse chimique de l'huile essentielle et des huiles pyrolytiques de *Cedrus atlantica* du Maroc nous a permis d'identifier directement 16 composés représentant de 74,0 % à 76,9 % de la composition chimique.

Au terme de cette étude, nous remarquons que le fractionnement de l'huile essentielle de *C. atlantica* commerciale a permis de mettre en évidence douze composés oxygénés supplémentaires. Il s'agit de :

- un dérivé du cyclohexène (4-acétyl-1-méthylcyclohexène) ;
- cinq alcools sesquiterpéniques (muurola-4,10(14)-diène-8 $\beta$ -ol, himachalol,  $\alpha$ -terpinéol, allohimachalol, *épi*-cédrol) ;
- deux oxydes sesquiterpéniques (oxydohimachalène, oxyde de  $\beta$ -himachalène)
- et quatre cétones sesquiterpéniques ((*Z*)- $\gamma$ -atlantone, (*E*)- $\gamma$ -atlantone, (4*R*,8*R*)-déodarone et (4*R*,8*S*)-déodarone).

Il est à noter que le dérivé du cyclohexène, les deux oxydes et deux des cétones (les déodarones) ont été identifiés à partir de notre bibliothèque « Littérature ». De plus, les deux stéréoisomères (*Z*)- et (*E*)- $\gamma$ -atlantone ont, à notre connaissance, été décrits en RMN  $^{13}\text{C}$  pour la première fois. Par ailleurs, les trois échantillons de *C. atlantica* provenant du Maroc (huiles essentielle et pyrolytiques) ont des compositions chimiques similaires, caractérisée par une teneur importante en sesquiterpènes avec le  $\beta$ -himachalène (22,0-33,8 %) comme constituant majoritaire, suivi de l'(*E*)- $\alpha$ -atlantone (9,8-11,0 %), de l' $\alpha$ -himachalène (9,4-10,8 %) et du  $\gamma$ -himachalène (6,8-8,3 %).

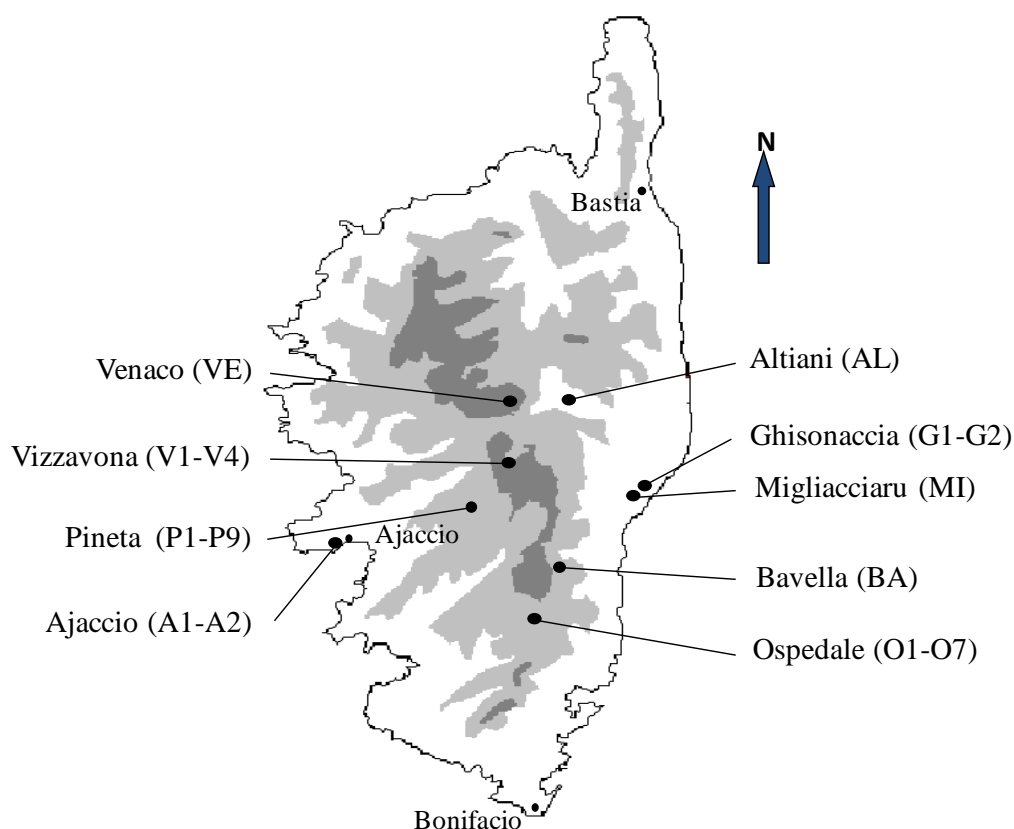
## V. Analyse qualitative et quantitative des résines de *Cedrus atlantica* par RMN $^{13}\text{C}$ et $^1\text{H}$

Dans la continuité des travaux menés sur la caractérisation chimique du cèdre de l'Atlas introduit en Corse (Paoli *et al.*, 2011), nous nous sommes intéressés à la composition de la résine de cet arbre. Au sein du laboratoire, l'étude des résines a déjà été réalisée sur deux espèces de pins : *Pinus nigra* (Rezzi *et al.*, 2002) et *Pinus pinaster* (Ottavioli, 2009). L'objectif de notre étude était d'identifier et de quantifier par RMN les principaux constituants de la résine de *C. atlantica* et de mettre en évidence une éventuelle variabilité chimique.

### V.1 Analyse qualitative de résines de *Cedrus atlantica* par RMN $^{13}\text{C}$

Nous avons récolté 28 échantillons de résine sur le tronc de cèdres adultes poussant dans les forêts de Corse (plantations réalisées par l'ONF : forêts de Bavella, de l'Ospedale, de Pineta et de Vizzavona) et dans des stations isolées (Figure IV.6).

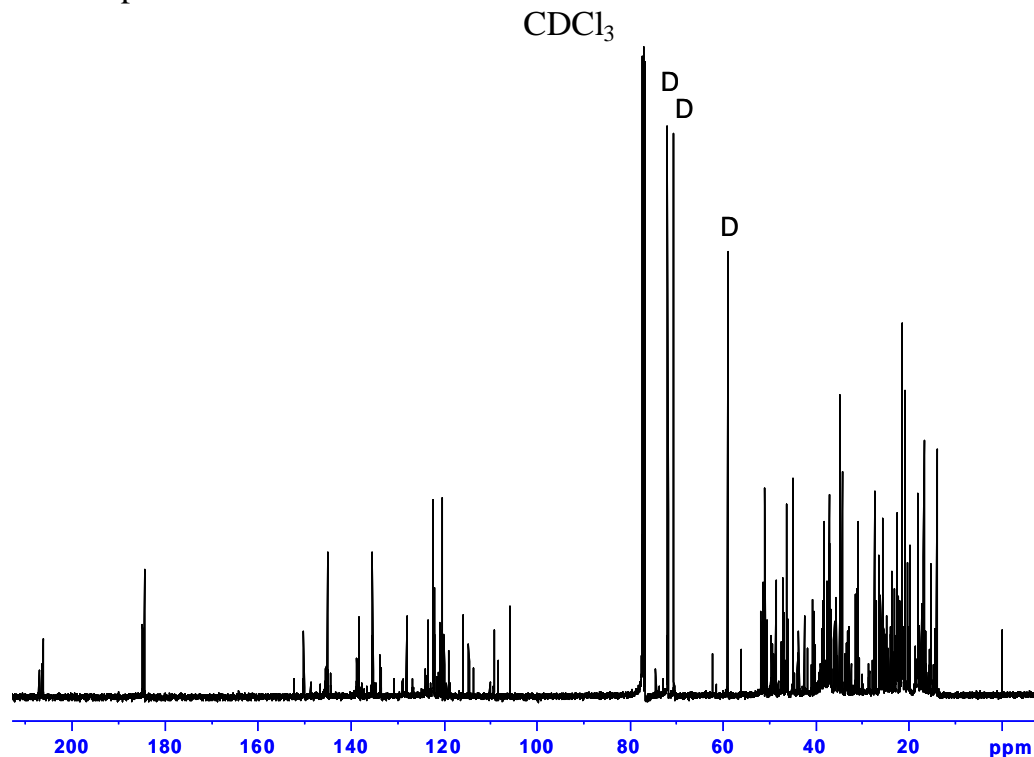
Figure IV.6 : Répartition géographique des échantillons de résine de *C. atlantica*



Pour parvenir à l'identification des composés présents dans les résines, nous avons choisi la RMN  $^{13}\text{C}$  comme outil d'analyse, selon un protocole mis en place au laboratoire (Rezzi *et al.*, 2002 ; 2005) plutôt que la CPG après dérivatisation. En effet la RMN  $^{13}\text{C}$  permet, avec un temps d'analyse compatible avec l'étude de la variabilité chimique, d'identifier les monoterpènes et les diterpènes acides et neutres en mélange sans partition acido-basique. En revanche en CPG, une dérivatisation est nécessaire pour les diterpènes acides parmi lesquels certains composés majoritaires comme les acides lévopimarique et palustrique sont toujours quantifiés ensemble du fait de leur coélution, ce qui peut être préjudiciable dans le cas d'une caractérisation chimique. Afin d'illustrer l'efficacité de la méthode utilisée, nous détaillerons tout d'abord l'analyse d'un échantillon de résine de *Cedrus atlantica* (G1) (Tableau IV.10 ; Figure IV.7) avant d'aborder l'étude de l'ensemble des échantillons.

- Analyse d'un échantillon de résine

L'interrogation des bibliothèques de spectres du laboratoire à partir des déplacements chimiques du spectre de l'échantillon G1 (Figure IV.7), nous a permis d'identifier 12 constituants. Il s'agit de 7 acides résiniques (les acides isopimarique, abiétique, déhydroabiétique, néoabiétique, lévopimarique, palustrique et sandaracopimarique), 3 diterpènes neutres (abiénoï, isopimarol et abiétadiène-18-al) (Figure IV.8) et 2 monoterpènes oléfiniques ( $\alpha$ -pinène et  $\beta$ -pinène).

Figure IV.7: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de la résine G1

D = diglyme ajouté pour la quantification

Dans le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de cette oléorésine, nous constatons que :

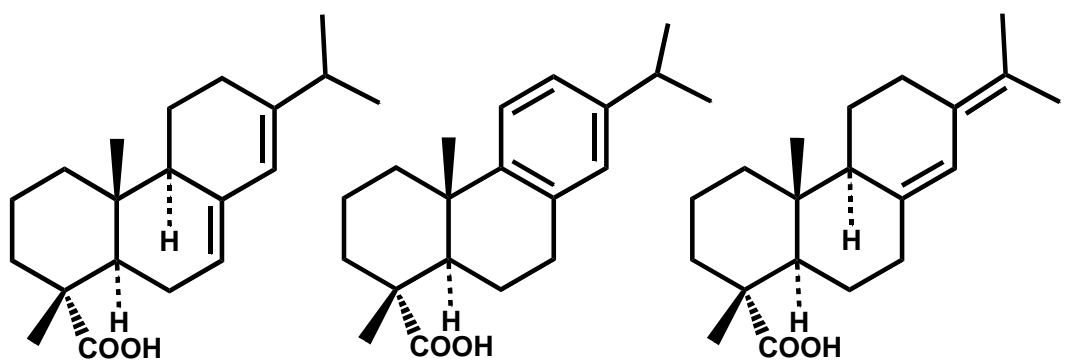
- les variations des déplacements chimiques entre les valeurs du mélange et celles des spectres de référence sont inférieures ou égales à 0,06 ppm pour 76 % des signaux et comprises entre 0,07 et 0,12 ppm pour 19 % des signaux, les carbones restant (carboxyles des acides abiétique, néoabiétique, isopimarique, lévopimarique et sandaracopimarique) présentent des variations plus importantes (de 0,33 à 0,77 ppm) ;
- le nombre de signaux superposés, compris entre 0 ( $\alpha$ -pinène) et 7 (acide levopimarique), ne gêne en rien l'identification des composés puisque dans tous les cas, chaque molécule est identifiée par au moins 63 % des pics lui appartenant en propre ;
- enfin, les quelques signaux non identifiés sont de faible intensité et correspondent donc à des composés minoritaires.

- Etude de 28 échantillons de résines

Sur l'ensemble de l'échantillonnage, nous remarquons que :

- 9 échantillons sur les 28 collectés contiennent divers acides résiniques, ainsi que des diterpènes neutres et des monoterpènes oléfiniques habituellement rencontrés dans les résines. Au total, 8 acides résiniques comportant le squelette pimarane et abiétane ont été identifiés : les acides isopimarique, abiétique, déhydroabiétique, néoabiétique, lévopimarique, palustrique, sandaracopimarique et 15-hydroxydéhydroabiétique. On trouve également 4 diterpènes neutres (isopimarol, abiéanol, manool et abiétadiène-18-al) (Figure IV.8) ainsi que l' $\alpha$ - et le  $\beta$ -pinène ;
- quatre autres échantillons renferment essentiellement les mêmes acides résiniques, diterpènes neutres et monoterpènes que ceux cités précédemment. Cependant, leurs spectres RMN  $^{13}\text{C}$  font apparaître plusieurs séries de raies de résonance d'intensité importante non attribuées ;
- enfin et de manière surprenante, aucun des composés identifiés dans tous les échantillons précédents n'est repéré dans les 13 échantillons restants, si ce n'est ponctuellement à des taux très faibles. Nous décrirons l'identification des composés majoritaires de ces résines en détaillant l'analyse de 2 échantillons (O1 et MI).

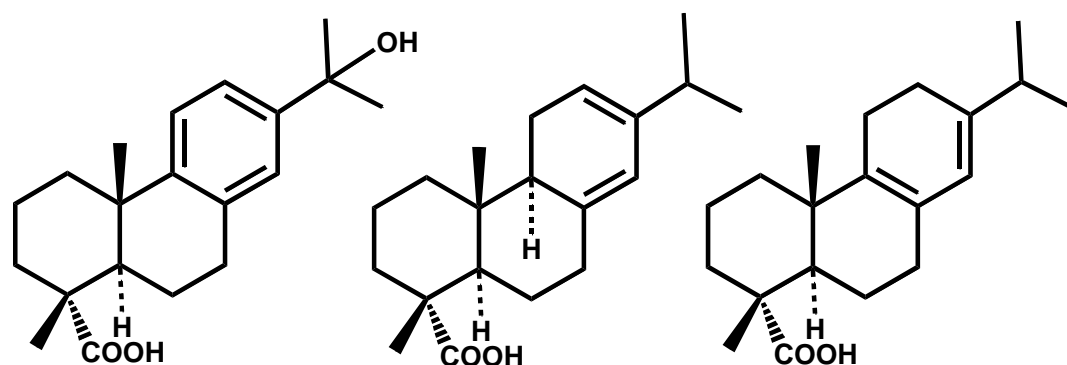


Figure IV.8 : Structures des diterpènes présents dans la résine de *Cedrus atlantica* M.

Acide abiétique

Acide déhydroabiétique

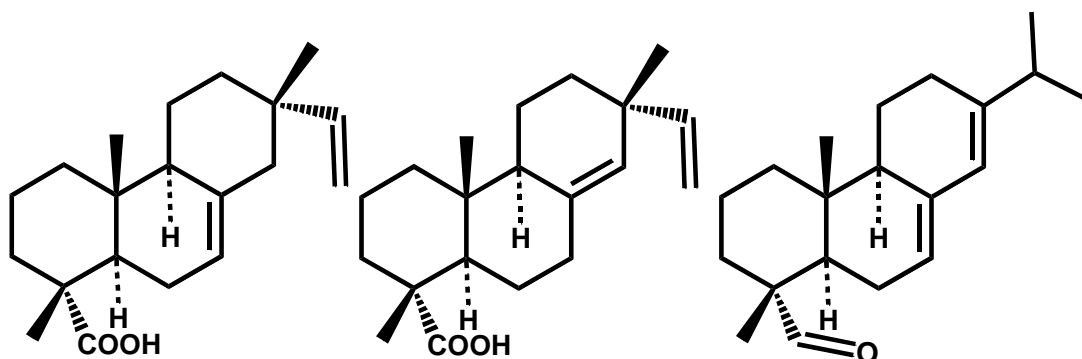
Acide néoabiétique



Acide 15-hydroxydéhydroabiétique

Acide lévopimarique

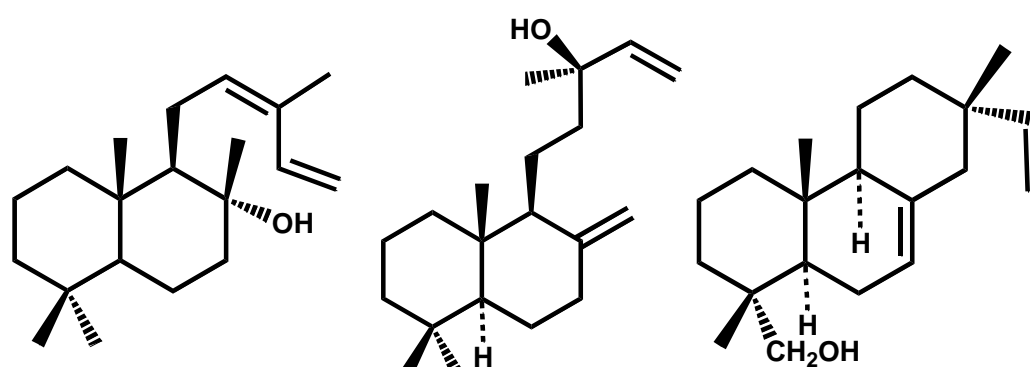
Acide palustrique



Acide isopimarique

Acide sandaracopimarique

Abiétadièn-18-al

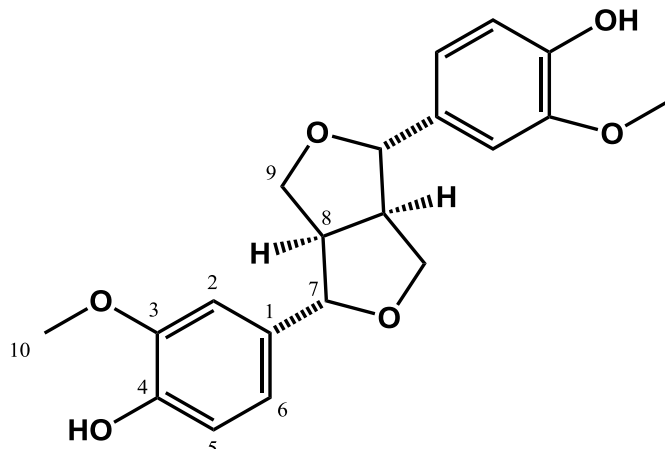


Abiéanol

Manool

Isopimarol

Sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de l'échantillon O1, nous observons une série de raies de résonance d'intensités fortes et homogènes correspondant à un composé majoritaire non identifié. Il s'agit de trois carbones quaternaires (146,77 ; 145,27 et 132,82 ppm), 5 méthynes (118,99 ; 114,36 ; 108,70 ; 85,91 et 54,10 ppm), un méthylène (71,65 ppm) et un méthyle appartenant à un groupement méthoxy (55,96 ppm) (spectre DEPT). Les signaux à 146,77 ; 145,27 ; 118,99 ; 114,36 ; 108,70 et 55,96 ppm sont caractéristiques du motif guaiacol substitué par une chaîne. Parallèlement, on observe aussi la présence de raies de résonances caractéristiques de fonctions oxygénées (alcool ou oxyde : signaux à 85,91, CH et 71,65 ppm,  $\text{CH}_2$ ). L'observation de ces divers signaux nous laisse à penser i) que nous sommes probablement en présence d'un composé possédant la structure des lignanes, ii) que la molécule est probablement symétrique étant donné le faible nombre de signaux. Nous nous sommes tout naturellement orientés vers la structure du pinorésinol (**8**), lignane symétrique qui résulte de la combinaison de deux entités de type «eugenol». Les valeurs de déplacements chimiques de ce composé dans le spectre de la résine sont d'ailleurs en parfait accord avec celle décrites par [Fonseca \*et al\* \(1979\)](#) qui ont isolé ce composé d'*Araucaria angustifolia* et par [Ottavioli \(2009\)](#) dans notre laboratoire qui a identifié ce lignane dans la résine de *Pinus pinaster* (à des teneurs inférieures à 8 %) (Tableau IV.9). Il est à noter que les lignanes et néolignanes ont été identifiés dans un extrait de bois de *Cedrus deodora* ([Agrawal et Rastogi, 1984](#)).

Tableau IV.9: Structure et valeurs des déplacements chimiques (ppm) du pinorésinol **(8)**


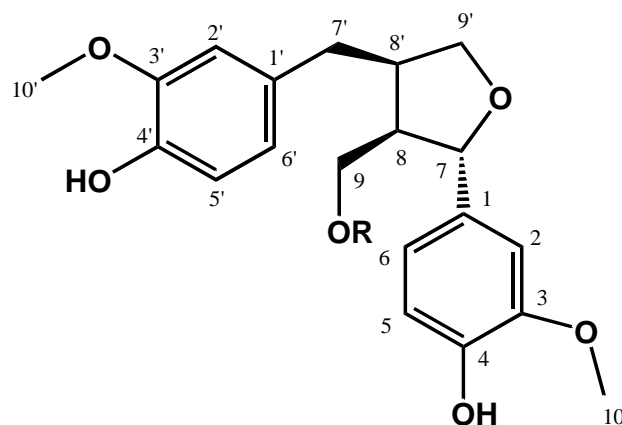
C	$\delta(\text{litt})$	$\delta(\mathbf{8})$
1	132,82	132,80
2	108,65	108,70
3	146,71	146,77
4	145,25	145,27
5	114,31	114,36
6	118,99	118,99
7	85,87	85,91
8	54,11	54,10
9	71,63	71,65
OMe	55,96	55,96

$\delta(\text{litt}^a)$  : déplacements chimiques décrits dans la littérature selon [Fonseca \*et al.\* \(1979\)](#)  
 $\delta(\mathbf{8})$  : déplacements chimiques observés dans le spectre de la résine O1.

Afin d'identifier d'autres composés dans la résine de *C. atlantica*, une bibliothèque informatisée de données RMN  $^{13}\text{C}$  de lignanes a été construite avec les données de la littérature (75 lignanes et dérivés). Ainsi, à partir du spectre de l'échantillon MI, nous avons identifié deux autres lignanes : le laricirésinol **(9)**, composé non symétrique qui contient également deux motifs guaiacol reliés par un motif de type tétrahydrofuranique, ainsi que son acétate en position 9 **(10)** ([Tableau IV.10](#)). Les valeurs des déplacements chimiques de chacun de ces lignanes dans le spectre du mélange correspondent bien à celles décrites dans la littérature ([Eklund \*et al.\*, 2002](#) ; [Brader \*et al.\*, 1998](#)). L'intensité des signaux indique qu'il s'agit manifestement des 2 seuls composés importants de cette résine.

Tableau IV.10 : Structures et valeurs des déplacements chimiques (ppm) du laricirésinol (**9**) et du 9-acétate de laricirésinol (**10**).

R :

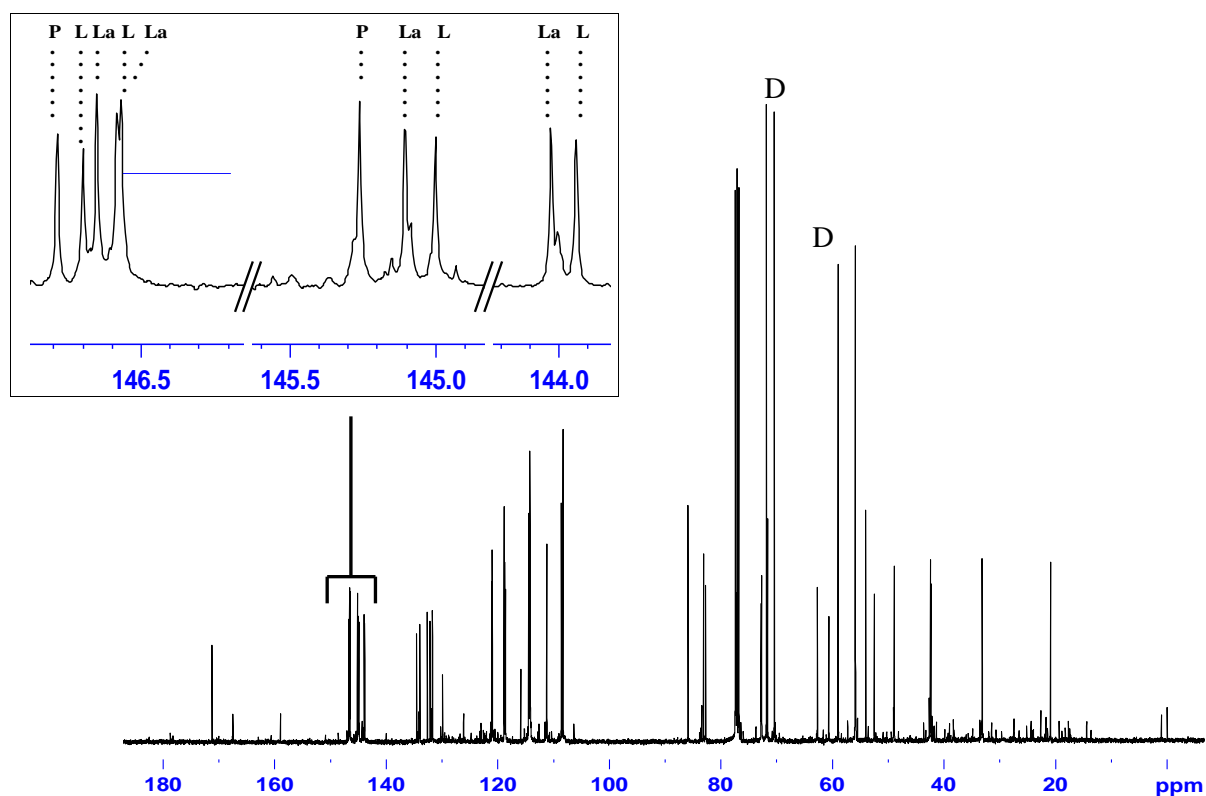
**9** : H**10** : O = C Me

C	$\delta(\text{litt}^a)$	$\delta(\mathbf{9})$	C	$\delta(\text{litt}^b)$	$\delta(\mathbf{10})$
1	134,82	134,74	1	134,3	134,74
2	108,37	108,42	2	108,3	108,42
3	146,67	146,60	3	146,6	146,66
4	145,08	145,06	4	145,1	145,15
5	114,22	114,27	5	114,2	114,31
6	118,78	118,75	6	118,8	118,86
7	82,86	82,80	7	83,1	83,13
8	52,61	52,55	8	49,0	48,95
9	60,95	60,76	9	62,7	62,72
O- <u>CH</u> <sub>3</sub>	55,95*	55,93°	O- <u>CH</u> <sub>3</sub>	55,9*	55,93 <sup>s</sup>
1'	132,30	132,29	1'	131,9	132,29
2'	111,25	111,31	2'	111,2	111,29
3'	146,57	146,60	3'	146,5	146,58
4'	144,05	144,01	4'	144,1	144,09
5'	114,45	114,49	5'	114,5	114,55
6'	121,22	121,20	6'	121,1	121,11
7'	33,35	33,24	7'	33,3	33,24
8'	42,44	42,39	8'	42,5	42,49
9'	72,92	72,86	9'	72,7	72,72
O- <u>CH</u> <sub>3</sub>	55,97*	55,93°	O- <u>CH</u> <sub>3</sub>	55,9*	55,93 <sup>s</sup>
			<u>COO</u> CH <sub>3</sub>	170,9	171,10
			<u>COO</u> CH <sub>3</sub>	20,8	20,88

$\delta(\text{litt}^a)$  : déplacements chimiques décrits dans la littérature selon Eklund *et al.*, (2002) ;  $\delta(\text{litt}^b)$  : déplacements chimiques décrits dans la littérature selon Brader *et al.*, (1998) ; numérotation des carbones du squelette selon Eklund *et al.*, (2002) ;  $\delta(\mathbf{9})$  et  $\delta(\mathbf{10})$  : déplacements chimiques observés dans le spectre de la résine O4 ; \* : déplacements chimiques pouvant être interchangeables ; <sup>s</sup> et : superpositions de déplacements chimiques dans le spectre de la résine.

Il est à noter que, en dépit de la similitude des structures de ces deux laricirésinols, le nombre de signaux superposés dans le spectre du mélange M1 reste limité à trois. Ainsi chacun de ces deux composés a été identifié grâce à l'observation d'au moins 15 signaux lui appartenant en propre.

Figure IV.9 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de la résine O1



P = pinorésinol ; L = laricirésinol ; La = 9-acétate de laricirésinol et D = diglyme.

Ces trois lignanes (pinorésinol, laricirésinol et le 9-acétate de laricirésinol) ont été identifiés dans 19 échantillons sur 28. Dans tous les cas :

- tous les signaux attendus ont été observés, à l'exception de ceux appartenant à des carbones quaternaires de composés minoritaires ;
- le nombre de signaux superposés est limité, même dans les spectres d'échantillons contenant simultanément des diterpènes acides et neutres et des lignanes ;
- les variations des déplacements chimiques entre les composés de références (données de la littérature) et les spectres des mélanges sont faibles, inférieures ou égales à 0,10 ppm pour tous les signaux à l'exception de ceux des carbones quaternaires.

Ainsi, pour l'ensemble des 28 échantillons de résine de *Cedrus atlantica* de Corse, l'interrogation des bibliothèques de spectres du laboratoire nous a permis d'identifier 17 composés parmi lesquels 8 acides résiniques (acides isopimarique, abiétique, déhydroabiétique, 15-hydroxydéhydroabiétique, néoabiétique, lévopimarique, sandaracopimarique et palustrique), 4 diterpènes neutres (isopimarol, abiénoïl, manool et abiétadiène-18-al) et 2 monoterpènes oléfiniques ( $\alpha$ - et  $\beta$ -pinène). De plus, l'étude des spectres des résines nous a également permis d'identifier 3 lignanes : le pinorésinol (**8**) (déjà identifié au laboratoire dans la résine de *Pinus pinaster*), le laricirésinol (**9**) et le 9-acétate de laricirésinol (**10**) (identifiés grâce aux données RMN  $^{13}\text{C}$  issues de la littérature). De ce fait, les déplacements chimiques de ces molécules en mélange enregistrés sur notre appareil ont été référencés dans la bibliothèque de spectres du laboratoire, contribuant ainsi à son enrichissement.

## V.2. Analyse quantitative de résines de *Cedrus atlantica* par RMN $^{13}\text{C}$ et $^1\text{H}$

La quantification des diterpènes acides et neutres dans les résines et extraits aux solvants est généralement réalisée par Chromatographie en phase Gazeuse à Haute Température (CGHT) après partition acido-basique et dérivatisation des acides. De même, la quantification des lignanes est habituellement réalisée par CGHT, après dérivatisation. Au laboratoire, nous avons montré que la RMN  $^{13}\text{C}$  est une méthode efficace pour l'identification et la quantification par référence interne des diterpènes acides et neutres dans les résines de *Pinus nigra* (Rezzi *et al.*, 2002, 2005) sans partition préalable. C'est cette méthode que nous avons choisi d'utiliser pour la quantification des constituants des résines de cèdres.

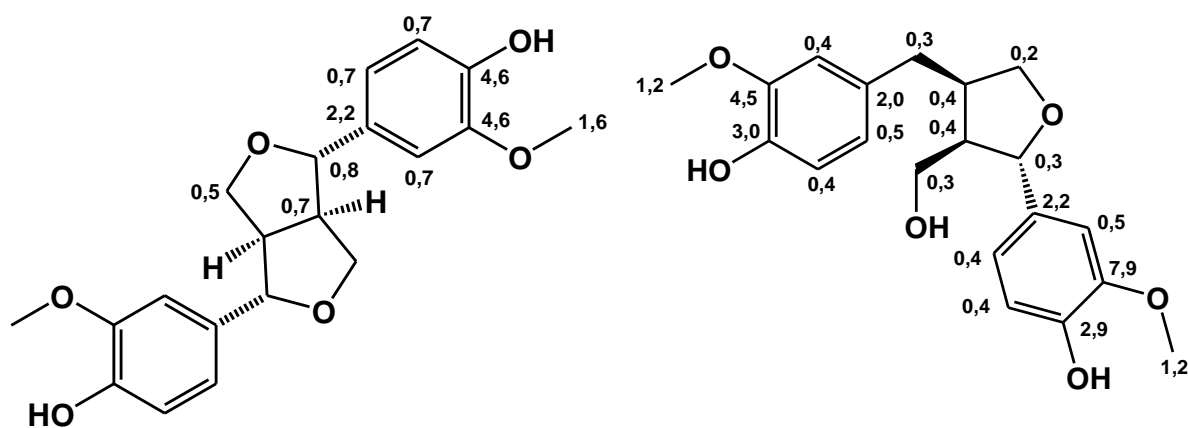
### V.2.1 Quantification par RMN $^{13}\text{C}$

Dans la mesure où les résines de cèdre renferment des lignanes à côté des acides résiniques, nous avons envisagé la possibilité d'utiliser la méthode précédemment mise au point au laboratoire lors de l'analyse des diterpènes dans les résines de pins (Rezzi *et al.*, 2002, 2005 ; Ottavioli, 2009) pour quantifier l'ensemble de ces produits.

Dans cette méthode, les paramètres utilisés pour la quantification en RMN  $^{13}\text{C}$  sont les suivants : angle d'impulsion  $\alpha$  de  $30^\circ$ , délai entre deux impulsions de 1,4 secondes (séquence powergate Brüker) avec le diglyme pour référence interne. Dans ces conditions, le délai d'enregistrement d'un spectre de 5000 accumulations est d'environ 2 heures. Nous avons commencé par mesurer les valeurs des  $T_1$  du pinorésinol et du laricirésinol en mélange, par la méthode d'inversion-récupération à partir de la résine O4. Le laricirésinol servira de modèle pour extrapoler les valeurs de  $T_1$  du 9-acétate de laricirésinol.

Les  $T_1$  des carbones protonés de ces deux lignanes, sont tous compris entre 0,2 et 1,6 s ([Figure IV.10](#)) c'est à dire dans la même gamme de valeurs que ceux des acides résiniques (0,2-2,0 s) et de la référence interne (diglyme : 3,8 s). En conséquence, les lignanes peuvent être quantifiés avec la même séquence que celle utilisée pour les diterpènes. Nous avons donc enregistré le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de chacune des résines en utilisant la séquence quantitative précédemment citée, avec le diglyme comme référence interne.

Figure IV.10 : Temps de relaxation longitudinale (s) des carbones du pinorésinol (**8**) et du laricirésinol (**9**)



Pour réaliser le calcul quantitatif, nous avons mesuré pour chaque composé les intégrales des signaux correspondant aux aires des carbones protonés, non superposés et parfaitement résolus. Pour chacun des composés nous avons pris soin, dans un souci d'homogénéité, de toujours utiliser la même série de signaux. Le nombre de signaux intégrés par composé est de 5 pour le pinorésinol (molécule symétrique), de 8 pour le

laricirésinol et de 9 pour le 9-acétate de laricirésinol. Chaque mesure quantitative a été réalisée à partir de la moyenne des aires des signaux sélectionnés ( $A_C$ ). Cette moyenne ( $A_C$ ) et celle de l'aire des signaux des deux méthylènes du diglyme ( $A_D$ , référence interne) ont été introduites dans la formule [6] qui permet de calculer les pourcentages massiques des composés considérés dans l'échantillon de résine (Tableau IV.11).

$$\%C = \frac{2A_C \times M_C \times m_D}{A_D \times M_D \times m} \times p_D \times 100 \quad [6]$$

Le facteur 2 est dû à la symétrie de la molécule de diglyme. Par contre, le facteur 2 n'est pas utilisé pour la quantification du pinorésinol qui est également symétrique ; %C : pourcentage de chaque composé ;  $A_C$  : moyenne des aires des signaux correspondant aux carbones protonés ;  $M_C$  : masse molaire du composé considéré ;  $m_D$  : quantité en mg de diglyme ;  $A_D$  : moyenne des aires des 2 signaux correspondant aux méthylènes du diglyme ;  $M_D$  : masse molaire du diglyme ;  $m$  : masse totale de l'échantillon en mg ;  $p_D$  : pureté du diglyme.

Nous avons globalement identifié et quantifié 17 composés (de 2 à 13 par résine), soit 8 diterpènes acides (acides isopimarique, abiétique, déhydroabiétique, 15-hydroxydéhydroabiétique, néoabiétique, lévopimarique, sandaracopimarique et palustrique), 4 diterpènes neutres (isopimarol, abiéanol, manool et abiétadièn-18-al), 2 monoterpènes ( $\alpha$ - et  $\beta$ -pinène) et 3 lignanes (pinorésinol (8), laricirésinol (9) et 9-acétate de laricirésinol (10)) qui représentent de 38,9 % à 66,7 % de la composition chimique globale de chaque échantillon de résine (Tableau IV.11).



Tableau IV.11 : Composition chimique des 28 résines de *Cedrus atlantica* de Corse

Échantillons	Type I									Type II				Type III															
	P1	P2	P3	P4	A1	AL	VE	G1	A2	P5	P6	P7	P8	O1	V1	V3	BA	G2	MI	O2	V2	O4	P9	O5	O6	V4	O7	O3	
Acide abiétique	15,7	14,7	12,3	10,6	11,0	12,0	9,8	18,7	6,2	10,8	12,1	9,5	10,7	-	0,8	-	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,7
Acide déhydroabiétique	7,6	9,2	6,5	8,3	7,2	6,5	7,8	2,0	7,7	7,2	6,1	5,2	4,2	-	1,7	-	1,7	-	-	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5
Acide néoabiétique	4,4	5,5	7,9	5,7	6,0	3,6	3,4	10,4	2,0	9,7	6,8	8,0	6,2	-	-	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9	
Acide 15-hydroxydéhydroabiétique	0,7	-	-	-	1,3	-	-	-	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Acide isopimarique	6,6	5,1	11,2	12,3	11,3	9,1	8,5	6,0	12,6	11,8	7,0	15,1	17,0	-	2,0	-	1,3	-	-	1,3	-	-	-	-	-	-	-	2,2	
Acide lévopimarique	3,2	2,3	3,1	2,7	6,2	1,3	2,5	4,2	3,0	6,6	3,6	7,4	1,1	-	-	-	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,7	
Acide sandaracopimarique	1,3	1,3	1,2	1,9	1,2	1,2	1,4	1,3	1,5	-	-	-	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Acide palustrique	1,9	2,5	-	3,4	1,6	-	1,3	1,4	-	1,5	-	4,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Isopimarol	-	-	-	-	0,7	-	1,7	1,5	1,3	-	-	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Abiénoï	-	-	-	-	-	-	-	2,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Manool	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,9	-	2,2	-	1,9	-	-	-	-	2,5	-	-	1,6	4,8	1,5	7,6	-	
Abiétadièn-18-al	0,6	-	-	1,1	2,0	-	2,0	4,2	1,5	-	0,5	2,1	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
$\alpha$ -Pinène	6,8	10,0	9,4	9,8	5,3	6,9	6,2	2,6	4,4	7,8	3,3	3,1	5,3	-	0,4	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	
$\beta$ -Pinène	0,5	0,6	0,5	-	0,9	0,4	0,6	2,8	-	0,3	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Pinorésinol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	2,2	1,8	2,1	38,9	19,7	18,1	14,7	1,0	-	9,5	18,2	8,1	13,6	13,3	9,9	14,4	12,2	5,9	
Laricirésinol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,7	5,8	4,3	2,6	15,1	16,9	16,9	33,7	23,7	23,4	22,3	22,1	17,2	21,1	19,5	17,0	17,7	18,1	16,0	
9-Acétate de laricirésinol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	2,3	1,6	-	9,8	8,4	4,0	3,3	16,0	20,4	9,2	5,2	13,6	29,1	24,5	22,9	22,2	19,6	16,9	
Total	49,3	51,2	52,1	55,8	54,7	41,0	45,2	58,0	42,2	59,5	49,7	66,7	52,0	66,0	49,9	40,9	58,8	40,7	43,8	43,6	48,0	38,9	63,8	58,9	54,6	55,8	57,5	48,4	

\* : pourcentages calculés selon la formule [6].

Au vu de ces résultats, nous distinguons clairement trois types de résines :

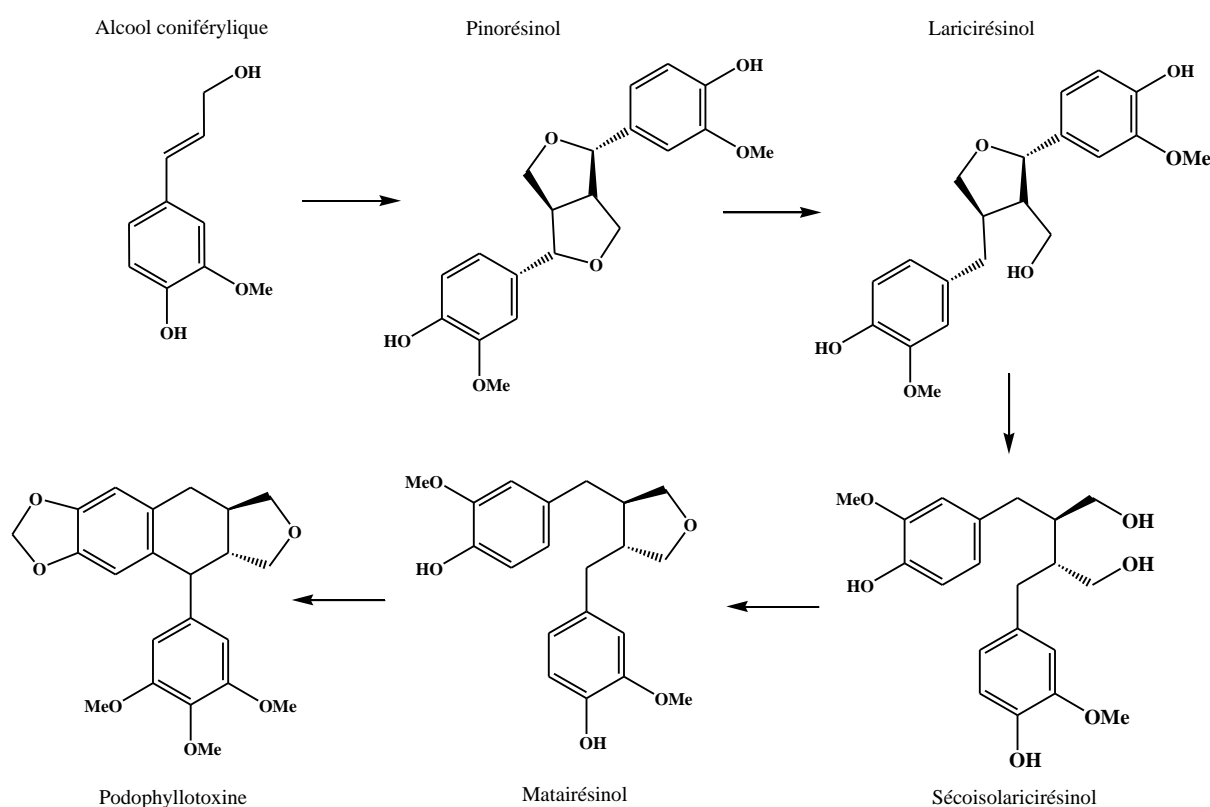
- dans les résines de **type I** (9 échantillons sur 28), les diterpènes acides (8 au total) dominent la composition chimique (33,7-45,8 %). Parmi ceux-ci, les plus abondants sont l'acide abiétique (6,2-18,7 %), isopimarique (5,1-12,6 %) et déhydroabiétique (2,0-9,2 %). Les composés neutres sont essentiellement représentés par l' $\alpha$ -pinène (2,6-10,0 %) alors qu'aucun lignane n'est détecté ;
- les échantillons de **type II** (4/28) sont caractérisés par la présence conjointe des acides résiniques (composés majoritaires : 35,6-49,5 %) et des lignanes (3,8-10,3 %). L' $\alpha$ -pinène est de nouveau rencontré à des teneurs appréciables (3,1-7,8 %) ;
- enfin, dans les résines de **type III** (15/28), les acides résiniques sont absents ou minoritaires (2,6-9,0 %). En revanche les lignanes sont les composés majoritaires. Ils représentent de 38,8 à 63,8 % de la composition globale. Le pinorésinol (18,1-38,9 %) est le composé majoritaire de trois échantillons (Résine O1, V1 et V3). Le laricirésinol (17,2-33,7 %) domine la composition de 6 échantillons (Résine BA, G2, MI, O2, V2, O4 et P9). Enfin, le 9-acétate de laricirésinol (16,9-29,1 %) est également le composé majoritaire de six échantillons (Résine P9, O5, O6, V4, O7 et O3).

Dans tous les échantillons étudiés, nous constatons que le pourcentage des constituants identifiés est compris entre 38,9 % et 66,7 %. Cependant, dans les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  de ces mélanges, nous n'observons que des raies de résonance non attribuées appartenant soit à des composés minoritaires voire très minoritaires soit à des oligomères (composés de masse moléculaire élevée).

### V.2.2 Quantification par RMN $^1\text{H}$

L'originalité des résines de *C.atlantica* de Corse réside dans la présence de lignanes. Ces derniers constituent un vaste groupe de substances naturelles de nature polyphénolique très répandu chez les végétaux supérieurs. Ce sont des métabolites secondaires largement répartis dans cinq des six familles de conifères. Ils sont présents dans différentes parties des plantes telles que les racines, le bois, les feuilles, les fruits et les graines. L'oléorésine est également une excellente source de lignanes ([Castro et al., 1996](#)). Ils sont rarement présents à des concentrations élevées, leur teneur n'excède pas 1 mg pour 100 g de matière sèche de végétal, soit 0,001 %.

Ils constituent une classe de composés qui présentent un large spectre d'activités biologiques (activités antitumorales, antimitotiques, anti-oxydantes et anti-oestrogéniques). Le pinorésinol et le laricirésinol sont des précurseurs dans la voie de biosynthèse des lignanes notamment chez le lin cultivé (*Linum usitatissimum* L.), aboutissant à l'accumulation de secoisolaricirésinol et de matairesinol dans les téguments de la graine ([Figure IV.12](#)). Ces derniers sont susceptibles de prévenir et de limiter le développement de pathologies cardiovasculaires et de certains cancers, particulièrement du poumon et des leucémies ([Lamblin et al., 2008](#)). Le pinorésinol est également un inhibiteur efficace de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), cette dernière intervient notamment dans l'action des hormones et des neurotransmetteurs ([Ayes et Loike, 1990](#)). Le laricirésinol, quant à lui, est considéré comme un agent chimio-préventif potentiel de différentes formes de cancer ([Eklund et al., 2002](#)).

Figure IV.12 : Voie de biosynthèse des lignanes dans le lin (Xia *et al.*, 2001)

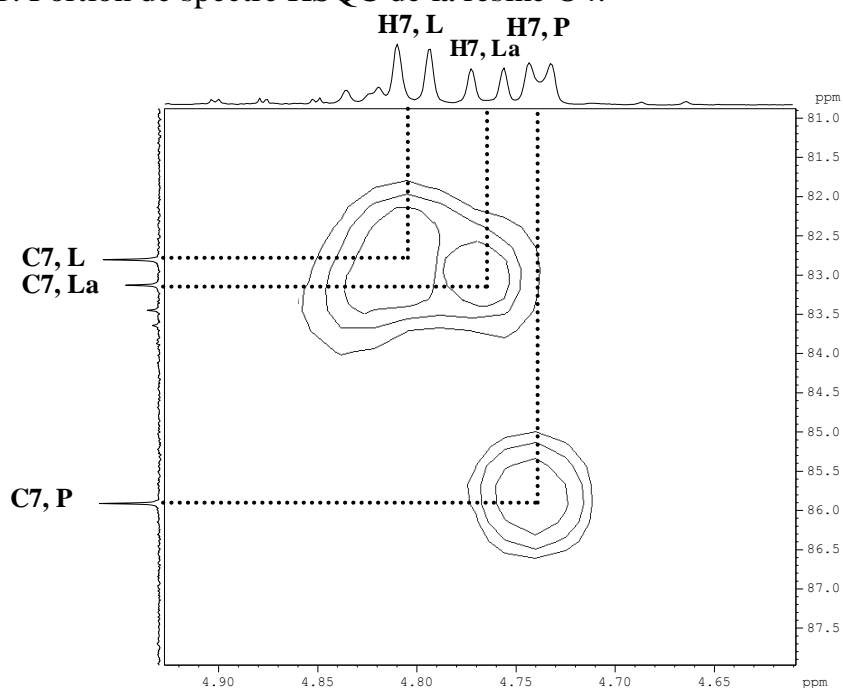
Les lignanes sont des molécules à forte valeur ajoutée, compte tenu de leur faible abondance naturelle et de leurs propriétés. Ainsi, le coût de ces produits est très élevé : 1500€/100mg pour le pinorésinol et 2000€/100 mg pour le laricirésinol. Compte tenu de l'importance de ces produits, il nous a semblé utile de mettre au point une méthode de quantification très rapide qui pourrait permettre le « screening » d'un grand nombre d'échantillons de résines. Nous nous sommes donc naturellement orientés vers l'utilisation de la RMN  $^1\text{H}$ .

Par RMN  $^1\text{H}$  comme par RMN  $^{13}\text{C}$ , la méthode standard de quantification met en œuvre un angle d'impulsion de  $90^\circ$  et un délai d'attente entre deux impulsions successives de cinq fois le  $T_1$  le plus long. Nous avons choisi l'anisole (méthoxybenzène) comme référence interne car il s'agit d'une molécule symétrique dont le spectre RMN  $^1\text{H}$  n'est constitué que de 4 raies de résonance et notamment d'un singulet à 3,80 ppm caractérisant les 3 protons du groupement méthoxy. Nous avons intégré cette raie de résonance pour réaliser le calcul quantitatif dans la mesure où ce signal est parfaitement résolu et n'est superposé à aucun autre signal dans le spectre

d'une résine. Par ailleurs, nous avons mesuré le temps de relaxation longitudinal ( $T_1$ ) des protons de ce groupement méthoxy en utilisant la méthode d'inversion-récupération. Ces derniers ont un  $T_1$  de 0,7 seconde.

Afin d'identifier les signaux des protons du pinorésinol, du laricirésinol et du 9-acétate de laricirésinol pouvant être utilisés en vue de leur quantification en mélange, nous avons mis en œuvre la séquence HSQC à partir de la résine O4 qui renferme ces 3 lignanes. Ainsi, nous avons pu déterminer que les doublets à 4,74 ppm, 4,76 ppm et à 4,81 ppm correspondent respectivement au proton H7 du pinorésinol, du laricirésinol et du 9-acétate de laricirésinol (Figure IV.11).

Figure IV.11: Portion de spectre HSQC de la résine O4.



C7, L : carbone n°7 du laricirésinol (**9**) ; C7, La : carbone n°7 du 9-acétate de laricirésinol (**10**) ; C7, P : carbone n°7 du pinorésinol (**8**) ; H7, L : proton du laricirésinol (**9**) ; H7, La : proton du 9-acétate de laricirésinol (**10**) ; H7, P : proton du pinorésinol (**8**).

Nous avons ensuite mesuré les  $T_1$  de ces protons en mélange, toujours par la méthode d'inversion-récupération. Les  $T_1$  des protons H7 précédemment cités sont de 0,3 seconde chacun, c'est à dire légèrement inférieurs à ceux du groupement méthoxy de l'anisole (0,7 seconde).

Dans ces conditions, la séquence quantitative que nous avons mise en œuvre utilise un angle d'impulsion de  $90^\circ$  et un délai entre deux impulsions de 4,1 secondes, soit plus de 5 fois la valeur de  $T_1$  le plus long (0,7 seconde). Ainsi, les 16 accumulations nécessaires à l'analyse du mélange naturel sont réalisées en 1 minute et 40 secondes.

Enfin, nous avons enregistré le spectre RMN  $^1\text{H}$  de 8 résines de type III, dans lesquelles nous avons identifié majoritairement des lignanes, dans les conditions quantitatives décrites précédemment (Tableau IV.12). Le pourcentage massique des lignanes a été calculé à l'aide de la formule [7] à partir de l'aire du signal sélectionné ( $A_C$ , proton H7) et de l'aire du signal des protons du méthoxy de l'anisole ( $A_A$ )

$$\%C = \frac{3A_C \times M_C \times m_A}{n \times A_A \times M_A \times m} \times p_A \times 100 \quad [7]$$

Le facteur 3 est dû à l'intégration des 3 protons du méthoxy de l'anisole ; %C : pourcentage de chaque composé ;  $A_C$  : aire du signal correspondant aux protons du composé considéré ;  $M_C$  : masse molaire du composé considéré ;  $m_A$  : quantité en mg d'anisole ; n : nombre de protons intégrés appartenant au composé considéré ;  $A_A$  : aire du signal des 3 protons du méthoxy de l'anisole ;  $M_A$  : masse molaire du diglyme ; m : masse totale de l'échantillon en mg ;  $p_A$  : pureté de l'anisole.

Tableau IV.12: Quantification des lignanes dans 8 échantillons par RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ \*

Échantillons	RMN	%		
		Pinorésinol	Laricirésinol	9-acétate de laricirésinol
BA	$^1\text{H}$	13,1	33,6	3,6
	$^{13}\text{C}$	14,7	33,7	3,3
G2	$^1\text{H}$	-	20,8	16,4
	$^{13}\text{C}$	1,0	23,7	16,0
M1	$^1\text{H}$	-	23,2	19,9
	$^{13}\text{C}$	-	23,4	20,4
O3	$^1\text{H}$	6,0	16,6	16,8
	$^{13}\text{C}$	5,9	16,0	16,9
O4	$^1\text{H}$	8,1	19,3	13,3
	$^{13}\text{C}$	8,1	17,2	13,6
P9	$^1\text{H}$	11,0	18,5	25,0
	$^{13}\text{C}$	13,6	21,1	29,1
V1	$^1\text{H}$	22,2	15,3	6,5
	$^{13}\text{C}$	19,7	16,9	8,4
V2	$^1\text{H}$	19,1	21,4	5,2
	$^{13}\text{C}$	18,2	22,1	5,2

\* : pourcentages calculés selon la formule [6] et [7].

La méthode utilisant la RMN  $^1\text{H}$ , nous a permis de quantifier le pinorésinol, le laricirésinol et le 9-acétate de laricirésinol avec une bonne précision des mesures. En effet, nous avons enregistré 5 fois le spectre de chacune des 8 résines et nous avons calculé la répétabilité avec un intervalle de confiance de 99 % (test de Student, coefficient bilatéral = 5,84). La répétabilité ainsi mesurée est comprise entre +/- 0,05 et +/- 0,84 %. Par ailleurs, les résultats obtenus par RMN  $^1\text{H}$  montrent une bonne concordance avec ceux obtenus par RMN  $^{13}\text{C}$  dans la mesure où les différences entre les pourcentages massiques calculés sont faibles (tous inférieurs à 4 %) (Tableau IV.12). Ainsi, la méthode de quantification par RMN  $^1\text{H}$  spécifiquement mise en œuvre pour les lignanes permet de déterminer le pourcentage massique de ces composés en mélange dans la résine de *C. atlantica* avec une justesse très proche de celle obtenue par RMN  $^{13}\text{C}$  et une bonne précision des mesures, dans un délai d'analyse très faible puisque l'enregistrement d'un spectre demande 1 minute et 40 secondes.

En conclusion, l'analyse par RMN  $^{13}\text{C}$  de 28 échantillons de résines de *Cedrus atlantica* M. de Corse a permis de mettre en évidence trois types de composition chimique, sur la base des teneurs en acides résiniques et en lignanes. L'analyse qualitative et quantitative a été directement effectuée sur l'échantillon, sans aucune séparation ni dérivatisation préalable. Ainsi, nous avons identifié par RMN  $^{13}\text{C}$  8 acides résiniques, 2 diterpènes neutres, 2 monoterpènes et 3 lignanes (pinorésinol, laricirésinol et un acétate du laricirésinol). La présence de lignanes dans les résines de *C. atlantica* est intéressante puisque les composés identifiés sont des précurseurs de molécules utilisées pour la prévention de certains cancers (leucémie, cancer du poumon notamment).

Compte tenu de l'abondance des lignanes au sein des résines de *C. atlantica* d'une part, et de leur intérêt (économique et pharmaceutique) d'autre part, nous avons validé un protocole de quantification spécifiquement dévolu à ces molécules par RMN  $^1\text{H}$ . Ainsi la quantification (% massique) de ces constituants peut être obtenue à partir d'un spectre RMN  $^1\text{H}$  enregistré en moins de 2 minutes.

L'ensemble des résultats sur les résines de *Cedrus atlantica* M. a donné lieu à une publication ([Natural Product Communications, 2011 6 : p 379-385](#)).





# Conclusion

---

Ce travail réalisé au sein de l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse Pascal Paoli (UMR CNRS 6134 « Sciences Pour l'Environnement, axe « Ressources Naturelles »), s'inscrit dans le cadre de la valorisation non énergétique de la biomasse végétale. Outre son utilisation à des fins énergétiques (biocombustibles notamment), la biomasse représente un vaste réservoir de composés naturels à forte valeur ajoutée. L'exploitation de ces composés peut donc participer à rendre l'utilisation de la biomasse plus durable et plus viable économiquement. En Corse, l'activité forestière génère chaque année une quantité importante de biomasse résiduelle, susceptible de constituer une matière première intéressante pour la production d'huiles essentielles ou d'extraits végétaux. Ces produits sont potentiellement valorisables par diverses industries telles que la cosmétique, la parfumerie et l'aromathérapie/phytothérapie. Néanmoins, la valorisation de ces produits naturels, qui se présentent généralement sous la forme de mélanges complexes, passe par une étape d'analyse afin de les caractériser, d'en contrôler la qualité ou bien de mettre en évidence une éventuelle spécificité.

Deux stratégies sont actuellement privilégiées pour ces analyses :

- la première consiste à mettre en œuvre le couplage « en ligne » d'une technique chromatographique (en général la CPG pour les composés volatils et la CLHP pour les composés plus lourds) qui individualise les constituants en mélange et une technique spectroscopique (la SM, l'IRTF ou éventuellement la RMN  $^1\text{H}$  par exemple) qui permet de les identifier par comparaison avec les données spectrales de produits de références ;
- la seconde démarche s'apparente à celle employée lors de l'analyse structurale d'une nouvelle molécule puisqu'elle consiste à purifier les constituants d'un mélange complexes (par des techniques chromatographiques) avant de les identifier par comparaison de leurs caractéristiques spectrales (incluant les informations fournies par la RMN  $^1\text{H}$  et la RMN  $^{13}\text{C}$ ) avec celles de produits de référence.

Parallèlement, notre laboratoire a mis au point et développé une technique d'analyse des mélanges complexes, basée sur l'utilisation de la RMN  $^{13}\text{C}$  comme outil d'identification des constituants, et éventuellement leur quantification, sans séparation préalable ou avec un fractionnement réduit au minimum. Un logiciel informatique, conçu et développé au laboratoire, permet de comparer les déplacements chimiques du spectre du mélange avec ceux de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres construites au laboratoire (spectres enregistrés sur notre appareil) ou avec les données de la littérature récente. Cette méthode, qui a été initialement utilisée pour l'analyse des terpènes et autres composés volatils contenus dans les huiles essentielles, a aussi été appliquée à l'identification des diterpènes dans les résines, des triterpènes et des taxanes dans les extraits végétaux ou encore des sucres dans les miels.

Ces différentes démarches analytiques, décrites dans le premier chapitre, ont participé à affiner l'objectif de notre travail qui était double :

- au niveau du laboratoire, il s'agissait de développer des méthodes d'identification et de quantification des constituants de mélanges naturels par RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  (sans séparation au préalable) susceptibles d'aider à la définition des critères de reconnaissance, de qualité voire de spécificité ;
- d'un point de vue appliqué, à travers diverses caractérisations chimiques de deux conifères (pin d'Alep et cèdre de l'Atlas) par l'étude de l'huile essentielle (cônes et aiguilles) du pin d'Alep de Corse, de l'huile essentielle et de l'huile pyrolytique (de bois) du cèdre de l'Atlas du Maroc et enfin de la résine du cèdre de l'Atlas de Corse. Pour atteindre ces objectifs, un panel de techniques d'analyse, souvent utilisé en association (CPG(Ir), CPG-SM et RMN  $^{13}\text{C}$ ), a été mis en œuvre.

Le deuxième chapitre a été consacré à l'élaboration de deux méthodes de quantification du squalène dans l'huile d'olive, par RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$ , sans séparation préalable et avec un appareil de routine (400 MHz). Le squalène est un triterpène linéaire qui participe à la stabilité de l'huile d'olive et qui joue un rôle important dans la réduction des risques de certains cancers. Nous avons tout d'abord mis au point et validé (justesse, linéarité et précision des mesures) une méthode de quantification par RMN  $^{13}\text{C}$  du squalène en mélange dans la trioléine (triglycéride majoritaire de l'huile d'olive). Nous avons constaté une bonne justesse des mesures. En ce qui concerne la quantification par RMN  $^1\text{H}$ , les résultats observés ne sont pas reproductibles pour des masses de squalène inférieures à environ 1,1 mg. Enfin, nous avons appliqué notre procédure quantitative (par RMN  $^{13}\text{C}$  uniquement) à 25 échantillons d'huile d'olive de Corse. Le pourcentage de squalène dans les huiles d'olive de Corse (0,26-0,83%) correspond bien avec ceux indiqués dans la littérature (0,2-0,7%).

Dans un troisième chapitre, nous avons caractérisé l'huile essentielle de cônes et d'aiguilles de *Pinus halepensis* qui a été introduit en Corse pour la première fois au 19<sup>ième</sup> siècle. Dans un premier temps, nous avons réalisé une analyse détaillée d'un mélange constitué de deux échantillons d'huile essentielle de cônes. Ainsi nous avons identifié, par combinaison de la CPG(Ir), de la RMN  $^{13}\text{C}$  et de la CPG-SM, 48 composés représentant environ 95% de la composition chimique globale. Cet échantillon est largement dominé par les monoterpènes et les sesquiterpènes oléfiniques avec l' $\alpha$ -pinène comme constituant majoritaire, suivi du (E)- $\beta$ -caryophyllène et du myrcène. Parmi les diterpènes identifiés, l'un d'entre eux, le (12*R*,13*R*)-8,12-époxy-14-labdène-13-ol, était absent de notre bibliothèque de spectres RMN « Terpènes ». Il est à noter que ce composé est identifié pour la première fois dans l'huile essentielle de cônes de *P. halepensis*. Dans un second temps, nous avons étudié la variabilité chimique à travers l'étude de 15 échantillons d'huiles essentielles de cônes, globalement dominée par des composés hydrocarbonés. Nous avons ainsi mis en évidence 3 groupes chimiques : le groupe I dominé par l' $\alpha$ -

---

pinène, le groupe II dominé par le myrcène et enfin le groupe III dominé par le couple  $\alpha$ -pinène/myrcène avec des teneurs similaires. A notre connaissance, aucune publication ne mentionne, à ce jour, le myrcène ou le couple  $\alpha$ -pinène/myrcène (respectivement groupe II et III) comme composés majoritaires de l'huile essentielle de cônes de *P. halepensis*. Enfin, nous avons étudié la variabilité chimique de l'huile essentielle d'aiguilles récoltées sur des pins adultes situés dans les trois stations de Corse où cet arbre est présent. Au total, 47 échantillons d'huiles essentielles ont été préparés et analysés. L'analyse en Composante Principale (ACP) et l'Analyse Factorielle Discriminante (AFD) des résultats ont permis d'obtenir une description statistique de notre échantillonnage. La représentation graphique des échantillons sur le plan de l'ACP et confirmée par les données de l'AFD, indiquent clairement que les échantillons se répartissent en trois groupes : le groupe I dominé par le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène, le groupe II dominé par le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène, l' $\alpha$ -pinène et le myrcène et le groupe III dominé par le couple myrcène/(*E*)- $\beta$ -caryophyllène. Ces différentes compositions sont retrouvées dans toutes les stations de récolte. Ce travail constitue la première étude réalisée sur l'huile essentielle d'aiguilles de *P. halepensis* avec un échantillonnage important dans une région bien définie.

Enfin, le quatrième et dernier chapitre est consacré à la caractérisation de *Cedrus atlantica* à travers l'étude de l'huile essentielle (commerciale et artisanale) et de l'huile pyrolytique de bois du Maroc et de la résine de Corse. En ce qui concerne l'huile essentielle commerciale, l'analyse détaillée a conduit à l'identification de 20 constituants qui représentent environ 81% de la composition chimique globale, dominé par les himachalènes ( $\beta$ -,  $\alpha$ - et  $\gamma$ -himachalène). Par ailleurs, 7 composés absents de notre bibliothèque de données spectrales enregistrées au laboratoire ont été identifiés. Pour 5 d'entre eux, l'identification a été effectuée par comparaison des déplacements chimiques des carbones contenus dans le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du mélange avec celles de composés décrits dans la littérature. Pour les 2 autres composés ((*Z*)- et (*E*)- $\gamma$ -atlantones), nous avons obtenus les données spectrales de RMN  $^{13}\text{C}$  puisque seules

celles de RMN  $^1\text{H}$  étaient décrites dans la littérature. De plus, les analyses de l'huile essentielle et des huiles pyrolytiques de bois artisanales nous ont permis de mettre en évidence une composition chimique très voisine, largement dominée par les sesquiterpènes. En effet pour les 3 échantillons, le  $\beta$ -himachalène est le constituant majoritaire, suivi de la (*E*)- $\alpha$ -atlantone, de l' $\alpha$ -himachalène et du  $\gamma$ -himachalène. La seconde partie de ce chapitre est consacrée à l'analyse quantitative et qualitative (sans séparation préalable) de 28 résines de *C. atlantica*, présents dans les 5 forêts de Corse répertoriées par l'ONF (Bavella, Bonifato, Ospedale, Pineta et Vizzavona). Elle illustre parfaitement la démarche parcourue durant cette thèse en associant :

- d'une part, une approche laboratoire qui consiste à identifier et quantifier par RMN  $^{13}\text{C}$  8 acides résiniques, 2 diterpènes neutres, 2 monoterpènes et 3 lignanes (pinorésinol, laricirésinol et un acétate du laricirésinol). Trois types de composition chimique ont pu alors être mis en évidence sur la base des teneurs en acides résiniques et en lignanes ;
- d'autre part, une approche finalisée avec la caractérisation des résines en élaborant et validant un protocole de quantification spécifiquement dévolu aux lignanes (composés d'intérêt) par RMN  $^1\text{H}$  (enregistrement d'un spectre en moins de 2 minutes). Les résultats concernant la résine de *C. atlantica* ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Natural Product Communications*.

# Partie expérimentale

## I. MATERIEL VEGETAL, HUILES ESSENTIELLES ET HUILES PYROLYTIQUES, HUILES D'OLIVES, COMPOSES PURS

- **Matériel végétal** : les aiguilles et les cônes de *Pinus halepensis* ont été récoltés d'octobre à février (Capo di Feno : janvier 2012 et février 2013 ; Saleccia : janvier 2013 ; Tre padule : octobre 2013). Les résines de *Cedrus atlantica* ont été récoltées de février à avril (2009 et 2010).
- **Huiles essentielles et huiles pyrolytiques** : l'huile essentielle et les huiles pyrolytiques de *Cedrus atlantica* du Maroc ont été fournies par le centre de Recherche Forestière de Rabat (Maroc) (Dr. Mohamed GHANMI : Coordonnateur du Programme Plantes Aromatiques et Médicinales). L'huile essentielle commerciale de bois de *Cedrus atlantica* a été fournie par la société Aroma-zone (Clermont-Ferrand, France).
- **Huiles d'olives** : les huiles d'olives de Corse ont été fournies par Mme Henneman (Chambre d'Agriculture de Haute-Corse).
- **Composés purs** : Le squalène (98% minimum) et la trioléine (99%), utilisés pour la mise au point de la méthode de quantification du squalène par RMN, ont été fournis par la société Sigma-Aldrich<sup>®</sup> et Acros organics<sup>®</sup>, respectivement. Le diglyme (99%) et l'anisole (99%), utilisés pour la quantification du squalène et des constituants des résines de *Cedrus atlantica*, ont été fournis par la société Janssen chimica<sup>®</sup>.



## II. HYDRODISTILLATIONS

Les huiles essentielles ont été préparées au laboratoire par hydrodistillation avec un appareil de type Clevenger (réacteurs 2L ou 6L), selon la quantité de matériel végétal disponible, pendant une durée de 3 heures environ. Les rendements en huiles essentielles de *Pinus halepensis*, par rapport à la masse de végétal frais, sont reportés dans le tableau suivant.

Tableau : Echantillonnage du pin d'Alep dans les 3 stations de l'île

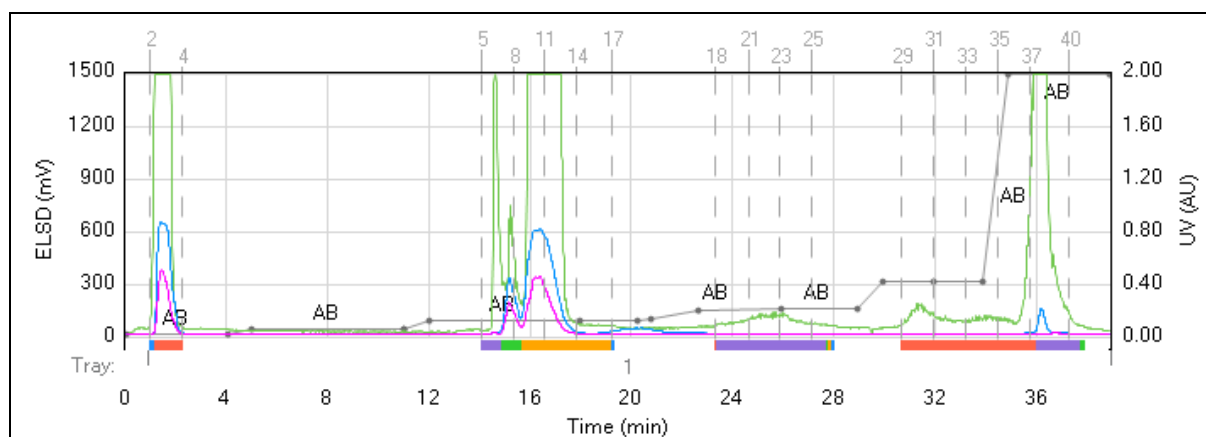
<b>Echantillons</b>	<b>Stations de récolte</b>	<b>Date de récolte</b>	<b>Aiguilles Rendement d'extraction (%)</b>	<b>Cônes Rendement d'extraction (%)</b>
<b>C1</b>	Capo di Fenò	01.12	0,23	0,24
<b>C2</b>	Capo di Fenò	01.12	0,45	-
<b>C3</b>	Capo di Fenò	01.12	0,16	-
<b>C4</b>	Capo di Fenò	01.12	0,65	0,25
<b>C5</b>	Capo di Fenò	01.12	0,27	-
<b>C6</b>	Capo di Fenò	01.12	0,27	-
<b>C7</b>	Capo di Fenò	01.12	0,33	-
<b>C8</b>	Capo di Fenò	01.12	0,04	-
<b>C9</b>	Capo di Fenò	01.12	0,63	-
<b>C10</b>	Capo di Fenò	01.12	0,42	0,07
<b>C11</b>	Capo di Fenò	02.13	0,42	0,30
<b>C12</b>	Capo di Fenò	02.13	0,64	0,24
<b>C13</b>	Capo di Fenò	02.13	0,29	0,30
<b>C14</b>	Capo di Fenò	02.13	0,59	-
<b>C15</b>	Capo di Fenò	02.13	0,48	-
<b>C16</b>	Capo di Fenò	02.13	0,50	-
<b>C17</b>	Capo di Fenò	02.13	0,32	-
<b>C18</b>	Capo di Fenò	02.13	0,46	0,19
<b>C19</b>	Capo di Fenò	02.13	0,24	-

<b>S1</b>	Saleccia	01.13	0,88	0,41
<b>S2</b>	Saleccia	01.13	0,61	-
<b>S3</b>	Saleccia	01.13	0,62	-
<b>S4</b>	Saleccia	01.13	0,93	0,61
<b>S5</b>	Saleccia	01.13	0,56	-
<b>S6</b>	Saleccia	01.13	0,36	-
<b>S7</b>	Saleccia	01.13	0,44	0,62
<b>S8</b>	Saleccia	01.13	0,40	-
<b>S9</b>	Saleccia	01.13	0,48	-
<b>S10</b>	Saleccia	01.13	0,46	-
<b>S11</b>	Saleccia	01.13	0,38	-
<b>S12</b>	Saleccia	01.13	0,42	-
<b>S13</b>	Saleccia	01.13	0,46	-
<b>S14</b>	Saleccia	01.13	0,48	0,41
<b>S15</b>	Saleccia	01.13	0,34	-
<b>T1</b>	Tre Padule	10.12	0,42	-
<b>T2</b>	Tre Padule	10.12	0,52	0,15
<b>T3</b>	Tre Padule	10.12	0,35	-
<b>T4</b>	Tre Padule	10.12	0,18	-
<b>T6</b>	Tre Padule	10.12	0,15	-
<b>T7</b>	Tre Padule	10.12	0,33	0,16
<b>T8</b>	Tre Padule	10.12	0,23	0,16
<b>T9</b>	Tre Padule	10.12	0,15	0,06
<b>T10</b>	Tre Padule	10.12	0,32	-
<b>T11</b>	Tre Padule	10.12	0,12	-
<b>T12</b>	Tre Padule	10.12	0,16	-
<b>T13</b>	Tre Padule	10.12	0,20	-
<b>T14</b>	Tre Padule	10.12	0,21	-
<b>T15</b>	Tre Padule	10.12	0,26	-

### III. CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE SILICE (CC)

- Pinus halepensis*** : La chromatographie sur colonne de silice (CC) de type «flash» a été réalisée sur l'huile essentielle de cônes (F0, 1,3 g) avec 25 g de silice ICN, 250-500  $\mu\text{m}$ , 60 Å. Deux fractions ont été éluées : F1 (996 mg) au pentane et F2 (290 mg) à l'oxyde de diéthyle. Un second fractionnement a été réalisé à partir des 290 mg de F2 avec la même silice. Quatre fractions ont été éluées, trois par un mélange pentane/oxyde de diéthyle (F2-1 : 101 mg, 95/5 ; F2-2 : 34 mg, 90/10 ; F2-3 : 77 mg, 80/20) et une dernière fraction à l'oxyde de diéthyle (F2-4 : 50 mg).
- Cedrus atlantica*** : La chromatographie a été effectuée grâce à un système automatisé de chromatographie flash Grace Reveleris™ (détection UV et diffusion de lumière (DEDL)) (Tableau). L'huile essentielle de bois (F0, 2,2 g) a été chromatographiée sur une cartouche de silice de 12 g (40  $\mu\text{m}$ ). Une seule fraction de chromatographie est éluée au pentane : F1 (1750 mg). Cinq fractions de chromatographie ont été éluées par un mélange pentane/oxyde de diisopropyle (F2 : 160 mg, 95/5 ; F3 : 20 mg, 95/5 ; F4 : 15 mg, 95/5 ; F5 : 30 mg, 90/10 ; F6 : 30 mg, 90/10). Enfin, deux fractions ont été éluées à l'oxyde de diisopropyle (F7 : 60 mg ; F8 : 80 mg).

Tableau : Chromatogramme de l'huile essentielle de *Cedrus atlantica*



En ce qui concerne les solvants, le pentane a été distillé la veille de la chromatographie. L'oxyde de diéthyle et diisopropyle ont également été préparés la veille par passage sur alumine basique (ICN, alumina B, super 1, 800 mL de solvant pour 100 g d'alumine) et conservés sur tamis moléculaire Merck, 0,4 nm en perle de 2 mm.

#### **IV. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CPG)**

Les analyses de chromatographie en phase gazeuse ont été réalisées à l'aide d'un appareil Perkin-Elmer type Clarus 500, équipé d'un injecteur diviseur, de deux colonnes (50 x 0,22 mm d.i. ; épaisseur du film : 0,25  $\mu\text{m}$ ), apolaire (BP-1, polyméthylsiloxane) et polaire (BP-20, polyéthylène glycol) et de deux détecteurs à ionisation de flamme. Les conditions opératoires sont les suivantes : gaz vecteur : hélium ; pression en tête de colonne : 20 psi ; température de l'injecteur et des détecteurs : 250°C ; programmation de température : de 60° à 220°C (80 min) à 2°C/min, avec un palier de 20 min à 220°C ; injection : mode diviseur avec un rapport 1/60. Les composés sont repérés sur les chromatogrammes grâce à leurs indices de rétention sur colonne apolaire et polaire, ce qui permet leur quantification.

##### **Quantification par CPG avec utilisation des facteurs de réponse :**

La quantification par CPG mettant en œuvre les facteurs de réponse (FR) a été appliquée aux huiles essentielles de *Pinus halepensis* (cônes et aiguilles). Les valeurs des FR que nous avons utilisés (Bicchi *et al.*, 2008) sont les suivantes : oléfines monoterpéniques (1,03) et sesquiterpéniques (0,98), cétones (1,30), alcools (1,30), aldéhydes (1,30) et acétates (1,59). En ce qui concerne la référence interne, une solution mère de nonane a été préparée afin d'ajouter à chaque analyse la même masse de nonane (environ 10 mg, pesée avec précision dans chaque cas). La masse de chaque constituant du mélange a été calculée selon la formule suivante :

$$m_c = \frac{A_C \times m_R}{A_R} \times p_N \times FR$$

$m_c$  : masse calculée (mg) du composé ;  $A_C$  : aire du composé sélectionné ;  $m_R$  : masse pesée (mg) de nonane (référence interne) ;  $p_N$  : pureté du nonane ;  $FR$  : facteur de réponse ;  $A_R$  : aire du nonane.

## V. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE ASSOCIEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (CPG-SM)

Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un chromatographe AGILENT TECHNOLOGIES 7890 A, doté d'un injecteur automatique (AGILENT TECHNOLOGIES 7683 B) et d'une colonne apolaire (HP-5) (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m), couplé à un détecteur de masse (AGILENT TECHNOLOGIES 5975 C VL MSD). Le gaz vecteur est l'hélium (1 ml/min) et il exerce une pression en tête de colonne de 8,8 psi. La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur de 230°C. La programmation de température consiste en un palier de 5 minutes à 60°C, une élévation de température de 60°C à 250 °C à 4 °C/min, puis en un palier de 5 minutes à 250°C. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/50. La quantité d'échantillon injectée est de 0,2  $\mu$ l. La détection se fait par un analyseur à filtre quadripolaire. Les molécules sont généralement bombardées par un faisceau électronique de 70 eV. Les spectres de masse obtenus par impact électronique ont été acquis sur la gamme de masse 35-350 Da.

## VI. RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN)

- **Enregistrement des spectres :** Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker 400 AVANCE, 9,4 Tesla, opérant à 400,132 MHz pour la RMN  $^1\text{H}$  et à 100,623 MHz pour la RMN  $^{13}\text{C}$ . Les spectres ont été enregistrés avec une sonde de 5 mm. Le solvant est le  $\text{CDCl}_3$  additionné de tétraméthylsilane (TMS). Les déplacements chimiques sont donnés en ppm ( $\delta$ ) par rapport au TMS pris comme référence interne. Les spectres RMN des huiles essentielles (*Pinus halepensis* et *Cedrus atlantica*) et des résines (*Cedrus atlantica*) ont été enregistrés en dissolvant de 40 à 60 mg dans 0,5 ml de  $\text{CDCl}_3$ . Les spectres RMN des huiles d'olives ont été enregistrés en dissolvant de 140 à 155 mg dans 0,5 ml de  $\text{CDCl}_3$ . Pour le noyau  $^{13}\text{C}$ , les données du signal de précession libre (FID) sont multipliées avant la transformée de Fourier par une fonction exponentielle (LB = 1,0 Hz). Pour le noyau  $^1\text{H}$ , aucun traitement mathématique du signal n'est appliqué avant la transformée de Fourier. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont donnés en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne.
- **Identification par RMN :** les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  utilisés pour l'identification des composés ont été enregistrés avec les paramètres suivants : angle d'impulsion  $45^\circ$  ; temps d'acquisition de 2,7 s correspondant à une taille mémoire de 128 K de données avec une largeur spectrale (SW) de 24000 Hz (240 ppm) ; délai de relaxation D1 = 0,1 s ; résolution digitale de 0,183 Hz/pt. Le nombre d'accumulations est compris entre 1000 et 3000 pour chaque enregistrement. Les spectres RMN  $^1\text{H}$  ont été enregistrés avec les paramètres suivants : angle d'impulsion  $30^\circ$  ; délai de relaxation 1 s ; temps d'acquisition = 2,6 s correspondant à une acquisition de 32 K avec une largeur spectrale (SW) de 6400 Hz (16 ppm). Le nombre d'accumulations est compris entre 16 et 32 pour chaque enregistrement. Pour l'enregistrement des spectres de RMN 2D (HSQC, HMBC et COSY) nous avons utilisé les séquences impulsionsnelles définies par les programmes Bruker.

- **Quantification par RMN**

- Mesure des temps de relaxation longitudinale ( $T_1$ ) des carbones et des protons : nous avons utilisé la technique dite d'inversion-récupération. Chaque spectre est le résultat d'une séquence d'impulsions  $180^\circ$ - $\tau$ - $90^\circ$  avec un  $D_1$  de 20 s (squalène, chapitre II ; lignanes : chapitre IV) pour le  $^{13}\text{C}$  et un  $D_1$  de 10,5 s (squalène, chapitre II) et de 4 s (lignanes, chapitre IV) pour le  $^1\text{H}$ . Les  $T_1$  ont été calculés par interpolation de la fonction:  $I_{(t)}=I_{(0)}+P.e^{(-\tau/T_1)}$ .

- ✓ Le squalène

- Quantification par RMN  $^{13}\text{C}$  : les spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  utilisés pour quantifier le squalène ont été enregistrés avec les paramètres suivants : angle d'impulsion  $30^\circ$  ; découplage total des protons (power gated decoupling) ; temps d'acquisition 2,7 s correspondant à une taille mémoire de 128 K, délai de relaxation  $D_1 = 1,0$  s, largeur spectrale (SW) de 24000 Hz (240 ppm) ; résolution digitale de 0,366 Hz/pt ; référence interne : diglyme ; nombre d'accumulations : 3000. Dans ces conditions, le temps nécessaire à l'enregistrement des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  est de 3 heures environ.
- Quantification par RMN  $^1\text{H}$  : Les spectres RMN  $^1\text{H}$  utilisés pour réaliser la quantification du squalène ont été enregistrés avec les paramètres suivants : angle d'impulsion de  $30^\circ$  ; temps d'acquisition de 2,6 s correspondant à une taille mémoire de 32 K avec une largeur spectrale (SW) de 6400 Hz environ (16 ppm) et  $D_1 = 1,0$  s ; référence interne : anisole ; nombre d'accumulations : 16. Dans ces conditions, le temps nécessaire à l'enregistrement des spectres RMN  $^1\text{H}$  est d'une minute environ.

- ✓ Les constituants des résines de *Cedrus atlantica*

- Quantification par RMN  $^{13}\text{C}$  : les spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  utilisé pour quantifier les constituants des résines ont été enregistrés avec les paramètres suivants : angle d'impulsion  $30^\circ$  ; découplage total des protons (power gated decoupling) ; temps d'acquisition 1,4 s correspondant à une taille mémoire de 64 K, délai de relaxation  $D_1 = 0,1$  s, largeur spectrale (SW) de 24000 Hz (240 ppm) ; résolution digitale de

0,366 Hz/pt ; référence interne : diglyme ; nombre d'accumulations : 5000. Dans ces conditions, le temps nécessaire à l'enregistrement des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  est de 2 heures environ.

- Quantification par RMN  $^1\text{H}$  : Les spectres RMN  $^1\text{H}$  utilisés pour réaliser la quantification des constituants des résines ont été enregistrés avec les paramètres suivants : angle d'impulsion de  $90^\circ$  ; temps d'acquisition de 2,56 s correspondant à une taille mémoire de 32 K avec une largeur spectrale (SW) de 6400 Hz environ (16 ppm) et  $D_1 = 3,5$  s ; référence interne : anisole ; nombre d'accumulations : 16. Dans ces conditions, le temps nécessaire à l'enregistrement des spectres RMN  $^1\text{H}$  est d'une minute et 40 s.

## VII. ANALYSE QUANTITATIVE

L'Analyse en Composantes Principales (ACP) et l'Analyse Factorielle Discriminante (AFD) (*Pinus halepensis*, chapitre IV) ont été réalisées à l'aide du logiciel XLSTAT-PRO (addinsoft).





# Références bibliographiques

- Aberchane M, Fechtal M, Chaouch A, Bouayoune T. 2001. Influence de la durée et de la technique d'extraction sur le rendement et la qualité des huiles essentielles du cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica* Manetti). *Annales de la recherche forestière au Maroc*. 34: 110–18.
- Aberchane M, Satrani B, Fechtal M, Chaouch A. 2003. Effet de l'infection du bois de cèdre de l'Atlas par *Trametes pini* et *Ungulina officinalis* sur la composition chimique et l'activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles. *Acta Botanica Gallica*. 150: 223–29.
- Aberchane M, Fechtal M, Chaouch A. 2004. Analysis of Moroccan Atlas cedarwood oil (*Cedrus atlantica* Manetti). *The Journal of essential oil research*. 16: 542–47.
- Abi-Ayad M, Abi-Ayad FZ, Lazzouni HA, Rebiahi SA, Ziani-Cherif C, Bessiere. 2011. Chemical composition and antifungal activity of Aleppo pine essential oil. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5: 5433–36.
- Adams RP. 1989. Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy. Academic Press: San Diego. 780p.
- Adams RP. 2001. Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Allured: Carol Stream. 798p.
- Adams RP. 2007. Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy. 4<sup>th</sup> edition. Allured: Carol Stream. 804p.
- Affane-Nguema. *Valorisation de l'essence de cèdre de l'Atlas : Fonctionnalisation et hétérocyclisation des trans himachalènes, 182 p. Thèse d'Etat : Chimie, Université du Languedoc : 1984.*
- Agrawal PK, Rastogi RP. 1984. Chemistry of the true cedars. *Biochemical Systematics and Ecology*. 12: 133–44.
- Akoka S, Barantin L, Trierweiler M. 1999. Concentration measurement by proton NMR using the ERETIC method. *Anal Chem*. 71: 2554-57.
- Albert K, Dachtler M, Glaser E, Händel H, Lacker T, Schlotterberck G, Strohschein S, Tseng LH, Braumanu U. 1999. On-line coupling of separation techniques to NMR, HRC. *J. High Resol. Chromatogr*. 22: 135-43.
- Almeida C, Duarte IF, Barros A, Rodrigues J, Spraul M, Gil AM. 2006. Composition of beer by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy: effets of brewing site and date of production. *J Agric Food Chem*. 54: 700-706.
- Alonso-Salces RM, Héberger K, Holland MV, Moreno-Rojas JM, Mariani C, Bellan G, Reniero F, Guillou C. 2010. Multivariate analysis of NMR fingerprint of the unsaponifiable fraction of virgin olive oils for authentication purposes. *Food Chemistry*. 118: 956–65.
- Andrade FDP, Santos LC, Datchler M, Albert K, Vilegas W. 2002. Use of on-line liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectroscopy for the rapid investigation of flavonoids from *Sorocea bomplandii*. *J. Chromatogr. A*. 953: 287-91.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1999. Squalene in oils and fats. Titrimetric method, official method AOAC. 943.04.
- Armougom R, Grondin I, Smadja J. 1998. Composition en acides gras des extraits lipidiques de quelques graines de cucurbitacées tropicales. *OCL*. 5: 323-28.

- Auffray B. 2007. Protection against singlet oxygen, the main actor of sebum squalene peroxidation during sun exposure, using *Commiphora myrrha* essential oil. *International Journal of Cosmetic Science*. 29: 23–29.
- Ayres DC, Loike JD. 1990. *Lignans: Chemical, Biological and Clinical Properties*. Cambridge University Press. 428 pp.
- Baldovini N, Tomi F, Casanova J. 2001. Identification and quantitative determination of furanodiene, a heat-sensitive compound, in essential oil by  $^{13}\text{C}$ -NMR. *Phytochem Anal*. 12: 58-63.
- Barrero AF, Quílez del Moral JF, Mar Herrador M, Arteaga JF, Akssira M, Benharref A, Dakir M. 2005. Abietane diterpenes from the cones of *Cedrus atlantica*. *Phytochemistry*. 66: 105–11.
- Basti'c M, Basti'c L, Jovanovi'c JJ, Spiteller G. 1978. Hydrocarbons and other weakly polar unsaponifiables in some vegetable oils. *J Am Oil Chem Soc*. 55: 886–91.
- Becker ED, Ferretti JA, Gambhir PN. 1979. Selection of optimum parameters for pulse Fourier transform nuclear magnetic resonance. *Anal Chem*. 51: 1413-20.
- Berregi I, Santos JI, Del Campo G, Miranda JI. 2003. Quantitative détermination of (-)-epicatechin in cider apple juices by  $^1\text{H}$  NMR. *Talanta*. 61: 139-145.
- Bicchi C, Rubiolo P, Marshall H, Weyerstahl P, Laurent R. 1998. Constituents of *Artemisia roxburghiana* Besser essential oil. *Flavour Fragr J*. 13: 40-46.
- Bicchi C, Liberto E, Matteodo M, Sgorbini B, Mondello L, D'Acampora Zellner B, Costa R, Rubiolo P. 2008. Quantitative analysis of essential oils : a complex task. *Flavour Fragr J*. 23: 382-91.
- Bighelli A, Casanova J. 2009. Analytical methods for *Cymbopogon* oils in essential oil-bearing grasses, the genus *Cymbopogon*. Taylor & Francis: London. 195-215.
- Blaise P, Wolff R, Farines M. 1997. Etude régiospécifique de triacylglycérols d'huiles végétales par clivage chimique et RMN  $^{13}\text{C}$  haute-résolution. *OCL*. 4: 135-41.
- Blanc MC, Muselli A, Bradesi P, Casanova J. 2004. Chemical composition and variability of the essential oil of *Inula graveolens* from Corsica. *Flavour Fragr J*. 19: 314-19.
- Blanc MC, Bradesi P, Gonçalves MJ, Salgueiro L, Casanova J. 2006. Essential oil of *Dittrichia viscosa* sp. *viscosa*: analysis by  $^{13}\text{C}$ -NMR and antimicrobial activity. *Flavour Fragr. J*. 21: 324-32.
- Blunt JW, Munro MHG. 1976. An automated procedure for qualitative and quantitative analysis of mixture by means of carbon-13 magnetic resonance spectroscopy: application to carbohydrate analysis. *Austr J Chem*. 29: 975-86.
- Bondioli P, Mariani C, Lanzani A, Fedeli E, Muller A. 1993. Squalene recovery from olive oil deodorizer distillates. *J Am Oil Chem Soc*. 70: 763–66.
- Boti JB, Bighelli A, Cavaleiro C, Salgueiro L, Casanova J. 2006. Chemical variability of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* berry and leaf oils from Corsica, analysed by combination of GC, GC/MS and  $^{13}\text{C}$ -NMR. *Flavour Fragr J*. 21: 268-73.
- Bouchra C, Mohamed A, Mina IH, Hmamouchi M. 2003. Antifungal activity of essential oils from several medicinal plants against four postharvest *Citrus* pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*. 42: 251–56.
- Boudarene L, Rahim L, Baaliouamer A, Meklati BY. 2004a. Analysis of Algerian essential oils from twigs, needles and wood of *Cedrus atlantica* G. Manetti by GC/MS. *Journal of Essential Oil Research*. 16: 531–34.

- Boudarene L, Baaliouamer A, Meklati BY, Scharff C. 2004b. Composition of the seed oils from Algerian *Cedrus atlantica* G. Manetti. *Journal of Essential Oil Research*. 16: 61–63.
- Brader G, Vajrodaya S, Greger H, Bacher M, Kalchhauser H, Hofer O. 1998. Bisamides, lignans, triterpenes, and insecticidal cyclopenta[*b*]benzofurans from *Aglaia* species. *Journal of Natural Products*. 61: 1482–90.
- Bradesi P, Tomi F, Terriaga I, Casanova J. 1994. Identification of dihydrocarvéol stereoisomers and their acetates using carbon-13 NMR spectroscopy. *Spectrosc Lett*. 27: 921-33.
- Bradesi P, Bighelli A, Tomi F, Casanova J. 1996. L'analyse des mélanges complexes par RMN du carbone-13. *Canadian J Appl Spectrosc*. Partie 1 41: 15-24 ; Partie 2 41: 41-50.
- Bruins AP. 1979. Negative ion chemical ionisation mass spectrometry in the determination of components in essential oils. *Anal Chem*. 51: 967-72.
- Cambon A. 1989. La spectrométrie de masse multidimensionnelle et ses applications à l'analyse de mélanges complexes. *Science, Technique, Technologie*. 11: 4-10.
- Cañabate-Díaz B, Segura Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Belmonte Vega A, Garrido Frenich A, Martínez Vidal JL, Duran Martos J. 2007. Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS. *Food Chemistry*. 102: 593–98.
- Cannac M, Barboni T, Ferrat L, Bighelli A, Castola V, Costa J, Trecul D, Morandini F, Pasqualini V. 2009. Oleoresin flow and chemical composition of Corsican pine (*Pinus nigra* subsp. *laricio*) in response to prescribed burnings. *Forest Ecol Manag*. 257: 1247-54.
- Castola V, Mazzoni V, Corticchiato M, Bighelli A, Casanova J. 1997. Hydrogen bonding effect on carbon-13 NMR chemical shifts of naturally occurring phenols. *Can. J. Anal. Science & Spectro*. 42: 90-94.
- Castola V, Bighelli A, Casanova J. 1999. Direct qualitative and quantitative analysis of triterpenes using <sup>13</sup>C NMR spectroscopy exemplified by dichloromethane extracts of cork. *Appl Spectro*. 53: 344-50.
- Castola V, Bighelli A, Conti L, Scano G, Mascia S, Casanova J. 2000. Identification and quantification of anhydrosugars in biomass pyrolytic oils using carbon-13 NMR spectroscopy. *Can J Anal Sci Spect*. 45: 102-107.
- Castola V, Bighelli A, Rezzi S, Melloni G, Gladiali S, Desjobert JM, Casanova J. 2002. Composition and chemical variability of the triterpene fraction of dichloromethane extracts of cork. *Ind Crops Prod*. 15: 15-22.
- Castola V, Marongiu B, Bighelli A, Floris C, Laï A, Casanova J. 2005. Extractives of cork (*Quercus suber* L.): chemical composition of dichloromethane and supercritical CO<sub>2</sub> extracts. *Ind Crops Prod*. 21: 65-69.
- Castro MA, Gordaliza M, Miguel Del Corral JM, Feliciano AS. 1996. The distribution of lignanoids in the order *Coniferae*. *Phytochemistry*. 41: 995–1011.
- Cavalli JF, Tomi F, Bernardini A-F, Casanova J. 2004a. Dihydroagarofurans: the fourth isomer isolated from *Cedrelopsis grevei* bark oil. *Magn. Reson. Chem*. 42: 709-11.

- Cavalli JF, Tomi F, Bernardini AF, Casanova J. 2004b. Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and <sup>13</sup>C-NMR: quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. *Phytochem Anal.* 15: 275-79.
- Ceymann M, Arrigoni E, Schärer H, Baumgartner D, Nising AB, Hurrell RF. 2011. Rapid high performance screening method using UHPLC-MS to quantify 12 polyphenol compounds in fresh apples. *Anal. Methods.* 3: 1774–78.
- Chalchat J-C, Garry R-P, Miehet A, Benjilali B. 1994. Essential oil components in sawdust of *Cedrus atlantica* from Morocco. *Journal of Essential Oil Research.* 6: 323–25.
- Chamblee TS, Karelitz RL, Radford T, Clark BC. 1997. Identification of sesquiterpenes in *Citrus* essential oil by cryofocusing GC/FT-IR. *J Essent Oil Res.* 9: 127-32.
- Chaudhary A, Sharma P, Nadda G, Tewary DK, Singh B. 2011. Chemical composition and larvicidal activities of the Himalayan cedar, *Cedrus deodara* essential oil and its fractions against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J Insect Sci.* 11: 1-10.
- Claridge TDW. 1999. High-Resolution NMR techniques in organic chemistry. Tetrahedron organic chemistry series volume 19. Elsevier: Oxford. 382 p.
- Cognard E, Rudaz S, Bouchonnet S, Staub C. 2005. Analysis of cocaine and three of its metabolites in hair by gas chromatography-mass spectrometry using ion trap detection for CI/MS/MS. *J Chromatogr B.* 826: 17-25.
- Cognard E, Bouchonnet S, Staub C. 2006. Validation of gas-ion trap tandem mass spectrometry for simultaneous analyse of cocaine and its metabolites in saliva. *J Pharm Biomed Anal.* 41: 925-34.
- Coleman WM, Lawrence BM. 1997. A comparison of selected analytical approaches to the analysis of an essential oil. *Flav Fragr J.* 12: 1-8.
- Corcoran O, Spraul M. 2003. LC–NMR–MS in drug discovery. *Drug Discov Today.* 8: 624-31.
- Costa R, d'Acampora Zellne B, Crupi ML, De Fina MR, Valentino MR, Dugo P, Dugo G, Mondello L. 2008. GC–MS, GC–O and enantio–GC investigation of the essential oil of *Tarchonanthus camphoratus* L.. *Flavour and Fragrance Journal.* 23: 40–48.
- Cullen CH, Ray GJ, Szabo CM. 2013. A comparison of quantitative nuclear magnetic resonance methods: internal, external, and electronic referencing. *Magnetic Resonance in Chemistry.* 51: 705–13.
- Cunha SS, Fernandes JO, Oliveira MBPP. 2006. Quantification of free and esterified sterols in Portuguese olive oils by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 1128: 220–27.
- Dahoun A, Derriche R, Belabbes R. 1993. Influence du mode d'extraction et de la composition de l'huile essentielle et de la concrète du bois de cèdre de l'atlas algérien. *Rivista Italiana EPPOS.* 10: 29–32.
- Dakir M, El Hanbali F, Mellouki F, Akssira M, Benharref A, Quilez Del Moral JF, Barrero AF. 2005. Antibacterial diterpenoids from *Cedrus atlantica*. *Nat. Prod. Res.* 19: 719–22.

- De Leonardis A, Macciola V, De Felice M. 1998. Rapid determination of squalene in virgin olive oils using gas-liquid chromatography. *Italian journal of food science*. 10: 75–80.
- Delort E, Jaquier A. 2009. Novel terpenyl esters from Australian finger lime (*Citrus australasica*) peel extract. *Flavour and Fragrance Journal*. 24: 123–32.
- Deprez P, Volkman J, Davenport S. 1990. Squalene content and neutral lipids composition of livers from deep-sea sharks caught in Tasmanian waters. *Mar. Freshwater Res.* 41: 375–87.
- Derome AE. 1987. Modern NMR techniques for chemistry research. *Pergamon Press*: Oxford. 250 p.
- Derwich E, Benziane Z, Boukir A. 2010. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of the essential oil of *Cedrus atlantica*. *International journal of agriculture & biology*. 12: 381–85.
- Dob T, Berramdane T, Chelgoum C. 2005. Chemical composition of essential oil of *Pinus halepensis* Miller growing in Algeria. *Comptes Rendus Chimie*. 8: 1939–45.
- Dob T, Berramdane T, Chelghoum C. 2007. Essential oil composition of *Pinus halepensis* Mill. from three different regions of Algeria. *Journal of Essential Oil Research*. 19: 40–43.
- Donato P, Bonaccorsi I, Russo M, Dugo P. 2013. Determination of new bioflavonoids in bergamot (*Citrus bergamia*) peel oil by liquid chromatography coupled to tandem ion trap–time-of-flight mass spectrometry. *Flavour and Fragrance Journal*. [soumis](#).
- Dugo P, Mondello L, Dugo L, Stancanelli R, Dugo G. 2000. LC-MS for the identification of oxygen heterocyclic compounds in *Citrus* essential oils. *J pharm Biomed Anal.* 24: 147-54.
- Duquesnoy E, Castola V, Casanova J. 2007a. Composition and chemical variability of the twig oil of *Abies alba* Miller from Corsica. *Flavour Fragr J.* 22: 293-99.
- Duquesnoy E, Castola V, Casanova J. 2007b. Triterpenes in the hexane extract of leaves of *Olea europaea* L. using  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *Phytochem Anal.* 18: 347-53.
- Duquesnoy E, Castola V, Casanova J. 2008. Identification and quantitative determination of carbohydrates in ethanolic extracts of two conifers using  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *Carbohydr Res.* 343: 893-902.
- Duquesnoy E, Paoli M, Castola V, Bighelli A, Casanova J. 2009. Identification of taxanes in extracts from leaves of *Taxus baccata* L. using  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy. *Phytochem Anal.* 20: 246-52.
- Dziri S, Hosni K. 2012. Effects of cement dust on volatile oil constituents and antioxidative metabolism of Aleppo pine (*Pinus halepensis*) needles. *Acta Physiol Plant.* 34: 1669–78.
- Eklund P, Sillanpaa R, Sjöholm R. 2002. Synthetic transformation of hydroxymatairesinol from norway spruce (*Picea abies*) to 7-hydroxysecoisolariciresinol, (+)-lariciresinol and (+)-cycloariciresinol. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I.* 1906–10.

- Esteve-Turrillas FA, Pastor A, de la Guardia M. 2005. Determination of pyrethroid insecticide residues in vegetable oils by using combined solid-phases extraction and tandem mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta*. 553: 50–57.
- Evilia RF. 2001. Quantitative NMR spectroscopy. *Anal. Lett.* 34: 2227-36.
- Fatope MO, Marwah RG, Al Hadhrami NM, Onifade AK, Williams JR. 2008. Identification of the chemotypes of *Ocimum forskolei* and *Ocimum basilicum* by NMR Spectroscopy. *Chemistry & Biodiversity*. 5: 2457-63.
- Fekih N, Allali H, Merghache S, Chaïb F, Merghache D, EL Amine M, Djabou N, Muselli A, Tabti B, Costa J. 2014. Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in west northern of Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 4: 97–103.
- Fernandez X, Chemat F. 2012. La chimie des huiles essentielles - Tradition et innovation. Vuilbert : Paris. 274p.
- Ferrari B, Tomi F, Casanova J. 2005a. Composition and chemical variability of *Ferula communis* essential oil from Corsica. *Flavour Fragr J.* 20: 180-85.
- Ferrari B, Tomi F, Casanova J. 2005b. Terpenes and acetylene derivatives from the roots of *Santolina corsica* (Asteraceae). *Biochem System Ecol.* 33: 445-49.
- Ferrari B, Castilho P, Tomi F, Rodrigues AI, do Ceu Costa M, Casanova J. 2005c. Direct identification and quantitative determination of costunolide and dehydrocostuslactone in *Laurus novocanariensis* fixed oil using  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy. *Phytochem Anal.* 16: 104-07.
- Ferreira MJP, Costantin MB, Sartorelli P, Rodrigues GV, Limberger R, Henriques AT, Kato MJ, Emerenciano VP. 2001. Computer-Aided method for identification of components in essential oils by  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *Anal Chim Acta.* 447: 125-34.
- Filippi JJ, Lanfranchi DA, Prado S, Baldovini N, Meierhenrich UJ. 2006. Composition, enantiomeric distribution, and antibacterial activity of the essential oil of *Achillea ligustica* all. from Corsica. *J. Agric. Food Chem.* 54: 6308–13.
- Filippi JJ, Belhassen E, Baldovini N, Brevard H, Meierhenrich UJ. 2013. Qualitative and quantitative analysis of Vetiver essential oils by comprehensive two-dimensional gas chromatography and comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 1288: 127–48.
- Fonseca SF, Nielsen LT, Rúveda EA. 1979. Lignans of *Araucaria angustifolia* and  $^{13}\text{C}$  NMR analysis of some phenyltetralin lignans. *Phytochemistry.* 18:1703–8.
- Formáček V, Kubeczka KH. 1982a.  $^{13}\text{C}$  NMR analysis of essential oils in aromatic plants: basic and applied aspects. Margaris N, Koedam A, Vokou D, Ed. Martinus Nijhoff Publishers: La Haye, 177-81.
- Formáček V, Kubeczka KH. 1982b. Essential oils analysis by capillary gas chromatography and carbon-13 NMR spectroscopy. John Wiley & Sons: Chichester.
- Formáček V, Kubeczka KH. 2002. Juniper berry oil, essential oils analysis by capillary gaz chromatography and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy (2nd Ed.). Wiley: New-York.
- Fox CB. 2009. Squalene emulsions for parenteral vaccine and drug delivery. *Molecules.* 14: 3286–3312.

- Ghanmi M, El Abid A, Chaouch A, Aafi A, Aberchane M, El Alami A, Farah A. 2005. Étude du rendement et de la composition de l'essence de térébenthine du Maroc: cas du pin maritime (*Pinus pinaster*) et du pin d'Alep (*Pinus halepensis*). *Acta Botanica Gallica*. 152: 3–10.
- Ghanmi M, Satrani B, Chaouch A, Aafi A, Abid AE, Ismaili M, Farah A. 2007. Composition chimique et activité antimicrobienne de l'essence de térébenthine du pin maritime (*Pinus pinaster*) et du pin d'Alep (*Pinus halepensis*) du Maroc. *Acta Botanica Gallica*. 154: 293–300.
- Giacometti J. 2001. Determination of aliphatic alcohols, squalene,  $\alpha$ -tocopherol and sterols in olive oils: direct method involving gas chromatography of the unsaponifiable fraction following silylation. *Analyst*. 126: 472–75.
- Gildemeister E, Hoffmann F. 1956. Die ätherischen öle révisé par w. treibs und k. bournet. *Akademie Verlag, Berlin*,. 4: 234–36.
- Giraudeau P, Wang JL, Baguet E. 2006. Improvement of the inverse-gated-decoupling sequence for faster quantitative analysis by  $^{13}\text{C}$  NMR. *CR Chim*. 9: 525-29.
- Gonçalves C, Alpenduradaa MF. 2004. Solid-phase micro-extraction–gas chromatography–(tandem) mass spectrometry as a tool for pesticide residue analysis in water samples at high sensitivity and selectivity with confirmation capabilities. *J Chromatogr A*. 1026: 239-50.
- Gonny M, Cavaleiro C, Salgueiro L, Casonova J. 2006. Analysis of *Juniperus communis* subsp. *alpina* needle, berry, wood and root oils by combination of GC, GC/MS and  $^{13}\text{C}$ -NMR. *Flavour Fragr J*. 21: 99-106.
- Grenier-Loustalot MF, Grenier P, Bounoure J, Grall M, Panaras R. 1990. Couplage direct chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) et résonance magnétique nucléaire du proton (RMN  $^1\text{H}$ ). Appareillage, méthodologie, exemple d'application. *Analisis*. 18 : 200-07.
- Grigoriadou D, Androulaki A, Psomiadou E, Tsimidou MZ. 2007. Solid phase extraction in the analysis of squalene and tocopherols in olive oil. *Food Chemistry*. 105: 675–80.
- Gröne D, Metternich HJ, Schoenfelder W. 1998. Quantitative NMR-spektroskopische analyse der zusammensetzung von glycerinfettsäureestermischungen. *Lett/Lipid* 100: S64-69.
- Günther H. 1994. La spectroscopie de RMN. Principes de base, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone-13 en chimie. *Masson*: Paris, 557p.
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol*. 86: 985–90.
- Hazekamp A, Choi YH, Verpoorte R. 2004. Quantitative analysis of cannabinoids from *Cannabis sativa* using  $^1\text{H}$ -NMR. *Chem Pharm Bull*. 52: 718-721.
- He HP, Cai Y, Sun M, Corke H. 2002. Extraction and purification of squalene from *Amaranthus* grain. *J. Agric. Food Chem*. 50: 368–72.
- Hesse M, Meier H, Zeeh B. 2008. Spectroscopic methods in organic chemistry (2nd Ed.). *Thieme*: New-York, 453 p.
- Hidalgo FJ, Zamora R. 2003. Edible oil analysis by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy: recent advances and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*. 14: 499–506.



- Hile AG, Shan Z, Zhang SZ, Block E. 2004. Aversion of European Starlings (*Sturnus vulgaris*) to garlic oil treated granules: garlic oil an avian repellent. Garlic oil analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Agric Food Chem.* 52: 2192-2196.
- Hmamouchi M, Hamamouchi J, Zouhdi M, Bessiere JM. 2001. Chemical and antimicrobial properties of essential oils of five Moroccan *Pinaceae*. *Journal of Essential Oil Research.* 13: 298–302.
- Hussein L, Ali M, Abouelhassan A, Grzeskiewicz S. 2001. Assessment of the fatty acid patterns in vegetable oils, and fat-rich foods commonly consumed in Egypt. *Grasas y Aceites.* 52: 163-70.
- Iconomou N, Valkanas G, Büchi J. 1964. Composition of gum turpentine of *Pinus halepensis* and *Pinus brutia* grown in Greece. *Journal of Chromatography A.* 16: 29–33.
- Jame P, Casabianca H, Batteau M, Goetinck P, Salomon V. 2010. Differentiation of the origin of squalene and squalane using stable isotopes ratio analysis. *SÖFW-Journal.* 136: 2–7.
- Jinping T, Yingwu Y, Hongbing S, Xiaofeng L. 2002. Magnesium chloride: an efficient  $^{13}\text{C}$  NMR relaxation agent for amino acids and some carboxylic acids. *J Magn Res.* 159: 137-44.
- Joulain D. 1994. Methods for analyzing essential oils. Modern analysis methodologies: use and abuse. *Perfumer & Flavorist.* 19: 5-17.
- Joulain D, König WA. 1998. The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons. E.B.-Verlag: Hamburg, 658p.
- Kalinowski HO, Berger S, Braun S. 1991. Carbon-13 NMR Spectroscopy, John Wiley & Sons: Chichester. 776p
- Karanikas C, Walker V, Scaltsoyiannes A, Comte G, Bertrand C. 2010. High vs. low yielding oleoresin *Pinus halepensis* Mill. trees GC terpenoids profiling as diagnostic tool. *Ann. For. Sci.* 67: 412p1-412p8.
- Kaundun SS, Lebreton P, Fady B. 1998. Geographical variability of *Pinus halepensis* Mill. as revealed by foliar flavonoids. *Biochemical Systematics and Ecology.* 26: 83–96.
- Kilic A, Hafizoglu H, Dönmez IE, Tümen I, Sivrikaya H, Reunanen M, Hemming J. 2011. Extractives in the cones of *Pinus* species. *Eur. J. Wood Prod.* 69: 37–40.
- König WA, Hochmuth DH, Joulain D. 2001. Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils. Library of MassFinder 2.1. Institute of Organic Chemistry: Hamburg.
- Kosir IJ, Kidric J. 2001. Identification of amino acids in wines by one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Agric Food Chem.* 49: 50-56.
- Kováts E. 1965. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Adv Chromatogr.* 1: 229-247.
- Kubeczka KH, Formáček V. 1984. Application of direct carbene-13 NMR spectroscopy in the analysis of volatiles. Schreier P. Ed., Walter de Gruyter & Co., Berlin. 219-30.

- Kubeczka KH., Schultze W, Formáček V, Herres W. New Developments in Essential Oils Analysis by Fourier-Transform Spectroscopy, 10th International Congress of Essential Oils, *Fragrances and Flavors*. Washington, 16-20 Nov 1986. Proceedings, Elsevier Science. 1988. 931-50.
- Kulik W, Lenthe H, Stet FS, Houtkooper RH, Kemp H, Stone JE, Steward CG, Wanders RJ, Vaz FM. 2008. Bloodspot Assay Using HPLC–Tandem Mass Spectrometry for Detection of Barth Syndrome. *Clinical Chemistry*. 54: 371–78.
- La Torre GL, Saitta M, Vilasi F, Pellicanò T, Dugo G. 2006. Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection. *Food Chem*. 94: 640-50.
- Lacrué MT. 1928. El aguarras espanol de pino de alep. *Instituto forestal de investigaciones y experiencias*. 2: 116–19.
- Lahlou M. 2003. Composition and molluscicidal properties of essential oils of five Moroccan *Pinaceae*. *Pharmaceutical biology*. 41: 207–10.
- Lamblin F, Hano C, Fliniaux O, Mesnard F, Fliniaux MA, Laine E. 2008. Intérêt des lignanes dans la prévention et le traitement de cancers. *Médecine sciences*. 24: 511–19.
- Lamiri A, Lhaloui S, Benjilali B, Berrada M. 2001. Insecticidal effects of essential oils against hessian fly, *Mayetiola destructor* (say). *Field Crops Research*. 71: 9–15
- Lange G, Schultze W. 1988. Differentiation of isopulegol isomers by chemical ionization mass spectrometry, in Bioflavour'87. P. Schreier Ed., W. de Gruyter & Co.: Berlin: New-York. 115-22.
- Lawrence B. 2009. Progress in essential oils, *Cedrus* oil. *Parfumer and Flavorist*. 34: 57.
- Lesueur D. La RMN du carbone-13, outil d'analyse : contribution à l'étude d'huiles essentielles du Viêt-Nam et d'un liquide de pyrolyse de la biomasse. 224 p. Thèse de Doctorat : Chimie : Université de Corse : 2005.
- Li CY, Lin CH, Wu CC, Lee KH, Wu TS. 2004. Efficient <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance method for improved quality control analyses of ginkgo constituents. *J Agric Food Chem*. 52: 3721-3725.
- Lindon JC, Nicholson JK, Wilson ID. 2000. Directly coupled HPLC–NMR and HPLC–NMR–MS in pharmaceutical research and development. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 748: 233–58.
- de Litardière R, Malcuit G. 1946. Découverte en Corse du *Pinus halepensis* Mill. à l'état spontané. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*. 688–90.
- Liu GC, Ahrens EH, Schreiberman PH, Crouse JR. 1976. Measurement of squalene in human tissues and plasma: validation and application. *Journal of Lipid Research*. 17: 38–45.
- Macchioni F, Cioni PL, Flamini G, Morelli I, Perrucci S, Franceschi A, Macchioni G, Ceccarini L. 2002. Acaricidal activity of pine essential oils and their main components against *Tyrophagus putrescentiae*, a stored food mite. *J. Agric. Food Chem*. 50: 4586–88.

- Macchioni F, Cioni PL, Flamini G, Morelli I, Maccioni S, Ansaldi M. 2003. Chemical composition of essential oils from needles, branches and cones of *Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster* and *P. nigra* from central Italy. *Flavour and Fragrance Journal*. 18: 139–43.
- Maguire LS, O’Sullivan SM, Galvin K, O’Connor TP, O’Brien NM. 2004. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 55: 171–78.
- Malcuit G, Deleuil G. 1957. A propos des nouvelles localités de pin d’Alep en Corse. *Bulletin de la Société Botanique Française*. 104: 527–29.
- Mannina L, Patumi M, Proietti N, Bassi D, Segre AL. 2001. Geographical characterization of italian extra virgin olive oils using high-field  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem*. 49: 2687–96.
- Mannina L, Segre A. 2002. High resolution nuclear magnetic resonance: from chemical structure to food authenticity. *Grasas y Aceites*. 53: 22–33.
- Mannina L, D’Imperio M, Capitani D, Rezzi S, Guillou C, Mavromoustakos T, Vilchez MD, Fernández A, Thomas F, Aparicio R. 2009.  $^1\text{H}$  NMR-based protocol for the detection of adulterations of refined olive oil with refined Hazelnut oil. *J. Agric. Food Chem*. 57: 11550–56.
- Mannina L, Sobolev AP. 2011. High resolution NMR characterization of olive oils in terms of quality, authenticity and geographical origin. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 49: S3–S11.
- Manzi P, Panfili G, Esti M, Pizzoferrato L. 1998. Natural antioxidants in the unsaponifiable fraction of virgin olive oils from different cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 77: 115–20.
- Mazzoni V, Bradesi P, Tomi F, Casanova J. 1997. Direct qualitative and quantitative analysis of carbohydrate mixtures using  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy: application to honeys. *Magn Reson Chem*. 35: 81–90.
- McLafferty FW, Stauffer DB. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data (6th Ed.), Mass spectrometry library search system BenchTop/PBM, version 3.10d. Palisade Co: Newfield.
- Mirov NT, Iloff PM. 1955. Composition of gum turpentines of pines. xxiii. a report on three mediterranean species: *Pinus pinea* (cultivated in California), *P. halepensis* (from Israel) and *P. brutia* (from Cyprus). *Journal of the American Pharmaceutical Association*. 44: 186–89.
- Mirov NT, Zavarin E, Snajberk K. 1966. Chemical composition of the turpentines of some eastern mediterranean pines in relation to their classification. *Phytochemistry*. 5: 97–102
- Mita E, Tsitsimpikou C, Tsiveleka L, Petrakis PV, Ortiz A, et al. 2005. Seasonal variation of oleoresin terpenoids from *Pinus halepensis* and *Pinus pinea* and host selection of the scale insect *Marchalina hellenica* (Homoptera, Coccoidea, Margarodidae, Coelostoniidiinae). *Holzforschung*. 56: 572–78.
- Miyazawa M, Tamura N. 2008. Characteristic odor components in the essential oil from yacón tubers (*Polymnia sonchifolia* poepp. et endl.). *Journal of Essential Oil Research*. 20: 12–14.

- Mooney JR. 1989. Quantitative application of  $^{13}\text{C}$  NMR. *Analytical NMR*. John Wiley & Sons: Chichester. 41-63.
- Mottram HR, Woodbury SE, Evershed RP. 1997. Identification of triacylglycerol positional isomers present in vegetable oils by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 11: 1240–52.
- Murkovic M, Lechner S, Pietzka A, Bratacos M, Katzogiannos E. 2004. Analysis of minor components in olive oil. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 61: 155–60.
- Nam AM, Paoli M, Castola V, Casanova J, Bighelli A. 2011. Identification and quantitative determination of lignans in *Cedrus atlantica* resins using  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *Nat Prod Commun*. 6: 379–85.
- National Institute of Standards and Technology. 1999. PC Version 1.7. *The NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library*, Perkin Elmer Corporation: Norwalk, CT.
- Nenadis N, Tsimidou M. 2002. Determination of squalene in olive oil using fractional crystallization for sample preparation. *J Amer Oil Chem Soc*. 79: 257–59.
- Newmark HL. 1997. Squalene, olive oil, and cancer risk: a review and hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 6: 1101–3.
- Nischwitz V, Pergantis SA. 2005. First report on the detection and quantification of arsenobetaine in extracts of marine algae using HPLC-ES-MS/MS. *Analyst*. 130: 1348–50.
- Norin T, Winell B. 1971. Diterpenoids of cones from two *Cedrus* species. *Phytochemistry*. 10: 2818–21.
- Novak P, Tepeš P, Fistrić I, Bratoš I, Gabelica V. 2006. The application of LC-NMR and LC-MS for separation and rapid structure elucidation of an unknown impurity in 5-aminosalicylic acid. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40: 1268-72.
- Núñez CV, Roque NF. 1999. Sesquiterpenes from the stem bark of *Guarea guidonia* (L.) *sleumer* (Meliaceae). *J Essent Oil Res*. 11: 439-40.
- Ormeño E, Fernandez C, Mévy JP. 2007. Plant coexistence alters terpene emission and content of mediterranean species. *Phytochemistry*. 68: 840–52.
- Ottavioli J, Bighelli A, Casanova J. 2008. Diterpene-rich needle oil of *Pinus pinaster* Ait. from Corsica. *Flavour Fragr J*. 23: 121-25.
- Ottavioli J, Gonny M, Casanova J, Bighelli A. 2009. Chemical variability of needle oil of *Juniperus communis* ssp. *alpina* from Corsica. *Chemistry and Biodiversity*. 6: 2192-99.
- Ottavioli J. *Contribution de la RMN  $^{13}\text{C}$  à l'analyse d'huiles essentielles et d'oléorésines : caractérisation de génévriers et du pin maritime de Corse*, 236 p. *Thèse de doctorat : Chimie : Université de Corse*: 2009
- Ottavioli J, Casanova J, Bighelli A. 2011. Identification and quantitative determination of dipropylene glycol in terpene mixtures using  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *Spectrosc Letters*. 44: 221-28.
- Ouattara Z. *Contribution de la RMN  $^{13}\text{C}$  à la caractérisation des huiles essentielles de cinq Annonacées acclimatées en Côte d'Ivoire*. 225 p. *Thèse de doctorat : Chimie : Université de Corse*: 2012.

- Ouattara ZA, Boti JB, Ahibo AC, Casanova J, Tomi F, Bighelli A. 2013. Analysis of *Cleistopholis patens* leaf and trunk bark oils using combined GC- Flame ionisation detection, GC-Retention Index, GC-MS and  $^{13}\text{C}$ -NMR. *Phytochemical Analysis*. 24: 574–580.
- Oueslati I, Anniva C, Daoud D, Tsimidou MZ, Zarrouk M. 2009. Virgin olive oil (VOO) production in Tunisia: the commercial potential of the major olive varieties from the arid Tataouine zone. *Food Chemistry*. 112: 733–41.
- Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Wurtele G, Spiegelhalter B, Bartsch H. 2000. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *The Lancet Oncology*. 1: 107–12.
- Pagelot A. Propriétés dynamiques de cryptates moléculaires : étude par résonance magnétique nucléaire, 182 p. Thèse de Doctorat : Chimie : Université de Strasbourg I : 1982.
- Paoli M, Nam AM, Castola V, Casanova J, Bighelli A. 2011. Chemical variability of the wood essential oil of *Cedrus atlantica* Manetti from Corsica. *Chem. Biodivers*. 8: 344–51.
- Paoli M, Bighelli A, Castola V, Tomi F, Casanova J. 2013. Quantification of taxanes in a leaf and twig extract from *Taxus baccata* L. using  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 51: 756–61.
- Paolini J, Costa J, Bernardini AF. 2005. Analysis of the essential oil from aerial parts of *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* (L.) by gas chromatography with electron impact and chemical ionisation mass spectrometry. *J chromatogr A*. 1076: 170-78.
- Pasqualini V, Robles C, Garzino S, Greff S, Bousquet-Melou A, Bonin G. 2003. Phenolic compounds content in *Pinus halepensis* Mill. needles: a bioindicator of air pollution. *Chemosphere*. 52: 239–48.
- Pauli GF, Jaki BU, Lankin DC. 2005. Quantitative  $^1\text{H}$  NMR: developpement and potential of a method for natural products analysis. *J Nat Prod*. 68: 133-149.
- Plattier M, Teisseire P. 1972. Isolement et synthèses de constituants de l'essence de cèdre de l'Atlas. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 44: 392-404.
- Pogliani L, Ceruti M, Ricchiardi G, Viterbo D. 1994. An NMR and molecular mechanics study of squalene and squalene derivatives. *Chemistry and Physics of Lipids*. 70: 21–34.
- Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 6: 39.
- Prosen H, Kočar D. 2008. Different sample preparation methods combined with LC-MS/MS and LC-UV for determination of some furocoumarin compounds in products containing citrus. *Flavour and Fragrance Journal*. 23: 263–71.
- Psomiadou E, Tsimidou M. 1999. On the role of squalene in olive oil stability. *J. Agric. Food Chem*. 47: 4025–32.
- Pusecker K, Albert K, Bayer E. 1999. Investigation of hop and beer bitter acids by coupling of high performance liquid chromatography to nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Chromatogr. A*. 836: 245–52.
- Radulovic N, Stojanovic G, Palic R. 2006. Composition and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. essential oil. *Phytother Res*. 20: 85-88.

- Ragunathan N, Krock KA, Klawun C, Sasaki TA, Wilkins CL. 1995. Multispectral detection for gas chromatography. *J chromatogr A*. 703: 335-82.
- Rao CV, Newmark HL, Reddy BS. 1998. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis*. 19: 287–90.
- Reddy LH, Couvreur P. 2009. Squalene: a natural triterpene for use in disease management and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 61: 1412–26.
- Reille M. 1992. New pollen-analytical researches in Corsica: the problem of *Quercus ilex* L. and *Erica arborea* L., the origin of *Pinus halepensis* Miller forests. *New Phytologist*. 122: 359–78.
- Rezzi S, Bighelli A, Castola V, Casanova J. 2002. Direct identification and quantitative determination of acidic and neutral diterpenes using  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy. Application to the analysis of oleoresin of *Pinus nigra*. *Appl. Spectrosc.* 56: 312–17.
- Rezzi S, Axelson DE, Héberger K, Reniero F, Mariani C, Guillou C. 2005. Classification of olive oils using high throughput flow  $^1\text{H}$  NMR fingerprinting with principal component analysis, linear discriminant analysis and probabilistic neural networks. *Analytica Chimica Acta*. 552: 13–24.
- Rezzi S, Bighelli A, Castola V, Casanova J. 2005. Composition and chemical variability of the oleoresin of *Pinus nigra* ssp. *laricio* from Corsica. *Ind Crops Prod*. 21: 65-69.
- Robosky LC, Wade K, Woolson D, Baker JD, Manning ML, Gage DA, Reily MD. 2008. Quantitative evaluation of sebum lipid components with nuclear magnetic resonance. *Journal of Lipid Research*. 49: 686 –692.
- Rouessac F, Rouessac A. 2004. Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes (6ème Ed.). Dunod : Liège, 303p.
- Roussis V, Petrakis PV, Ortiz A, Mazomenos BE. 1995. Volatile constituents of needles of five *Pinus* species grown in Greece. *Phytochemistry*. 39: 357–61.
- Ryan E, Galvin K, O'Connor TP, Maguire AR, O'Brien NM. 2007. Phytosterol, squalene, tocopherol content and fatty acid profile of selected seeds, grains, and legumes. *Plant Foods Hum Nutr*. 62: 85–91.
- Sacchi R, Addeo F, Giudiccianni I, Paolillo L. 1992. Analysis of the positional distribution of fatty acids in olive oil triacylglycerols by high-resolution  $^{13}\text{C}$  NMR of the carbonyl region. *Ital. J. Food Sci*. 2: 117-24.
- Sacchi R, Addeo F, Paolillo L. 1997.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR of virgin olive oil. An overview. *Magn. Reson. Chem*. 35: S133–S145.
- Sandermann W. 1962. Biosynthetische untersuchugen an verschiedenen kiefernarten. *Holzforschung*. 65–74.
- Satrani B, Aberchane M, Farah A, Chaouch A, Talbi M. 2006. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites par hydrodistillation fractionnée du bois de *Cedrus atlantica* Manetti. *Acta Botanica Gallica*. 153: 97–104.
- Schantz MV, Hiltunen R. 1983. Famille *Pinaceae* (*Coniferae*). *Comment. Phys.-Math*. 57: 1-149.
- Schultze W, Lange G, Schmaus G. 1992. Isobutane and ammoniac chemical ionization mass spectrometry of sesquiterpene hydrocarbons. *Flav Fragr J*. 7: 55-64.

- Silvestre V, Goupy S, Trierweiler M, Robins R, Akoka S. 2005. Determination of substrate and product concentrations in lactic acid bacterial fermentations by proton *NMR* using the ERETIC method. *Anal Chem.* 73: 1862-68.
- Smith TJ, Yang GY, Seril DN, Liao J, Kim S. 1998. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene. *Carcinogenesis.* 19: 703–6.
- Sutour S, Bradesi P, Casanova J, Tomi F. 2010. Composition and chemical variability of *Mentha suaveolens* ssp. *suaveolens* and *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* from Corsica. *Chemistry and Biodiversity.* 7: 1002-08.
- Sutour S, Tomi F, Bradesi P, Casanova J. 2011. Chemical composition of the essential oil from Corsican *Mentha aquatica*-combined analysis by GC(RI), GC-MS and <sup>13</sup>C *NMR* spectroscopy. *Nat Prod Com.* 6: 1-4.
- Tazerouti F, Badjah-Hadj-Ahmed AY, Meklati BY, Favre-Bonvin J, Bobenrieth MJ. 1993. Analyse des huiles essentielles des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. par C.G.-S.M. *Plantes médicinales et phytothérapie.* 26: 161–76.
- Tomi F, Bradesi P, Bighelli A, Casanova J. 1995. Computer-aided identification on individual components of essential oils using carbon-13 *NMR* spectroscopy. *J Magn Reson Anal.* 1: 25-34.
- Tomi F, Casanova J. 2006. <sup>13</sup>C *NMR* as a tool for identification of individual components of essential oils from *Labiatae*-A Review. *Actae Horticulturae.* 723: 185-92.
- Tumen I, Hafizoglu H, Kilic A, Dönmez IE, Sivrikaya H, Reunanen M. 2010. Yields and constituents of essential oil from cones of *Pinaceae* spp. natively grown in Turkey. *Molecules.* 15: 5797–5806.
- Tuomi T, Johnsson T, Reijula K. 1999. Analysis of nicotine, 3-Hydroxycotinine, cotinine, and caffeine in urine of passive smokers by HPLC-tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry.* 45: 2164–72.
- Tzakou O, Yannitsaros A, Vassiliades D. 2001. Investigation of the C 16:3/ C18:3 fatty acid balance in leaf tissues of *Biebersteinia orphanidis* Boiss. (*Biebersteiniaceae*). *Biomedical Systematics and Ecology.* 29: 765-67.
- Ucciani E. 1995. Dictionnaire des huiles végétales, Ed Lavoisier Tec. & Doc., Paris. 644p
- Ustun O, Senol FS, Kurkcuoglu M, Orhan IE, Kartal M, Baser KHC. 2012. Investigation on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant activities of extracts and essential oils of Turkish *Pinus* species and pycnogenol. *Industrial Crops and Products.* 38: 115–23.
- Van den Dool H, Kratz PD. 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatog.* 11: 463-71.
- Vellutini M, Baldovini N, de Rocca Serra D, Tomi F, Casanova J. 2005. β-Cyclolavandulyl and β-isocyclolavandulyl esters from *Peucedanum paniculatum* L., an endemic species to Corsica. *Phytochem.* 66: 1956-62.
- Vézes M, Dupont G. 1922. Les constituants de la gemme de pin d'Alep. *Chimie et Industrie.* 8: 318–19.

- Victoria M, Elipe S. 2003. Advantages and disadvantages of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a hyphenated technique. *Analytica Chimica Acta*. 497: 1-25.
- Vidrich V, Michelozzi M., Fusi P, Heimler D. 1988. Essential oils of vegetables species of the mediterranean and alpine temperate climate areas. *4th E.C. Conference, Biomass for Energy and Industry*.
- Villecco MB, Hernández LR, Guzmán MI, Catalán CAN, Bucio MA, Joseph-Nathan P. 2001. Synthesis, stereochemistry and absolute configuration of deodarols and deodarones. *Tetrahedron: Asymmetry*. 12: 2947-53.
- Villén J, Blanch GP, Ruiz del Castillo ML, Herraiz M. 1998. Rapid and simultaneous analysis of free sterols, tocopherols, and squalene in edible oils by coupled Reversed-Phase Liquid Chromatography-gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1419-22.
- Vlahov G. 1999. Application of NMR to the study of olive oils. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 35: 341-57.
- Wahlberg I, Karlsson K, Nishida T, Cheng K, Enzell CR, Berg JE, Pilotti AM. 1977. Tobacco chemistry, 40: Syntheses of (12*R*,13*R*)- and (12*S*,13*S*)-8,12-epoxy-14-labden-13-ol and (13*R*)- and (13*S*)-8,13-epoxy-14-labden-12-one, four tobacco diterpenoids. *Acta Chemica Scandinavica. Series B*. 31: 453-59.
- Wetherbee BM, Nichols PD. 2000. Lipid composition of the liver oil of deep-sea sharks from the chatham rise, New Zealand. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 125: 511-21.
- Weyerstahl P, Kaul VK, Weirauch M, Marschall-Weyerstahl H. 1987. Volatile constituents of *Artemisia vestita* oil. *Planta Med.* 53: 66-72.
- Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D. 1996. New sesquiterpene ethers from vetiver oil. *Liebigs Ann.* 7: 1195-99.
- Weyerstahl P, Schlicht V. 1997a. Synthesis of rac-bisabola-3(15),10-dien-7-ol. *Liebigs Ann.* 8: 1789-90.
- Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D. 1997b. New cis-eudesm-6-ene derivatives from vetiver oil. *Liebigs Ann.* 7: 1783-87.
- Weyerstahl P, Marschall H, Weirauch M, Thefeld K, Surburg H. 1998. Constituents of commercial Labdanum oil. *Flavour Fragr J.* 13: 295-318.
- Weyerstahl P, Marschall H, Wahlburg HC, Christiansen C, Rustaiyan A, Mirdjalili F. 1999a. Constituents of the essential oil of *Pulicaria gnaphalodes* (Vent.) boiss. from Iran. *Flavour Fragr J.* 14: 121-30.
- Weyerstahl P, Marschall H, Eckhardt A, Christiansen C. 1999b. Constituents of commercial brazilian Lantana oil. *Flavour Fragr J.* 14: 15-28.
- Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D. 2000a. 1,7-Cyclogermacra-1(10),4-dien-15-al, a sesquiterpene with a novel skeleton, and other sesquiterpenes from Haitian vetiver oil. *Flavour Fragr J.* 15: 61-83.
- Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D. 2000b. Analysis of the polar fraction of Haitian vetiver oil. *Flavour Fragr J.* 15: 153-73.
- Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D, Surburg H. 2000c. Constituents of Haitian vetiver oil. *Flavour Fragr J.* 15: 395-412.
- Williamson M, Neuhaus D. 1989. The nuclear overhauser effect in structural and conformational analysis. VCH Publishers : New York. 522p.



- Wolfender JL, Ndjoko K, Hostettmann K. 1998. LC/NMR in natural products chemistry. *Current Organic Chemistry*. 2: 575-96.
- Yang Z. 2006. Online hyphenated liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy-mass spectrometry for drug metabolite and nature product analysis. *J Pharm Biomed Anal*. 40: 516-27.
- Yapi TA, Boti JB, Attioua BK, Ahibo AC, Bighelli A, Casanova J, Tomi F. 2012. Three new natural compounds from the root bark essential oil from *Xylopi aethiopica*. *Phytochemical Analysis*. 23: 651-56.
- Yapi TA, Boti JB, Ahibo AC, Bighelli A, Casanova J, Tomi F. 2013. Combined analysis of *Xylopi rubescens* Oliv. leaf oil using gas chromatography with flame ionization detection, gas chromatography with mass spectrometry and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance: structure elucidation of new compounds. *Flavour and Fragrance Journal*. 28: 373-79.
- Zafra M, García-Peregrín E. 1976. Seasonal variations in the composition of *Pinus halepensis* and *Pinus sylvestris* twigs and needles essential oil. *The Journal of Agricultural Science*. 86: 1-6.
- Zupanc M, Prošek M, Dušan M. 1992. Combined CI and EI mass spectra in the analysis of essential oils. *J High Resol Chromatogr*. 15: 510-13.



# Annexes

Annexe I: Composition chimique de 15 échantillons d'huile essentielle de cônes de *Pinus halepensis* (% corrigé : g/100 g)

Composés	Stations	CAPO DI FENO							TRE PADULE				SALECCIA			
	FR	C1	C4	C10	C11	C12	C13	C18	T2	T7	T8	T9	S1	S4	S7	S14
Tricyclène	1,03	0,2	0,1	0,3	0,2	-	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	-	0,1	0,1
$\alpha$ -Pinène	1,03	54,8	56,8	41,1	48,6	39,3	47,6	34,6	24,4	18,0	26,6	37,3	27,6	24,9	24,9	25,9
Camphène	1,03	0,7	0,7	0,9	0,8	0,8	0,8	0,8	0,4	0,3	0,3	0,9	0,5	0,4	0,4	0,5
Verbénène	1,03	0,3	0,1	0,1	0,3	0,2	0,5	0,6	0,1	0,1	-	0,5	0,2	0,1	0,1	0,2
$\beta$ -Pinène	1,03	1,7	2,5	1,4	1,5	1,2	1,1	0,9	0,9	1,1	1,3	2,1	1,1	1,5	1,6	1,9
Myrcène	1,03	9,3	15,2	9,1	8,3	11,7	10,5	6,2	21,7	19,5	44,6	7,6	34,8	33,8	33,9	23,6
$\delta$ -3-Carène	1,03	0,6	0,7	0,3	5,9	1,1	0,6	0,3	0,1	6,8	0,3	9,6	2,8	2,9	2,9	7,7
<i>p</i> -Cymène	1,03	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	-	0,1	0,1	0,1	-	0,8	0,2	0,1	0,1	0,3
Limonène*	1,03	0,5	0,6	0,4	0,5	0,4	0,1	0,4	0,3	0,3	0,4	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4
$\beta$ -Phellandrène*	1,03	0,1	0,3	-	0,2	0,2	0,5	0,1	0,3	0,3	0,5	0,2	0,4	0,4	0,4	0,3
<i>p</i> -Cyménène	1,03	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	-	-	-	0,2	0,1	-	-	0,1
Terpinolène	1,03	0,1	0,0	-	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,6	-	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5
$\alpha$ -Campholéal	1,30	0,3	0,1	0,2	0,6	0,2	0,7	0,6	0,1	0,1	0,1	0,6	0,3	0,2	-	-
Camphre	1,30	-	0,1	0,4	0,4	0,5	0,0	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -Pinocarvéol	1,30	1,0	-	0,6	0,8	0,3	1,4	1,0	0,2	0,1	-	1,2	0,5	-	0,2	0,3
<i>trans</i> -Verbénol	1,30	1,8	-	-	1,1	0,1	1,0	0,6	-	-	-	1,2	0,4	-	0,1	0,4
<i>cis</i> -Verbénol	1,30	-	0,2	-	0,4	0,2	0,7	0,6	-	-	-	0,6	0,2	-	0,1	0,4
Pinocarvone	1,30	1,0	0,1	0,2	-	-	0,5	0,5	-	0,1	-	0,9	0,3	-	-	-
<i>p</i> -Mentha-1,5-diène-8-ol	1,30	0,2	-	-	0,9	0,1	1,5	1,2	0,1	0,2	-	1,6	0,5	0,2	0,3	0,5
Terpinéol-4	1,30	0,3	0,1	0,1	-	0,2	0,1	0,1	-	-	-	-	0,0	-	-	-
<i>p</i> -Cymène-8-ol	1,30	-	-	0,2	-	0,2	-	-	-	0,1	-	-	0,2	0,1	-	0,1
<i>cis</i> -Pinocarvéol*	1,30	0,3	0,1	0,3	0,3	0,2	0,6	0,5	0,1	0,1	-	0,6	0,2	0,1	0,1	-
Myrténal*	1,30	-	-	0,2	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	0,2	-
$\alpha$ -Terpinéol	1,30	0,1	0,3	0,1	0,5	0,3	0,6	-	0,1	0,1	-	0,4	0,3	0,1	0,2	0,2
Verbénone	1,30	0,7	0,2	0,7	0,5	0,3	0,9	0,6	0,1	0,1	-	1,4	0,4	0,1	0,1	-
Carvone	1,30	0,1	-	0,1	0,1	-	0,1	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-
Acétate de bornyle	1,59	0,4	0,2	0,8	0,8	0,9	0,7	0,4	0,4	0,3	0,6	1,1	0,4	0,4	-	0,5

$\alpha$ -Copaène	0,98	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	-	0,2
( <i>E</i> )- $\beta$ -caryophyllène	0,98	4,6	4,4	1,2	7,4	8,2	10,3	6,0	11,0	11,5	19,0	9,9	11,0	12,7	12,8	11,0
$\alpha$ -humulène	0,98	0,8	0,8	0,3	1,3	1,4	1,8	1,0	1,9	2,0	3,2	1,6	1,9	2,2	2,2	1,9
Isovalérate de phényléthyle	1,59	-	0,2	1,2	0,2	0,2	0,2	-	0,2	0,2	0,1	0,3	-	0,1	0,2	0,2
Cubébol	1,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-
$\delta$ -Cadinène	0,98	-	-	-	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	-	0,3
$\beta$ -élémol	1,30	-	-	-	-	0,1	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
Palustrol	1,30	0,4	0,3	0,9	-	0,2	-	-	-	-	-	-	0,0	-	-	-
Oxyde de caryophyllène	1,53	4,2	2,6	5,9	3,7	2,9	6,5	5,2	2,8	-	1,8	6,2	3,4	3,7	3,8	3,3
Guaiol	1,30	0,1	0,0	0,0	0,2	0,2	0,1	-	0,1	0,1	0,3	-	0,3	0,2	0,3	0,5
Oxyde d'humulène	1,53	0,6	0,3	0,8	0,5	0,4	0,9	0,8	0,4	0,3	0,2	0,9	0,5	0,6	-	0,5
Caryophylla-4(14),8(15)-dièn-5 $\beta$ -ol	1,30	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1
Caryophylla-3,8(15)-dièn-5 $\beta$ -ol	1,30	-	-	-	0,9	-	0,7	0,6	-	-	-	1,0	1,1	-	0,8	1,4
Oxyde de manoylène	1,53	0,1	-	-	0,2	-	0,5	0,9	0,2	0,3	-	-	0,3	0,5	0,5	0,6
Abiétatriène	0,98	-	-	-	0,2	0,4	0,1	0,3	-	-	-	-	0,2	-	0,3	0,2
8,12-époxy-14-labdèn-13-ol	1,30	0,1	-	-	0,1	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-
<i>cis</i> -Abiéol	1,30	-	-	-	0,1	-	-	0,1	0,2	0,5	0,6	0,2	-	-	0,2	-
Isopimaral	1,30	-	-	-	0,5	-	0,3	0,5	0,5	0,7	1,4	-	0,1	1,7	1,6	1,4
Déhydroabiétal	1,30	-	-	-	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	-	-	0,4	0,5	0,6
<b>Total</b>		<b>85,7</b>	<b>87,4</b>	<b>68,4</b>	<b>89,4</b>	<b>73,2</b>	<b>93,4</b>	<b>67,2</b>	<b>67,2</b>	<b>64,6</b>	<b>102,3</b>	<b>90,5</b>	<b>91,2</b>	<b>88,3</b>	<b>89,6</b>	<b>85,7</b>

L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire (BP-1) ; \* : pourcentage donnés sur colonne polaire (BP-20) ; FR: facteurs de réponses de Bicchi *et al.* (2008).

Annexe II : Composition chimique des 46 échantillons d'huile essentielle de *P. halepensis* (% corrigé : g/100 g)

Composés	SALECCIA														
	FR	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S15
$\alpha$ -Thujène	1,03	0,5	0,9	0,6	0,5	0,7	0,8	0,6	0,8	0,9	0,6	0,8	1,1	0,9	1,0
$\alpha$ -Pinène	1,03	11,4	14,7	11,1	12,7	12,0	11,5	13,2	15,6	14,1	12,3	14,4	14,9	13,5	16,8
Camphène	1,03	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
Sabinène	1,03	4,9	6,8	4,3	6,4	5,9	5,8	4,8	5,9	6,1	4,6	5,4	4,8	7,1	7,6
$\beta$ -Pinène	1,03	1,4	1,7	1,4	1,6	1,7	1,6	1,5	1,8	1,7	1,4	1,7	1,5	1,7	1,9
Myrcène	1,03	38,3	14,4	33,8	39,5	24,2	18,4	24,5	25,2	19,1	32,4	11,6	10,0	12,2	10,1
$\delta$ -3-Carène	1,03	1,9	6,3	2,6	1,5	4,4	3,5	3,1	4,7	4,2	3,1	3,6	4,2	3,1	6,3
$\alpha$ -Terpinène	1,03	0,3	0,7	0,5	0,3	0,7	0,7	0,5	0,7	0,8	0,6	0,7	0,5	0,7	0,8
<i>p</i> -Cymène	0,99	0,1	0,2	0,3	0,2	0,4	0,6	0,3	0,4	0,4	0,2	0,5	0,5	0,4	0,4
Limonène*	1,03	0,7	0,7	1,1	0,9	1,1	1,1	1,1	1,0	1,0	1,2	1,0	1,1	0,7	1,3
$\beta$ -Phellandrène*	1,03	0,7	1,2	0,8	0,9	0,9	0,9	0,8	0,9	1,0	1,0	0,9	0,8	1,2	1,0
( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimène	1,03	0,4	0,3	0,2	0,4	0,5	0,9	0,8	0,7	0,9	0,5	1,2	1,7	1,3	0,5
$\gamma$ -Terpinène	1,03	0,6	1,2	1,0	0,7	1,3	1,4	0,9	1,1	1,4	1,0	1,3	0,9	1,3	1,4
Terpinolène	1,03	6,3	10,6	7,6	7,3	9,8	10,0	7,7	8,8	10,7	8,1	9,3	8,3	10,9	11,7
Linalol	1,30	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	0,1
para-Cymèn-8-ol	1,30	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,2	0,1	0,1
Terpinéol-4	1,30	0,9	2,2	2,0	1,1	2,4	3,5	1,6	2,3	3,1	1,7	2,3	2,0	2,0	2,4
$\alpha$ -Terpinéol	1,30	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,3	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2
Acétate de géranyle	1,59	0,3	1,5	0,2	0,5	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1
$\alpha$ -Copaène	0,98	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4
( <i>E</i> )- $\beta$ -Caryophyllène	0,98	20,5	21,1	18,3	16,2	21,2	16,7	20,9	16,5	21,5	22,2	25,8	24,9	26,4	21,9
( <i>E</i> )- $\beta$ -Farnésène	0,98	0,3	0,4	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3
$\alpha$ -Humulène	0,98	3,4	3,4	3,0	2,7	3,4	2,8	3,5	2,8	3,6	3,6	4,2	4,1	4,2	3,4
2-Méthylbutyrate de phényléthyle*	1,59	0,4	0,4	0,3	0,4	0,4	0,7	0,3	0,5	0,3	0,2	0,2	0,6	0,5	0,2
Isovalérate de phényléthyle*	1,59	4,2	3,5	3,2	3,3	3,4	6,6	3,7	4,7	2,7	2,5	2,9	5,0	5,0	0,3
Germacrène D	0,98	0,7	0,5	0,3	0,8	0,4	0,1	0,3	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2
$\alpha$ -Muuroolène	0,98	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3
$\delta$ -Cadinène	0,98	0,6	0,7	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,7	0,6	0,7	0,6
( <i>E</i> )- $\alpha$ -Bisabolène	0,98	0,3	0,2	0,1	0,0	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,2
Oxyde de caryophyllène	1,53	0,6	0,6	0,7	0,7	0,8	1,2	0,9	1,3	0,9	0,6	1,2	1,9	1,0	0,8
Guaiol	1,30	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,7	0,5	0,6	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3
Cembrène	0,98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Géranyl $\alpha$ -terpinene	0,98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cembrène A	0,98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Épi-isocembrol*	1,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isocembrol*	1,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total		101,2	95,7	95,4	100,8	98,5	91,9	93,7	98,0	97,1	100,1	92,2	91,8	97,4	92,9

L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire (BP-1) ; \* : pourcentages donnés sur colonne polaire (BP-20) ; RF: facteurs de réponses de Bicchi *et al.* (2008).

Annexe II : Composition chimique des 46 échantillons d'huile essentielle de *P. halepensis* (% corrigé : g/100 g) (suite)

Composés	TRE PADULE														
	FR	T1	T2	T3	T4	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15
$\alpha$ -Thujène	1,03	0,2	0,8	0,8	0,3	0,3	0,8	0,9	0,5	0,7	0,8	0,6	0,9	0,6	1,4
$\alpha$ -Pinène	1,03	9,4	8,8	11,5	14,0	9,9	10,4	10,5	8,2	18,8	8,5	22,2	14,2	15,7	15,1
Camphène	1,03	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2
Sabinène	1,03	2,3	3,4	3,4	1,8	2,1	1,0	0,8	0,0	1,4	0,1	0,4	1,4	0,2	0,7
$\beta$ -Pinène	1,03	0,8	1,2	1,3	1,3	1,1	1,1	1,1	0,8	1,6	0,8	1,6	1,2	1,1	1,5
Myrcène	1,03	9,1	30,8	18,5	11,6	8,0	19,8	12,2	7,9	2,1	6,7	3,5	2,2	16,6	11,2
$\delta$ -3-Carène	1,03	8,7	0,5	5,9	0,7	1,3	4,6	0,2	1,7	2,8	1,9	2,1	6,8	0,3	1,0
$\alpha$ -Terpinène	1,03	0,2	0,5	0,5	0,3	0,2	0,6	0,3	0,1	0,4	0,3	0,2	0,1	0,4	0,6
<i>p</i> -Cymène	0,99	0,3	0,4	0,4	0,4	1,2	0,5	0,7	0,4	0,9	0,3	0,3	1,3	0,3	0,4
Limonène*	1,03	0,5	0,6	0,7	0,5	1,4	0,8	1,1	0,5	1,2	0,5	0,8	0,7	1,2	1,0
$\beta$ -Phellandrène*	1,03	0,5	0,9	1,0	0,6	0,6	0,8	0,9	0,4	0,7	0,4	0,5	0,6	0,6	0,9
( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimène	1,03	1,4	0,9	1,5	1,3	1,0	1,8	1,7	1,5	1,6	0,8	2,1	1,1	2,1	2,4
$\gamma$ -Terpinène	1,03	0,4	1,1	1,1	0,4	0,1	1,3	0,9	0,4	1,0	0,8	0,6	0,5	0,9	1,4
Terpinolène	1,03	3,6	6,8	6,9	3,2	4,0	6,0	4,2	1,5	5,1	3,6	2,8	3,1	4,0	6,4
Linalol	1,30	0,2	0,2	0,4	0,3	0,5	0,2	1,2	0,5	0,5	0,2	0,3	0,4	0,3	1,0
para-Cymèn-8-ol	1,30	0,1	0,1	0,1	0,1	0,5	0,1	0,2	0,1	0,3	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1
Terpinéol-4	1,30	0,6	2,0	1,8	1,4	2,0	2,3	1,9	0,7	2,5	1,0	0,9	2,2	1,6	2,4
$\alpha$ -Terpinéol	1,30	0,2	0,2	0,4	0,3	0,4	0,4	1,0	0,3	0,9	0,2	0,3	0,3	0,6	0,9
Acétate de géranyle	1,59	0,7	0,5	0,4	1,6	0,7	0,8	0,3	0,5	0,5	1,6	1,3	1,3	0,3	0,6
$\alpha$ -Copaène	0,98	0,8	0,5	0,4	0,5	0,5	0,4	0,5	0,4	0,8	0,3	1,1	0,6	0,4	0,4
( <i>E</i> )- $\beta$ -Caryophyllène	0,98	28,8	24,4	25,3	25,0	29,1	21,6	33,0	38,5	26,0	23,6	30,5	24,9	18,1	28,1
( <i>E</i> )- $\beta$ -Farnésène	0,98	0,4	0,2	0,2	0,4	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,5	0,3
$\alpha$ -Humulène	0,98	4,8	4,0	3,9	4,2	4,7	3,6	5,4	6,7	4,4	4,4	5,0	4,4	3,0	4,6
2-Méthylbutyrate de phényléthyle*	1,59	0,1	0,5	0,9	0,8	0,4	0,7	1,1	0,6	0,9	0,6	0,6	0,8	0,7	0,9
Isovalérate de phényléthyle*	1,59	0,7	3,5	7,5	6,3	3,5	6,6	8,5	6,2	7,6	6,0	5,7	8,7	5,4	7,3
Germacrène D	0,98	1,2	0,7	0,3	0,4	0,3	0,1	0,1	-	0,3	-	0,4	0,1	0,1	0,1
$\alpha$ -Muuroolène	0,98	1,5	0,5	0,4	0,5	0,3	0,4	0,4	0,4	1,1	0,4	0,9	0,6	0,1	0,5
$\delta$ -Cadinène	0,98	1,2	0,4	0,4	0,7	0,6	0,4	0,6	0,7	0,6	0,8	2,0	0,6	0,8	0,7
( <i>E</i> )- $\alpha$ -Bisabolène	0,98	0,5	0,1	0,2	0,1	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,1	0,3	0,7	0,2
Oxyde de caryophyllène	1,53	1,1	0,8	0,9	1,5	3,3	0,9	2,9	4,4	2,4	1,5	1,6	4,8	0,7	1,1
Guaiol	1,30	0,4	0,1	0,1	0,4	0,2	0,1	0,2	0,4	0,1	0,3	0,1	0,3	0,3	0,3
Cembrène	0,98	1,5	0,9	0,5	3,8	0,4	3,1	0,4	1,2	1,7	8,4	2,5	1,4	5,9	1,0
Géranyl $\alpha$ -terpinène	0,98	0,7	0,3	0,2	1,4	0,2	0,9	0,1	0,3	0,5	2,3	0,7	0,5	1,5	0,3
Cembrène A	0,98	0,4	0,2	0,1	0,5	0,1	0,4	0,1	0,2	0,2	1,1	0,3	0,3	0,7	0,1
4-Épi-isocembrol*	1,30	1,7	1,3	0,4	2,1	0,4	1,8	0,4	0,8	1,2	6,3	1,5	2,0	3,4	0,5
Isocembrol*	1,30	1,3	1,0	0,3	1,2	0,3	1,2	0,3	0,5	0,8	3,9	1,1	1,4	2,2	0,4
Total		86,4	99,1	98,8	90,1	80,3	96,2	94,6	87,7	92,3	89,4	95,3	90,9	91,1	95,8

L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire (BP-1) ; \* : pourcentages donnés sur colonne polaire (BP-20) ; RF: facteurs de réponses de Bicchi *et al.* (2008).

Annexe II : Composition chimique des 46 échantillons d'huile essentielle de *P. halepensis* (% corrigé : g/100 g) (suite)

Composés	Stations		CAPO DI FENO																
	FR	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19
$\alpha$ -Thujène	1,03	0,3	0,7	0,4	1,0	0,5	0,7	0,7	1,0	0,8	0,5	0,5	0,2	0,6	0,3	0,7	0,6	0,3	0,3
$\alpha$ -Pinène	1,03	13,2	12,1	12,2	11,8	9,8	19,0	12,4	10,5	12,1	9,7	10,0	6,9	13,3	10,1	11,8	14,6	19,0	7,2
Camphène	1,03	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
Sabinène	1,03	3,4	6,1	2,2	7,0	0,7	1,6	1,8	7,1	2,1	5,8	5,8	1,7	6,0	5,8	8,2	4,4	2,8	3,2
$\beta$ -Pinène	1,03	0,9	1,2	1,0	1,5	0,8	1,4	1,0	1,3	1,2	1,3	1,3	0,6	1,6	1,4	1,8	1,4	1,7	0,8
Myrcène	1,03	7,6	7,5	4,7	13,8	4,3	12,4	3,8	6,2	20,3	14,2	21,9	6,8	20,6	27,3	6,4	8,4	18,7	8,8
$\delta$ -3-Carène	1,03	0,4	1,9	0,6	1,4	0,4	1,6	0,6	1,6	1,7	5,2	1,2	0,2	2,7	1,0	2,7	4,4	0,8	0,4
$\alpha$ -Terpinène	1,03	0,1	0,1	0,0	0,5	0,1	0,1	0,1	0,3	0,2	0,6	0,6	0,2	0,6	0,4	1,1	0,8	0,4	0,3
<i>p</i> -Cymène	0,99	0,6	0,6	0,4	0,5	0,2	0,4	0,4	0,5	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,2	0,0	0,2
Limonène*	1,03	0,6	0,5	0,9	0,6	0,4	1,7	0,4	0,8	0,5	0,8	0,8	0,7	0,8	0,8	0,7	1,3	0,4	0,8
$\beta$ -Phellandrène*	1,03	0,4	0,5	0,2	0,8	0,2	0,5	0,3	0,6	0,5	0,8	0,8	0,3	0,8	0,8	1,0	0,8	0,6	0,4
( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimène	1,03	0,5	0,6	0,1	0,9	1,1	0,6	0,4	0,4	0,8	1,2	1,2	0,7	1,3	0,5	0,6	1,4	0,4	0,9
$\gamma$ -Terpinène	1,03	0,2	0,3	0,1	0,9	0,2	0,3	0,2	0,7	0,4	1,1	1,1	0,4	1,0	0,8	1,8	1,5	0,6	0,6
Terpinolène	1,03	2,5	4,9	0,3	8,3	1,1	2,5	1,4	7,6	2,6	8,9	8,6	3,0	8,6	7,5	13,2	9,5	4,0	4,3
Linalol	1,30	0,3	0,1	0,5	0,3	0,2	0,2	0,2	0,5	0,2	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3
para-Cymèn-8-ol	1,30	0,2	0,5	0,5	0,3	0,1	0,1	0,3	0,2	-	-	-	-	0,1	-	0,0	0,0	-	0,1
Terpinéol-4	1,30	0,6	0,8	0,3	1,6	0,3	0,6	0,3	1,7	0,7	1,9	1,6	0,6	2,1	1,1	3,1	2,4	0,9	0,9
$\alpha$ -Terpinéol	1,30	0,1	0,1	0,4	0,2	0,1	0,2	0,1	0,6	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	0,3
Acétate de géranyle	1,59	0,2	0,9	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2	1,4	1,6	0,8	0,1	0,2	0,1	0,9	0,4	0,4	0,2	0,1
$\alpha$ -Copaène	0,98	0,8	0,7	0,6	0,4	0,8	1,0	0,6	0,5	0,6	0,6	0,4	0,9	0,5	0,5	0,0	0,6	0,4	0,4
( <i>E</i> )- $\beta$ -Caryophyllène	0,98	39,5	26,3	28,8	22,0	49,7	30,9	42,3	22,9	24,5	22,9	21,4	48,5	19,3	22,1	23,5	29,3	30,7	38,0
( <i>E</i> )- $\beta$ -Farnésène	0,98	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,6	0,3	0,5	0,4	0,5	0,2	6,2
$\alpha$ -Humulène	0,98	6,0	4,2	4,4	3,7	8,0	4,8	6,8	3,9	4,0	3,6	3,4	8,3	3,1	3,6	3,8	4,7	5,1	0,0
2-Méthylbutyrate de phényléthyle*	1,59	0,4	0,3	0,9	1,1	0,2	0,3	0,4	1,2	0,9	1,8	1,4	0,9	0,9	0,4	0,9	0,3	0,3	1,6
Isovalérate de phényléthyle*	1,59	4,7	4,3	7,3	8,9	2,7	3,9	4,6	9,2	6,7	11,4	10,0	10,7	6,9	4,9	7,1	2,4	3,0	11,3
Germacrène D	0,98	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	0,4	0,1	0,2	0,2	0,4	0,2	0,5	0,3	0,2	0,8	0,6	0,4	0,5
$\alpha$ -Muuroène	0,98	0,4	0,8	0,4	0,4	0,5	1,2	0,5	0,4	0,6	0,8	0,3	0,5	0,6	0,5	0,1	0,7	0,4	0,3
$\delta$ -Cadinène	0,98	0,7	0,3	0,2	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	0,6	0,9	0,7	0,9	0,6	0,9	0,2	0,8	0,4	0,7
( <i>E</i> )- $\alpha$ -Bisabolène	0,98	0,3	0,1	0,1	0,5	0,2	0,3	0,1	0,2	0,4	0,2	0,2	0,7	0,1	0,1	0,2	0,4	0,0	0,2
Oxyde de caryophyllène	1,53	2,8	3,6	8,1	1,1	3,1	2,1	4,2	1,9	1,7	0,4	0,3	1,2	0,5	0,3	0,7	0,5	0,4	1,7
Guaiol	1,30	0,3	0,1	0,2	0,3	0,5	0,1	0,6	0,4	0,2	0,8	0,4	0,4	0,5	0,6	2,1	0,4	0,1	0,4
Cembrène	0,98	0,4	0,3	0,0	0,5	0,6	0,3	0,6	1,1	0,7	1,5	1,3	0,8	0,9	2,0	0,9	2,1	2,0	0,5
Géranyl $\alpha$ -terpinene	0,98	0,2	0,2	0,0	0,3	0,3	0,1	0,3	0,6	0,3	0,9	0,8	0,5	0,5	1,3	0,2	1,0	1,1	0,0
Cembrène A	0,98	0,1	0,2	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,4	0,8	0,3	0,3	0,3
4- <i>Épi</i> -isocembrol*	1,30	0,3	1,4	0,2	0,7	0,9	0,4	0,8	2,4	1,2	1,1	0,9	0,6	0,8	1,6	1,0	1,3	1,1	0,5
Isocembrol*	1,30	0,2	1,2	0,1	0,5	0,6	0,3	0,6	1,8	0,9	0,6	0,6	0,4	0,5	1,0	0,6	0,8	0,6	0,4
Total		90,0	84,1	77,2	93,5	90,2	91,5	88,4	91,1	90,0	102,2	99,1	98,9	97,2	99,9	97,4	99,5	98,0	93,2

L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire (BP-1) ; \* : pourcentages donnés sur colonne polaire (BP-20) ; RF: facteurs de réponses de Bicchi *et al.* (2008).

*« La sagesse, c'est d'avoir des rêves suffisamment  
grands pour ne pas les perdre de vue  
lorsqu'on les poursuit. »*

*Oscar Wilde*



---

## ABSTRACT

---

Natural products isolated from plants acquired, in recent years, a growing success in many industries (aromatherapy, cosmetic, perfumes). The objective of our study was to contribute, on the one hand, to the development of methods involving  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR for the identification and quantification of the components of natural mixtures, and on the other hand, to the chemical characterization of two conifers brought to Corsica, Aleppo pine (essential oil) and atlas cedar (essential oil, pyrolysis oil and resins).

The first part concerned the quantification of squalene present in olive oil. Indeed, linear triterpene participated in the oxidative stability of olive oil and play an important role by decreasing some kind of cancers risks. It's deal with to elaborate an experimental part based on NMR  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  by using routine apparatus (9.4 Tesla). Quantification by NMR  $^{13}\text{C}$  is reliable and have been applied to squalene quantification in 25 samples of Corsican olive oil.

The second part of our work concerned the chemical characterization of the essential oil of Aleppo pine brought to Corsica in three different stations (Capo di Feno, Saleccia and Tre Padule de Suartone). A detailed analysis of cone essential oil, using the combination of chromatographic and spectroscopic techniques, leads to the identification of 48 compounds. Chemical composition is extensively dominated by monoterpens ( $\alpha$ -pinene and myrcene) and one olefinic sesquiterpen (*(E)*- $\beta$ -caryophyllene).  $^{13}\text{C}$  NMR allowed to the identification of various diterpens, particularly the 8,12-epoxy-14-labden-13-ol. This compound is described for the first time in aleppo pine essential oil. Fifteen samples of cone essential oil were analysed allowing differentiating three kinds of compositions:  $\alpha$ -pinene; myrcene;  $\alpha$ -pinene/myrcene. Finally, analysis of 47 samples of needles essential oil, associated with statistical treatment of the results (PCA and PFA), suggested the occurrence of an intraspecific chemical variability. Samples are divided into three groups, based on their high contents in *(E)*- $\beta$ -caryophyllene (groupe I), in *(E)*- $\beta$ -caryophyllene/ $\alpha$ -pinene/myrcene (groupe II) and in myrcene (groupe III).

The last part concerned the study of *Cedrus atlantica*. A detailed analysis of commercial essential oil leads to the identification of 20 constituents. Main compounds are  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -himachalene. Moreover, seven compounds, not yet referenced in our home-made NMR spectral data library, were identified by NMR  $^{13}\text{C}$ . Chemical compositions of handwork pyrolysis oils from Morocco were also dominated by the himachalene's and *(E)*- $\alpha$ -atlantone. Qualitative and quantitative analysis of 28 samples of *Cedrus atlantica* resins, obtained from the five Corsican forests referenced by the Office National des Forêts of Corsica (Bavella, Bonifato, Ospedale, Pineta and Vizzavona) have been done, without any step of chromatography. Beside resinic acids, we have been identified three lignans (pinoresinol, lariciresinol and lariciresinol-9-acetate). Qualitative and quantitative analysis of these compounds, leads to the occurrence of three types of chemical composition. Finally, we have developed and validated a method for quantification of lignans by  $^1\text{H}$  NMR.

Discipline: Organic and analytical chemistry

Key words: Natural mixture analysis, Essential oil, Pyrolysis oil, Olive oil, Oleoresins,  $^{13}\text{C}$  NMR,  $^1\text{H}$  NMR, Squalene, Lignans, *Olea europaea*, *Pinus halepensis*, *Cedrus atlantica*

---

## RIASSUNTU

---

I prudutti esciuti da a biomassa vegetale cunnoscenu dapoi qualch'anni un successu criscente inde industrie numerose ( aromaterapia, cosmetiche, muschi,...) L'ogettivu di u nostru studiu era di cuntribuisce: d'un cantu, à u sviluppu di metodi d'identificazione è di quantificazione di i custituanti di l'imbuleghji naturali per RMN  $^{13}\text{C}$  è RMN  $^1\text{H}$  (esempiu u squalène di l'oliu d'aliva) è d'un altru, à a caratterisazione chimica di dui cuniferi intruiti in Corsica : u pinu d'Alep (oliu essenziale) è u cedru di l'Atlas (oliu essenziale, oliu piroliticu è rasgia).

A prima parte, cuncerna a quantificazione di u squalène presente in l'oliu d'aliva. Di fatti, issu triterpene lineariu participa à a stabilità ossidativa di l'aliva è ghjoca un rollu maiò in a riduzione di i risichi di certi cancari. Era di primura di mette à u puntu un prutucollu sperimentale appughjatu à u RMN  $^1\text{H}$  o  $^{13}\text{C}$  ghjuvendusi d'un apparecchju di pratica (9,4 Tesla). A quantificazione da RMN  $^{13}\text{C}$  hà fattu prova d'affibilità è hè stata applicata à a quantificazione di u squalène in 25 campioni d'oliu d'aliva di Corsica.

A seconda parte di i nostri lavori cuncerna a caratterisazione chimica di l'oliu essenziale di u pinu d'Alep fattu entre in tre stazioni di Corsica (Capo di Feno, Saleccia, Tre Padule di Suartone). L'analisi stagliata di l'oliu essenziale di pignotti per associu di e tecniche cromatografiche è spettroscopiche hà permessu d'identificà 48 cumposti. A cumposizione chimica hè di modu largu supranita da i monoterpeni ( $\alpha$ -pinene è myrcene) è un sesquiterpene olifinicu ((E)- $\beta$ -caryophyllene). A RMN  $^{13}\text{C}$  hà permessu d'identificà diterpene svariati per un cità chè u 8,12-époxy-14-labden-13-ol. Stu cumpostu hè discritu per a prima volta in l'oliu essenziale di pinu d'Alep. L'analisi di 15 campioni d'oliu essenziale di pignotti hà messu in risaltu tre tipi di cumposizione :  $\alpha$ -pinene, myrcene è  $\alpha$ -pinene/myrcene. Infine, l'analisi di 47 campioni d'oliu essenziale di pinacule associatu à un trattamentu statisticu di e date (ACP, AFD), hà permessu di mette in risaltu una variabilità chimica intraspecifica. Cusi, i campioni si scumpertenu in tre gruppi in funzione di a so prupuzione in (E)- $\beta$ -caryophyllène (Gruppu I), (E)- $\beta$ -caryophyllène/ $\alpha$ -pinène/myrcène (Gruppu II) è myrcène (Gruppu III).

L'ultima parte, hè stata cunsacrata à u studiu di *Cedrus atlantica*. L'analisi stagliata d'un oliu essenziale commerciale (di u Maroccu) hà permessu d'identificà 20 cumponenti. I cumposti maghjoritarii (di primura) essendu i  $\alpha$ -,  $\beta$ - è  $\gamma$ -himachalène. D'altronde, 7 cumposti mancanti di a nostra biblioteca di date spettrale sò stati identificati per RMN  $^{13}\text{C}$ . E cumposizioni chimiche di l'olii pirolitichi artigianali di u Maroccu sò anch'elli supraniti per i himachilènes è a (E)- $\alpha$ -atlantone. Infine, emu realizatu l'analisi qualitativa è quantitativa per RMN, senza staccanza preliminarina, di 28 campioni di rasgia (pece) di *C. atlantica* raccolti in e 5 fureste di Corsica referenziate da l'ONF (Bavella, Bonifatu, Ospedale, Pineta è Vizzavona). Accantu di l'aciti rasgianinchi, avemu ancu identificati 3 lignanes (pinorésinol, laricirésinol è 9-acétate de laricirésinol). Per issi cumposti adduniti, emu messu in risaltu 3 tipi chimichi. Infine, emu messu à u puntu è valutatu un prutucollu sperimentale di quantificazione di i lignanes per RMN  $^1\text{H}$ .

Disciplina : Chimia organica è analitica

Parulle chjave : Analisi di l'imbuleghji cumplacati naturali, olii essenziali, olii pirolitichi, olii d'alivi, oleorasinchi, RMN  $^{13}\text{C}$ , RMN  $^1\text{H}$ , Squalène, lignanes, *Pinus halepensis*, *Olea europaea* *Cedrus atlantica*.

---

## RÉSUMÉ

---

Les produits issus de la biomasse végétale connaissent depuis quelques années un succès grandissant dans de nombreuses industries (aromathérapie, cosmétique, parfums, etc.). L'objectif de notre étude était, d'une part de contribuer au développement des méthodes d'identification et de quantification des constituants des mélanges naturels par RMN  $^{13}\text{C}$  et RMN  $^1\text{H}$  (par exemple le squalène dans l'huile d'olive), et d'autre part, de contribuer à la caractérisation chimique de deux conifères introduits en Corse, le pin d'Alep (huile essentielle) et le cèdre de l'Atlas (huile essentielle, huile pyrolytique et résine).

La première partie concerne la quantification du squalène présent dans l'huile d'olive. En effet, ce triterpène linéaire participe à la stabilité oxydative de l'huile d'olive et joue un rôle important dans la réduction des risques de certains cancers. Il s'agissait de mettre au point un protocole expérimental basé sur la RMN  $^1\text{H}$  ou  $^{13}\text{C}$  en utilisant un appareil de routine (9,4 Tesla). La quantification par RMN  $^{13}\text{C}$  s'est avérée fiable et elle a été appliquée à la quantification du squalène dans 25 échantillons d'huile d'olive de Corse.

La seconde partie de nos travaux concerne la caractérisation chimique de l'huile essentielle de pin d'Alep introduit dans trois stations de Corse (Capo di Feno, Saleccia et Tre Padule de Suartone). L'analyse détaillée de l'huile essentielle de cônes, par combinaison des techniques chromatographiques et spectroscopiques, a permis d'identifier 48 composés. La composition chimique est largement dominée par les monoterpènes ( $\alpha$ -pinène et myrcène) et un sesquiterpène oléfinique ((E)- $\beta$ -caryophyllène). La RMN  $^{13}\text{C}$  a permis d'identifier divers diterpènes, dont le 8,12-époxy-14-labdèn-13-ol. Ce composé est décrit pour la première fois dans l'huile essentielle de pin d'Alep. L'analyse de 15 échantillons d'huile essentielle de cônes a mis en évidence trois types de compositions :  $\alpha$ -pinène ; myrcène ;  $\alpha$ -pinène/myrcène. Enfin, l'analyse de 47 échantillons d'huile essentielle d'aiguilles, associée à un traitement statistique des données (ACP, AFD), a permis de mettre en évidence une variabilité chimique intraspécifique. Ainsi, les échantillons se répartissent en trois groupes selon leur teneur en (E)- $\beta$ -caryophyllène (groupe I), en E- $\beta$ -caryophyllène/ $\alpha$ -pinène/myrcène (groupe II) et en myrcène (groupe III).

La dernière partie a été consacrée à l'étude de *Cedrus atlantica*. L'analyse détaillée d'une huile essentielle commerciale (du Maroc) a permis d'identifier 20 constituants, les composés majoritaires sont les  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -himachalène. Par ailleurs, 7 composés absents de notre bibliothèque de données spectrales ont été identifiés par RMN  $^{13}\text{C}$ . Les compositions chimiques des huiles pyrolytiques artisanales du Maroc sont également dominées par les himachalènes et la (E)- $\alpha$ -atlantone. Enfin, nous avons réalisé l'analyse qualitative et quantitative par RMN  $^{13}\text{C}$ , sans séparation préalable, de 28 échantillons de résine de *C. atlantica* récoltés dans les 5 forêts de Corse référencées par l'ONF (Bavella, Bonifato, Ospedale, Pineta et Vizzavona). A côté des acides résiniques, nous avons également identifié 3 lignanes (pinorésinol, laricirésinol et 9-acétate de laricirésinol). Pour l'ensemble de ces composés, nous avons mis en évidence trois types chimiques. Enfin, nous avons mis au point et validé un protocole expérimental de quantification des lignanes par RMN  $^1\text{H}$ .

Discipline : Chimie organique et analytique

Mots clés : Analyse des mélanges complexes naturels, Huiles essentielles, Huiles pyrolytiques, Huiles d'olives, Oléorésines, RMN  $^{13}\text{C}$ , RMN  $^1\text{H}$ , Squalène, Lignanes, *Olea europaea*, *Pinus halepensis*, *Cedrus atlantica*