



HAL
open science

Caractérisation chimique d'huiles essentielles de Corse et du Vietnam. La RMN du carbone-13, outil d'analyse des mélanges naturels.

Ophélie Bazzali

► To cite this version:

Ophélie Bazzali. Caractérisation chimique d'huiles essentielles de Corse et du Vietnam. La RMN du carbone-13, outil d'analyse des mélanges naturels.. Chimie analytique. Université de Corse Pascal Paoli 2016. Français. NNT: . tel-01340043

HAL Id: tel-01340043

<https://theses.hal.science/tel-01340043>

Submitted on 30 Jun 2016

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

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



UNIVERSITE DE CORSE-PASCAL PAOLI
ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT ET SOCIETE
UMR CNRS 6134 (SPE)



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

Soutenue publiquement par
OPHELIE BAZZALI

le 19 mai 2016

Caractérisation chimique d'huiles essentielles
de Corse et du Vietnam.
La RMN du carbone-13, outil d'analyse des mélanges naturels

Directeurs :

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

Rapporteurs :

Mme Chahrazed Bekhechi, MC-HDR, Université de Tlemcen
M. Hervé Casabianca, IGR CNRS (HDR), Institut des Sciences Analytiques

Jury

M. Jean-Jacques Filippi, MC-HDR, Université de Nice Sophia Antipolis
M. Alain Muselli, Professeur, Université de Corse
Mme Chahrazed Bekhechi, MC-HDR, Université de Tlemcen
M. Hervé Casabianca, IGR CNRS (HDR), Institut des Sciences Analytiques
M. Félix Tomi, Professeur, Université de Corse
M. Ange Bighelli, Professeur, Université de Corse

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. Leur expérience et leur disponibilité ont permis la réalisation de cette thèse. 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 Madame Chahrazed Bekhechi (Maître de Conférences-HDR, Université de Tlemcen) et Monsieur Hervé Casabianca (Ingénieur de recherche CNRS, HDR, Institut des Sciences Analytiques de Villeurbanne) en acceptant d'être les rapporteurs de ce travail. Je suis très heureuse de bénéficier de leurs recommandations et je tiens à leur exprimer ma sincère reconnaissance pour cette marque d'intérêt.

Que Messieurs Jean-Jacques Filippi (Maître de Conférences-HDR, Université de Nice) et Alain Muselli (Professeur, Université de Corse), qui ont accepté de participer à cette Commission d'Examen, trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements pour l'intérêt qu'ils ont 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.

Mes remerciements vont également à Mesdames Pascale Bradesi et Dominique de Rocca Serra (MC, Université de Corse) et à Messieurs Vincent Castola (Professeur, Université de Corse) et Marc Gibernau (Chargé de Recherche, CNRS) pour leur sympathie.

Je tiens à remercier M. Nicolas Baldovini (MC, Institut de Chimie de Nice) pour m'avoir accueilli au sein de l'Institut de Chimie de Nice et avoir partagé son expérience en matière de CPG-Olfactométrie. Merci également à M. Patrick Paquet (gérant de la société Corsica Essences) pour avoir permis la caractérisation olfactive de quelques échantillons dans le cadre de notre étude sur les huiles essentielles de myrte.

A Mme Marie-Christine Bosquet (membre du personnel CNRS) ainsi qu'aux membres de l'équipe « Système à Sources Renouvelables d'Energie », une vive reconnaissance pour leur soutien moral et leur sympathie. Je pense également à mes collègues jeunes Docteur de Corte, Elodie Romagnoli et Sabrina Jacopini, un grand merci pour leur gentillesse.

Merci également à mes camarades de l'équipe « Chimie et Biomasse » : Tao, Gaby, Sylvain, Mathieu, Zana, Thierry, Khadija, Delphin et tant d'autres. Votre présence et votre

soutien m'ont permis de garder le sourire tout au long de cette thèse et de partager des moments de fou rire et de détente si importants au cours de ces années !

Malgré ma grande pudeur, je ne saurais oublier de dire mon amitié sincère à deux femmes. Mme Cathy Lugrezi, ma petite Cathy si généreuse et si ouverte d'esprit, merci pour ton soutien et ton amitié. Mme Anne-Marie Nam (peux-être aurais-tu préféré que je conserve le Mlle !), merci d'avoir su partager si agréablement ces quelques années.

Merci également à mes amis géniaux, Fred et Caro ! Fred, quelques mois de Master en ta compagnie ont suffi à me faire plonger dans l'univers terrible des blagues et jeux de mots ... souvent nuls mais tellement drôles !!

A mes belles amies, Marie-Jo (ma « mini Jo ») et Géraldine, mille merci pour nos discussions si réconfortantes et agréables, si drôles aussi, qui ont su (et savent toujours !) me remonter le moral plus d'une fois ! Vous comptez tellement pour moi ...

Je remercie enfin ma famille ... nul besoin d'en dire une tartine car vous me connaissez et me savez peu expansive ! Mais à travers ces simples mots, les personnes qui me sont proches traduiront mon sentiment, j'en suis certaine.

A mon mari, tu ne croyais pas que je profiterais de cette thèse pour te dire une multitude de compliments ? Tu rêves mon petit ! Je tiens simplement à te féliciter pour avoir relevé le défi de me supporter et d'avoir osé passer la bague au doigt ... ou bien la corde au cou (plus approprié certainement) ! Et merci de nous avoir donné la plus belle de toutes les merveilles du monde, notre petite bébinette Molly, celle qui a su me donner la force, le courage et tant de joie au cours de ces derniers mois. Merci ma fille de rendre chaque jour plus merveilleux grâce à ta présence, ta joie de vivre et tes discours approximatifs ponctués de quelques « Mamannnnn ! » prononcés avec tant de douceur !

SOMMAIRE

INTRODUCTION	9
CHAPITRE I - IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS D'UN MELANGE NATUREL	15
I. ANALYSE PAR COUPLAGES « EN LIGNE » : VOIE A	17
I.1. La CPG associée aux indices de rétention	18
I.2. Couplage de la CPG avec des techniques spectroscopiques.....	19
I.2.1. Couplages associant la CPG à la SM : CPG-SM, CPG-SM(ICP), CPG-SM(ICN) et CPG-SM-SM ..	19
I.2.2. La CPG bidimensionnelle (CPGxCPG)	22
• CPG bidimensionnelle par « heart-cutting »	22
• CPG bidimensionnelle intégrale (« Comprehensive GC x GC »)	23
I.2.3. Couplage CPG-Olfactométrie (CPG-O)	23
II. IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS APRES SEPARATION (VOIE B)	26
III. METHODE D'IDENTIFICATION PAR RMN ¹³ C, SANS SEPARATION PREALABLE (VOIE C).....	28
III.1. Intérêt de la RMN ¹³ C	29
III.2. Identification de constituants en mélange par RMN ¹³ C	30
III.2.4. Observation des signaux.....	30
III.2.5. Individualisation des signaux	31
III.2.6. Attribution des signaux	32
III.3. La méthode d'analyse développée au laboratoire	36
III.3.1. Le principe de la méthode	36
III.3.2. Application à l'analyse d'huiles essentielles.....	39
• Identification de molécules qui co-éluent	40
• Identification de stéréoisomères.....	40
• Identification de molécules thermosensibles	41
• Combinaison de la chromatographie sur colonne et de la RMN ¹³ C.....	42
• Combinaison de l'hémisynthèse et de la RMN ¹³ C.....	42
III.3.3. Autres applications	43
III.3.4. Etude de la variabilité chimique	43
CHAPITRE II - CARACTERISATION CHIMIQUE D'HUILES ESSENTIELLES DU VIETNAM	47
I. TRAVAUX ANTERIEURS REALISES AU LABORATOIRE RELATIFS A LA CONNAISSANCE DES HUILES ESSENTIELLES DU VIETNAM	48
I.1. Huiles essentielles analysées par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ¹³ C	49
I.2. Identification de molécules absentes des bibliothèques de spectres de masse.....	51
I.3. Identification de molécules qui co-éluent sur les colonnes utilisées pour les analyses par CPG et CPG-SM	54
I.4. Identification de molécules qui ne sont pas assez volatiles pour être éluées en CPG et CPG-SM	55
I.5. Identification de stéréoisomères.....	56
I.6. Identification par « reconstruction » de spectre.....	59
I.7. Identification après isolement des composés	60
II. HUILES ESSENTIELLES DU VIETNAM ETUDIEES DANS LA SUITE DE CE CHAPITRE.	62
A. CARACTERISATION CHIMIQUE D'HUILES ESSENTIELLES DU GENRE <i>CLAUSENA</i> : <i>C. INDICA</i> (DALZELL) OLIVER ET <i>C. ANISUM-OLENS</i> (BLANCO) MERRILL.	63
I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	63
II. LES HUILES ESSENTIELLES DE <i>C. INDICA</i> ET <i>C. ANISUM-OLENS</i> ORIGINAIRES DU VIETNAM.	67
II.1. Etude de la composition chimique de l'huile essentielle de <i>Clausena indica</i> (Dalzell) Oliver : illustration de la méthode.....	67
II.2. Etude de la composition chimique de l'huile essentielle de <i>Clausena anisum-olens</i> (Blanco) Merrill.	72
• Identification de l'isogéranial (synonyme : (<i>E</i>)-isocitral).....	76
• Identification de l'isonéral (synonyme : (<i>Z</i>)-isocitral)	76

B. CARACTERISATION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>CUNNINGHAMIA KONISHII</i> HAYATA.....	79
I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	80
II. ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE BOIS DE <i>C. KONISHII</i> HAYATA.....	83
C. CARACTERISATION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES D'<i>ASARUM CORDIFOLIUM</i> ET <i>ASARUM GLABRUM</i> MERRILL C.E.C. FISCHER DU VIETNAM.	87
I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	87
II. L'HUILE ESSENTIELLE D' <i>ASARUM CORDIFOLIUM</i> : NOUVELLE ESPECE RECENSEE AU VIETNAM.....	89
II.1. Description botanique	89
II.2. Etude de la composition chimique de l'huile essentielle.....	90
III. L'HUILE ESSENTIELLE D' <i>ASARUM GLABRUM</i>	92
III.1. Description botanique.....	92
III.2. Etude de la composition chimique de l'huile essentielle	93
D. LES HUILES ESSENTIELLES DE <i>CUPRESSUS TONKINENSIS</i>.....	98
I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	99
II. ANALYSE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE FEUILLES.....	101
II.1. Analyse directe de l'huile essentielle par CPG-SM, CPG(Ir) et RMN ¹³ C.....	102
II.2. Fractionnement de l'huile essentielle de feuilles.....	102
I.1.1. Etude des fractions hydrocarbonées.....	102
I.1.2. Etude des fractions oxygénées.....	103
III. ANALYSE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE TIGES.....	105
E. EXTRACTION DES DONNEES DE RMN ¹³C : APPLICATION A L'IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>XANTHOCYPARIS VIETNAMENSIS</i> FARJON ET HIEP.	108
I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	108
II. ANALYSE PAR CPG(IR), CPG-SM ET RMN ¹³ C DE L'HUILE ESSENTIELLE BRUTE.....	111
III. FRACTIONNEMENT DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>X. VIETNAMENSIS</i>	112
III.1. Chromatographie sur colonne ouverte de silice de type « flash ».....	112
III.2. Fractionnements sur colonne ouverte de silice (F2, F8 et F9).....	113
IV. IDENTIFICATION DE COMPOSES ABSENTS DE LA BANQUE « TERPENES ».....	118
IV.1. Identification du 1,4-cinéole.....	118
IV.2. Identification du déhydrojinkoh-érémol.....	119
IV.3. Identification du composé A.....	119
IV.4. Identification du composé B.....	124
IV.5. Identification du composé C	126
<u>CHAPITRE III - CARACTERISATION CHIMIQUE DE DEUX ESPECES DU GENRE <i>MYRTUS</i> : <i>M. NIVELLEI</i> ET <i>M. COMMUNIS</i></u>	<u>131</u>
I. ASPECTS BOTANIQUES.....	132
I.1. <i>Myrtus communis</i>	133
I.2. <i>Myrtus nivellei</i>	134
II. USAGES POPULAIRES	135
II.1. <i>Myrtus communis</i>	135
II.2. <i>Myrtus nivellei</i>	136
III. PHYTOCHIMIE ET ACTIVITES BIOLOGIQUES.....	137
III.1. <i>Myrtus communis</i>	137
III.2. <i>Myrtus nivellei</i>	142
A. MYRTUS NIVELLEI BATT. ET TRAB.....	144
I. CARACTERISATION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>MYRTUS NIVELLEI</i> BATT. & TRAB.....	144
I.1. Analyse détaillée d'un échantillon d'huile essentielle de feuilles de <i>M. nivellei</i>	144
I.1.1. Fractionnement de l'huile essentielle brute.....	145
• Identification des composés A et B par RMN bidimensionnelle.....	148
II. ETUDE DE LA VARIABILITE CHIMIQUE ET DU POTENTIEL BIOLOGIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>M. NIVELLEI</i>	152

B. MYRTUS COMMUNIS L.....	155
I. ANALYSE DETAILLEE D'UN ECHANTILLON COMMERCIAL D'HUILE ESSENTIELLE DE <i>MYRTUS COMMUNIS</i> L. DE CORSE.....	157
I.1. Fractionnement de l'huile essentielle commerciale.....	158
I.1.1. Etude de la fraction hydrocarbonée (F1)	159
I.1.2. Etude des fractions oxygénées (F2-F9)	159
II. ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE D'HUILES ESSENTIELLES DE <i>MYRTUS COMMUNIS</i> L. DE CORSE ET DU BASSIN MEDITERRANEEN.	167
III. CARACTERISATION OLFACTIVE DES HUILES ESSENTIELLES DE FEUILLES DE <i>M. COMMUNIS</i> L. CONTRIBUTION DES ESTERS A CHAINE COURTE.	170
III.1. Analyse sensorielle des esters et de quelques huiles essentielles de myrte.	170
III.2. Analyse sensorielle d'un échantillon d'huile essentielle de myrte de Corse par CPG-O.....	172
<u>PARTIE EXPERIMENTALE.....</u>	181
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u>	189
<u>ANNEXES</u>	213

Introduction

Ce travail de thèse, financé par la Collectivité Territoriale de Corse, est réalisé dans le cadre des recherches auxquelles se consacre, depuis plus d'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 ».

L'objectif global est de caractériser les produits issus de la biomasse en vue de leur valorisation. En effet, depuis de nombreuses années, particulièrement suite aux chocs pétroliers, la biomasse suscite un grand intérêt du fait de sa potentialité dans le domaine des énergies renouvelables (biocarburants, biocombustibles) ou encore comme source de produits industriels à forte valeur ajoutée (huiles essentielles, extraits végétaux, résines). Aujourd'hui, l'aromathérapie/phytothérapie connaît un succès grandissant et les secteurs de la cosmétique, de la parfumerie, de la pharmacie ou encore de l'agroalimentaire se tournent de plus en plus vers l'utilisation de produits biosourcés. La réglementation REACH, entrée en vigueur en 2007, tend à favoriser ces produits, tout en encadrant leur utilisation.

Un produit naturel se présente presque toujours sous la forme d'un mélange complexe pouvant renfermer une centaine (et parfois davantage) de composés, appartenant ou non à une même famille chimique. Or, la valorisation de ces produits naturels nécessite généralement une connaissance précise de leur composition chimique, que ce soit pour les caractériser, pour en contrôler la qualité ou bien encore pour mettre en évidence une éventuelle spécificité. Leur analyse constitue de ce fait une étape primordiale. Dans le cas de produits originaires d'une région insulaire telle que la Corse, l'accent doit être mis sur la qualité du produit et l'existence d'un particularisme peut constituer un atout lors de la commercialisation.

Dans ce contexte, de nombreuses techniques analytiques existent aujourd'hui pour permettre d'identifier les constituants d'un mélange naturel. Le choix de ces techniques se fait en fonction de l'objectif fixé (analyse de routine ou étude approfondie), de la complexité du mélange naturel et de la nature des constituants. Deux voies sont généralement privilégiées :

- la première voie correspond au couplage en ligne d'une ou plusieurs techniques chromatographiques (individualisation des constituants) avec une ou plusieurs techniques spectroscopiques. L'identification des constituants se fait par comparaison de leurs données spectrales avec celles de produits de référence contenues dans une bibliothèque de spectres. La Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG-SM), associée aux indices de rétention (Ir), est la technique analytique la plus couramment utilisée pour l'analyse de routine des huiles essentielles. Néanmoins, elle montre ses limites lorsque

les constituants à identifier présentent des structures très proches (cas des stéréoisomères notamment), des couples d'indices de rétention très voisins ou encore des spectres de masse insuffisamment différenciés ;

- la seconde voie, bien que plus longue à mettre en œuvre, est plus fiable pour identifier des molécules absentes des bibliothèques de spectres ou encore pour la caractérisation structurale de nouvelles molécules. Elle repose sur une étape de purification des constituants par différentes techniques chromatographiques, préalable à une étape d'identification. Cette dernière étape se fait également par comparaison de leurs données spectrales avec celles de référence, en y incluant notamment la RMN ^1H , la RMN ^{13}C , et surtout la RMN 2D, dans le but d'apporter des informations précieuses sur le squelette carboné de la molécule et les fonctions présentes.

Parallèlement, la RMN ^{13}C comme outil analytique a connu ces dernières années un essor important. Ainsi, à la suite des travaux de Formáček et Kubeczka (utilisation de la RMN ^{13}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}C , permettant l'identification des constituants des mélanges complexes naturels sans séparation 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, ce travail présentait deux objectifs principaux :

- contribuer à la caractérisation de plantes originaires du Vietnam à travers la composition chimique de leurs huiles essentielles, dans le cadre d'une collaboration que notre équipe mène depuis une vingtaine d'année avec divers centres de recherche de Hanoi. Pour se faire, les techniques et méthodes de séparation et d'identification des constituants ont été adaptées à la complexité du mélange, afin d'identifier avec certitude un maximum de constituants des huiles essentielles, d'isoler et de réaliser l'analyse structurale de nouvelles

molécules si nécessaire. Les plantes originaires du Vietnam étudiées (7 espèces) appartiennent à trois familles différentes : la famille des Rutacées (*Clausena indica* et *Clausena anisumolens*), la famille des Aristolochiacées (*Asarum glabrum* et *Asarum cordifolium*) et la famille des Cupressacées (*Cunninghamia konishii*, *Cupressus tonkinensis* et *Xanthocyparis vietnamensis*) ;

- contribuer à la caractérisation chimique de l'huile essentielle de *Myrtus nivellei* d'Algérie, jamais décrite jusqu'alors, en prenant part à un projet commun associant trois universités : Annaba, Corte et Coimbra, et étudier les huiles essentielles de *Myrtus communis* du pourtour méditerranéen à travers leur composition chimique et leur aspect olfactif, en portant une attention particulière aux composés oxygénés minoritaires, notamment des esters à chaîne courte.

Ainsi, dans le premier chapitre, nous décrivons les principales techniques analytiques utilisées pour la caractérisation chimique d'une huile essentielle et à travers quelques exemples, nous mettrons en évidence leurs avantages et leurs limites. Nous présenterons également la méthode d'analyse par RMN ¹³C développée au laboratoire, en soulignant ses potentialités pour identifier les constituants d'un mélange naturel et sa complémentarité avec différentes techniques analytiques conventionnelles.

Le deuxième chapitre sera consacré à la caractérisation chimique d'huiles essentielles de différentes espèces originaires du Vietnam. Nous décrivons tout d'abord la composition chimique détaillée des huiles essentielles de *Clausena indica* (à travers laquelle nous illustrerons la méthode d'analyse par RMN ¹³C), *Clausena anisumolens*, *Asarum glabrum*, *Asarum cordifolium* et *Cunninghamia konishii*, par la mise en œuvre de techniques analytiques conventionnelles (CPG(Ir) et CPG-SM) associées à la RMN ¹³C. Puis, nous reporterons la composition chimique des huiles essentielles de *Cupressus tonkinensis* et *Xanthocyparis vietnamensis*, plus complexes que les précédentes, pour lesquelles une ou plusieurs étapes de fractionnement par chromatographie sur colonne ouverte de silice ont été réalisées avant analyse par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ¹³C. Pour l'huile essentielle de *X. vietnamensis*, très riche en sesquiterpènes, nous présenterons l'identification de composés absents de nos bibliothèques de spectres ou non décrits dans la littérature au moyen d'analyses structurales par RMN bidimensionnelle.

Enfin, le troisième chapitre sera dédié aux huiles essentielles de deux espèces du genre *Myrtus* : *Myrtus nivellei*, endémique du Sahara et *Myrtus communis*, très abondante dans les îles et pays du bassin méditerranéen. Il s'articule en deux parties :

- la première est relative à l'huile essentielle de feuilles de *Myrtus nivellei*, jamais décrite jusqu'alors. Notre travail s'inscrit dans une collaboration entre trois universités : Annaba (étude ethnopharmacologique), Corse (détermination de la composition chimique avec étude structurale de molécules présentes à des teneurs non négligeables et absentes de nos bibliothèques de spectres) et Coimbra (activités antifongiques et cytotoxiques). Nous décrirons la composition chimique détaillée d'un échantillon en utilisant la combinaison de plusieurs fractionnements sur colonne de silice avec l'analyse par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ^{13}C , ainsi que l'étude structurale de molécules absentes de nos bibliothèques de spectres. Enfin, nous reporterons la composition chimique de 10 échantillons d'huiles essentielles de feuilles récoltées dans deux stations distinctes et nous présenterons le bilan des études concernant la variabilité chimique et les activités antifongiques et cytotoxiques ;

- la seconde concerne les huiles essentielles de *Myrtus communis* et tout particulièrement les composés oxygénés minoritaires susceptibles de contribuer de façon significative à leur odeur. Nous présenterons tout d'abord l'analyse détaillée d'un échantillon commercial d'huile essentielle de Corse par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ^{13}C , après fractionnement sur colonne de silice. Puis nous décrirons la composition chimique de 65 échantillons de Corse et de plusieurs localités du pourtour méditerranéen (Algérie, Maroc, Portugal, Sardaigne et Tunisie). Enfin, nous reporterons une caractérisation olfactive de l'huile essentielle de *M. communis* en relation avec la présence d'esters minoritaires ainsi qu'une étude préliminaire menée par CPG-Olfactométrie.

Chapitre I

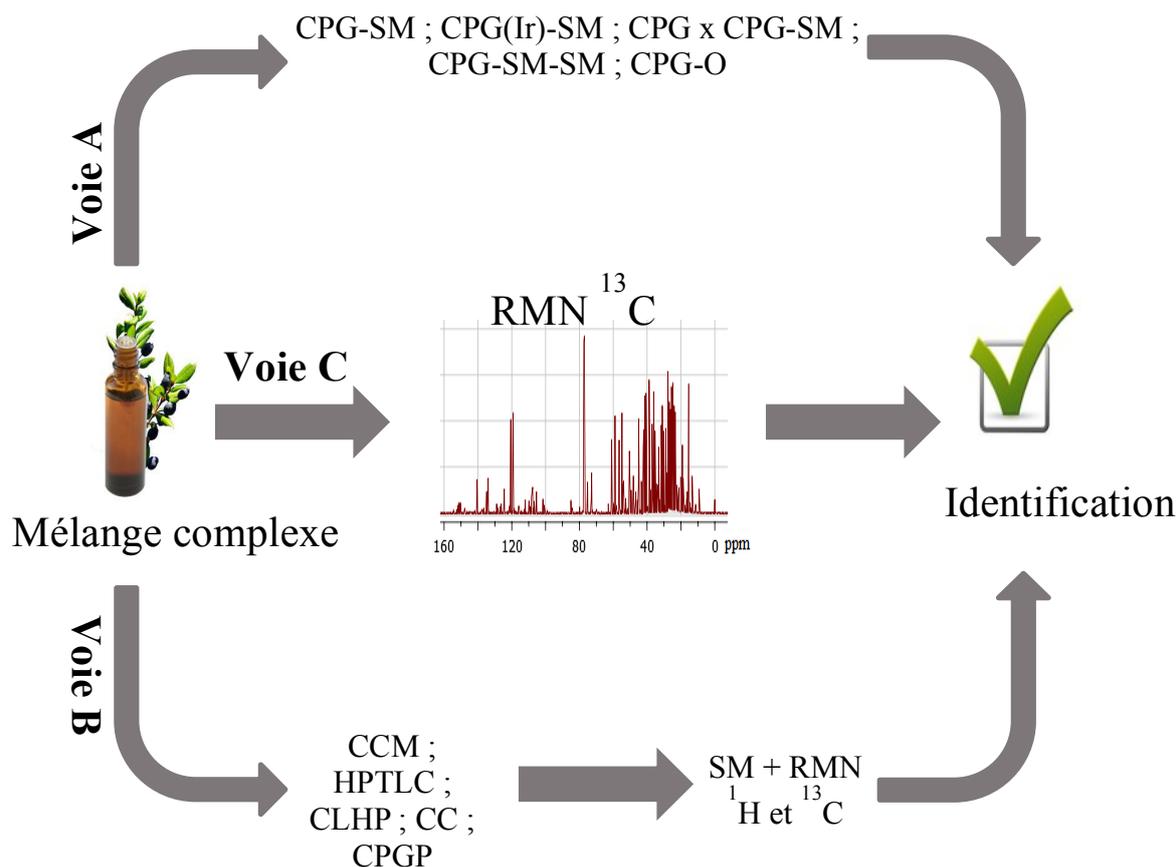
Identification des constituants d'un mélange naturel

Les produits naturels issus de la biomasse (huiles essentielles, huiles végétales, extraits, résines, etc.) se présentent pratiquement toujours sous la forme d'un mélange complexe constitué de plusieurs dizaines, voire de plus d'une centaine de composés en proportions variables. Les huiles essentielles (HE), obtenues par entraînement à la vapeur d'eau par hydrodistillation de diverses parties du végétal ou par expression à froid de certains fruits (agrumes), sont des mélanges complexes de diverses molécules, principalement des mono-, sesqui- et parfois diterpènes ainsi que des phénylpropanoïdes. A la fois odorantes et parfois biologiquement actives, les huiles essentielles font partie intégrante du secteur des PAM (Plantes Aromatiques et Médicinales) et trouvent de nombreuses utilisations dans des secteurs industriels très divers, principalement en parfumerie, en cosmétique, en pharmaceutique et en agroalimentaire. Les hydrolats, commercialement nommés « eaux florales », correspondent à la phase aqueuse qui se sépare de l'huile essentielle à la sortie de l'alambic ou dans un essencier. Les extraits d'hydrolat renferment également des composés terpéniques, principalement. Les hydrolats peuvent être obtenus en quantité beaucoup plus importante que les huiles essentielles et font l'objet d'une demande croissante dans le domaine de la cosmétique. Néanmoins, leur conservation s'avère plus délicate en raison des risques de proliférations bactériennes pouvant survenir avec des phases aqueuses.

La valorisation de ces produits naturels, quel que soit leur secteur d'application, passe nécessairement par une étape de caractérisation (analyse chimique) afin d'en contrôler la qualité et de mettre en évidence une éventuelle spécificité. Afin d'identifier et de quantifier les constituants de ces mélanges, le choix des techniques analytiques utilisées dépend de l'objectif fixé (analyse de routine ou étude approfondie) et de la complexité du mélange (nombre et nature des constituants). Cependant, ce travail délicat nécessite souvent l'utilisation conjointe de plusieurs techniques analytiques complémentaires. L'analyse de la composition chimique d'un mélange naturel, tel qu'une huile essentielle, s'effectue de manière conventionnelle selon les voies A et B (**Figure I.1**).

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 ^{13}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.

Figure I.1 : Méthodes d'analyse d'un mélange complexe.



CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse ; SM : Spectrométrie de Masse ; CPG-O : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à l'Olfactométrie ; 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 de Haute Performance.

I. Analyse par couplages « en ligne » : voie A

Ce type d'analyse associe une (ou plusieurs) technique(s) chromatographique(s) (individualisation et quantification des constituants) à une (ou plusieurs) technique(s) spectroscopique(s) (identification des constituants par comparaison de leurs données spectrales avec celles des produits de référence contenus dans des banques de données spectrales, généralement informatisées). Cette voie est particulièrement bien adaptée aux analyses de routine, notamment dans le cas de contrôles qualités d'échantillons d'huiles essentielles ou d'extraits végétaux dont les constituants ne présentent pas de difficultés d'identification.

I.1. La CPG associée aux indices de rétention

On attribue la découverte de la chromatographie en phase gazeuse (CPG) à Martin et Synge, qui publient dès 1941 la théorie de la chromatographie de partage (Prix Nobel de chimie en 1950). Cette technique d'analyse est l'une des plus utiles et des plus répandues dans les laboratoires d'analyse, notamment en raison de son coût modéré, de son automatisation et de sa robustesse. La CPG est couramment utilisée dans le domaine des mélanges complexes tels que les huiles essentielles. Elle permet, en effet, l'individualisation de composés naturellement volatils mais s'applique également à des molécules qui, par des réactions de dérivatisation (acétylation, silylation), sont rendues volatiles à des températures ne provoquant par leur décomposition (Bielicka-Daskiewicz *et al.*, 2004 ; Rojas-Escudero *et al.*, 2004). Leur détection est possible même pour des teneurs inférieures au nanogramme. Cette technique présente également une bonne adaptabilité, grâce à un grand choix de phases stationnaires, de phases mobiles (hélium, argon, azote ou encore hydrogène) et de températures (isotherme ou programmée). La CPG permet aussi, grâce à la comparaison des aires des pics, de fournir une quantification relative des constituants.

L'identification d'un composé ne peut être basée uniquement sur la connaissance de son temps de rétention (t_r). En effet, cette valeur dépend fortement de plusieurs paramètres concernant la phase stationnaire (nature, vieillissement) et les conditions expérimentales (programmation de température). Aussi, dans le domaine des huiles essentielles, les constituants sont caractérisés par un couple d'indices de rétention (I_r) (plus fiables que les temps de rétention), l'un obtenu sur colonne apolaire, l'autre sur colonne polaire (colonnes capillaires). Ceux-ci sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme d'étalon d'alcane linéaires à température constante (Indice de Kovats, IK) (Kovats, 1965) ou en programmation de température (Indices de rétention, I_r) (Van Den Dool et Kratz, 1963). Ils sont ensuite comparés avec ceux de composés de référence, mesurés au laboratoire ou décrits dans la littérature.

Cependant, pour un même composé, il est fréquent de constater des écarts lorsque l'on compare les indices de rétention obtenus au laboratoire avec ceux de la littérature, tout particulièrement pour les composés élués les derniers sur colonne polaire. Il est *a fortiori* impossible d'identifier des sesquiterpènes uniquement sur la base des indices de rétention. Joulain (1994) remarque d'ailleurs que 230 sesquiterpènes de même masse moléculaire se répartissent sur une plage de seulement 300 unités d'indices de rétention. Nous pouvons également citer des cas de co-élution : le limonène qui co-élue avec le β -phellandrène sur

colonne apolaire (BP-1) ou encore le β -curcumène qui co-élue avec l' α -bulnesène sur colonne apolaire (BP-1) et avec le (*Z*)- α -bisabolène sur colonne polaire (BP-20). Ainsi, si la CPG seule reste adaptée pour l'identification de composés dans le cas d'analyses répétitives pour des contrôles de qualité par exemple (screening), elle permet difficilement la caractérisation chimique d'une huile essentielle. C'est pourquoi divers couplages de la CPG avec des techniques spectroscopiques ont été développés, leur utilisation rendant plus fiable l'identification des composés.

1.2. Couplage de la CPG avec des techniques spectroscopiques

1.2.1. Couplages associant la CPG à la SM : CPG-SM, CPG-SM(ICP), CPG-SM(ICN) et CPG-SM-SM

Le couplage de la CPG avec la spectrométrie de masse en mode impact électronique, dit CPG-SM(IE), est la technique la plus fréquemment utilisée dans les laboratoires d'analyses. Dans la majorité des cas, ce procédé permet d'une part, d'obtenir des informations structurales sur un composé, notamment sa masse moléculaire, et d'autre part, d'identifier un composé en comparant son spectre de masse à ceux contenus dans des bibliothèques informatisées. Un grand nombre de bibliothèques de spectres de masse sont commercialisées : Adams (1989, 2001, 2007a), McLafferty et Stauffer (1994), NIST (1999) ou encore König *et al.* (2001). Néanmoins, celles-ci doivent être utilisées avec précaution car, compte tenu de la diversité et du très grand nombre de composés qu'elles contiennent, il est très rare qu'une interrogation n'obtienne pas de réponse (même avec une note de concordance moyenne). C'est pourquoi les bibliothèques de spectres constituées au sein même du laboratoire d'analyse permettent, en règle générale, d'obtenir des résultats plus fiables. En effet, les spectres de masse des mélanges à analyser et ceux des composés de référence y sont enregistrés dans des conditions expérimentales rigoureusement identiques.

La spectrométrie de masse associée aux indices de rétention calculés sur deux colonnes de polarité différente (CPG) constitue l'appareillage classique des laboratoires d'analyses. Vernin *et al.* (1986, 1988) d'une part, et Cavaleiro *et al.* (2001) d'autre part, ont développé un logiciel prenant simultanément en compte les propositions de la spectrométrie de masse et les indices de rétention sur deux colonnes, permettant ainsi d'identifier les constituants de nombreuses huiles essentielles. Ainsi, nous pouvons citer à titre d'exemples :

- l'identification de près de 100 composés dans un échantillon d'huile essentielle de feuilles de *Corymbia citriodora* Hook de l'île de la Réunion. Parmi eux, nous trouvons le citronellal, l' α -citronellol, les isomères de l'isopulégol et l'acétate de citronellyle (Vernin *et al.*, 2004) ;

- les huiles essentielles de racines d'*Erigeron acris* L. et *Erigeron annuus* (L.) Pers., récoltées à proximité de Bialystok (Pologne), dans lesquelles 54 et 47 composés ont été respectivement identifiés (soit 99 % et 97 %). Les composés majoritaires sont des esters polyacétyléniques : l'ester de (Z,Z)-matricaria et l'ester méthylique de lachnophyllum (Nazaruk *et al.*, 2009) ;

- l'huile essentielle de fruits *Cicuta virosa* L. var. *latisecta*, dans laquelle 45 composés ont été identifiés, représentant 98,4 % de la composition chimique totale. Il s'agit principalement de monoterpènes hydrocarbonés (73,09 %) et oxygénés (24,84 %) avec comme composés majoritaires : le γ -terpinène, le *p*-cymène et le cuminaldéhyde (Tian *et al.*, 2011) ;

- les huiles essentielles de feuilles (2 échantillons) et de fruits (3 échantillons) de *Litsea cubeba* Pers. (Inde), dans lesquelles Saikia *et al.* (2013) ont au total identifié 117 composés. Les huiles essentielles de feuilles sont majoritairement composées de sabinène, suivi de l' α -pinène, du terpinèn-4-ol, de l' α -terpinéol et du myrcène (échantillon 1) ou du 1,8-cinéole et de l' α -pinène (échantillon 2). Les huiles essentielles de fruits présentent deux types de compositions chimiques : soit riche en citronellol (70 %) et citronellal (10%) pour 2 échantillons, soit riche en géraniol (44 %) et néral (40 %) pour le troisième échantillon.

Cependant, si ce couplage permet dans la plupart des cas l'identification de nombreux constituants dans les mélanges naturels tels que les huiles essentielles, il induit parfois quelques ambiguïtés (spectres de masse insuffisamment différenciés, par exemple) (Sandra et Bicchi, 1987).

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 quasi-moléculaires qui renseignent sur la masse molaire et la nature du composé. Ces deux modes d'ionisation chimique (IC) ont permis, par exemple, d'identifier des esters d'alcools monoterpéniques dans l'huile essentielle d'*Eupatorium cannabinum* (thymol, dihydrothymol, nérol, bornéol et lavandulol) (Paolini *et al.*, 2005, 2007) mais aussi de différencier des stéréoisomères d'esters de chrysanthényle dans l'huile

essentielle d'*Anthemis maritima* (Darriet *et al.*, 2009). Toutefois, cette technique a montré ses limites pour l'identification de molécules ayant des structures voisines. Il s'agit notamment du géraniol et du nérol, deux monoterpènes qui ne diffèrent que par la stéréochimie d'une des doubles liaisons et qui présentent des spectres de masse ICN identiques (Bruins, 1979). Il faut également considérer l'influence des paramètres expérimentaux (gaz réactant, température et pression de la source d'ionisation) sur les résultats d'une analyse en IC (Vernin *et al.*, 1992). Ainsi, la comparaison de spectres enregistrés dans des laboratoires différents nécessite beaucoup de prudence et de ce fait, 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 spectrométrie de masse multidimensionnelle à double analyseur (SM-SM) présente une sélectivité nettement supérieure à celle obtenue avec un seul spectromètre de masse. Cette technique vient ainsi pallier aux difficultés d'identification liées aux similitudes de spectres rencontrées lors de l'analyse de mélanges complexes. Son principe de fonctionnement est le suivant : les ions correspondant à un rapport m/z choisi au moyen d'un premier analyseur (jouant ainsi le rôle d'un filtre) sont sélectionnés et envoyés 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). Plusieurs spectromètres de masse peuvent ainsi être branchés en série avec des analyseurs différents (quadripôles, trappes d'ions et temps de vols (TOF) parmi les plus courants). De par sa haute sensibilité et sa haute sélectivité, la CPG-SM-SM constitue une excellente technique de détection et d'identification des résidus de pesticides dans l'alimentaire et l'environnement (Hernández *et al.*, 2013). La SM-SM a également été utilisée pour détecter des traces de cocaïne dans les cheveux et la salive en toxicologie (Cognard *et al.*, 2005, 2006), de phtalates dans l'huile d'olive en agroalimentaire (Cavaliere *et al.*, 2008), ainsi que pour le dépistage néonatal de maladies métaboliques telles que la phénylcétonurie en médecine (détection d'un excès de phénylalanine dans le sang) (Banta-Wright et Steiner, 2004). Lisko *et al.*, (2013) ont développé une méthode basée sur la CPG-SM-SM en mode MRM (Multiple Reaction Mode) pour quantifier 5 alcaloïdes minoritaires (nornicotine, myosmine, anabasine, anatabine et isonicotéine) dans divers échantillons de tabac. Ces alcaloïdes sont des précurseurs chimiques de la formation de composés carcinogènes, les nitrosamines spécifiques du tabac (TSNA : Tobacco-specific nitrosamines). Dans le domaine des huiles essentielles, le couplage CPG-SM-SM a permis d'identifier 118 composés dans une huile essentielle de vétiver de Chine et surtout de confirmer la présence de l' α -cédrène, de l'acoradiène et du khusimène.

En effet, l'identification de ces sesquiterpènes n'est pas évidente par l'utilisation de la CPG-SM (Sellier *et al.*, 1991).

I.2.2. La CPG bidimensionnelle (CPGxCPG)

La CPG bidimensionnelle a été introduite dans les années 80 et 90. Elle consiste à coupler deux colonnes de natures différentes pour avoir une séparation optimale, ce qui entraîne une diminution, voire une suppression, d'éventuelles co-élutions. On distingue deux méthodes de CPG bidimensionnelle : la CPG bidimensionnelle par « heart-cutting » et la CPG bidimensionnelle intégrale (« *Comprehensive GC x GC* »).

- **CPG bidimensionnelle par « heart-cutting »**

Il s'agit de la première méthode de chromatographie bidimensionnelle. Son principe est le suivant : le mélange à analyser est injecté dans une première colonne de chromatographie (le plus souvent apolaire) puis une fraction sélectionnée est transférée dans une seconde colonne de polarité différente (le plus souvent polaire) dans le but d'améliorer sa résolution et de séparer ainsi des composés qui co-éluient (Wüst, 2015). Dans l'appareillage le plus classique et le moins coûteux, les deux colonnes sont placées dans le même four avec deux détecteurs indépendants et un système de commutation. Cependant, ce système ne permet pas d'utiliser des programmations de températures différentes pour les deux colonnes. C'est pourquoi, différentes configurations matérielles ont été mises au point, parmi lesquelles un appareillage comportant deux fours séparés (Pazitna *et al.*, 2013). On note également que très souvent, la seconde colonne utilisée est une colonne chirale, permettant ainsi la séparation d'énantiomères. Cette technique de CPG multidimensionnelle énantiomérique a été pour la première fois décrite en 1984 par Schomburg *et al.* La chromatographie chirale est, en effet, couramment utilisée pour mettre en évidence l'éventuelle adultération d'une huile essentielle, qui constitue un phénomène grandissant dans le domaine (Sciarrone *et al.*, 2010). Par exemple, Begnaud et Chaintreau (2005) ont montré l'adultération d'un échantillon d'huile essentielle de bergamote en déterminant le ratio énantiomérique du linalol. La CPG bidimensionnelle par « heart-cutting » a également permis à Sciarrone *et al.* (2010) de détecter la présence d'un allergène, l'ascaridole, dans l'huile essentielle de feuilles d'arbre à thé (tea tree).

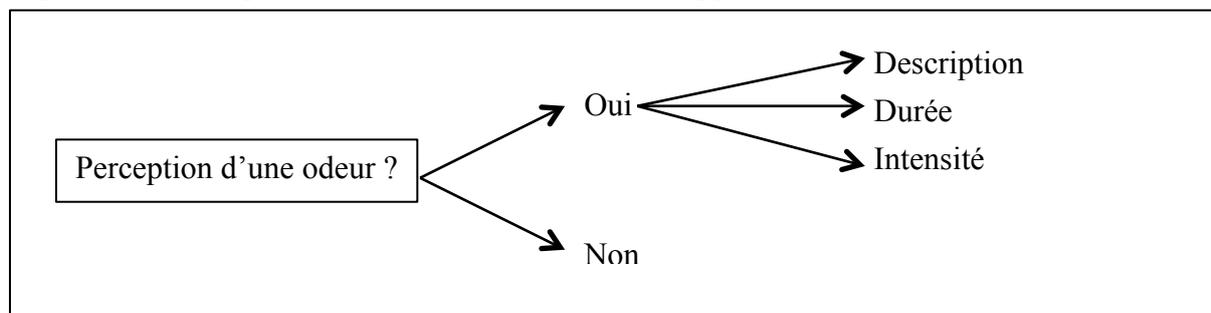
- **CPG bidimensionnelle intégrale (« Comprehensive GC x GC »)**

Cette méthode a été inventée par Philipps et Liu en 1991 (Liu & Philipps, 1991). Ici, contrairement à la méthode par “heart-cutting”, la totalité de l'échantillon passe successivement dans les deux colonnes de chromatographie. La première colonne est de dimensions classiques tandis que la seconde est plus courte avec un diamètre plus faible, permettant une seconde séparation très rapide. Les deux colonnes sont connectées entre elles par un modulateur dont le rôle est d'isoler, de concentrer et de transférer en continu des coupes d'effluents de la première colonne (dimension 1) vers la deuxième colonne (dimension 2) (Mondello *et al.*, 2005).

Grâce à la CPG x CPG couplée à la SM, Filippi *et al.* (2013) sont parvenus à identifier 135 composés dans l'huile essentielle de vétiver, réputée très complexe sur le plan analytique. Krupcik *et al.* (2015) ont également montré que cette méthode pouvait permettre de vérifier l'authenticité et l'origine de l'huile essentielle de *Rosa damascena Miller*.

I.2.3. Couplage CPG-Olfactométrie (CPG-O)

Un produit odorant est caractérisé par sa concentration, sa note olfactive et son seuil de perception. Les techniques de CPG « classiques » permettent, certes, de l'identifier et le quantifier, mais il est plus difficile de caractériser son impact olfactif et son seuil de perception. Pour cela, la chromatographie en phase gazeuse couplée à l'olfactométrie (CPG-O) est une technique analytique parfaitement adaptée qui combine la séparation (CPG) et l'évaluation olfactive de composés volatils (olfactométrie). La mise en place d'un tel couplage nécessite d'effectuer une modification au niveau de l'instrument de CPG. Plus précisément, un diviseur d'effluents (split) est installé en sortie de colonne de chromatographie. Ainsi, une partie du flux est envoyée vers un détecteur à ionisation de flamme (DIF) ou un spectromètre de masse (le plus fréquemment, mais tous les types de détecteurs sont utilisables), l'autre partie est dirigée vers un cône de détection nasale. Ce système permet donc de réaliser simultanément l'enregistrement du chromatogramme et l'évaluation olfactive des composés volatils. Le flux sortant au niveau du cône de détection nasale passe par un tube chauffé afin d'éviter les condensations. Cependant, afin de préserver la muqueuse nasale d'une déshydratation et en conséquence, d'une perte de sensibilité, de l'air humide est ajoutée en sortie de cône (Hanaoka *et al.*, 2000). Le juge doit indiquer plusieurs informations selon le schéma suivant (**Figure I.2**) :

Figure I.2 : Perception d'une odeur et informations apportées

La CPG-Olfactométrie est une technique très efficace pour la mise en évidence de composés dont la teneur est très faible mais suffisamment importante pour être perçue par le nez humain. Ce couplage est notamment utilisé pour détecter et identifier des composés aromatisants caractéristiques d'un aliment, d'un environnement ou des composés responsables d'une mauvaise odeur. Bien que plus sensible que la CPG-FID ou encore la CPG-SM, la CPG-O présente deux inconvénients majeurs liés aux facteurs humains :

- entraînement long et fastidieux pour habituer un opérateur à détecter, différencier et définir des odeurs,
- sensibilité de l'odorat pouvant être altérée par exemple par un rhume, un stress et ainsi affecter l'efficacité des opérateurs.

Aussi, dès les années 2000, des chercheurs ont travaillé au développement de nez électroniques (« E-noses ») capables de différencier une variété d'odeurs, des plus simples aux plus complexes. Pour se faire, l'appareil (nez-électronique) utilise comme références les empreintes numériques d'odeurs de composés stockées dans une banque de données (Brattoli *et al.*, 2011 ; Fernandez *et al.*, 2009). Ces nez électroniques constituent un moyen d'obtenir une analyse « objective » d'odeurs plus ou moins complexes et sont plus rentables qu'un panel sensoriel. De plus, plusieurs analyses peuvent se succéder sans craindre d'une diminution de la sensibilité du nez. Ce type d'équipement a notamment été utilisé pour caractériser et classer quatre types de vins rouges provenant de la même cave, de la même variété de raisin et d'origine géographique identique (García *et al.*, 2006). Néanmoins, le vieillissement rapide des capteurs électroniques d'odeurs demeure une limite à cette innovation (Bruneton, 2009).

Ces dernières années, on constate un intérêt grandissant pour la CPG-Olfactométrie, notamment dans l'industrie agroalimentaire (œnologie, arômes) et peu à peu, dans le domaine des huiles essentielles. Nous pouvons ainsi citer à titre d'exemples :

- l'analyse d'une huile essentielle d'orange par CPG-SM et CPG(FID)-Olfactométrie. Högnadóttir et Rouseff (2003) identifient 95 composés dont 55 ayant un arôme actif. Le limonène est le composé ultra-majoritaire (94,5 %). La totalité de l'activité aromatique est générée par un peu plus de 4 % des volatils globaux. L'arôme le plus intense est produit par l'octanal, la lactone de vin, le linalol, le décanal, la β -ionone, le citronellal et le β -sinensal ;

- l'étude menée par Goodner *et al.* (2006) sur les huiles essentielles de deux sous-espèces du genre *Thymus* : *T. hyemalis* et *T. vulgaris* d'Espagne, récoltées à 5 stades végétatifs différents. Pour chaque échantillon correspondant à un stade végétatif défini, une analyse par CPG-SM a permis de déterminer son profil chromatographique et une analyse par CPG-O a été réalisée. Il ressort de cette étude que les profils aromatiques des huiles essentielles de *T. hyemalis* et *T. vulgaris* d'Espagne dépendent du stade végétatif ;

- la caractérisation olfactométrique de l'huile essentielle de *Tagetes minuta* d'Afrique du Sud par deux méthodes de CPG-O : la méthode des dilutions successives (AEDA) et la méthode hybride (VIDEO-Sniff : Vocabulary-Intensity-Duration of Elementary Odours by Sniffing) qui combine la fréquence de détection et les méthodes d'intensité. Trois esters à chaîne courte (2-méthylpropanoate d'éthyle, 2-méthylbutanoate d'éthyle et 3-méthylbutanoate d'éthyle), par ailleurs identifiés par spectrométrie de masse, ont été reconnus par les deux méthodes de CPG-O comme faisant partie des principaux composés odorants de cette huile essentielle (Breme *et al.*, 2009) ;

- l'identification et la caractérisation olfactive de nombreux composés responsables de l'odeur boisée caractéristique de l'huile essentielle de vétiver (la β -vétivone et le (*E*)-isovalencenol parmi les principaux), une huile essentielle réputée comme des plus complexes et actuellement très recherchée et utilisée dans le monde de la parfumerie moderne. Pour cela, les auteurs ont mis en œuvre la CPGxCPG-SM et la CPG-O ainsi qu'un fractionnement de l'huile essentielle (Belhassen *et al.*, 2014).

Nous avons pu constater, au travers des paragraphes précédents, que les couplages en ligne d'une (ou plusieurs) technique(s) chromatographique(s) avec une (ou plusieurs) technique(s) spectroscopique(s) se sont rapidement développés. Ceux-ci se révèlent performants pour divers types d'analyses, qu'il s'agisse d'analyses de routine et de contrôle de qualité ou d'analyses fines. Néanmoins, l'utilisation de tels couplages doit faire l'objet de la plus grande prudence si l'on veut éviter les erreurs, essentiellement liées à une informatisation poussée de ces différentes techniques ou à un excès de confiance. Joulain (1994) dresse un large éventail de ces erreurs d'interprétation fréquemment commises lors de l'analyse d'huiles essentielles pour lesquelles l'utilisation conjointe de la CPG-SM avec les

indices de rétention sur colonnes apolaire et polaire ne donne pas toujours des résultats satisfaisants.

Face à la complexité de certains mélanges, il est nécessaire d'utiliser une méthode d'analyse en deux étapes. La première est basée sur la purification des constituants du mélange particulièrement complexe, la seconde consistant en leur identification. Cette méthode est illustrée ci-après par la voie B.

II. Identification des constituants après séparation (voie B)

La voie B se décompose en deux étapes. Dans un premier temps, le mélange est 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 ou la CPG préparative (CPGP). Cette étape peut parfois être précédée d'une distillation fractionnée ou d'une partition acido-basique. Dans un second temps, les différents constituants isolés (ou très majoritaires dans une fraction de chromatographie) sont identifiés par comparaison de leurs données spectrales avec celles de composés de références (spectre de masse, spectre IR, spectres de RMN ^1H ou ^{13}C , ou éventuellement RMN bidimensionnelle). Bien que longue à mettre en œuvre, cette voie B se révèle être extrêmement fiable et adaptée pour l'étude d'huiles essentielles complexes, en particulier lorsque celles-ci contiennent de nombreux sesquiterpènes oxygénés. Elle est indispensable lorsqu'il s'agit d'élucider la structure d'un composé qui n'a jamais été décrit.

Cette séquence d'analyse en deux étapes (purification-identification) a été la première à être utilisée pour la caractérisation chimique d'huiles essentielles. Elle a par la suite été supplantée par la voie A (couplages en ligne), plus rapide. Néanmoins, la voie B est toujours utilisée dans le cas d'huiles essentielles complexes car la grande fiabilité de ses résultats 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 extrêmement complexes. C'est notamment le cas de l'huile essentielle de vétiver d'Haiti (connue pour sa très grande complexité) qui est composée de nombreux sesquiterpènes aux propriétés physico-chimiques et spectroscopiques voisines. Les auteurs ont réalisé une partition acido-basique de l'huile

essentielle, suivie d'une étude poussée des parties neutre et acide obtenues. Près de 170 composés sesquiterpéniques (mono- et polyfonctionnalisés) ont ainsi été identifiés (CPG-SM, RMN ^1H et parfois RMN ^{13}C), certains présentant des squelettes originaux et rares tels que : prézizaane, zizaane, khusiane, cyclopacamphane, spirovétivane, *épi*-, *séco*- et *nor*-eudesmanes, oppositane, etc. (Weyerstahl *et al.*, 2000c).

Nous pouvons également citer les travaux de Bicchi *et al.* (1998) qui font état de la composition chimique détaillée de l'huile essentielle d'*Artemisa roxbughiana*. Un fractionnement poussé de l'échantillon (distillations fractionnées sous vide, CC, CCM préparatives) a permis l'identification de 108 constituants, essentiellement par combinaison de la CPG(Ir) et de la CPG-SM. Néanmoins, l'identification de 23 d'entre eux (dont de nombreux sesquiterpènes oléfiniques et oxygénés) a nécessité l'utilisation de la RMN ^1H et/ou de la RMN ^{13}C .

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

Pour l'élucidation structurale de nouvelles molécules, la RMN (1D et 2D) constitue, à ce jour, la technique analytique la plus performante et la plus utilisée. La RMN 2D permet de mettre en évidence les interactions homo- et hétéronucléaires entre les différents noyaux (Claridge, 1999). Les différentes séquences peuvent être classées en deux catégories générales : celles concernant les corrélations entre les différents protons d'une molécule, voisins (COSY) et à longue distance (COSY Long Range, NOESY) et celles dédiées aux corrélations entre protons et carbones (HSQC, HMBC). Celles-ci fournissent des informations sur la structure moléculaire et facilitent considérablement l'analyse structurale. Grâce à la séquence de corrélations homonucléaires carbone-carbone (INADEQUATE), il est possible d'obtenir sans ambiguïté la structure de la molécule recherchée, mais celle-ci nécessite une quantité de produit plus importante que pour la mise en œuvre des séquences précédemment citées (Derome, 1987).

Au laboratoire, l'analyse de diverses huiles essentielles a conduit à la caractérisation de nouvelles molécules par combinaison de différentes techniques analytiques conventionnelles dont la RMN 1D et 2D, après séparation et purification par chromatographies successives (CC). Nous pouvons citer, par exemple :

- l'identification de 2 nouveaux aldéhydes sesquiterpéniques à squelette acyclique irrégulier dans l'huile essentielle de *Santolina corsica* : le 3,9-diméthyl-6-isopropyl-2(*E*),7(*E*),9-decatriénel et son stéréoisomère, le 3,9-diméthyl-6-isopropyl-2(*Z*),7(*E*),9-decatriénel (Ferrari *et al.*, 2005) ;
- l'étude menée par Yapi *et al.* (2012a) sur l'huile essentielle de racines de *Xylopiya aethiopica* de Côte d'Ivoire, qui a conduit à l'identification de 2 nouvelles molécules (4,4-diméthyl-2-vinylcyclohexène et *endo*-5-méthoxypatchoul-3-ène) et une troisième reportée pour la première fois à l'état naturel (3,3-diméthyl-1-vinylcyclohexène) ;
- l'identification de 3 nouvelles molécules dans l'huile essentielle de feuilles de *Xylopiya rubescens* de Côte d'Ivoire, dont 2 isomères sesquiterpéniques à squelette guaiane : furanoguaia-1,4-diène, furanoguaia-1,3-diène et (8*Z*, 11*Z*, 14*Z*)-heptadéca-8,11,14-triène-2-ol (Yapi *et al.*, 2013) ;
- l'identification d'une nouvelle cétone possédant un squelette modhephane, la 1*S*,2*S*,5*S*,8*S*-modhephan-3-one, dans l'huile essentielle de racines de *Pulicaria mauritanica* récoltée en Algérie (Xu *et al.*, 2015).

Si la voie A, par sa rapidité, est tout à fait adaptée aux analyses de routine, la voie B garantit quant à elle l'identification des composés. Cette dernière est cependant souvent chronophage. Aussi, une troisième voie (Voie C), intermédiaire par rapport aux précédentes, a été initiée au début des années 1980 puis développée au laboratoire depuis une plus d'une vingtaine d'années. Celle-ci est basée sur l'identification et parfois la quantification des principaux constituants de mélanges naturels (huiles essentielles, extraits végétaux, résines, huiles végétales, etc.) par l'étude du spectre RMN ^{13}C du mélange, sans séparation préalable.

III. Méthode d'identification par RMN ^{13}C , sans séparation préalable (voie C)

Dans le domaine des mélanges complexes, la RMN ^{13}C a d'abord été utilisée dans le but de confirmer l'identification de constituants préalablement identifiés par une autre technique analytique, la CPG-SM le plus souvent, comme dans les travaux précurseurs de Formáček et Kubeczka (1982, 1984, 1988). Dans ce contexte, dès le début des années 1980, l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse a initié, puis mis au point et développé, une véritable méthode d'identification des constituants des mélanges complexes naturels par RMN ^{13}C , basée sur l'analyse informatisée du spectre RMN ^{13}C du mélange.

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

III.1. Intérêt de la RMN ^{13}C

Malgré sa faible abondance isotopique (environ 1 %) et un rapport gyromagnétique environ 5700 fois moins sensible que celui du proton (Günther, 1994), le ^{13}C est préféré aux autres noyaux dans le domaine de l'analyse des mélanges complexes pour les raisons suivantes :

- le carbone est l'élément constitutif de toutes les molécules organiques et les différents atomes présents sont, à quelques exceptions près, magnétiquement non équivalents. Ainsi, dans la majorité des cas, le spectre RMN ^{13}C présente autant de raies de résonance que 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 engendre une variation plus ou moins importante, mais en général mesurable, des déplacements chimiques de tous (ou presque tous) les carbones de la molécule. De ce fait, il est possible d'identifier par RMN ^{13}C la plupart des molécules organiques, même dans le cas où les molécules ont des structures très proches ;

- les spectres de RMN ^{13}C peuvent être simplifiés par irradiation totale des noyaux d'hydrogène (spectre « broad band »), ce qui permet de n'observer dans le spectre qu'une seule raie de résonance par carbone (Williamson et Neuhaus, 1989). En effet, les couplages $^1J_{\text{C-H}}$, en raison de leurs valeurs considérablement élevées, engendrent très souvent des superpositions de signaux et donc un spectre parfois complexe à analyser ;

- le temps de relaxation transversale T_2 (temps de relaxation spin-spin) est plus important pour le carbone que pour le proton. La largeur du signal de résonance à mi-hauteur est inversement proportionnelle à T_2 . Il en résulte un gain dans la finesse des pics et une meilleure résolution, ce qui est crucial lors de l'enregistrement du spectre d'un mélange ;

- le domaine de résonance du carbone s'étend sur une plage beaucoup plus large que celle du proton (240 ppm par rapport à 12 ppm), ce qui améliore nettement la dispersion spectrale (Günther, 1994) et évite un nombre rédhibitoire de superpositions de signaux dans le spectre du mélange ;

- les spectres de RMN ^{13}C sont enregistrés à température ambiante, ce qui évite une éventuelle dégradation ou transformation des molécules thermosensibles ;

- la RMN est une technique non destructive. L'échantillon peut ainsi être récupéré pour être éventuellement soumis à des analyses ultérieures.

III.2. Identification de constituants en mélange par RMN ^{13}C

L'identification des constituants d'un mélange par RMN ^{13}C se fait par comparaison des déplacements chimiques dans le spectre du mélange avec ceux de composés de référence contenus dans des bibliothèques de spectres. Pour identifier un composé au sein d'un mélange, il faut que les signaux qui lui appartiennent soient observés et individualisés, puis il faut attribuer les déplacements chimiques des carbones à une molécule donnée. Il est donc nécessaire que les enregistrements du spectre du mélange et des spectres des composés de référence soient réalisés dans des conditions expérimentales optimisées et standardisées afin d'assurer une reproductivité optimale des résultats obtenus.

III.2.4. Observation des signaux

L'observation des raies de résonance des carbones d'une molécule dépend de la masse de produit disponible, de sa viscosité, de sa solubilité dans un solvant choisi et de la sensibilité de l'appareil qui s'exprime par le rapport signal sur bruit (S/B). Il est possible de pallier à un manque de produit et/ou une faible sensibilité (S/B) par :

- une augmentation du nombre d'acquisitions, engendrant inévitablement un temps d'expérimentation plus long. En effet, le rapport S/B étant proportionnel à la racine carrée du nombre d'acquisitions, le temps d'utilisation du spectromètre devient rapidement prohibitif par rapport au gain escompté ;
- l'utilisation d'une cryosonde (sonde à antennes refroidie) reliée à une unité cryogénique à l'hélium. Ces sondes spécifiques ont fait leur apparition en 1976 et permettent de multiplier la sensibilité d'un facteur 4 et donc de diminuer la durée d'expérimentation d'un facteur 16 ;
- l'utilisation d'aimants supraconducteurs à très hauts champs (23,5 Tesla pour les plus performants), permettant d'augmenter sans conteste la sensibilité de la RMN et d'utiliser de ce fait des quantités de produit plus faibles.

Le rapport S/B peut également être amélioré en modifiant les paramètres d'enregistrement des spectres. Ainsi, l'irradiation des protons se traduit d'une part, par une simplification des spectres (chaque signal se présentant sous la forme d'un singulet) et d'autre part, par une multiplication du rapport S/B d'un facteur 3 due à l'effet nucléaire Overhauser (effet NOE) (Günther, 1994). La séquence « Inensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfert » (INEPT) développée en 1979 et aujourd'hui, les séquences « Distortionless Enhancement by Polarization Transfert » (DEPT), permettent un accroissement de S/B

pouvant aller jusqu'à 300% (Günther, 1994 ; Freeman, 1988 ; Brekke, 1996). La séquence « DEPT » a été employée dans l'analyse de mélanges complexes tels que les substances humiques (Lambert, 1992), les huiles de schistes bitumineux (Dahbi, 1992) et les coupes pétrolières (Urdahl, 1992 ; Brekke, 1990 ; Michon, 1997).

III.2.5. Individualisation des signaux

Cette étape est indispensable pour parvenir à l'identification des constituants d'un mélange par RMN ^{13}C . Si elle est rarement problématique pour un composé pur (superpositions des signaux de deux carbones peu fréquentes), elle s'avère délicate dans le cas du spectre d'un mélange complexe. En effet, le nombre de constituants et le nombre de carbones de chacun d'entre eux sont autant de facteurs qui augmentent la probabilité de superposition des raies de résonance.

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.

Plusieurs paramètres influent sur la résolution :

- le champ magnétique : plus il est élevé, plus la séparation des signaux de résonance des différents noyaux est importante. Ceci facilite l'interprétation des spectres, ce qui est primordial dans le cas des études réalisées sur des composés ayant une masse moléculaire élevée (oligomères et protéines, par exemple), dont les spectres sont très complexes ;
- le nombre de points de digitalisation sur le signal de la FID, qui peut être augmenté (souvent doublé) grâce à la méthode « Zero Filling » ;
- l'amélioration de la digitalisation des données par l'utilisation d'un convertisseur analogique numérique (CAN) performant, tout comme l'application d'une fonction exponentielle de Lorentz-Gauss sur le signal de décroissance libre d'induction (FID) préalablement à la transformation de Fourier, améliorent la résolution des spectres (Williamson et Neuhaus, 1989 ; Günther, 1994 ; Hesse *et al.*, 2008 ; Claridge, 1999) ;
- la largeur de la fenêtre spectrale : en la modifiant, il est possible d'enregistrer le spectre sur une largeur correspondant uniquement à la zone d'intérêt ou en plusieurs portions. Dans le domaine des lipides, l'utilisation de fenêtre réduite est fréquente en raison des nombreuses superpositions situées autour de 25, 29, 34 et 130 ppm. A titre d'exemple, nous pouvons citer les travaux de Blaise *et al.* (1997) qui ont appliqué cette méthode à l'analyse d'huiles végétales. Néanmoins, 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.

Ainsi, l'optimisation des conditions d'enregistrement peut permettre d'obtenir une très haute résolution des signaux. L'étude menée par Allerhand et Maple (1987) sur un échantillon d'essence sans plomb en est une très bonne illustration. En combinant l'utilisation de fenêtre réduites, de multiplication exponentielle et de la méthode « Zero Filling », et en utilisant un appareil opérant à 4,7 T, ces derniers sont parvenus à individualiser 1800 pics avec une résolution de 0,08 Hz sur le spectre de leur échantillon.

III.2.6. Attribution des signaux

L'identification d'un composé en mélange par RMN ^{13}C repose principalement sur l'attribution des déplacements chimiques de ses carbones. L'intérêt de la RMN réside dans sa faculté à reconnaître un noyau déterminé par rapport à son environnement dans la molécule. De ce fait, contrairement à la majorité des autres techniques spectroscopiques, il est très peu probable que deux composés de structures différentes présentent des spectres de RMN ^{13}C superposables ou insuffisamment différenciés.

Ainsi, chaque molécule est définie par une série de déplacements chimiques qui lui est propre et qui constitue son spectre (son empreinte digitale, en quelque sorte), à partir duquel elle pourra être identifiée. De ce fait, il est essentiel d'avoir une excellente reproductibilité des valeurs de déplacements chimiques dans le spectre du mélange par rapport à celles présentes dans les spectres des composés de référence. Pour cela, différents paramètres sont à prendre en compte :

- la valeur du déplacement chimique est indépendante de la puissance du champ magnétique B_0 , des séquences impulsionnelles, des paramètres d'acquisition des spectres mais aussi du traitement du signal ;
- en revanche selon la fonctionnalisation des molécules, les valeurs des déplacements chimiques sont susceptibles d'être influencées par la nature du solvant, la concentration de l'échantillon et la présence d'autres molécules (à cause des liaisons hydrogènes notamment). A ce propos, il est important de noter que la mise sur le marché d'aimants supraconducteurs de plus en plus puissants (500 MHz à la fin des années 70, 1 GHz aujourd'hui) permet de travailler à des concentrations plus faibles et de minimiser la formation de liaisons hydrogènes.

Au vu de cela, il est évidemment préférable de se référer aux valeurs des déplacements chimiques des carbones de la molécule à identifier tels qu'ils sont répertoriés dans la (les) bibliothèque(s) de spectres construite(s) au laboratoire, avec des paramètres expérimentaux bien définis. Toutefois, il est possible d'utiliser des données de la littérature pour l'identification de composés en mélange, à condition que les paramètres d'analyse (dilution, nature du solvant, température) soient identiques.

Nombre d'exemples illustrent le succès de l'application de la RMN ^{13}C à l'identification de constituants présents dans divers types de mélanges, dans des domaines très variés.

- **Les produits pétroliers :**

Dans l'étude menée sur un échantillon d'essence sans plomb citée précédemment (voir p.32), Allerhand et Maple (1987) ont attribué une partie des 1800 raies de résonance observées à 32 hydrocarbures en utilisant la méthode des ajouts. Cette méthode d'identification consiste à enregistrer une série de spectres d'un même échantillon enrichis à chaque fois avec un produit de référence différent et à les comparer au spectre brut initial. En 1991, Matlengiewicz *et al.* ont mis au point un programme informatique d'aide à l'identification des composés en mélange prenant en compte les déplacements chimiques et les intensités relatives des signaux. Ils ont ainsi identifié 10 hydrocarbures monoaromatiques présents dans un mélange artificiel. Par la suite, cette méthode informatisée a été appliquée à l'analyse de composés polymérisables des fuels légers (Matlengiewicz, 1992) et des constituants d'un échantillon de fuel obtenu par hydroliquéfaction du charbon (Matlengiewicz, 1994).

- **En agroalimentaire :**

Wei *et al.* (2012) ont démontré que la variété et l'origine géographique d'un café pouvaient être rapidement distinguées sur la base de la teneur des métabolites majoritaires contenues dans les graines de café vertes, évaluée par RMN ^{13}C . Ces auteurs ont ainsi mis en évidence l'efficacité de l'analyse par RMN ^{13}C pour mener à bien cette classification. La mise en œuvre de séquences 1D et 2D a permis à Kosir et Kidrik (2001) d'identifier 17 acides aminés dans un vin de Slovénie. Ces composés minoritaires sont d'une grande importance puisqu'ils influencent considérablement la qualité des vins et peuvent également permettre de les différencier (variétés, origine géographique ou encore année de production). Ces auteurs ont ainsi montré l'intérêt de la RMN ^{13}C dans le cadre d'un contrôle de qualité, pour la

vérification d'éventuelles adultérations du vin. Nous pouvons également citer les travaux menés par Standal *et al.* (2010) sur différentes espèces de gadidés. L'analyse par RMN ^{13}C de la totalité des lipides extraits des muscles des poissons a permis de distinguer les espèces entre elles sur la base de leur profil phospholipidique.

- **Les huiles essentielles :**

Formáček et Kubeczka (1982, 1984, 1988) ont réalisé des travaux précurseurs pour l'identification des principaux constituants d'une huile essentielle. Pour cela, les auteurs ont comparé les signaux présents sur les spectres des huiles essentielles avec ceux des composés de références, enregistrés dans des conditions expérimentales identiques (benzène- D_6). Ainsi, la RMN ^{13}C a été employée pour confirmer la présence de composés par ailleurs mis en évidence par CPG-SM. Par la suite, et encore aujourd'hui, d'autres travaux ont été menés sur les huiles essentielles, utilisant cette même méthode. Nous pouvons citer à titre d'exemples :

- l'identification de 12 sesquiterpènes dans une fraction chromatographique de l'huile essentielle de bois de *Guarea guidonia*. La RMN a particulièrement permis d'identifier les oxydes de caryophyllène et d'isocaryophyllène qui sont, d'après les auteurs, difficiles à différencier par CPG-SM (Núñez et Roque, 1999) ;

- l'identification du bicyclogermacrène, du β -caryophyllène, de l' α -pinène, du germacrène D, du β -pinène et du spathulénol dans l'huile essentielle de feuilles de *Piper cernuum* et du myrcène, du linalol, du β -caryophyllène et du bicyclogermacrène dans l'huile essentielle de feuilles de *Piper regnelli* du Brésil, à l'aide d'un logiciel basé sur l'analyse des mélanges par RMN ^{13}C (Costantin *et al.*, 2001) ;

- l'huile essentielle de racines de *Valeriana hardwickii* var. *arnottiana*, dans laquelle l'identification d'un sesquiterpène de type guaiane, le valeracétate (composé majoritaire et marqueur potentiel de la variété), a été confirmée par RMN ^1H et ^{13}C (Sati et Mathela, 2005) ;

- l'huile essentielle des parties aériennes de *Cymbopogon jawarancusa*, analysée par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ^{13}C . L'identification de 7 composés, parmi lesquels les 2 composés majoritaires (la piperitone et l'élémol), a été confirmée par RMN ^{13}C (Dar *et al.*, 2011) ;

- l'huile essentielle de racines de *Paeonia emodi* de l'Himalaya, analysée par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ^1H et ^{13}C . L'identification du composé majoritaire, le salicylaldéhyde (85,5 %) a été confirmée par RMN ^1H et ^{13}C (Verma *et al.*, 2015).

Par ailleurs, Ferreira *et al.* (2001) ont développé une méthode d'identification des constituants (connus ou nouveaux) d'un mélange complexe par RMN ^{13}C . Le principe est le suivant : le spectre du mélange est comparé aux spectres de mono- et sesquiterpènes décrits dans la littérature. Les valeurs des déplacements chimiques du mélange et la multiplicité de chacun des carbones, préalablement déterminée par des séquences DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfert), sont prises en compte par un logiciel informatique. Après consultation de la bibliothèque de spectres décrits dans la littérature, le logiciel propose une identification. Les auteurs ont appliqué cette méthode à l'analyse d'huiles essentielles de feuilles de *Piper cernuum* Vell. et de *Piper regnellii* (Miq.) et ont comparé leurs résultats avec ceux obtenus par l'analyse par CPG-SM. Ils ont ainsi identifié les composés majoritaires de ces huiles essentielles (teneurs supérieures ou égales à 2,26 %) et ont conclu à une utilisation du logiciel réalisé comme outil complémentaire d'une analyse par CPG-SM. En effet, cette méthode présente l'avantage de parvenir à l'identification correcte d'isomères de certains composés et permet de détecter la présence éventuelle de nouvelles molécules dans les huiles essentielles. Elle fait suite à la méthode déjà développée en 1990 par Emerenciano *et al.* qui avait été appliquée à un mélange d'acétates triterpéniques isolés à partir des racines de *Vernonia cognata* Less.

Très récemment, Hubert *et al.* (2014) ont mis au point une stratégie « déréplicative » pour identifier des métabolites naturels directement en mélange. Le principe de la méthode consiste dans un premier temps à fractionner le mélange par CPE (Centrifugal Partition Extraction). Ensuite, chaque fraction est analysée par RMN ^{13}C et les valeurs des déplacements chimiques obtenues sont compilées et regroupées de façon hiérarchique (HCA : Hierarchical Clustering Analysis), afin d'obtenir un groupe de valeurs par molécule à identifier. Enfin, chaque groupe (« cluster ») est attribué à une structure moléculaire grâce à la base de données locale répertoriant les déplacements chimiques de nombreuses molécules. Les auteurs ont appliqué leur méthode à un mélange artificiel puis à un extrait éthanolique d'écorce d'*Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr. dans lequel ils sont parvenus à identifier 7 molécules.

III.3. La méthode d'analyse développée au laboratoire

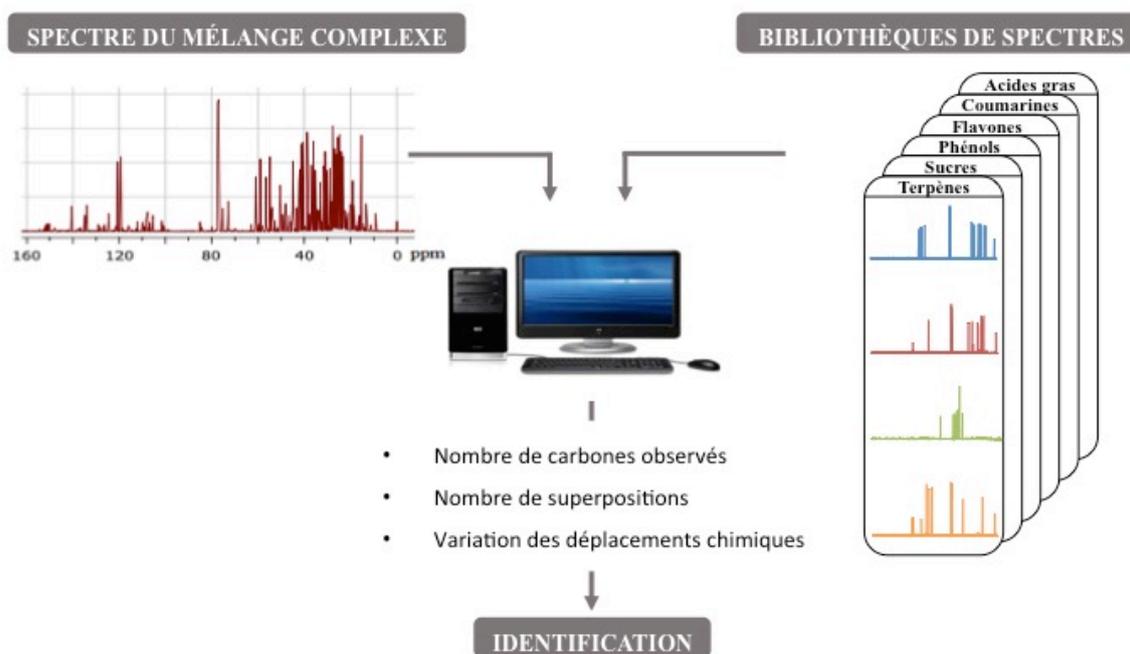
III.3.1. Le principe de la méthode

Depuis plus d'une vingtaine d'années, l'équipe « Chimie et Biomasse » utilise la RMN ^{13}C comme outil d'analyse des mélanges naturels complexes. La méthode mise au point a pour but d'identifier (voire de quantifier) les constituants d'un mélange, à partir de son spectre RMN ^{13}C et sans séparation préalable (ou du moins en limitant le nombre d'étapes de séparation).

L'originalité de cette méthode réside dans l'informatisation de la recherche, grâce à un logiciel d'aide à l'identification développé au laboratoire. Celui-ci assure la comparaison des déplacements chimiques de chacun des carbones du mélange avec ceux des composés de références répertoriés dans des bibliothèques de spectres (**Figure I.3**). L'enregistrement des spectres des composés de références et des mélanges est réalisé dans des conditions expérimentales identiques (nature du solvant, concentration, paramètres d'enregistrement des spectres) (Tomi *et al.*, 1995 ; Bradesi *et al.*, 1996 ; Tomi et Casanova, 2000 ; Bighelli et Casanova, 2009).

Afin d'identifier les constituants d'un mélange, il est indispensable de prendre en compte 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 pouvant se produire lorsque les différents effets électroniques et/ou stériques font que deux carbones appartenant à deux molécules différentes ont fortuitement le même déplacement chimique, ou lorsque les molécules présentes ont une partie de leur squelette et de leur fonctionnalisation très proche ;
- les variations des déplacements chimiques ($\Delta\delta$) des carbones dans le spectre du mélange par rapport aux valeurs de référence.

Figure I.3 : Identification des constituants d'un mélange complexe par RMN ^{13}C .

Cette méthode d'analyse a été appliquée à différentes familles de molécules (terpènes, flavonoïdes, coumarines, acides gras, sucres, phénols, etc.) selon un protocole expérimental adapté à chaque famille (choix du solvant, concentration, paramètres d'acquisition, etc.). Différentes bibliothèques de spectres ont ainsi été réalisées, à partir de produits commerciaux dans un premier temps. Par la suite, elles ont été régulièrement enrichies avec les données spectrales des composés isolés à partir de mélanges naturels ou bien préparés par hémisynthèse. A l'heure actuelle, la bibliothèque de spectres la plus importante est celle qui correspond aux composés terpéniques (bibliothèque de spectres « Terpènes »). Elle contient plus d'un millier de molécules : mono-, sesqui- et diterpènes, ainsi que des phénylpropanoïdes, que l'on identifie notamment dans les huiles essentielles. D'autres bibliothèques de spectres ont été développées : composés linéaires, sucres, phénols, coumarines, etc.

Par ailleurs, pour chaque famille de composés, une deuxième bibliothèque contenant les données spectrales publiées dans la littérature récente a été élaborée, permettant ainsi de disposer d'un nombre important de spectres de référence. En effet, l'avantage de la RMN ^{13}C est que pour chaque molécule nouvelle isolée et caractérisée structuralement, son spectre de RMN ^{13}C est décrit dans son intégralité, contrairement à la description des autres spectres SM ou IR (seuls les principaux fragments ou les raies d'absorption les plus importants sont décrits). De plus, les spectres étant aujourd'hui enregistrés à partir d'une quantité minime

(quelques milligrammes en général) de produit purifié, la concentration est ainsi faible et la reproductibilité des déplacements chimiques est très bonne.

Lorsque la RMN ^{13}C est appliquée à des mélanges contenant des composés volatils, les constituants identifiés à partir du spectre du mélange sont ensuite repérés, généralement sans difficulté, sur le chromatogramme (CPG). En effet, leurs indices de rétention sur colonnes polaire et apolaire sont comparés avec ceux des produits de références, ce qui permet à la fois de confirmer leur identification mais également de connaître leur quantité relative (%).

En résumé, l'intérêt de la RMN ^{13}C réside non seulement dans sa fiabilité et sa rapidité mais aussi dans sa complémentarité avec des techniques conventionnelles (exposées précédemment dans les voies A et B). Ainsi, cette méthode d'analyse a été appliquée avec succès au laboratoire à différentes familles de produits naturels (huiles essentielles, extraits végétaux, huiles végétales, résines, etc.) en utilisant pendant de nombreuses années (1990-2004) un spectromètre à 4,7 T puis un spectromètre à 9,4 T. Après l'enregistrement et le traitement de plusieurs milliers de spectres, nous pouvons dresser le bilan suivant :

- la teneur minimale des composés identifiables avec notre spectromètre (9,4 T) est de l'ordre de 0,3-0,4 % ;
- en général, tous les carbones des composés identifiés sont observés, excepté certains carbones quaternaires appartenant aux composés minoritaires ;
- le nombre de superpositions est limité et n'empêche pas l'identification d'un composé ;
- les variations des déplacements chimiques ($\Delta\delta$) sont inférieures à 0,05 ppm dans la grande majorité des cas. Il existe néanmoins quelques exceptions, en particulier les composés phénoliques (thymol et carvacrol, par exemple) ou les composés carbonyles α,β -insaturés, dont certains carbones sp^2 présentent des variations de déplacement chimique plus importantes selon la polarité, la fonctionnalisation et l'abondance des autres constituants du mélange (Castola *et al.*, 1997) ;
- dans un mélange, deux à trois douzaines de composés peuvent être identifiés. Par exemple, dans un échantillon d'huile essentielle d'écorce de tronc de *Cleistopholis patens*, 33 composés présents à des teneurs comprises entre 0,4 et 25,4 % ont été identifiés (Ouattara *et al.*, 2013).

-

III.3.2. Application à l'analyse d'huiles essentielles

De nombreuses huiles essentielles ont été caractérisées au moyen de la méthode d'analyse basée sur la RMN ^{13}C que nous venons de décrire, utilisée en complément de la CPG(Ir) ou en combinaison avec la CPG(Ir) et la CPG-SM. Ainsi :

- Rossi *et al.* (2007) ont identifié 31 composés dans l'huile essentielle de *Daucus carota* de Corse, parmi lesquels 4 phénylpropanoïdes dont 2 majoritaires : le (*E*)-méthylisoeugénol et l'élémicine ;
- deux oxydes monoterpéniques, les *cis*- et *trans*-7-hydroxy-3,7-diméthyl-3,6-oxyoctanal, ont été identifiés par RMN ^{13}C pour la première fois à l'état naturel dans deux huiles essentielles d'espèces du genre *Cymbopogon* du Vietnam : *C. flexuosus* et *C. tortilis* (Ottavioli *et al.*, 2009) ;
- Paoli *et al.* (2011) ont identifié 23 composés dans l'huile essentielle de bois de *Cedrus atlantica* de Corse, principalement des monoterpènes à squelette pinane (α - et β -pinène) et plusieurs sesquiterpènes à squelette himachalane (himachalol, α -, β -, γ -himachalène et himachala-2,4-diène) ;
- diverses lactones *p*-menthaniques (mintlactone, isomintlactone, hydroxymintlactone, menthofurolactone et épimenthofurolactone) ont été mises en évidence dans l'huile essentielle de feuilles de *Mentha aquatica* de Corse (Sutour *et al.*, 2011) ;
- Bighelli *et al.*, (2010) ont étudié pour la première fois la composition chimique de l'huile essentielle de graines d'*Angelica acutiloba* originaire du Vietnam, marquée par la présence de composés appartenant à diverses familles chimiques : terpènes (*p*-cymène, γ -terpinène, etc.), alcools et acétates acycliques non terpéniques (dodécanol, acétate de tétradécyle, etc.) et phtalides ((*Z*)-ligustilide, 3-(*Z*)-butylidene-phtalide, etc.). Il est à noter que le 3-(*Z*)-butylidène-4,5,6,7-tétrahydro-*cis*-6,7-dihydroxy-phtalide a été identifié grâce aux données RMN ^{13}C de la littérature et est absent des bibliothèques de spectres de masse ;
- Yapi *et al.* (2012b) ont analysé par CPG(Ir) et RMN ^{13}C les huiles essentielles isolées à partir de différentes parties (feuilles, branches et racines) de *Pachypodanthium staudtii* Engl & Diels récolté en Côte d'Ivoire. Toutes sont riches en composés hydrocarbonés et composés aromatiques. Les huiles essentielles de racines et de branches sont marquées par une forte teneur en 2,4,5-triméthoxystyrène (composé majoritaire) et en sabinène, tandis que les huiles essentielles de feuilles contiennent principalement du β -élémane, du (*E*)- β -caryophyllène, du β -sélinène, du β -bisabolène, du δ -cadinène et du 2,4,5-triméthoxy-1-vinylbenzène.

Cette méthode d'analyse a également permis d'identifier des molécules pour lesquelles la combinaison classique de la CPG(Ir) associée à la CPG-SM ne permettait pas de conclure. Ces différents cas sont exposés dans les points qui suivent.

- **Identification de molécules qui co-éluent**

Il n'est pas rare d'observer des composés qui co-éluent dans les huiles essentielles. C'est notamment le cas pour le limonène, le 1,8-cinéole et le β -phellandrène, qui co-éluent sur colonne apolaire (BP-1) ou encore pour le β -himachalène qui co-élué avec le β -bisabolène et le β -curcumène sur colonne apolaire (BP-1) et avec le valencène sur colonne polaire (BP-20). Ainsi, alors que l'analyse par CPG-SM de l'huile essentielle de rhizomes de *Piper betle* du Vietnam conduit à l'identification du δ -cadinol à une teneur d'environ 20 %, l'analyse par RMN ^{13}C révèle la présence du τ -cadinol et τ -muurolol à environ 10 % chacun. En effet, ces deux composés co-éluent sur colonne apolaire (Lê Thanh *et al.*, 1996/1997).

Un autre exemple concerne l'identification par RMN ^{13}C du (*E*)- β -caryophyllène et du 4,8- β -époxy-caryophyllane dans l'huile essentielle de feuilles de *Polyalthia longifolia* de Côte d'Ivoire, alors que ces deux composés co-éluent sur colonne apolaire (BP-1). Ainsi, seul le (*E*)- β -caryophyllène a été identifié par SM (Ouattara *et al.*, 2014).

- **Identification de stéréoisomères**

La RMN ^{13}C a permis l'identification de certains stéréoisomères, ce qui est délicat par l'utilisation de techniques conventionnelles. A titre d'exemples, nous pouvons citer l'identification :

- de quatre stéréoisomères possédant un squelette cédrane (α -cédrene/ α -funébrène et β -cédrene/ β -funébrène). Ceux-ci ne peuvent être différenciés ni sur la base de leurs spectres de masse qui sont quasiment superposables deux à deux, ni en se fiant aux indices de rétention qui sont très proches. En revanche, ces couples, qui ne diffèrent que par la stéréochimie de la jonction de cycle, présentent des spectres de RMN ^{13}C suffisamment différenciés pour pouvoir les identifier sans difficulté dans les huiles essentielles de bois de cèdre (Tomi *et al.*, 1995) et de *Cupressus funebris* du Vietnam (Duquesnoy *et al.*, 2006) ;
- de quatre stéréoisomères du dihydroagarofurane : isodihydroagarofurane, *cis*-dihydroagarofurane, 4-*épi-trans*-dihydroagarofurane et 4-*épi-cis*-dihydroagarofurane) dans l'huile essentielle d'écorce de *Cedrelopsis grevei* (Cavalli *et al.*, 2004a) ;

- de la shyobunone et de son épimère (6-épi-shyobunone) dans l'huile essentielle de *Daucus carota* de Corse (Gonny *et al.*, 2004) ;
- de l'isoliratul et de l'épi-isoliratul (deux épimères ayant des spectres de masse extrêmement proches) dans l'huile essentielle de *Santolina corsica* (Liu *et al.*, 2007) ;
- des 4,8- α - et 4,8- β -époxyaryophyllanes dans l'huile essentielle de feuilles de *Polyalthia longifolia* de Côte d'Ivoire. Ces deux isomères présentent des spectres de masse similaires et des indices de rétention proches (Ouattara *et al.*, 2014) ;
- de deux isomères sesquiterpéniques à squelette guaiane (furanoguaia-1,4-diène et furanoguaia-1,3-diène) dans les huiles essentielles de *Xylopiya rubescens* et de *Xylopiya staudtii* de Côte d'Ivoire (Yapi *et al.*, 2013 ; Yapi *et al.*, 2015) ;
- du germacra-1(10),5-dièn-4 α -ol dans les huiles essentielles de 5 espèces du genre *Fortunella*. Dans cette étude, les données RMN ^{13}C de ce composé sont décrites pour la première fois. En effet, les deux diastéréoisomères α - et β - du germacra-1(10),5-dièn-4-ol ont longtemps fait l'objet de discussions autour de leur identification (Sutour *et al.*, 2015a).

- **Identification de molécules thermosensibles**

La RMN ^{13}C a également été utilisée au laboratoire pour l'identification et la quantification de composés thermosensibles tels que :

- le furanodiène et le furanoélémente dans l'huile essentielle de rhizomes et fleurs de *Smyrniolum olusatrum* de Corse (Baldovini *et al.*, 2001). Au cours de l'analyse par CPG, le furanodiène se réarrange thermiquement selon une réaction sigmatropique [3,3] (transposition de Cope) pour donner le furanoélémente. Les deux composés possèdent donc le même couple d'indices de rétention et ne sont pas différenciables en CPG(Ir) et en CPG-SM ;
- l'ascaridole et son isomère, l'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 par CPG ;
- les germacrènes A, B et C dans les huiles essentielles de *Cleistopholis patens* de Côte d'Ivoire. Le germacrène A se réarrange thermiquement en β -élémente, ce qui rend difficile sa quantification par CPG(Ir) dans l'huile essentielle de feuilles. Les germacrènes B et C se réarrangent respectivement en γ - et δ -élémente dans l'huile essentielle d'écorce. Le réarrangement thermique partiel ou total des germacrènes en éléments est confirmé par l'examen de l'intensité des signaux sur le spectre de RMN ^{13}C . La teneur erronée des germacrènes quantifiés par CPG est corrigée grâce à la RMN ^{13}C (Ouattara *et al.*, 2013).

- **Combinaison de la chromatographie sur colonne et de la RMN ^{13}C**

Dans le cas d'huiles essentielles complexes, il est parfois utile d'avoir recours à un (ou plusieurs) fractionnement(s) sur colonne ouverte de silice (ou alumine, ou sephadex), combiné(s) à des analyses par CPG(Ir) et RMN ^{13}C , dans le but d'obtenir une composition chimique détaillée et fiable. En effet, la RMN ^{13}C peut permettre d'identifier, au sein des fractions, des composés présents en très faible proportion dans l'huile essentielle brute. Cette méthode a, par exemple, été appliquée pour :

- l'analyse de l'huile essentielle isolée à partir des parties aériennes de *Daucus carota* (Gonny *et al.*, 2004) ;
- l'étude de la composition chimique des huiles essentielles d'aiguilles, de baies, de bois et de racines de *Juniperus communis* ssp. *alpina* (Gonny *et al.*, 2006) ;
- l'analyse d'huiles essentielles de *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* et de *Mentha aquatica*, originaires de Corse (Sutour *et al.*, 2008, 2011).

- **Combinaison de l'hémisynthèse et de la RMN ^{13}C**

La complexité de la composition chimique de certaines huiles essentielles est parfois telle que la combinaison des diverses techniques évoquées précédemment n'est pas suffisante, soit parce que des constituants ont des structures très proches, soit en raison d'une trop faible quantité de produit pour poursuivre le fractionnement. Dans ce cas, l'hémisynthèse de certaines molécules peut apporter la solution.

A titre d'exemple, nous pouvons citer les travaux menés par Liu *et al.* (2007) sur l'huile essentielle isolée à partir des parties aériennes de *Santolina corsica*. Dans cette huile essentielle, le lyratol, le butyrate de lyratyle et l'isovalérate de lyratyle ont été identifiés par comparaison de leurs spectres RMN ^{13}C avec ceux de composés authentiques préparés par oxydation ou estérification du lyratol. De même, dans une étude menée sur l'huile essentielle de racines de *Pulicaria mauritanica*, Xu *et al.* (2015) ont identifié l'isobutyrate de carvacryle par comparaison de ses données spectrales de RMN ^{13}C avec celles du composé préparé par estérification du carvacrol.

III.3.3. Autres applications

La méthode d'analyse par RMN ^{13}C développée au laboratoire a également été utilisée pour caractériser des mélanges naturels variés, de type extraits végétaux et résines principalement. Ainsi, des composés lourds, acides ou polaires ont été identifiés, comme par exemple :

- des triterpènes dans des extraits de *Quercus suber* L. (Castola *et al.*, 1999, 2002, 2005) et dans un extrait de *Santolina corsica* (Ferrari *et al.*, 2005) ;
- des diterpènes acides et neutres dans les oléorésines de *Pinus nigra* ssp. *laricio* de Corse, sans partition acido-basique préalable (Rezzi *et al.*, 2002, 2005 ; Cannac *et al.*, 2009) ;
- des lignanes (pinorésinols, laricirésinol et laricirésinol-9-acétate), pour la première fois dans les oléorésines de *Cedrus atlantica* (Nam *et al.*, 2011);
- des taxanes dans les extraits d'aiguilles de *Taxus baccata* (Duquesnoy *et al.*, 2009);
- des coumarines dans les extraits au dichlorométhane de *Peucedanum paniculatum* (Vellutini *et al.*, 2005) ;
- des sucres dans les miels de Corse (Mazzoni *et al.*, 1997) et dans les extraits de *Pinus nigra* et *Abies alba* (Duquesnoy *et al.*, 2008) ;
- des lactones sesquiterpéniques dans l'huile végétale de *Laurus novacanariensis* de Madère (Ferrari *et al.*, 2005) ;
- des stérols, des dérivés phénoliques et des diterpènes acides et neutres dans les extraits au pentane et à l'acétate d'éthyle d'une espèce marine, *Chaetomorpha linum*, récoltée en Corse. Les trois diterpènes possédant un squelette abiétane (acide abiétique, acide déhydroabiétique et déhydroabiétate de méthyle) sont identifiés pour la première fois dans un organisme d'origine marine (Sutour *et al.*, 2015b).

III.3.4. Etude de la variabilité chimique

La RMN ^{13}C , associée en général à la CPG(Ir), est une méthode adaptée à la mise en évidence d'une variabilité chimique. L'étude de cette variabilité nécessite cependant l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Un traitement statistique des données obtenues, par exemple l'Analyse en Composante Principale (ACP), est généralement associé à cette méthode. Au laboratoire, la variabilité chimique de nombreuses plantes a ainsi été étudiée, par exemple :

- les extraits isolés à partir de 38 échantillons de liège de *Quercus suber* de Corse et de Sardaigne. Leurs compositions chimiques ont permis de les classer en trois groupes sur la

base de leur teneur en friedéline, acide bétulinique et 3- α -hydroxyfriedélan-2-one (Castola *et al.*, 2002) ;

- l'analyse de la composition chimique de 57 échantillons d'huile essentielle des parties aériennes de *Bupleurum fruticosum* de Corse a mis en évidence la présence d'un seul groupe dominé par le β -phellandrène. Néanmoins, quelques échantillons présentaient une composition atypique, caractérisée par une teneur élevée en sabinène et une teneur plus faible en β -phellandrène (Liu *et al.*, 2009) ;

- les huiles essentielles de *Mentha suaveolens* ssp. *suaveolens* et ssp. *insularis* de Corse (Sutour *et al.*, 2010). Les compositions chimiques de 59 échantillons d'huile essentielle, obtenus à partir de plants individuels de *Mentha suaveolens*, ont été soumises à une partition par la méthode *k*-means et à une ACP. Ceci a permis de distinguer trois groupes de composition chimique. Le premier est caractérisé par l'association de la pulégone et de la *cis-cis-p*-menthénolide comme composés majoritaires et rassemble la totalité des échantillons de la sous-espèce *insularis*. Les deux autres groupes concernent la sous-espèce *suaveolens* dominée d'une part, par l'oxyde de pipéritone et d'autre part, par l'association de la pipériténone et de l'isopipériténone. Ainsi, si la différenciation botanique des deux sous-espèces apparaît délicate, la prise en compte de la composition chimique des huiles essentielles (présence (ssp. *insularis*)/absence (ssp. *suaveolens*) de la *cis-cis-p*-menthénolide) constitue un outil fiable pour la détermination de la sous-espèce ;

- les résines de *Cedrus atlantica* de Corse. L'analyse de 28 échantillons a permis de mettre en évidence trois groupes de compositions chimiques. Le groupe I (9 échantillons) dominé par les acides diterpéniques, le groupe II (4 échantillons) contenant majoritairement des acides résiniques et une teneur appréciable de lignanes et enfin le groupe III (15 échantillons) réunissant les résines composées majoritairement de lignanes (Nam *et al.*, 2011) ;

- Bouzabata *et al.* (2013a) ont analysé 55 échantillons d'huile essentielle des parties aériennes de *Myrtus communis* d'Algérie. Deux groupes I (78% des échantillons) et II (22% des échantillons), chacun divisé en deux sous-groupes, ont été distingués sur la base de leur teneur en α -pinène, en linalol et en acétate de linalyle ;

- les études menées par Yapi *et al.* (2012a, 2014) sur les huiles essentielles de feuilles de 2 sous-espèces du genre *Xylopi*a : *X. aethiopica* (48 échantillons) et *X. quintasii* (42 échantillons). Dans les deux cas, une classification hiérarchique ascendante et une analyse en composante principale a été réalisée. Dans le cas de *X. aethiopica*, 2 groupes ont pu être mis en évidence : le groupe I (38 échantillons) dominé par le β -pinène et le groupe II (10 échantillons) marqué par la présence majoritaire du couple β -pinène/germacrène D.

Concernant *X. quintasii*, 3 groupes ont été distingués. Le plus important est le groupe I (22 échantillons) contenant majoritairement du (*E*)- β -caryophyllène, suivi du groupe II (12 échantillons) à dominante β - α -pinène. Le groupe III (8 échantillons) est quant à lui marqué par la présence majoritaire du (*Z*)- β -ocimène, du germacrène D, du (*E*)- β -ocimène et du furanoguaia-1,4-diène. Pour les deux sous-espèces, cette variabilité chimique est corrélée aux conditions pédoclimatiques ;

- les huiles essentielles de cônes de *Pinus halepensis* récoltés en Corse (Nam *et al.*, 2014). L'analyse de la composition chimique de 15 échantillons obtenus à partir de plants individuels répartis sur 3 stations de l'île a permis de mettre en évidence 2 groupes de compositions chimiques : l'un concernant 8 échantillons et contenant majoritairement de l' α -pinène, l'autre concernant 7 échantillons pour lesquels les composés majoritaires sont le myrcène et l' α -pinène ;

- l'étude menée par Bouzabata *et al.* (2014) sur 8 échantillons d'huile essentielle de feuilles d'*Eucalyptus bosistoana* acclimatée à Tamanrasset (sud de l'Algérie). Leur analyse par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ^{13}C a permis de distinguer 2 groupes de composition chimique : un premier groupe (5 échantillons) dominé par le *p*-cymène, la cryptone, le 1,8-cinéole et le spathulénol, et un second groupe (3 échantillons) dans lequel les composés majoritaires sont le 1,8-cinéole et l' α -pinène.

En conclusion, cette étude bibliographique montre l'efficacité de la méthode d'analyse mise au point et développée au laboratoire, y compris au moyen d'un appareil de routine opérant à champ moyen (4,7 ou 9,4 T). Elle donne des résultats probants et complémentaires des autres méthodes d'analyses dites conventionnelles. Cette méthode a pu être appliquée à une grande variété de mélanges naturels tels que les huiles essentielles, les hydrolats ou encore les huiles végétales, les extraits et résines. Elle permet l'identification et la quantification de composés volatils ou non, de stéréoisomères, de molécules thermosensibles, sans séparation ni dérivatisation préalable, après optimisation et adaptation des conditions expérimentales à chaque famille de molécules.

Chapitre II

Caractérisation chimique d'huiles essentielles du
Vietnam

Ce chapitre regroupe plusieurs études qui concernent la caractérisation chimique de différentes huiles essentielles du Vietnam par combinaison de la chromatographie sur colonne ouverte de silice (lorsque l'intérêt et les quantités en huile essentielle nous le permettaient), la CPG(Ir), la CPG-SM et la RMN ^{13}C . Il met en évidence les potentialités de notre méthode d'analyse et plus largement de la RMN ^{13}C pour l'identification de certaines molécules (absentes de nos bibliothèques de spectres, non décrites dans la littérature ou encore stéréoisomères).

I. Travaux antérieurs réalisés au laboratoire relatifs à la connaissance des huiles essentielles du Vietnam.

Dans ce paragraphe introductif, nous présentons les résultats des travaux menés au laboratoire sur les huiles essentielles isolées de plantes poussant à l'état spontané ou cultivées au Vietnam. En effet, depuis près d'une vingtaine d'années, notre équipe travaille en collaboration avec divers centres de recherche de Hanoi, d'abord dans le cadre d'un Programme de coopération décentralisée, initié par le Ministère des Affaires Etrangères et la Collectivité Territoriale de Corse (1995-2005) et cette collaboration s'est ensuite poursuivie (2005-2015). Il s'agit principalement de l'Institut d'Ecologie et des Ressources Biologiques (IERB) de Hanoi (Pr Tran Minh Hoi, Dr Tranh Hui Thai), de la Faculté de Pharmacie de Hanoi (Pr Nguyen), de l'Institut Materia Medica (Dr Bui Thi Bang) et, à un degré moindre, du Centre pour l'Education et le Développement de la Chromatographie (Dr Nguyễn Xuân Dũng) et de la Faculté de Chimie de Hanoi (Dr Ninh Khac Ban). Nous avons choisi de présenter les résultats de ces travaux, qui ont conduit à près de vingt publications, en tenant compte évidemment du supplément d'information apporté à la connaissance de la plante à travers la composition (et parfois l'activité biologique) de son huile essentielle, mais aussi en mettant en évidence les différentes potentialités de la RMN ^{13}C pour l'identification des constituants d'un mélange naturel complexe.

Tout d'abord, il est intéressant de noter que le Vietnam est l'un des pays du monde qui bénéficie de la biodiversité la plus riche. Cette extraordinaire diversité, notamment au niveau de la flore, s'explique par la situation géographique (sud-est de l'Asie), le climat (tropical au sud, subtropical humide au nord, avec des moussons) et la complexité géologique du pays, situé à l'interface de trois plaques continentales convergentes (Sterling *et al.*, 2005). Près de 12 000 espèces végétales y sont recensées, parmi lesquelles environ 4000 espèces ont des vertus médicinales. Ces 25 dernières années, le corps médical vietnamien a su mettre en avant

plus de 1800 espèces de plantes couramment utilisées dans la médecine populaire. Il faut savoir que dans certaines régions du Vietnam, la culture de ces plantes constitue une ressource économique notable. Or, cette ressource souffre aujourd'hui d'un problème de surexploitation qui menace certaines plantes médicinales d'extinction (*Panax vietnamensis* et *Panax stipuleanatus*, notamment). Aussi, le gouvernement vietnamien encourage depuis 2013 un plan d'aménagement global (aménagement de zones de production, construction de parcs nationaux) visant à préserver et à développer l'usage des plantes médicinales dans le secteur pharmaceutique d'ici 2020/2030, tout en respectant la biodiversité de chaque région (Péré, 2015).

I.1. Huiles essentielles analysées par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ¹³C.

Parmi les huiles essentielles étudiées, certaines présentaient une composition chimique pour laquelle le schéma standard d'analyse utilisé au laboratoire (CPG(Ir), CPG-SM et RMN ¹³C) a permis d'identifier près de 90 % de la composition chimique globale, sans rencontrer de difficultés. C'est le cas notamment des huiles essentielles suivantes :

- ***Huile essentielle isolée à partir des parties aériennes de *Bursera tonkinensis* Guill. (Burseraceae)***

Quinze monoterpènes ont été identifiés, représentant 97,2 % de la composition chimique globale. La RMN ¹³C a confirmé l'identification des 7 composés majoritaires (95 % de la composition chimique), l' α -phellandrène étant le composé ultra majoritaire (70,1 %), suivis de 6 autres composés (1,4-8,4 %) (Hoi *et al.*, 2004).

- ***Huile essentielle isolée des parties aériennes d'*Acronychia pedunculata* (L.) Miq. (Rutaceae)***

L'analyse a montré que l' α -pinène (57,4 %) et le (*E*)- β -caryophyllène (13,6 %) sont les composés majoritaires parmi les 34 composés identifiés. Cette huile essentielle présente par ailleurs un large spectre d'activité antimicrobienne, en particulier contre *Salmonella enterica* et *Staphylococcus epidermidis* (Lesueur *et al.*, 2008).

- ***Huiles essentielles de feuilles et de fleurs d'*Artemisia vulgaris* L. (Asteraceae)***

Ces huiles essentielles sont riches en composés oxygénés, tout particulièrement le 1,8-cinéole (21,7 et 20,3 %), le camphre (10,9 et 14,7 %) et l' α -terpinéol (9,8 et 4,8 %). Les compositions de ces deux huiles essentielles présentent peu de différences. De même, la

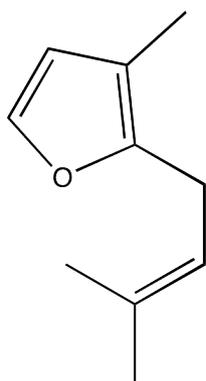
composition de l'huile essentielle des parties aériennes de la plante varie peu au cours du cycle annuel. Néanmoins, l'huile essentielle isolée avant la floraison présente des variations quantitatives notables. La teneur en monoterpènes hydrocarbonés est nettement inférieure (particulièrement l' α -pinène et le β -pinène) tandis que la teneur en monoterpènes oxygénés est plus importante (surtout celles du bornéol, du myrténol et du *trans*-carvéol). De même, cet échantillon présente une teneur légèrement plus importante en composés sesquiterpéniques, à savoir le β -élémane, le spathulenol, l'oxyde de caryophyllène, le germacra-1(10),5-diène-4 β -ol et le presilphiperfolan-9-ol. Ce dernier composé est un sesquiterpène plutôt inhabituel, qui a été identifié par RMN ^{13}C par comparaison avec les données de la littérature (Thao *et al.*, 2004).

- ***Huiles essentielles de feuilles et de tiges de deux variétés d'Illicium griffithii Hook. F. et Thoms. (Illiciaceae)***

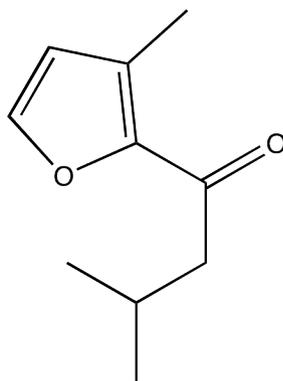
Ces deux variétés présentent la particularité d'avoir des pédoncules longs. Les compositions des huiles essentielles de feuilles, d'une part, et celles des tiges, d'autre part, sont semblables. Elles sont dominées soit par le safrole (variété A, 52,4 et 53,5 %), soit par le safrole et le méthyleugénol à des teneurs sensiblement équivalentes (variété B : 23,3 et 26,0 % / 26,2 et 22,8 %, respectivement). Entre 15 et 19 composés représentant de 88,7 % à 92,0 % de l'huile essentielle ont été identifiés par RMN ^{13}C (Tam *et al.*, 1998a).

- ***Huiles essentielles d'Elsholtzia blanda Benth., d'E. penduliflora W.W. Smith et d'E. winitiana Craib. (Labiatae/Lamiaceae)***

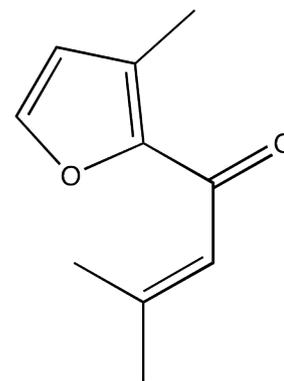
Six échantillons d'huile essentielle ont été isolés à partir des parties aériennes de trois espèces du genre *Elsholtzia*, *E. blanda*, *E. penduliflora* et d'*E. winitiana*. Les compositions chimiques de ces huiles essentielles diffèrent considérablement d'une espèce à l'autre. Ainsi, le linalol est identifié comme composé majoritaire (75,2 et 56,8 %) des deux échantillons d'huile essentielle d'*E. blanda*. Les deux échantillons se distinguent néanmoins par l'importance de la teneur du 1,8-cinéole (20,8 %) exclusivement dans l'un d'entre eux. Ce composé est d'ailleurs le composé majoritaire (62,7 et 65,5 %) des deux échantillons d'huile essentielle d'*E. penduliflora*. Enfin, le rosefurane (56,0 %) et la déhydroelsholtzia cétone (22,8 %) dominent la composition d'un échantillon d'huile essentielle d'*E. winitiana*, tandis que le second échantillon contient ultra-majoritairement l'elsholtzia cétone (87,5 %). La composition de l'huile essentielle d'*E. winitiana*, est décrite pour la première fois dans le cadre de ce programme de coopération (Lesueur *et al.*, 2007a).



rosefurane



elsholtzia cétone



déhydroelsholtzia cétone

- ***Huile essentielle de Piper bavinum C. DC. (Piperaceae)***

L'huile essentielle a été isolée à partir des parties aériennes de la plante (feuilles et fleurs) et sa composition est décrite pour la première fois. Cette huile essentielle est riche en composés sesquiterpéniques, les composés majoritaires étant le bicylogermacrène (10,6 %), le globulol (5,7 %), le lédène (5,1 %), le viridiflorol (3,5 %) et l' α -gurjunène (3,0 %). Parmi les monoterpènes, l' α -pinène (4,4 %) et le terpinèn-4-ol (3,2 %) sont prédominants. Il nous faut signaler que la composition de cette huile essentielle est caractérisée d'une part, par l'absence de composé nettement prédominant et d'autre part, par la présence de composés possédant des squelettes carbonés très variés : cadinane, muurolane, germacrane, élémmane, lédane, caryophyllane, humulane, etc. Il est remarquable que parmi les 50 composés identifiés dans cette huile essentielle, 38 d'entre eux, dont les teneurs sont comprises entre 0,5 % et 10,6 %, ont été identifiés par RMN, sans séparation préalable (Lesueur *et al.*, 2009).

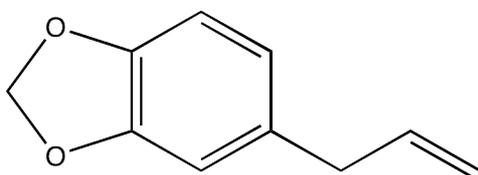
1.2. Identification de molécules absentes des bibliothèques de spectres de masse.

Dans certains cas, la RMN a permis d'identifier des molécules qui n'étaient pas identifiées par CPG-SM car absentes des bibliothèques de spectres de masse. Par contre, nous disposons des données RMN ^{13}C dans nos bibliothèques de spectres de RMN, que ce soit celle qui est construite à partir des spectres enregistrés au laboratoire ou celle élaborée avec les données de la littérature récente. Nous pouvons citer :

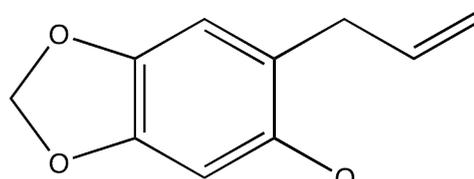
- ***Huiles essentielles d'Illicium griffithii Hook. f. et Thoms. (Illiciaceae)***

Les huiles essentielles de différentes parties d'*Illicium griffithii* (feuilles, branches, fleurs et racines ; variété à pédoncule court) pour lesquelles une trentaine de composés

représentant 93,9 % à 98,2 % de la composition chimique ont été identifiés par l'ensemble de ces techniques. Le produit majoritaire pour l'ensemble de ces huiles essentielles est le safrole (51,6-65,3 %). L'huile essentielle de racines se distingue néanmoins par la présence de 4-méthoxysafrole (19,6 %), identifié uniquement par RMN ^{13}C , à côté du safrole (59,6 %) (Tam *et al.*, 2005).



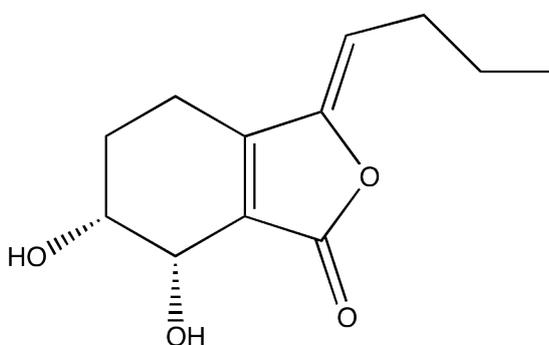
safrole

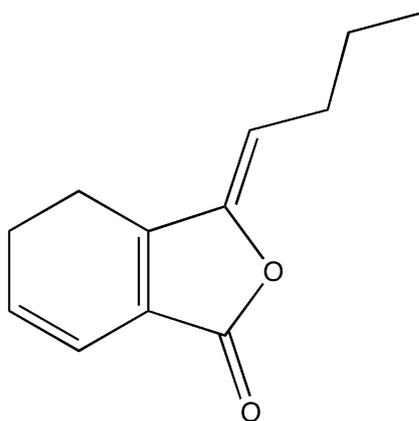


4-méthoxysafrole

- **Huile essentielle de graines d'*Angelica acutiloba* Kit. (Umbelliferae)**

L'huile essentielle a été analysée par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ^{13}C . Les composés majoritaires se répartissent en 3 groupes : i) des composés linéaires non terpéniques, tels que l'acétate de dodécyle (33,0 %), le dodécanol (7,1 %) et l'acétate de tétradécyle (5,0 %), ii) des monoterpènes tels que le p-cymène (6,4 %) et le γ -terpinène (5,9 %) ainsi que iii) des phthalides parmi lesquels, le (*Z*)-ligustilide (17,4 %). Si ce phthalide a bien été identifié par SM et par RMN, un autre phthalide, le 3-(*Z*)-butylidène-4,5,6,7-tétrahydro-*cis*-6,7-dihydroxyphthalide (1,8 %, Ira=1945) a été identifié uniquement par RMN ^{13}C par comparaison avec les données de la littérature (Bighelli *et al.*, 2010).

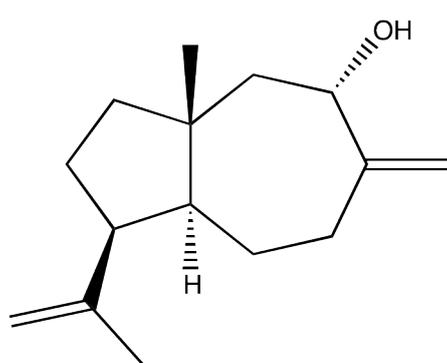
3-(*Z*)-butylidène-4,5,6,7-tétrahydro-*cis*-6,7-dihydroxyphthalide



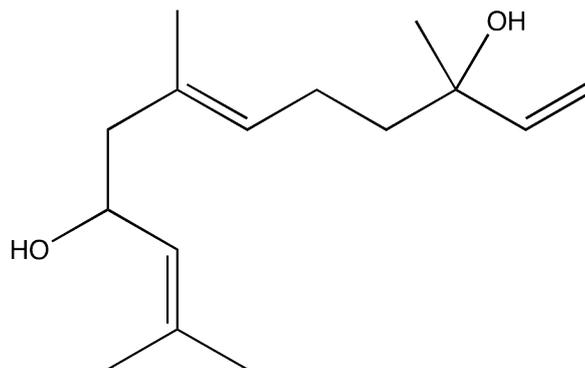
(Z)-ligustilide

• **Huile essentielle de racines de *Fokiena hodginsii* (Dunn) Henry et Thomas (Cupressaceae)**

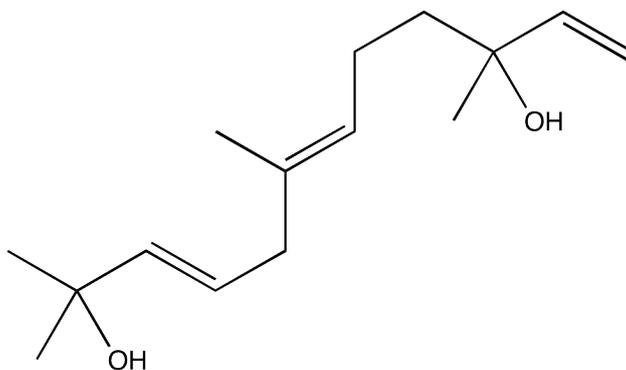
Cette huile essentielle a été analysée par combinaison de la CPG(Ir), la CPG-SM et la RMN ^{13}C et sa composition est dominée par deux alcools sesquiterpéniques de la famille du farnésane, le (*E*)-nérolidol (35,5 %) et le fokiéniol (26,4 %). Cette huile essentielle étant riche en sesquiterpènes, l'identification des composés minoritaires (particulièrement les hydrocarbures sesquiterpéniques) a été réalisée par CPG(Ir) et RMN après fractionnement répétitif sur colonne ouverte de silice (CC Flash donnant une fraction hydrocarbonée F1 et une fraction oxygénée F2, puis CC fines donnant diverses fractions F1.1-F1.10 et F2.1-F2.4). Une soixantaine de composés ont été identifiés. Dans les sous-fractions oxygénées F2.x, trois composés absents des bibliothèques de spectres de masse ont été identifiés par RMN ^{13}C en comparant les données spectrales avec celles de la littérature : le dauca-8(14),11-dièn-9-ol (3,9 %), le 9-hydroxynérolidol (0,2 %) et le 2,6,10-triméthylodéca-3(*E*),6(*E*),11-trièn-2,10-diol (0,1 %) (Lesueur *et al.*, 2006).



dauca-8(14),11-dièn-9-ol



9-hydroxynérolidol



2,6,10-triméthylodéca-3(E),6(E),11-triène-2,10-diol

1.3. Identification de molécules qui co-éluent sur les colonnes utilisées pour les analyses par CPG et CPG-SM.

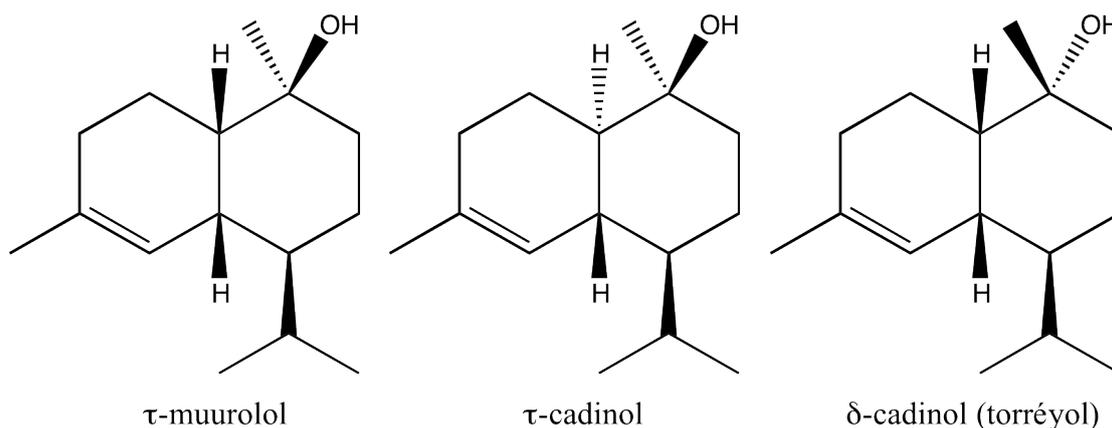
Dans les huiles essentielles étudiées, nous avons observé des co-élutions de composés, phénomène très fréquemment rencontré. Dans le cas où deux composés co-éluent sur colonnes polaire et apolaire, ou lorsque un composé co-élué à la fois avec un composé A sur colonne polaire et avec un composé B sur colonne apolaire, il est possible d'évaluer sa teneur (%) en combinant les données issues de la CPG (teneur globale des 2 molécules) et de la RMN (moyenne des intensités relatives des signaux appartenant à chaque composé). Ainsi :

- le 1,8-cinéole et le β -phellandrène sont deux composés qui co-éluent à la fois sur colonne polaire (BP-20) et apolaire (BP-1). C'est notamment le cas dans les huiles essentielles (feuilles, branches, écorce de tronc et écorce de racines) d'une espèce non identifiée d'*Illicium* du Vietnam (Tam *et al.*, 1998b). La teneur du 1,8-cinéole est comprise entre 1,8 % et 10,9 % selon l'échantillon et celle du β -phellandrène entre 0 et 1,8 %. C'est également le cas de l'huile essentielle de feuilles de *Litsea cubeba*. Les 6 échantillons analysés présentent une forte variabilité. Les compositions chimiques de 4 d'entre eux sont dominées par le 1,8-cinéole (23,4-51,7 %), une autre par le linalol (91,1 %) et une dernière par le sabinène (48,1 %). Seul ce dernier échantillon contient le 1,8-cinéole et le β -phellandrène à des teneurs évaluées à 7,5 % et 1,4 %, respectivement (Bighelli *et al.*, 2005). Nous signalerons toutefois que ces deux molécules sont séparées sur colonne apolaire DB-5.

- Le linalol et le *cis*-hydrate de sabinène co-éluent sur les deux colonnes (Ira=1081 ; Irp=1541) dans l'huile essentielle de *Michelia foveolata*, et représentent ensemble 1,6 % de la composition chimique globale (Lesueur *et al.*, 2007b).

- Les *cis*- et *trans*-calaménènes co-éluent sur colonnes apolaire (Ira=1511) et polaire (Irp=1830) dans l'analyse de l'huile essentielle de racines de *Fokiena hodginsii* et représentent, ensemble, 1,8 % de la composition chimique globale (Lesueur *et al.*, 2006).

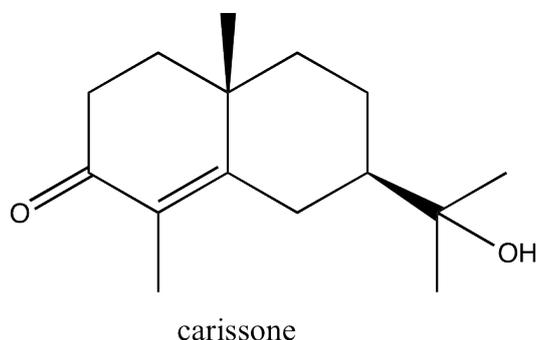
- l'huile essentielle de rhizomes de *Piper betle* est riche en sesquiterpènes. Dans cette huile essentielle, 44 composés représentant 96,1 % de la composition chimique globale ont été identifiés par combinaisons des techniques [CPG(Ir), CPG-SM et RMN ^{13}C]. Le chromatogramme laisse apparaître un pic important (20,7 %) ayant un indice de rétention de 1621 sur colonne apolaire. L'analyse par CPG-SM identifie ce composé comme étant le δ -cadinol (également connu sous le nom de torrèyol). Or, un autre composé élué avec un indice de rétention de 1623 sur colonne apolaire est également identifié comme étant le δ -cadinol. Parallèlement, la RMN ^{13}C montre de manière non ambiguë la présence de τ -muurolol et de τ -cadinol dans des proportions équivalentes (environ 10 % chacun). Ceci indique que le pic du composé représentant 20,7 % de la composition chimique de l'huile essentielle, identifié à tort en CPG-SM comme étant le δ -cadinol, correspond en fait à la co-élution de 2 composés : le τ -muurolol et le τ -cadinol (Lê Thanh *et al.*, 1996/1997).



1.4. Identification de molécules qui ne sont pas assez volatiles pour être éluées en CPG et CPG-SM

Il arrive parfois qu'après analyse, le spectre de RMN d'une HE présente des signaux (avec des intensités appréciables) qui ne sont attribués à aucun composé identifié alors que tous les pics importants du chromatogramme sont attribués. Ces signaux appartiennent donc à un composé qui n'est pas élué en CPG et qui par conséquent n'est pas pris en compte lors de l'analyse réalisée par CPG(Ir) et par CPG-SM. Ce composé a pu être identifié par RMN ^{13}C ,

dans plusieurs cas. Cela a notamment été le cas de la carissone identifiée dans l'huile essentielle d'*Acanthopanax trifoliatum* (Araliaceae). En effet, cette huile essentielle a été classiquement analysée par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ^{13}C . Riche en monoterpènes, essentiellement en α -pinène (23,9 %) et en sabinène (14,9 %), cette huile essentielle ne présentait pas de difficulté d'analyse. Néanmoins, un composé minoritaire était non élué en CPG et nous suspicions sa présence d'après les signaux non attribués sur le spectre de RMN ^{13}C et pour lequel nous ne disposons pas de données spectrales RMN ^{13}C dans la bibliothèque de spectres du laboratoire. Aussi, afin de parvenir à son identification, l'huile essentielle a été fractionnée et par comparaison avec les données RMN ^{13}C de la littérature, nous avons identifié la carissone, une bicyclo[4.4.0]décanone hydroxylée présente à une teneur évaluée à environ 1 % par RMN (Muselli *et al.*, 1999).

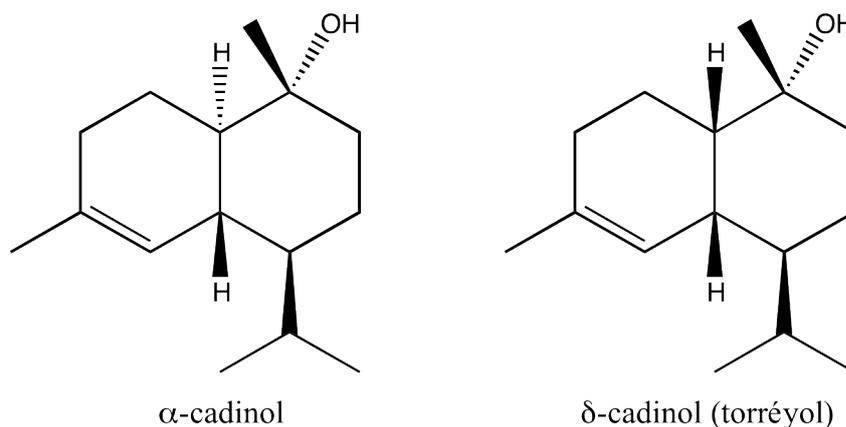


I.5. Identification de stéréoisomères

Pour certaines huiles essentielles étudiées, l'analyse par RMN ^{13}C s'est avérée indispensable pour l'identification de molécules stéréoisomères. En effet, les stéréoisomères présentent, dans la très grande majorité des cas, des spectres de masse extrêmement proches sinon indifférenciables. Leur identification nécessite la combinaison de la CPG(Ir) et de la SM et fonctionne correctement si les deux isomères sont présents dans l'huile essentielle. Cette identification est plus délicate s'il n'y a qu'un seul isomère et dépend avant tout, dans ces conditions, de la différence des valeurs des indices de rétention sur colonnes apolaire et polaire. A contrario, les stéréoisomères possèdent des spectres de RMN différents contenant au moins quelques signaux caractéristiques.

- **Huiles essentielles d'*Illicium* (espèce non identifiée)**

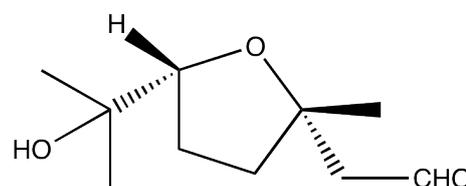
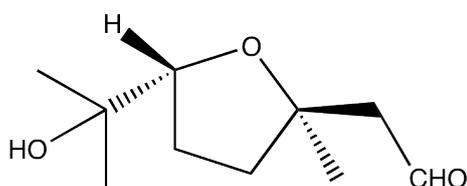
Dans les huiles essentielles (feuilles, branches et écorce de tronc) d'une espèce d'*Illicium* non identifiée, l'identification de l' α -cadinol par CPG-SM s'est avérée difficile compte tenu du fait que la consultation des bibliothèques de spectres de masse donnaient pour résultats à la fois l' α -cadinol et le δ -cadinol. En effet, ces deux isomères ne diffèrent que par la stéréochimie de la jonction de cycle. En revanche, les valeurs des signaux des déplacements chimiques en RMN ^{13}C pour les deux isomères sont suffisamment différents pour permettre sans doute aucun l'identification de l' α -cadinol (0,7-1,1 %). Dans l'huile essentielle de feuilles de cette même plante, la RMN ^{13}C a également permis l'identification des *cis*- et *trans*-oxyde de linalol (type furane) (Ira=1062 et 1076 respectivement) (Tam *et al.*, 1998b).



- **Huiles essentielles de feuilles de *Cymbopogon flexuosus* et de *Cymbopogon tortilis* (Poaceae)**

Ces huiles essentielles ont été analysées par combinaison de la CPG(Ir), CPG-SM et RMN ^{13}C , sans séparation au préalable. Le gèranial (39,2 et 32,0 %) et le néral (24,1 et 19,1 %) sont les composés majoritaires. Ces huiles essentielles contiennent également divers monoterpènes portant une fonction oxyde, tels que le 6,7-époxyneral et le 6,7-époxygèranial ou encore les *cis*- et *trans*- oxydes de linalol (forme furanique). Dans les deux cas, les épimères ne peuvent être différenciés par SM. Ils le sont par la combinaison de la SM avec les indices de rétention et bien entendu par RMN ^{13}C . Deux composés minoritaires, les *cis*-7-hydroxy-3,7-diméthyl-3,6-oxyoctanal (4,4 % et 1,4 %) et *trans*-7-hydroxy-3,7-diméthyl-3,6-oxyoctanal (4,5 % et 2,5 %) (synonymes : *cis*- and *trans*-tétrahydro-5-(1-hydroxy-1-méthyléthyl)-2-méthyl-furanacétaldéhyde) qui n'avaient pas été identifiés par SM, l'ont été par comparaison de leurs déplacements chimiques en RMN ^{13}C avec les données de la littérature. Les deux épimères présentent des spectres de RMN ^{13}C parfaitement différenciés. Enfin, l'identification par RMN ^{13}C de l'isoascaridole et du β -élémente permet de conclure

que ces deux composés sont effectivement des métabolites de la plante et qu'ils ne proviennent pas de l'isomérisation thermique de l'ascaridole, d'une part, et du germacrène A, d'autre part (Ottavioli *et al.*, 2009 ; Ouattara *et al.*, 2013).

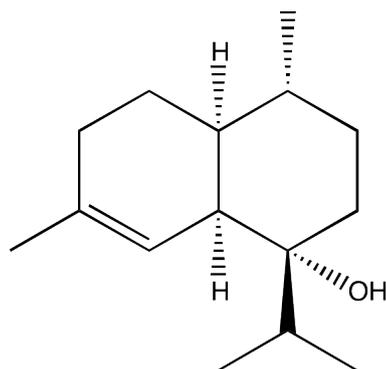


trans-7-hydroxy-3,7-diméthyl-3,6-oxyoctanal

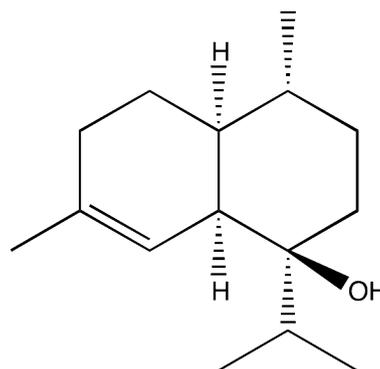
cis-7-hydroxy-3,7-diméthyl-3,6-oxyoctanal

- **Huiles essentielles d'*Eupatorium coelistinum* L. (Compositae)**

Autre exemple, celui des huiles essentielles de tiges et de feuilles d'*Eupatorium coelistinum* qui illustre très clairement la complémentarité de la CPG(Ir), de la CPG(SM) et de la RMN ^{13}C . Dans l'huile essentielle de tiges, le composé très nettement majoritaire est le méthylchavicol (45,2 %) tandis que dans l'huile essentielle de feuilles, 3 composés dominent la composition chimique avec des teneurs comparables : l'acétate de bornyle (12,6 %), le camphène (11,9 %) et le *cis*-cadin-4-èn-7-ol (10,9 %). Pour cette dernière molécule, les bibliothèques de spectres de masse proposaient comme identification le chamomillol qui ne diffère du *cis*-cadin-4-èn-7-ol que par la stéréochimie des substituants du carbone C7. Ces deux molécules ont donc des spectres de masse trop similaires pour être différenciées. Il est important de préciser qu'au moment où l'analyse a été réalisée, le spectre de masse du *cis*-cadin-4-èn-7-ol n'était pas présent dans les bibliothèques de spectres commerciales ou du laboratoire. Par contre, nous disposons des données RMN ^{13}C dans notre bibliothèque des spectres de RMN construite au laboratoire avec les données de la littérature. Les spectres RMN ^{13}C de ces deux composés permettent leur identification sans ambiguïté.

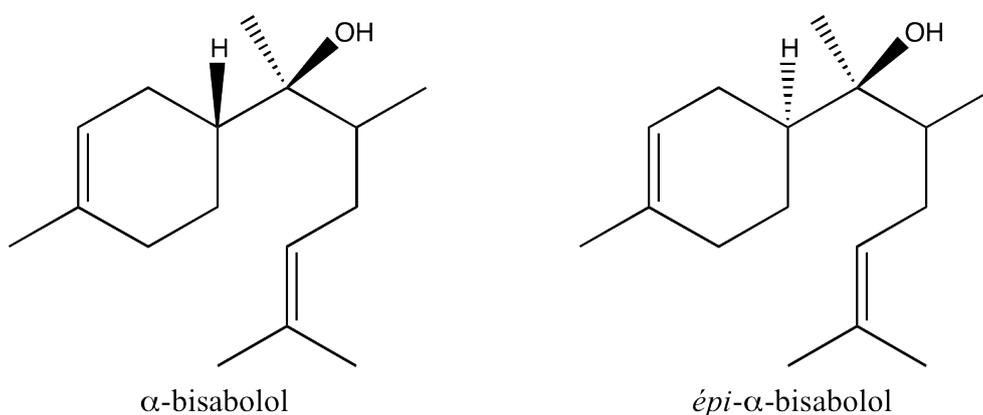


cadin-4-èn-7-ol



chamomillol

Ces échantillons contiennent également un composé à une teneur de 2,4 % dans l'huile essentielle de tiges et 6,4 % dans l'huile essentielle de feuilles. Ce composé a été identifié par SM comme étant l' α -bisabolol mais à tort, car les valeurs des déplacements chimiques de ses signaux sur le spectre RMN ^{13}C ne correspondent pas à l' α -bisabolol, molécule présente dans notre bibliothèque de spectres. L'hypothèse selon laquelle le composé serait l'*épi*- α -bisabolol a donc été faite car au moment de l'analyse, nous ne disposions pas de son spectre de RMN ^{13}C pour pouvoir la confirmer. Ces deux diastéréoisomères présentent en effet des spectres de masse superposables et des indices de rétention extrêmement proches sur colonnes polaire et apolaire. Ainsi, si seul l'un des deux diastéréoisomères est présent dans une huile essentielle, son identification sur la seule base de la combinaison de la CPG(Ir) et de la CPG-SM est pour ainsi dire impossible. Aujourd'hui, nous disposons des données RMN de ces deux diastéréoisomères et nous sommes à même de les identifier avec certitude (Dung *et al.*, 1998).



I.6. Identification par « reconstruction » de spectre

Cette méthode a été utilisée lors de l'analyse de l'huile essentielle d'ambrette (*Hibiscus abelmoscus*, syn=*Abelmoschus moscatus*) qui est utilisée en Asie comme additif alimentaire mais aussi en médecine traditionnelle (Inde, Malaisie, Vietnam). La méthodologie appliquée a consisté, dans un premier temps, à combiner les informations fournies par la SM et par la RMN ^{13}C afin d'avoir une idée sur le squelette et les fonctions du composé dont il pourrait s'agir. Puis dans un second temps, afin de vérifier cette hypothèse, il a été utilisé le concept de « reconstruction » de spectres de RMN ^{13}C qui a permis d'accéder à la structure du composé recherché. L'huile essentielle d'ambrette contient principalement des acétates de farnésyle ainsi qu'une lactone macrocyclique, l'ambrettolide. Dans l'étude menée par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ^{13}C sur 5 échantillons d'huile essentielle de graines d'ambrette, récoltées dans diverses régions du nord du Vietnam, ces mêmes composés ont été identifiés.

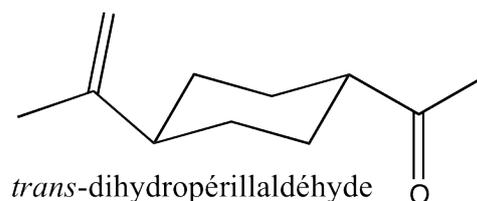
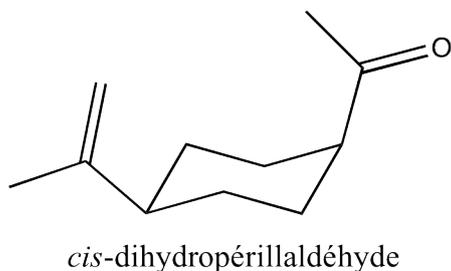
Ces cinq échantillons contenaient également un autre composé à des teneurs importantes (32,9-67,3 %), et qui constituait le composé majoritaire de quatre d'entre elles. Ce composé n'était répertorié dans aucune des bibliothèques de spectres dont nous disposions (SM et RMN ^{13}C). Néanmoins, les informations fournies par la SM (spectre de masse proche de celui du (*E*)-2,3-dihydrofarnésol et pic $m/z=43$) et par la RMN (valeurs des déplacements chimiques indiquant un acétate sesquiterpénique linéaire bi-insaturé) ont été mises en parallèle et ont permis de faire l'hypothèse d'un ester possédant un squelette farnésane. En combinant les données RMN ^{13}C de l'acétate de (*E,E*)-farnésyle avec celles de l'acétate de citronellyle, nous avons pu déduire la structure du composé recherché : l'acétate du (*E*)-2,3-dihydrofarnésyle (Dung *et al.*, 1999).

1.7. Identification après isolement des composés

Enfin, il est arrivé que des huiles essentielles contiennent des produits dont les données spectrales ne sont répertoriées ni dans les bibliothèques de spectres de masse (commerciales et laboratoire), ni dans notre bibliothèque de spectres de RMN ^{13}C construite au laboratoire et qui n'ont pu être identifiés par aucune des méthodes décrites précédemment. Dans ce cas, les composés ont été purifiés par chromatographies successives et leur structure a été élucidée.

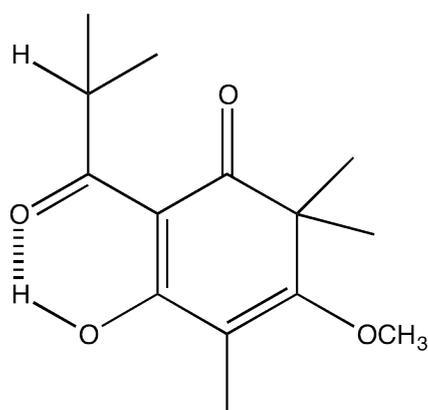
- ***Huiles essentielles d'Enhydra fluctuans Lour. (Asteraceae)***

Ainsi, l'huile essentielle des parties aériennes d'*Enhydra fluctuans* contient majoritairement du myrcène (37,5 %) et du limonène (28,5 %). A côté de ces deux produits majoritaires et de divers composés minoritaires (0,2-4,4 %), cette huile essentielle contient deux composés présents à des teneurs appréciables, 5,6 % et 9,7 %, et qui n'ont pu être identifiés, les données spectrales SM et RMN ^{13}C étant absentes des bibliothèques de spectres. D'après les valeurs des indices de rétention sur les deux colonnes (apolaire : 1176 et 1180, polaire : 1601 et 1612), on peut supposer qu'il s'agit de deux monoterpènes oxygénés. En faisant abstraction sur le spectre de RMN ^{13}C des signaux appartenant aux molécules identifiées, on peut attribuer les signaux appartenant à chacun de ces deux composés. La RMN dévoile la présence d'une fonction aldéhyde et d'une double liaison, ainsi qu'une symétrie dans chaque molécule. Les deux composés ont été isolés par CC successives et caractérisés par leurs données spectrales comme étant les *cis*- et *trans*-dihydropérillaldéhydes (Ira/p *cis*- = 1176/1601, Ira/p *trans*- = 1180/1612). Il s'agit de la première observation de ces deux isomères dans la nature (Muselli *et al.*, 2000).

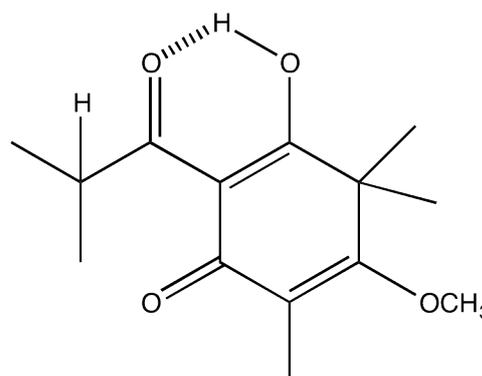


- **Huiles essentielles de *Baeckea frutescens* L. (Myrtaceae)**

Les huiles essentielles de *Baeckea frutescens* sont caractérisées par une importante variabilité chimique. Parmi les 4 échantillons originaires du nord du Vietnam, analysés au laboratoire, deux contenaient majoritairement des monoterpènes, à savoir l' α -pinène, le β -pinène, le p-cymène, le 1,8-cinéole, le γ -terpinène, le linalol et l' α -terpinéol. Les deux autres échantillons contenaient, en plus des monoterpènes cités, et avec des teneurs importantes (22,9% et 24,3%), un composé qui n'a pu être identifié car absent des bibliothèques de spectres de masse commerciales et de notre bibliothèque de spectres de RMN ^{13}C construite au laboratoire. Néanmoins, on note la présence pour un seul composé de deux séries de raies de résonance et les signaux qui appartiennent à ce composé laissent suspecter la présence d'une tricétone. Le composé a donc été isolé par partition acido-basique et soumis à une analyse par RMN 2D, ce qui a conduit à la structure de la tasmanone [2-(2-méthylpropanoxy)-4,6,6-triméthyl-5-méthoxy-4-cyclohexèn-1,3-dione], auparavant isolés dans les huiles essentielles d'*Eucalyptus tasmanica*, *E. camfieldi* et *E. cloeziana*. Les corrélations observées en RMN 2D (COSY, XHCORR et HMBC) ont permis de confirmer la présence des deux formes céto-énoliques, d'où la présence des deux séries de raies de résonance (Tam *et al.*, 2004).



tautomère majoritaire 2/3



tasmanone

tautomère minoritaire 1/3

II. Huiles essentielles du Vietnam étudiées dans la suite de ce chapitre.

Les analyses des premières huiles essentielles que nous présentons dans ce chapitre (*Clausena indica*, *Clausena anisum-olens*, *Cunninghamia konishii*, *Asarum glabrum* et *Asarum cordifolium*) ne présentaient pas de difficultés majeures d'identification. Le schéma classique d'analyse par combinaison de la CPG(Ir) avec la CPG-SM et la RMN ^{13}C a permis d'identifier entre 88 % et 98 % de la composition chimique globale. Pour d'autres, le passage par un ou plusieurs fractionnements sur colonne ouverte de silice, suivi(s) d'une analyse par CPG(Ir), CPG-SM, RMN ^{13}C a été nécessaire pour parvenir à un meilleur pourcentage d'identification. Il s'agit là du schéma d'analyse que nous avons adopté pour l'étude des huiles essentielles de *Cupressus tonkinensis* et de *Xanthocyparis vietnamensis*. Pour cette dernière, sans aucun doute la plus complexe de toutes, des analyses structurales par RMN bidimensionnelle se sont avérées indispensables pour identifier des composés représentant un pourcentage non négligeable de l'huile essentielle globale et absents de nos bibliothèques de spectres voire non décrits dans la littérature.

Aussi, dans ce second chapitre, nous allons dans un premier temps décrire en détail l'analyse d'une huile essentielle de *Clausena indica* afin d'illustrer notre méthode d'analyse par RMN ^{13}C . Dans un second temps, nous présenterons l'analyse de quelques huiles essentielles n'ayant pas nécessité de fractionnement au préalable (*Clausena anisum-olens*, *Cunninghamia konishii*, *Asarum glabrum* et *Asarum cordifolium*) et enfin, nous terminerons par l'étude d'huiles essentielles pour lesquelles il a été nécessaire de réaliser une, voire plusieurs chromatographies sur colonne ouverte de silice (*Cupressus tonkinensis* et *Xanthocyparis vietnamensis*).

A. Caractérisation chimique d'huiles essentielles du genre *Clausena* : *C. indica* (Dalzell) Oliver et *C. anisumolens* (Blanco) Merrill.

I. Etude bibliographique

Le genre *Clausena* appartient à la famille des Rutacées qui recense près de 160 genres et 2000 espèces très dispersées géographiquement (Nelson, 1994). Il comprend 15 espèces et 6 variétés reconnues (Shi *et al.*, 2010), évoluant principalement en Inde et en Asie tropicale (Arbab *et al.*, 2012). Il existe néanmoins deux zones géographiques « satellites » recensant la présence d'espèces du genre *Clausena* : l'Afrique, où *C. anisata* est très répandue, et le nord-est de l'Australie, où l'on retrouve *C. brevistyla* et *C. smyrelliana* (Krueger *et al.*, 2007). Les espèces du genre *Clausena* sont faciles à cultiver, elles présentent l'avantage d'être résistantes aux maladies et à la taille sévère (Arbab *et al.*, 2012). Il s'agit d'arbustes ou d'arbres susceptibles d'atteindre jusqu'à 20 mètres de haut (Krueger *et al.*, 2007).

Plusieurs espèces du genre *Clausena* produisent des fruits comestibles mais seule *C. lansium* (le wampi), qui est l'espèce la plus connue, est cultivée à des fins commerciales. Ses fruits, parfois aigres, acidulés et sucrés, sont blancs ou jaunes, de forme ovale mesurant environ 3 cm de long et 2 cm de diamètre. (**Figure II.1**) D'autres espèces, non cultivées, *C. dentata* var. *dulcis* (Madras, India), *C. dentata* var. *henryi* (sud-ouest de la Chine) et *C. indica* (Inde et Sri Lanka), produisent des fruits consommés localement (Krueger *et al.*, 2007).

Figure II.1 : Fruits mûrs produits par *Clausena lansium*.



La plupart des espèces appartenant au genre *Clausena* sont utilisées en médecine traditionnelle. Arbab *et al.* (2012) ont répertorié les principales d'entre elles (*Clausena excavata*, *C. anisata*, *C. lansium*, *C. harmandiata*, *C. ansium-olens* et *C. dentata*), recensé leurs utilisations en médecines traditionnelles et donné une vue globale des résultats des travaux menés sur chacune de ces espèces. Ainsi, nous pouvons citer l'utilisation des fruits verts et séchés produits par *C. lansium* en médecine traditionnelle chinoise et vietnamienne pour soigner les bronchites. D'autres espèces sont utilisées en cas de douleurs intestinales (*C. excavata*, *C. harmandiata*), de candidose buccale et d'infections fongiques de la peau (*C. anisata*), de maux de têtes, de douleurs oculaires et de fièvre (racines de *C. harmandiata*) (Arbab *et al.*, 2012) ou encore pour soulager des douleurs rénales (*C. dentata*) (Malarvannan *et al.*, 2008).

Les extraits au solvant de plusieurs espèces du genre *Clausena* ont fait l'objet de travaux. Les composés isolés de ces extraits sont majoritairement des métabolites secondaires, principalement des alcaloïdes et des coumarines, notamment dans *C. excavata*, *C. anisata*, *C. dentata*, *C. lansium*, *C. harmandiana* et *C. suffruticosa* (Arbab *et al.*, 2012 ; Begum *et al.*, 2008). Des limonoïdes sont également identifiés dans les extraits de *C. excavata* (Arbab *et al.*, 2012).

Par ailleurs, de nombreuses études concernant la composition chimique des huiles essentielles de diverses espèces de ce genre ont été menées. Au regard des composés majoritaires de chacune de ces huiles essentielles, Diep *et al.* (2009) proposent de les classer au sein de 3 groupes chimiques :

- Le **groupe 1** rassemble les huiles essentielles dont la composition chimique est dominée par des composés terpéniques. Nous pouvons citer les huiles essentielles de *C. excavata*, contenant principalement des sesquiterpènes hydrocarbonés (Leclercq *et al.*, 1994 ; Lim, 2004 ; Zhi, 2006a) et ponctuellement une huile essentielle de *C. engleri* originaire du Vietnam, riche en sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés (Trung *et al.*, 2014). D'autres espèces produisent des huiles essentielles riches en monoterpènes hydrocarbonés ainsi qu'en sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés : *C. lansium* (Chokeprasert *et al.*, 2007 ; Zhao *et al.*, 2004 ; Pino *et al.*, 2006), *C. dentata* (Rajkumar *et al.*, 2010) et *C. dunniana* (Zhi, 2006b).

- Le **groupe 2** concerne les compositions chimiques marquées par des teneurs élevées en phénylpropanoïdes. Nous y retrouvons les huiles essentielles de *C. heptaphylla* (Nath *et al.*, 1992 ; Nath *et al.*, 1996 ; Lockwood, 1984), *C. lunalata* (Kafuku *et al.*, 1934) et

ponctuellement, un échantillon d'huile essentielle de *C. excavata* originaire du Nigeria (Peh, 2001) et un autre de *C. dimidiata* originaire du Vietnam (Trung *et al.*, 2014).

- Le **groupe 3** est spécifique des espèces présentant une variabilité chimique. C'est le cas de *C. anisata*, espèce dont la répartition géographique est très large et dont les huiles essentielles ont fait l'objet de nombreuses études. Les composés majoritaires sont soit des phénylpropanoïdes (Avlessi *et al.*, 2004 ; Ayedoun *et al.*, 1997 ; Meijer, 1947 ; Usman *et al.*, 2010 ; Ekundayo *et al.*, 1986 ; Okunade *et al.*, 1987 ; Addae-Mensah *et al.*, 1996 ; Garneau *et al.*, 2000), soit des monoterpènes et sesquiterpènes hydrocarbonés (Govindarajan, 2010 ; Senthilkumar, 2009 ; Gundidza *et al.*, 1994), soit des monoterpènes et sesquiterpènes oxygénés (Ngassoum *et al.*, 1999), soit encore des monoterpènes hydrocarbonés et oxygénés ainsi qu'un sesquiterpène hydrocarboné (Yaouba *et al.*, 2011).

Concernant les espèces *Clausena indica* et *Clausena anisum-olens* qui font l'objet de notre étude, nous recensons les travaux phytochimiques qui ont été publiés à leur sujet. Dans les extraits de *C. anisum-olens*, nous retrouvons des coumarines (Arbab *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2008a, 2008b, 2009a, 2010) ainsi que des cyclopeptides (Wang *et al.*, 2005, 2009b). Les extraits de *C. indica* contiennent des coumarines (Joshi et Gawad, 1971 ; Joshi *et al.*, 1974 ; Prakash *et al.*, 1978) mais également des alcaloïdes (Joshi *et al.*, 1972), des sesquiterpènes (Joshi *et al.*, 1975), des amides (Riemer *et al.*, 1997) et des flavonoïdes (Liang *et al.*, 2010a, 2010b ; Wei *et al.*, 2011).

Les quelques études menées sur les huiles essentielles de *C. indica* ont mis en évidence la présence de composés majoritaires variables. Ainsi, l'huile essentielle isolée à partir des feuilles de *C. indica* originaire du sud de l'Inde est composée majoritairement de monoterpènes (sabinène, 53,1 % et terpinèn-4-ol, 13,1 %) et les auteurs ont mis en évidence une activité antibactérienne importante (John *et al.*, 2011). Deux monoterpènes, le β -myrcène (51,50 %) et le terpinolène (12,82 %), ainsi qu'un phénylpropanoïde, la myristicine (24,8 %) sont les principaux composés d'un échantillon d'huile essentielle de zestes de fruits de *C. indica* originaire de Chine (Zhou *et al.*, 2008a). Yu *et al.* (2009) reportent la composition chimique de l'huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur des feuilles de *C. indica* (Chine) puis extraite à l'oxyde de diéthyle et à l'acétate d'éthyle. Les compositions des fractions sont dominées par différents constituants : le terpinolène (53,9 %), la myristicine (15,3 %), et le δ -3-carène (9,7 %) pour la fraction obtenue à l'oxyde de diéthyle et le 4-carène (45,7 %) et le 2,6-bis(1,1-diméthyléthyl)-4-méthylphénol (40,8 %) pour celle obtenue à l'acétate d'éthyle. Enfin, la myristicine est le principal composé (61,0 % et 47,5 %)

obtenu par HSPME (micro-extraction en phase solide par espace de tête) des zestes de fruits frais et des feuilles fraîches de *C. indica* (Chine). Ce phénylpropanoïde est accompagné soit du β -myrcène (23,5 %, zestes), soit du terpinolène (23,8 %, feuilles) (Zhou *et al.*, 2008b). Enfin, concernant les huiles essentielles de *C. indica* originaire du Vietnam, nous recensons 2 articles qui reportent des compositions chimiques très différentes. Dans un échantillon d'huile essentielle isolé à partir des feuilles et des branches (Melin, province de Vĩnh Phúc), les auteurs identifient la myristicine (35,3 %) comme composé majoritaire, suivie du terpinolène (16,7 %) et du δ -3-carène (11,6 %). Les auteurs mettent également en évidence l'activité antimicrobienne de cette huile essentielle (Diep *et al.*, 2009). En revanche, le deuxième article décrit la composition chimique d'une huile essentielle (province de Nghê An) dominée par la menthone (70,6 %) et le β -phellandrène (13,0 %) (Trung *et al.*, 2014).

Au sujet de *C. anisum-olens*, la première étude est très ancienne (1911). Elle concerne une huile essentielle de feuilles (origine : Philippines) dans laquelle l'estragole (méthylchavicol) a été identifiée comme constituant majoritaire par combinaison de méthodes physiques et chimiques (densité, oxydation par KMnO_4) et par un examen olfactif. Sa teneur a ainsi été estimée à 93 % (Brooks, 1911). Plus récemment, Molino (2000) a analysé un grand nombre d'échantillons de *C. anisum-olens* originaires des Philippines. Les volatils ont été extraits aux solvants (dichlorométhane et méthanol) à partir des feuilles. L'auteur a montré que l'estragole et le (*E*)-anéthole sont les deux constituants principaux, mais avec des teneurs variables d'un échantillon à l'autre. Il distingue ainsi 3 groupes de compositions chimiques :

- le groupe A dont les échantillons ont des compositions chimiques à (*E*)-anéthole ultra majoritaire (99,47 à 99,9 %),
- le groupe E dont les échantillons ont des compositions chimiques à estragole ultra majoritaire (99,87 à 100 %),
- le groupe AE au sein duquel les échantillons contiennent à la fois du (*E*)-anéthole (88,04 à 90,73 %) et de l'estragole (9,27 à 11,96 %).

Enfin, la composition chimique de plusieurs échantillons d'huiles essentielles de différentes parties (branches, racines, feuilles, pépins, fruits et fleurs) de *C. anisum-olens* originaire de Chine a été analysée (Su *et al.*, 2008, 2011a, 2011b). La myristicine est le composé majoritaire (29,0-100 %), à côté d'autres phénylpropanoïdes tels que l'élémicine et le 2,6-diméthoxy-4-(2-propényl)-phénol. Quelques terpènes ont également été identifiés dans ces différents échantillons, notamment le 4-carène et le germacrène B, ainsi que des acides gras et des alcanes. Les auteurs ont également montré une importante activité antimicrobienne

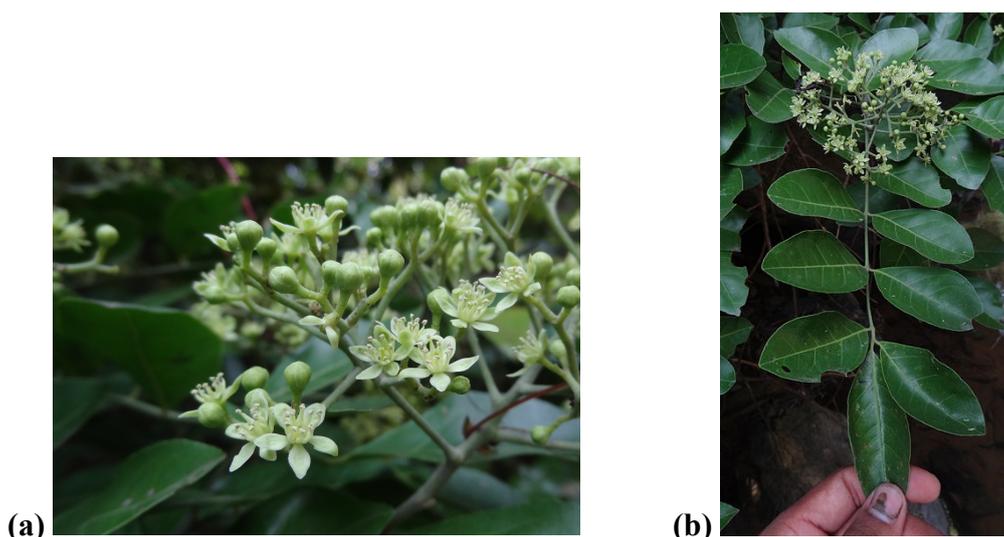
contre des souches de *Staphylococcus*, *Escherichia* et *Bacillus*. Concernant les huiles essentielles de *C. anisum-olens* originaire du Vietnam, seule une étude (postérieure à notre article) est reportée dans la littérature. Les auteurs décrivent la composition chimique d'une huile essentielle de feuilles analysée par CPG-SM, dans laquelle les constituants majoritaires identifiés sont la myristicine (36,87 %), le terpinolène (13,92 %) et le *p*-cymèn-8-ol (12,38 %) (You *et al.*, 2015).

Ainsi, dans le cadre de nos travaux de recherche sur les huiles essentielles du Vietnam réalisés en collaboration avec l'IERB de Hanoï, nous avons étudié la composition chimique de deux échantillons d'huile essentielle de *C. indica* ainsi que celle d'un échantillon de *C. anisum-olens*, par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ¹³C. L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une publication en 2014 parue dans le journal Natural Product Communications (Thai *et al.*, 2014).

II. Les huiles essentielles de *C. indica* et *C. anisum-olens* originaires du Vietnam.

II.1. Etude de la composition chimique de l'huile essentielle de *Clausena indica* (Dalzell) Oliver : illustration de la méthode.

Clausena indica est un arbuste originaire d'Inde et du Sri Lanka pouvant atteindre 7 mètres de hauteur. Ses feuilles sont alternées (10-30 cm de long), ses fleurs sont de couleur blanc verdâtre (6-8 mm) et ses fruits (9-13 mm de diamètre), de couleur rose-rouge à maturité, sont riches en pulpe avec une ou deux graines (**Figure II.2**). En Inde, *C. indica* est présent dans les forêts sempervirentes des Ghats occidentaux, à plus de 1000 m d'altitude. La floraison s'y produit d'avril à septembre et les fruits comestibles arrivent à maturité entre octobre et mars (John *et al.*, 2011 ; Zhou *et al.*, 2008a ; Brooks, 1911 ; Molino, 1994, 2000).

Figure II.2: (a) Fleurs et (b) Feuilles de *Clausena indica*. (Source : Wikimedia commons)

Au Vietnam, *Clausena indica* est très employé en médecine traditionnelle. En infusion, les tiges sont utilisées pour soigner les coliques et les diarrhées tandis que les feuilles et les racines sont indiquées en cas de grippe, de céphalées, de coliques et de rhumatismes, mais également pour leurs vertus diurétiques et digestives (Jayaweera, 1982). Les feuilles écrasées sont utilisées en cas de luxations ou de fractures (Diep *et al.*, 2009). Très aromatiques, ces dernières servent à aromatiser les currys (Pradheep *et al.*, 2003). L'huile essentielle produite par *C. indica* est utilisée comme huile de massage.

Nous disposons de deux échantillons d'huile essentielle de *C. indica* (notés 1 et 2) originaires du Vietnam (1: province de Lạng Sơn, mai 2012 ; 2 : province de Hà Giang, septembre 2012). Ceux-ci ont été obtenus par hydrodistillation des parties aériennes (feuilles et petits fruits) pendant une durée de 2 heures 30. Tous deux ont été analysés par RMN ^{13}C et CPG(Ir) dans un premier temps, puis par CPG-SM dans un second temps.

Les résultats des premières analyses (RMN ^{13}C et CPG(Ir)) ont montré que ces deux huiles essentielles se caractérisent par une très forte proportion de monoterpènes oléfiniques (76,6 et 83,7 %, respectivement), parmi lesquels le terpinolène est largement majoritaire (53,9 et 56,1 %), et d'un phénylpropanoïde, la myristicine (17,9 et 7,3 %). D'autres monoterpènes oléfiniques sont présents à des teneurs non négligeables tels que le δ -3-carène (8,2 et 10,0 %), le myrcène (3,7 et 4,1 %) et l' α -terpinène (3,1 et 2,9 %). Le *p*-cymèn-8-ol est le seul monoterpène oxygéné identifié, sa teneur atteint 0,7 et 2,0 %, respectivement. (**Tableau II.1**)

Les 13 composés identifiés par RMN ^{13}C et CPG(Ir) sont présents dans la bibliothèque de spectres « Terpènes » constituée au Laboratoire. Pour chacun de ces composés :

- la quasi-totalité des signaux des carbones a été observée, exceptés ceux des carbones quaternaires de quelques composés minoritaires (*p*-cymène, (*E*)- β -ocimène et *p*-cymèn-8-ol), 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 références sont faibles (**Figure II.3**) ;
- le nombre de superpositions de signaux est limité (inférieur ou égal à 4) et n'empêche pas l'identification des constituants, chacun d'entre eux étant identifié au minimum à partir de 60 % de ses propres signaux.

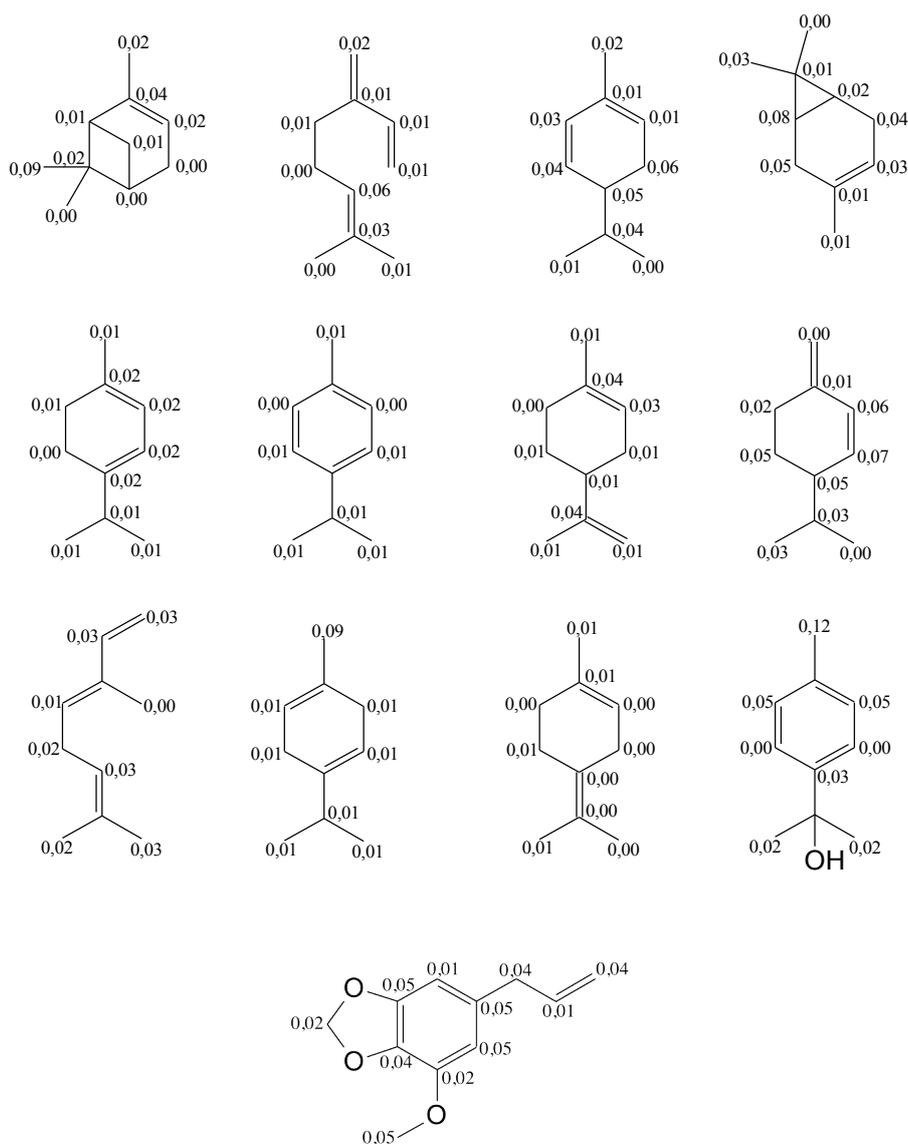
Concernant les composés demeurant non identifiés sur les deux chromatogrammes, tous sont présents à des teneurs inférieures ou égales à 0,6 % (échantillon **1**) et 0,8 % (échantillon **2**). Seul un composé présent à 1,2 % reste non identifié dans l'échantillon **2**. Ainsi, l'analyse de ces deux échantillons d'huile essentielle de *Clausena indica* par RMN ^{13}C et CPG(Ir), sans séparation préalable, a conduit à l'identification de 13 composés représentant 94,5 % et 91,0 % de la composition totale. Ceci est tout à fait suffisant pour caractériser ces deux échantillons.

Tableau II.1 : Composés identifiés par RMN ^{13}C dans les huiles essentielles de feuilles de *Clausena indica* (échantillons **1** et **2**)

Composés	RMN	Sup	Ir ^a	Ir ^p	HE1 %	HE2 %
α -Pinène	10/10	2	932	1014	1,1	1,3
Myrcène	10/10	4	982	1163	3,7	4,1
α -Phellandrène	10/10	1	998	1168	1,2	1,1
δ -3-Carène	10/10	0	1007	1151	8,2	10,0
α -Terpinène	9/9	0	1010	1183	3,1	2,9
<i>p</i> -Cymène	5/7	0	1013	1272	0,7	1,2
Limonène*	10/10	0	1022	1203	1,7	2,2
β -Phellandrène*	10/10	2	1022	1212	1,1	1,5
(<i>E</i>)- β -Ocimène	8/10	3	1037	1251	0,7	0,8
γ -Terpinène	7/9	0	1049	1247	0,5	0,5
Terpinolène	10/10	3	1082	1288	53,9	56,1
<i>p</i> -Cymèn-8-ol	5/7	0	1160	1843	0,7	2,0
Myristicine	11/11	0	1488	2257	17,9	7,3
Total					94,5	91,0

RMN : nombre de signaux observés dans le spectre RMN ^{13}C par rapport au nombre de pics attendus. Sup : nombre de superpositions de signaux en RMN. L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés suivis d'un astérisque (colonne polaire). Ira et Irp : indices de rétention mesurés respectivement sur colonnes apolaire (BP-1) et polaire (BP-20).

Figure II.3 : Identification des constituants de l'huile essentielle de feuilles de *Clausena indica* par RMN ^{13}C .



Cependant, nous avons souhaité compléter l'identification des composés minoritaires en analysant ces mêmes échantillons par CPG-SM. Nous avons ainsi identifié 9 composés supplémentaires dans l'échantillon **1** (soit 1,3 %) et 10 dans l'échantillon **2** (soit 1,3 %). Il s'agit principalement de monoterpènes oléfiniques et oxygénés, mais également d'un phénylpropanoïde (l'élémicine) et de l'unique sesquiterpène identifié dans ces deux échantillons, le spathuléol (tr et 0,1 %, respectivement). Ainsi, nous avons identifié au total, par la combinaison des techniques analytiques, 22 composés représentant 95,8 % de la composition chimique de l'échantillon **1** et 23 composés représentant 92,3 % de la composition chimique de l'échantillon **2** (**Tableau II.2**).

Tableau II.2 : Compositions chimiques des huiles essentielles de feuilles de *Clausena indica* (échantillons **1** et **2**)

Composés	Ir ^a	Ir ^p	HE1 %	HE2 %	Identification
α -Thujène	924	1014	tr	tr	Ir, SM
α -Pinène	932	1014	1,1	1,3	Ir, SM, RMN ¹³ C
Camphène	945	1066	-	0,1	Ir, SM
Sabinène	966	1124	tr	0,1	Ir, SM
β -Pinène	972	1114	tr	tr	Ir, SM
Myrcène	982	1163	3,7	4,1	Ir, SM, RMN ¹³ C
δ -2-Carène	997	1133	0,2	0,3	Ir, SM
α -Phellandrène	998	1168	1,2	1,1	Ir, SM, RMN ¹³ C
δ -3-Carène	1007	1151	8,2	10,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Terpinène	1010	1183	3,1	2,9	Ir, SM, RMN ¹³ C
<i>p</i> -Cymène	1013	1272	0,7	1,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
Limonène*	1022	1203	1,7	2,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
β -Phellandrène*	1022	1212	1,1	1,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
(<i>Z</i>)- β -Ocimène	1026	1234	0,2	0,2	Ir, SM
(<i>E</i>)- β -Ocimène	1037	1251	0,7	0,8	Ir, SM, RMN ¹³ C
γ -Terpinène	1049	1247	0,5	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
Terpinolène	1082	1288	53,9	56,1	Ir, SM, RMN ¹³ C
Linalol	1084	1543	0,3	0,3	Ir, SM
<i>p</i> -Cymèn-8-ol	1160	1843	0,7	2,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Terpinéol	1172	1691	0,5	0,1	Ir, SM
Myristicine	1488	2257	17,9	7,3	Ir, SM, RMN ¹³ C
Elémicine	1516	2219	0,1	0,1	Ir, SM
Spathulénol	1563	2216	tr	0,1	Ir, SM
Total			95,8	92,3	

L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés suivis d'un astérisque (colonne polaire). Ir^a et Ir^p : indices de rétention mesurés respectivement sur colonnes apolaire (BP-1) et polaire (BP-20).

Ainsi, nos deux échantillons sont riches en terpinolène (**1**: 53,9 % : **2** : 56,1 %), myristicine (**1**: 17,9 % : **2** : 7,3 %) et δ -3-carène (**1**: 8,2 % : **2** : 10,0 %). En confrontant ces résultats à ceux de la littérature, nous constatons que la composition chimique de nos deux échantillons du Vietnam se rapproche qualitativement de celle de l'huile essentielle isolée à partir des branches et des feuilles de *C. indica* également originaire du Vietnam (myristicine, 35,3 % ; terpinolène, 16,7 % et δ -3-carène, 11,6 % ; Diep *et al.*, 2009). Néanmoins, cette dernière renferme plus de *p*-cymèn-8-ol que nos échantillons (7,8 % contre **1** : 0,7 % et **2** : 2,0 %). En revanche, nos échantillons sont radicalement différents de l'échantillon d'origine vietnamienne caractérisé par la présence majoritaire de menthone et de β -phellandrène (Trung *et al.*, 2014). La composition chimique de nos échantillons diffère également de celle des huiles essentielles riches en monoterpènes, originaires d'Inde et de Chine (sabinène, 53,1 % et β -myrcène, 51,5 % ; respectivement) (John *et al.*, 2011 ; Zhou *et al.*, 2008a). Elle est cependant semblable à la composition chimique de la fraction de l'huile essentielle de feuilles

de *C. indica* originaire de Chine, extraite à l'oxyde de diéthyle, contenant du terpinolène (53,9 %), de la myristicine (15,3 %) et du δ -3-carène (9,7 %) (Yu *et al.*, 2009).

II.2. Etude de la composition chimique de l'huile essentielle de *Clausena anisum-olens* (Blanco) Merrill.

Clausena anisum-olens est un arbuste à feuilles persistantes pouvant atteindre 6 mètres de hauteur. Ses feuilles alternées, glabres à velues, ovales à lancéolées, mesurent jusqu'à 25 cm de long sur 10 cm de large (**Figure II.4**). Ses fleurs de couleur vert-blanchâtre sont régulières (6-8 mm) et ses fruits (0,8-1,6 cm de diamètre) rosés à maturité contiennent de 1 à 3 graines vertes. Au froissement, les parties aériennes émettent une forte odeur anisée. Cette espèce est endémique des Philippines (très répandue dans tout l'archipel) et de Bornéo. Elle est cultivée ponctuellement en Chine (où elle se naturalise facilement), à Taiwan, au Vietnam et en Indonésie. Elle pousse spontanément dans les sous-bois des forêts humides, quel que soit le type de sol, à une altitude supérieure à 1500 m (Oyen et Dung, 1999).

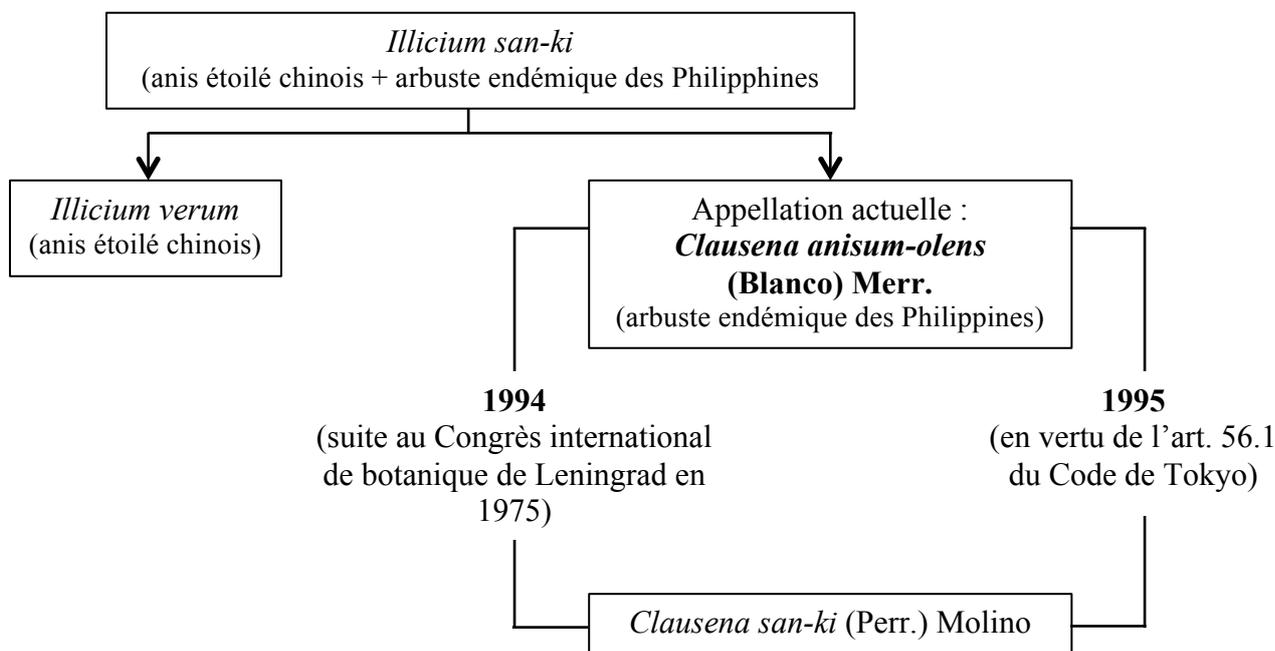
Figure II.4 : *Clausena anisum-olens* (Source : blog.163.com/gzxm@126/blog)



D'un point de vue botanique, l'appellation *Clausena anisum-olens* a fait l'objet de désaccords et de nombreux changements depuis la découverte de cet arbuste (**Figure II.5**). En effet, à l'origine, cet arbuste endémique aux Philippines ainsi que les fruits séchés d'anis étoilé de Chine (*Illicium verum*) étaient regroupés sous l'appellation d'*Illicium san-ki*. Par la suite et pendant de nombreuses années, l'appellation commune *I. san-ki* n'est plus employée, au profit des deux appellations distinctes : *C. anisum-olens* et *I. verum*. Il est alors décidé lors du Congrès international de botanique de Leningrad en 1975 que l'appellation *I. san-ki* doit être attribuée à l'une de ces deux espèces. Or, l'anis étoilé de Chine (*I. verum*) présentant un intérêt économique nettement supérieur à celui de *C. anisum-olens*, Molino décide en 1994 de

modifier le nom de *C. anisum-olens* en *Clausena san-ki*. Cependant, l'article 56.1 du code de Tokyo rejetant le nom d'*I. san-ki* ainsi que toutes les combinaisons basées sur celui-ci, le nom de *Clausena anisum-olens* est restauré et utilisé depuis lors (Molino, 1995).

Figure II.5 : Evolution de l'appellation botanique de *Clausena anisum-olens*.



Les utilisations des différentes parties de *C. anisum-olens* sont diverses et variées, plus particulièrement pour les feuilles. En effet, *C. anisum-olens* est très utilisée en médecine traditionnelle aux Philippines. Les feuilles placées dans les oreillers sont utilisées pour leur effet soporifique. En bain, celles-ci servent à soulager les douleurs rhumatismales et en décoction, elles apaisent les nausées de grossesse. Les fruits et les racines sont quant à eux utilisés en décoction pour soigner la toux associée à de la fièvre. En agroalimentaire, les feuilles sont utilisées par les Philippins comme condiments dans les boissons et les plats locaux. Elles servent également à aromatiser les cigarettes (Oyen et Dung, 1999). En Indonésie, *C. anisum-olens* est cultivée pour la production de son huile essentielle de feuilles (Molino, 1994). Sa forte teneur en anéthole en fait une source naturelle potentielle. Aussi, elle pourrait constituer un substitut de l'huile essentielle d'anis, notamment dans la préparation de la boisson locale des Philippines (Anisado) (Oyen et Dung, 1999).

L'échantillon d'huile essentielle de *Clausena anisum-olens* originaire du Vietnam (province de Kon Tum, octobre 2013) dont nous disposons a été obtenu par hydrodistillation des parties aériennes (feuilles et petits fruits) pendant une durée de 2 heures 30. Sa composition chimique a été analysée par CPG-SM, CPG(Ir) et RMN ¹³C, sans fractionnement préalable.

Au total, 36 composés (30 monoterpènes, 3 sesquiterpènes, 1 cétone linéaire, 1 phénol, 1 phénylpropanoïde) ont été identifiés, représentant 97,9 % de la composition chimique globale (**Tableau II.3**). La RMN ^{13}C a permis de confirmer l'identification de 19 de ces composés alors que les 18 composés minoritaires restants ont été identifiés par CPG-SM. Les composés majoritaires sont principalement des aldéhydes monoterpéniques, le citronellal (22,8 %), le géraniol (21,4 %) et le néral (16,8 %), ainsi qu'un monoterpène oléfinique, le sabinène (13,5 %). Les autres composés dont la teneur dépasse 1 % appartiennent à la famille des monoterpènes. C'est le cas notamment de l' α -pinène (4,3 %), du terpinène-4-ol (2,6 %), du limonène (2,3 %), de l' α -thujène (2,0 %), du γ -terpinène (2,0 %) et de l'acétate de géranyle (1,7 %). La famille des sesquiterpènes n'est que très faiblement représentée (au total, 0,3 %), il s'agit du (*E*)- β -caryophyllène (0,2 %), du *trans*- α -bergamotène (tr) et du spathulénol (0,1 %). L'élémicine (unique phénylpropanoïde présent) est identifié par CPG-SM à l'état de traces. La plupart des composés identifiés par RMN ^{13}C sont présents dans la banque Terpènes du laboratoire. Seuls l'isogéraniol (1,0 %) et l'isonéral (0,7 %), deux isomères de position du géraniol et du néral, ont été identifiés grâce aux données RMN ^{13}C de la littérature. Leur identification est décrite dans les pages qui suivent.

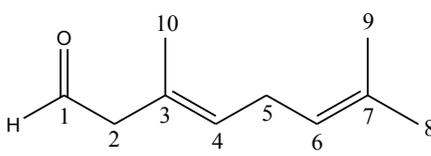
Tableau II.3 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Clausena anisum-olens*.

Composés	Ir^a	Ir^p	HE %	Identification
α -Thujène	923	1016	2,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Pinène	931	1014	4,3	Ir, SM, RMN ¹³ C
6-Méthylhept-5-èn-2-one	960	1334	0,9	Ir, SM, RMN ¹³ C
Sabinène	966	1125	13,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
β -Pinène	971	1114	0,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
Myrcène	981	1162	0,9	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Terpinène	1009	1183	0,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
<i>p</i> -Cymène	1012	1272	0,3	Ir, SM
Limonène*	1021	1203	2,3	Ir, SM, RMN ¹³ C
β -Phellandrène*	1021	1211	0,2	Ir, SM
1,8-Cinéole*	1021	1212	0,2	Ir, SM
(<i>E</i>)- β -Ocimène	1036	1251	tr	Ir, SM
γ -Terpinène	1049	1247	2,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
<i>trans</i> -Hydrate de sabinène	1053	1459	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
Terpinolène	1079	1284	0,3	Ir, SM
<i>cis</i> -Hydrate de sabinène	1083	1542	0,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
<i>cis-p</i> -Menth-2-èn-1-ol	1121	nd	0,2	Ir, SM
Citronellal*	1132	1480	22,8	Ir, SM, RMN ¹³ C
Isopulégol*	1132	1571	0,3	Ir, SM
Isonéral	1140	nd	0,7	Ir, SM, RMN ¹³ C
Isogéranial	1157	nd	1,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
Terpinèn-4-ol	1162	1598	2,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Terpinéol	1172	1690	0,2	Ir, SM
Citronellol	1209	1760	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
Néral	1216	1679	16,8	Ir, SM, RMN ¹³ C
Géraniol	1234	1841	0,2	Ir, SM
Géranial	1244	1729	21,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
Acétate d'isobornyle	1269	1583	0,1	Ir, SM
2-Méthoxy-4-vinylphénol	1320	nd	0,1	Ir, SM
Acétate de citronellyle	1333	1659	0,1	Ir, SM
Acétate de néryle	1341	1722	0,1	Ir, SM
Acétate de géranyle	1359	1753	1,7	Ir, SM, RMN ¹³ C
(<i>E</i>)- β -Caryophyllène	1417	1595	0,2	Ir, SM
<i>trans</i> - α -Bergamotène	1432	1578	tr	Ir, SM
Elémicine	1516	2219	tr	Ir, SM
Spathuléol	1569	2113	0,1	Ir, SM
Total			97,9	

L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés suivis d'un astérisque (colonne polaire). Ir^a et Ir^p : indices de rétention mesurés respectivement sur colonnes apolaire (BP-1) et polaire (BP-20).

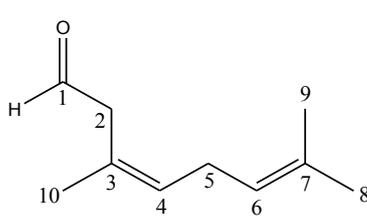
- **Identification de l'isogéranial (synonyme : (E)-isocitral)**

Dans un premier temps, l'analyse par CPG-SM suggère la présence de l'isogéranial. Présent à 1,0 % dans l'huile essentielle, les valeurs des déplacements chimiques de 7 de ses carbones sur 10 ont pu être relevées dans le spectre RMN ^{13}C du mélange et correspondent parfaitement à celles décrites par Mineeva *et al.* (2009). Seuls les signaux des carbones quaternaires n'ont pu être observés, ce qui ne gêne en rien l'identification du composé. De plus, la valeur de l'indice de rétention sur colonne apolaire de ce monoterpène oxygéné ($I_r = 1157$) est conforme à celle donnée dans la littérature par Adams ($I_r = 1177$) (Adams, 2001).

isogéranial	C	δC (ppm) Mineeva <i>et al.</i> , 2009	δC (ppm)	DEPT
	1	200,35	-	C
	7	132,07	-	C
	4	129,62	129,72	CH
	3	126,09	-	C
	6	122,20	122,21	CH
	2	54,15	54,24	CH ₂
	5	27,24	27,32	CH ₂
	8	25,57	25,49	CH ₃
	9	17,63	17,58	CH ₃
	10	16,79	16,87	CH ₃

- **Identification de l'isonéral (synonyme : (Z)-isocitral)**

L'analyse par CPG-SM suggère également la présence de l'isonéral. Présent à 0,7 % dans l'huile essentielle, les valeurs des déplacements chimiques de tous ses carbones hydrogénés (soit 7 carbones sur 10) ont pu être relevées dans le spectre RMN ^{13}C du mélange. Six d'entre elles correspondent parfaitement à celles décrites par Erm *et al.* (1979). Seule la valeur du déplacement chimique du carbone éthylénique n°6 présente un écart plus important par rapport à la littérature ($\Delta\delta$ d'environ 0,9 ppm). Cette différence peut s'expliquer par l'ancienneté des travaux reportés dans la littérature (1979) et donc par des conditions expérimentales d'enregistrement de spectres (concentration notamment) probablement différentes. Néanmoins, cela ne compromet pas l'identification de ce composé. Par ailleurs, l'indice sur colonne apolaire de ce monoterpène oxygéné ($I_r^a = 1140$) est conforme à celui cité dans la littérature par Adams ($I_r^a = 1160$) (Adams, 2001).

isonéral	C	δC (ppm) Erm <i>et al.</i> , 1979	δC (ppm)	DEPT
	1	197,9	-	C
	7	131,9	-	C
	4	128,9	129,02	CH
	3	126,7	-	C
	6	123,1	122,21	CH
	2	47,4	47,35	CH ₂
	5	27,5	27,60	CH ₂
	8	25,7	25,76	CH ₃
	9	24,4	24,44	CH ₃
	10	17,7	17,73	CH ₃

Ainsi, l'huile essentielle des parties aériennes de *Clausena anisum-olens* étudiée présente une composition chimique radicalement différente de celles décrites dans la littérature, dont les compositions chimiques sont dominées par des phénylpropanoïdes : estragole ou anéthole (Philippines : Brooks, 1911 ; Molino, 2000), myristicine (Chine : Su *et al.*, 2008, 2011a, 2011b ; Vietnam : You *et al.*, 2015). Ces différences de composition chimique observées peuvent s'expliquer par l'existence de plusieurs variétés de *C. anisum-olens*. En effet, Molino (1999) dénombre trois variétés botaniques : var. *anisum-olens* (Philippines, Chine, Taiwan, Vietnam et Indonésie), var. *calciphila* (B.C. Stone) Molino (Bornéo), var. *mollis* (Merrill) Molino, Philippines. En revanche, à l'image de notre échantillon, plusieurs huiles essentielles obtenues à partir d'un végétal du genre *Citrus* présentent une composition chimique dominée par le citronellal et/ou le citral (géranial + néral). Nous pouvons citer, par exemple, l'huile essentielle de feuilles de *Citrus hystrix* dont le composé majoritaire est le citronellal (66,8-72,4 % ; Fan *et al.*, 2011 ; Jantan *et al.*, 1996). Le géranial et le néral sont reportés parmi les composés majoritaires de différentes huiles essentielles de feuilles du genre *Citrus* : *C. medica* L. var. *sarcodactylis* (25,9 % et 16,4 % ; Theanpong *et al.*, 2008), *C. reticulata* (19,0 % et 14,5 % ; Chutia *et al.*, 2009) et *C. aurantifolia* (19,4 % et 11,4 % ; Jantan *et al.*, 1996). Enfin, le citronellal, le géranial et le néral sont simultanément reportés dans la composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de divers limes (citronellal, jusqu'à 17,7 % ; géranial, jusqu'à 26,9 % et néral, jusqu'à 20,5 % ; Lota *et al.*, 2002).

L'utilisation de l'huile essentielle de *Clausena anisum-olens*, riche en citral et citronellal, doit être envisagée avec d'importantes précautions dans les produits cosmétiques. En effet, depuis le 11 septembre 2004, le 7^{ème} amendement de la directive Cosmétique de la législation européenne impose l'étiquetage des allergènes présents à plus de 10 ppm dans les produits rincés (savons, shampoings, etc.) et à plus de 100 ppm dans les produits non-rincés (parfums, déodorants, etc.). Or, le géraniol et le néral font partie de la liste des 26 composés allergènes au contact de la peau (Kinani *et al.*, 2006). Néanmoins, le citral possède des propriétés anti-inflammatoire et antimicrobienne qui ne sont plus à prouver (Park *et al.*, 2007), tout comme l'activité fongicide du citronellal (Ramezani *et al.*, 2002).

B. Caractérisation chimique de l'huile essentielle de *Cunninghamia konishii* Hayata.

Le genre *Cunninghamia* (Cupressacées) comprend deux espèces évoluant dans l'Est asiatique (Taiwan, Chine, Laos et Vietnam) : *C. lanceolata* (Lamb.) et *C. konishii* Hayata (syn. : *C. lanceolata* (Lamb.) Hook. var. *konishii* (Hay.) Fujita ; *C. kawakamii* Hayata).

Cunninghamia konishii est un conifère endémique de Taiwan, décrit par Bunzô Hayata en 1908. Il est réparti du centre au nord de l'île, à des altitudes comprises entre 1300 et 2700 mètres (Chang *et al.*, 2013). Au Vietnam, on le retrouve ponctuellement dans les provinces de Hà Giang, Thanh Hóa, Son La et Nghê An, dans les forêts subtropicales denses, aux côtés d'autres espèces telles que *Fokiena hodginsii*, *Dacrydium pierrei* et *Quercus bambusaefolia* (Le Sau *et al.*, 1996). Cet arbre, à feuilles verticillées persistantes et produisant des cônes, peut atteindre 50 mètres de haut et possède un tronc d'un diamètre d'environ 2,5 mètres à sa base. Il pousse préférentiellement sur des sols granitiques ou siliceux et supporte des températures allant jusqu'à -7 °C. Cette espèce se distingue de *C. lanceolata* par ses feuilles plus petites (2-3 cm), un apex obtus et des cônes femelles plus petits (moins de 3 cm de diamètre) (**Figure II.6**). *Cunninghamia konishii* possède un bois très odorant et d'une grande qualité. Il est localement utilisé dans la construction de maisons (résistant à la pourriture et aux termites) et dans la fabrication de cercueils. Il fait ainsi partie des cinq conifères les plus précieux de Taiwan, aux côtés de *Chamaecyparis formosensis*, *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana*, *Calocedrus formosana* et *Taiwania cyrtomerioides* (Su *et al.*, 2006). Des forêts de plantations sont envisageables dans la mesure où *C. konishii* possède une croissance rapide. Sa distribution étant limitée, cela permettrait de pallier aux problèmes de surexploitation. *Cunninghamia konishii* est d'ailleurs classée parmi les espèces en voie de disparition. L'intégrité génétique des populations sauvages du Vietnam et du Laos est également menacée par l'introduction de *Cunninghamia lanceolata*, espèce connue pour s'hybrider facilement. A Taiwan, il existe des populations protégées situées dans les Parcs Nationaux de Yushan et Taroko.

Figure II.6 : (a) Feuilles de *C. konishii*. (b) *C. konishii* (Source : www.flickr.com)

I. Etude bibliographique

Les études phytochimiques au sujet de *Cunninghamia konishii* concernent essentiellement des extraits isolés à partir du bois. L'analyse de la plupart d'entre eux a conduit à l'identification de nouveaux composés, principalement des diterpènes oxygénés à squelette abietane ou labdane (Li *et al.*, 1998, 2002 ; Cheng *et al.*, 2012 ; Chen *et al.*, 2013a, 2013b ; Chang *et al.*, 2014) mais aussi des lignanes (He *et al.*, 1997 ; Chang *et al.*, 2013) et des stérols tels que le β -sitostérol et le stigmastérol (Cheng *et al.*, 1972, 1979). Un extrait de l'intégralité de la plante a également permis d'identifier un nouveau sesquiterpène oxygéné, le konishiol (He *et al.*, 1997). Enfin, des monoterpènes et des sesquiterpènes déjà connus ont été identifiés dans divers extraits (terpinèn-4-ol, l'acétate d' α -terpinyle, le cadalénol, le 3-cédrol, le τ -cadinol, le cédrol, le τ -muurolol et l'*épi*-cédrol) (Cheng *et al.*, 1972, 1979 ; He *et al.*, 1997) et notamment dans un extrait de bois à l'éthanol (Cheng *et al.*, 2012) dont l'activité antifongique a été mise en évidence (le τ -cadinol, le cédrol et le τ -muurolol pouvant être considérés comme de nouveaux agents antifongiques naturels) (Cheng *et al.*, 2012).

Concernant les huiles essentielles de *C. konishii*, seules quelques études décrivent leur composition chimique. Selon Cheng *et al.* (2011), une première étude a été menée par Ikeda et Fujita en 1929 sur la composition chimique de l'huile essentielle de bois. Les composés identifiés sont des monoterpènes (notamment le pinène, le sabinène, le limonène, l' α -terpénol, le *l*-bornéol) et le *d*-cédrol. Plus récemment, deux études ont été réalisées sur la composition

chimique de l'huile essentielle de feuilles et cinq autres sur celle de bois de *Cunninghamia konishii*.

Ainsi, les deux seules études relatives à l'huile essentielle de feuilles concernent *C. konishii* provenant de Taiwan et évoquent des compositions chimiques dominées par les monoterpènes hydrocarbonés (entre 55 et 60 %) avec l' α -pinène comme seul composé majoritaire commun. En effet, Su *et al.* (2006) identifient dans l'échantillon étudié, l' α -pinène (36,4 %) et l' α -thujène (11,4 %) comme composés majoritaires, suivis de l' α -eudesmol (8,1 %) et du β -élémol (5,8 %), seuls composés présents à des teneurs supérieures à 5%. L'échantillon analysé par Cheng *et al.* (2011) s'avère également riche en α -pinène (34,9 %). Toutefois, les autres composés importants sont le *p*-cymène (16,7 %) et le γ -muurolène (11,4 %), suivis de quelques autres composés dont les teneurs oscillent autour de 5 % (α -copaène, δ -sélinène, β -sélinène, β -élémente et α -cadinol). Ainsi, ces deux échantillons présentent certaines différences au niveau de leur composition chimique, malgré une origine géographique similaire (Taiwan). Ces mêmes auteurs (Cheng *et al.* ; Su *et al.*) ont également étudié la composition chimique de l'huile essentielle de bois de *C. konishii* de Taiwan. L'une de ces études décrit une composition chimique dominée par le cédrol (53,0 %) et l' α -pinène (25,6%), suivis de l' α -cédrene (6,6 %) et de l' α -terpinéol (4,4 %). Testés biologiquement, cette huile essentielle de bois ainsi que le cédrol seraient utilisables comme agents antifongiques (Cheng *et al.*, 2011). L'autre étude concerne plus particulièrement l'huile essentielle isolée à partir du bois de cœur de *C. konishii* et contient également du cédrol comme composé majoritaire (58,3 %), suivi de l' α -cédrene (11,8 %), de l' α -terpinéol (4,2 %) et du β -cédrene (3,5 %). Dans cet échantillon, l' α -pinène ne représente que 0,7 % de la composition chimique totale (Su *et al.*, 2012). Enfin, trois études concernent l'huile essentielle de bois de *C. konishii* originaire du Vietnam. La composition chimique de deux échantillons obtenus à partir de végétal récolté dans les provinces de Son La et Nghê An, est dominée par le cédrol (30,0 % et 37,0 %, respectivement) suivi de l'alcool β -penchylique (synonymes : alcool β -fenchylique ; 16,1 % et 27,5 %, respectivement) et de l' α -cédrene (4,5 % et 5,3 %, respectivement) (Thai *et al.*, 2007a). Un troisième échantillon isolé à partir du bois de *C. konishii* récolté dans la Réserve Naturelle de Tay Con Linh (province de Hà Giang) se distingue des deux précédents par sa forte teneur en α -terpinéol (36,6 %, absent dans les autres échantillons) et l'absence d'alcool β -penchylique. Il contient cependant du cédrol à une teneur de 29,8 %. Les auteurs évoquent d'ailleurs un probable nouveau chémotype à α -terpinéol (Dai *et al.*, 2012).

Du point de vue de l'activité biologique de ces huiles essentielles, Cheng *et al.* (2013) ont démontré une activité larvicide importante de deux des échantillons décrits précédemment (HE bois et HE feuilles) (Cheng *et al.*, 2011), contre deux espèces de moustiques responsables de la dengue : *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. Celles-ci constituent un produit bon marché et respectueux de l'environnement pouvant réduire la population de ce type de moustiques. L'activité antimicrobienne et cytotoxique de l'huile essentielle de bois de cœur sur des cellules cancéreuses humaines a également été démontrée, le cédrol étant le composé actif (Su *et al.*, 2012).

Cette étude bibliographique nous a permis de constater que globalement, la composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de *Cunninghamia konishii* est dominée par des monoterpènes hydrocarbonés (α -pinène essentiellement) et celle de l'huile essentielle de bois est riche en sesquiterpènes oxygénés (cédrol en général).

Le but de notre travail était d'identifier les constituants de l'huile essentielle de bois de *Cunninghamia konishii* originaire du Vietnam et plus précisément de la province de Thanh Hóa. En effet, les travaux précédents ont été menés sur les huiles essentielles de bois de trois des quatre provinces vietnamiennes abritant ce conifère et ont montré que les huiles essentielles de bois des provinces de Sơn La et Nghê An présentent des compositions similaires et considérablement différentes de celle de l'huile essentielle de bois de la province de Hà Giang. Aussi, il nous a semblé intéressant de compléter ces données par l'étude d'un échantillon issu de la quatrième province, Thanh Hóa. Afin d'éviter toute erreur d'identification de composés présentant des spectres de masse insuffisamment différenciés (diastéréoisomères par exemple) ou encore des indices de rétention très proches, nous avons analysé l'échantillon dont nous disposons par combinaison de différentes techniques analytiques (CPG(Ir), CPG-SM et RMN ^{13}C). L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une publication en 2015 parue dans le journal American Journal of Essential Oils and Natural Products (Thai *et al.*, 2015).

II. Etude de la composition chimique de l'huile essentielle de bois de *C. konishii* Hayata.

L'échantillon nous a été fourni par le Dr. Tran Huy Thai (IERB, Vietnam). L'huile essentielle (2,65 mL), jaune pâle, a été obtenue par hydrodistillation de 550 g de bois de *C. konishii* (province de Thanh Hóa) pendant 4 h, avec un rendement de 0,48 % (v/m).

L'analyse par CPG(Ir) et RMN ^{13}C a permis l'identification de 29 composés représentant 85,5 % de la composition chimique globale (**Tableau II.5 p.85**). Les composés majoritaires sont l' α -cédrene (18,4 %), le cédrol (11,2 %), l' α -terpinéol (9,6 %) et le γ -eudesmol (8,8 %). D'autres composés sont présents à des teneurs notables (> 2 %) tels que le β -cédrene (5,2 %), le bornéol (4,4 %), le β -eudesmol (3,0 %), l' α -eudesmol (2,8 %) et le camphre (2,7 %). Les composés non identifiés ont tous des teneurs inférieures à 0,6 %. Tous les composés identifiés étaient présents dans notre bibliothèque de spectres « Terpènes », excepté l' α -duprézianène qui a été identifié grâce aux données de la littérature. Pour ce composé, l'ensemble des signaux observés sur le spectre RMN ^{13}C du mélange correspond parfaitement à ceux décrits dans la littérature par Barrero *et al.* (1996) (**Tableau II.4**). De plus, l'indice de rétention en CPG sur colonne apolaire de ce sesquiterpène hydrocarboné ($I_r = 1386$) est tout à fait en accord avec celui donné par Joulain (1998) ($I_r^a = 1387$). Ce composé a ensuite été identifié également par SM. Son identification par RMN ^{13}C a contribué à l'enrichissement de notre banque « Terpènes » d'un composé supplémentaire.

Tableau II.4 : Structure et déplacements chimiques de l' α -duprézianène.

α -duprézianène	C	δC (ppm) Barrero <i>et al.</i> , 1996	δC (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
	8	142,86	142,71	0,15
	9	127,03	126,94	0,09
	5	52,66	52,67	0,01
	7	49,59	49,51	0,08
	1	49,40	49,45	0,05
	2	36,97	36,83	0,14
	3	33,80	33,83	0,03
	13	33,24	33,27	0,03
	6	31,91	31,94	0,03
	11	25,90	25,82	0,08
	14	24,67	24,66	0,01
	10	23,23	23,17	0,06
	4	22,93	22,84	0,09
	15	22,23	22,22	0,01
	12	20,05	20,02	0,03

Dans le but d'identifier un plus grand nombre de composés minoritaires, nous avons soumis notre échantillon à une analyse par CPG-SM et avons ainsi identifié 17 composés supplémentaires (2,9 % pour l'ensemble). Au total, 46 composés représentant 88,4 % de la composition chimique globale ont été identifiés dans cette huile essentielle de bois de *Cunninghamia konishii* originaire du Vietnam, par combinaison des techniques analytiques. Parmi ceux-ci, on dénombre 16 sesquiterpènes hydrocarbonés, dont l'identification a été assurée pour la plupart d'entre eux par RMN ^{13}C . C'est notamment le cas pour l' α -cédrène, composé majoritaire (18,4 %), le β -cédrène (5,2 %), ainsi que leurs diastéréoisomères, l' α -funébrène (également appelé 1,7-di-*épi*- α -cédrène, 1,4 %) et le β -funébrène (2,0 %). L'identification des cédrènes et des funébrènes, présents ensemble dans un échantillon d'huile essentielle, illustre parfaitement l'intérêt d'utiliser conjointement la RMN ^{13}C et la SM pour réaliser l'identification des constituants d'une huile essentielle riche en sesquiterpènes. En effet, les isomères du cédrène et du funébrène, qui ne diffèrent que par la stéréochimie de la jonction de cycle du squelette tricyclo[5.3.1.0^{1,5}]undécannique, possèdent des spectres de masse superposables (fréquent dans le cas de stéréoisomères) et des indices de rétention en CPG très proches (voir Chapitre I p.34). Ainsi, la SM propose l' α -cédrène d'une part à la place de l' α -funébrène et d'autre part à la place du β -funébrène (qui coélué avec l' α -cédrène sur la colonne utilisée pour réaliser l'analyse CPG-SM).

Par ailleurs, seuls 6 sesquiterpènes oxygénés ont été identifiés. Ils représentent néanmoins 26,2 % de la composition globale. Parmi ces composés, le cédrool (11,2 %) et le γ -eudesmol (8,8 %) sont les plus abondants. De nouveau, il est intéressant de remarquer que le sesquithuriférol coélué avec le cédrool sur la colonne utilisée pour réaliser l'analyse CPG-SM. Son identification a été assurée par RMN ^{13}C . Enfin, la RMN ^{13}C nous a également permis de confirmer que le β -élémane est bien un composé présent dans cette huile essentielle et non un artefact provenant du réarrangement thermique du germacrène A (Ouattara *et al.*, 2013). Notre échantillon contient également un phénylpropanoïde, le safrole (0,7 %), dont l'identification a été confirmée par l'observation des signaux caractéristiques sur le spectre de RMN ^{13}C de l'huile essentielle (en particulier les carbones protonés appartenant au cycle aromatique).

Tableau II.5 : Composition chimique de l'huile essentielle de bois de *Cunninghamia konishii*.

Components	Ir ^a	Ir ^p	HE %	Identification
α -Thujène	924	1028	0,5	Ir, SM
α -Pinène	932	1026	0,8	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Fenchène	943	1062	0,1	Ir, SM
Camphène	945	1072	0,3	Ir, SM
Sabinène	966	1125	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
β -Pinène	972	1114	0,1	Ir, SM
Myrcène	982	1163	0,1	Ir, SM
1,4-Cinéole	1005	1180	0,1	Ir, SM
<i>p</i> -Cymène	1013	1273	0,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
Limonène *	1022	1203	1,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
1,8-Cinéole *	1022	1211	0,4	Ir, SM
β -Phellandrène *	1022	1211	0,4	Ir, SM
Fenchone	1069	1398	1,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
Fenchol	1100	1580	1,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
Terpin-3-èn-1-ol	1118	nd	0,2	Ir, SM
Camphre	1122	1515	2,7	Ir, SM, RMN ¹³ C
Isobornéol *	1142	1665	1,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
Bornéol *	1150	1697	4,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
Terpinèn-4-ol	1160	1603	tr	Ir, SM
<i>p</i> -Cymèn-8-ol	1162	1843	0,2	Ir, SM
α -Terpinéol	1174	1692	9,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
γ -Terpinéol	1180	1697	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
Pipéritone	1231	1734	tr	Ir, SM
Safrole	1263	1872	0,7	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Copaène	1381	1492	0,1	Ir, SM
α -Funébrène	1383	1506	1,4	Ir, RMN ¹³ C
α -Duprézianène	1386	1524	0,8	Ir, SM, RMN ¹³ C
β -Elémène	1388	1590	2,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Cédrène*	1415	1570	18,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
β -Funébrène*	1415	1572	2,0	Ir, RMN ¹³ C
β -Cédrène	1420	1597	5,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
Thujopsène	1430	1621	0,7	Ir, SM, RMN ¹³ C
γ -Muuroène	1470	1687	1,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
Séline-4,11-diène	1474	1674	0,2	Ir, SM
β -Sélinène	1482	1717	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Muuroène	1494	1722	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
γ -Cadinène	1500	1757	0,2	Ir, SM
β -Bisabolène	1507	1725	0,7	Ir, SM, RMN ¹³ C
Cuparène	1514	1829	0,2	Ir, SM
α -Calacorène	1528	1912	0,2	Ir, SM
β -Elémol	1534	2073	1,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
Cédrol *	1591	2107	11,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
Sesquithuriférol *	1591	2113	0,4	Ir, RMN ¹³ C
γ -Eudesmol	1619	2177	8,8	Ir, SM, RMN ¹³ C
β -Eudesmol	1636	2242	3,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Eudesmol	1641	2233	2,8	Ir, SM, RMN ¹³ C
Total			88,4	

L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés suivis d'un astérisque (colonne polaire). Ir^a et Ir^p : indices de rétention mesurés respectivement sur colonnes apolaire (BP-1) et polaire (BP-20).

L'huile essentielle de bois de *Cunninghamia konishii* originaire du Vietnam, analysée au cours de cette étude, s'avère riche en composés sesquiterpéniques et plus particulièrement en molécules à squelette cédrane (α - et β -funébrène, α - et β -cédrène et cédrol, 38,2 % au total). La comparaison de sa composition chimique à celles décrites dans la littérature amène les constatations suivantes, qui mettent en évidence certaines particularités :

- le cédrol est moins abondant dans les huiles essentielles du Vietnam (11,2 % dans notre échantillon, 29,8-37,0 % dans ceux reportés dans la littérature) que dans celles de Taiwan (53,0 % et 58,3 %) ;

- notre échantillon se distingue par une teneur élevée en α -cédrène (18,4 %), composé moins abondant dans les autres échantillons (Taiwan : 6,6 % et 11,8 % ; Vietnam : 3,4-5,3 %) ;

- la teneur en α -terpinéol (9,6 %) dans notre échantillon est moindre par rapport à celle d'un autre échantillon d'huile essentielle de bois du Vietnam dans lequel il constitue le composé majoritaire (Hà Giang, 36,6 %) ;

- l' α -pinène n'est abondant (25,6 %) que dans un seul échantillon d'huile essentielle de bois de Taiwan alors qu'il est le composé majoritaire des huiles essentielles de feuilles ;

- le fenchol ne représente que 1,4 % de la composition chimique notre échantillon alors qu'il fait partie des composés majoritaires de deux autres échantillons originaires du Vietnam (16,1 % et 27,5 %) ;

- les trois isomères de l'eudesmol sont plus abondants dans notre échantillon (2,8 % à 8,8 %, contre 0 % à 1,9 % dans tous les autres échantillons de la littérature) ;

- le safrole, le β -funébrène, l' α -muurolène, le β -bisabolène, le β -élémol ainsi que le sesquithuriférol sont pour la première fois identifiés dans une huile essentielle de bois de *Cunninghamia konishii*.

Ainsi, il apparaît que l'huile essentielle isolée à partir du bois de *Cunninghamia konishii* originaire de 4 provinces du Vietnam présente des compositions chimiques différentes. Celles-ci sont dominées soit par des monoterpènes (α -terpinéol, alcool β -fenchylique), soit par des sesquiterpènes (cédrol, α -cédrène). De ce fait, il serait désormais intéressant d'étudier l'éventuelle variabilité chimique des huiles essentielles de bois de *C. konishii* originaire du Vietnam.

C. Caractérisation chimique des huiles essentielles d'*Asarum cordifolium* et *Asarum glabrum* Merrill C.E.C. Fischer du Vietnam.

I. Etude bibliographique.

La famille des Aristolochiacées regroupe des arbustes, des lianes et des plantes herbacées, qui évoluent dans des régions tempérées chaudes à tropicales. Elle est répandue dans la plupart des pays répondant à ces critères, excepté l'Australie. Cette famille compte plus de 600 espèces réparties en 9 genres, les deux principaux étant les genres *Aristolochia* (plus de 500 espèces) et *Asarum* (près de 90 espèces).

Les espèces du genre *Asarum* L. sont principalement répandues dans l'est de l'Asie (Chine, Japon et Vietnam), en Amérique du Nord et en Europe (Sugawara *et al.*, 2005). Certaines de ces espèces sont aussi connues sous le nom de « gingembre sauvage », en raison du goût poivré de leurs racines. Il s'agit des gingembres sauvages japonais (*A. asperum*), canadien (*A. canadense*), européen (*A. europaeum*), chinois (*A. delavayi*), et taïwanais (*A. epigynum*). Plusieurs espèces produisent de l'huile essentielle et ont fait l'objet d'études phytochimiques. La plupart de ces huiles essentielles contiennent des phénylpropanoïdes dans des proportions importantes et ces composés sont très probablement responsables de leur activité biologique.

Dès 1902, le méthyleugénol (phénylpropanoïde) est identifié comme composé majoritaire de l'huile essentielle d'*Asarum canadense* (Asaret du Canada), à une teneur de 36,9 % (Gower et Lees, 1902). Des études plus récentes décrivent plus en détails la composition chimique de cette huile essentielle. Ainsi, le méthyleugénol (36,05 %) et un monoterpène oxygéné, l'acétate de linalyle (28,02 %), sont décrits par Motto *et al.* (1985) comme les composés majoritaires de l'huile essentielle de racines d'*A. canadense* ; d'autres phénylpropanoïdes comme l'élémicine (1,76 %) et l'(*E*)-isoélémicine (0,92 %) font partie des composés minoritaires. Le méthyleugénol (53,8 %) est également le composé majoritaire de l'huile essentielle de rhizomes d'*A. canadense* décrite par Bélanger *et al.* (2010), au côté d'un alcool monoterpénique, le linalol (12,5 %). Divers autres phénylpropanoïdes y sont identifiés à des teneurs moindres tels que l'asaricine (2,2 %), l'élémicine (1,6 %), l'(*E*)-isoélémicine (0,6 %) et l'isométhyleugénol (0,1 %). En revanche, l'(*E*)-isoélémicine (20,0 %) et l'élémicine (4,9 %) sont parmi les composés majoritaires de l'huile essentielle de racines

d'*A. canadense*, accompagnés de plusieurs de leurs dérivés présents à des teneurs n'excédant pas 1,7 % chacun (Bélangier *et al.*, 2010). Le méthyleugénol (59,42 %) est également le composé majoritaire de l'huile essentielle d'*Asarum hétérotropoïdes* var *mandshuricum*, au côté d'une cétone monoterpénique, l'eucarvone (24,1 %). L'élémicine est présente à une teneur non négligeable de 5,72 %. Cette huile essentielle possède d'ailleurs une activité anti-phytopathogène à large spectre, due en grande partie à la présence du méthyleugénol (Dan *et al.*, 2010).

D'autres phénylpropanoïdes sont cités parmi les principaux composés d'huiles essentielles d'espèces du genre *Asarum*. Ainsi, le safrole (17 % à 33 %) et le méthyleugénol (21 % à 33 %) sont les composés majoritaires de l'huile essentielle de racines d'*A. hétérotropoïdes*, dont la composition varie en fonction des saisons (Wang *et al.*, 1997). Les huiles essentielles de feuilles et de racines d'*A. forbesii* se caractérisent par des compositions chimiques qualitativement très proches mais pour lesquelles les teneurs des composés majoritaires sont variables, excepté l'asaricine (8,6 % et 9,1 %, respectivement). Ainsi, l'isométhyleugénol, composé majoritaire de l'huile essentielle de feuilles (33,3 %), ne représente que 2,3 % de l'huile essentielle de racines tandis que l' α -asarone, très nettement majoritaire dans l'huile essentielle de racines (58,8 %), est présente à 19,2 % dans celle de feuilles. Les deux échantillons contiennent également du méthyleugénol (HE feuilles, 5,7 % ; HE racines, 10,3 %) et de l'isoélémicine (HE feuilles, 10,4 % ; HE racines, 6,3 %) à des teneurs importantes (Zhang *et al.*, 2005). Enfin, l'huile essentielle d'*Asarum europaeum* (seule espèce rencontrée en Europe) est majoritairement composée de (*E*)-asarone (59,1 %), composé aux propriétés antithrombotique et hypolipidémiant (Wilczewska *et al.*, 2008).

D'autres espèces du genre *Asarum* produisent des huiles essentielles riches en composés monoterpéniques, la part de phénylpropanoïdes étant moindre :

- l'huile essentielle d'*Asarum insigne* contenant principalement du camphène (13,48 %), de l' α -pinène (12,44 %) et du β -pinène (11,07 %). Trois phénylpropanoïdes sont identifiés à des teneurs plus faibles, l'élémicine (5,38 %), le safrole (3,06 %) et la myristicine (2,95 %) (Qu *et al.*, 2010) ;

- les huiles essentielles d'*Asarum caulescense* Maxim. isolées à partir du végétal frais et séché (teneurs respectives), qui sont majoritairement composées de β -pinène (7,63 % / 20,72 %), de 2-carène (8,94 % / 7,99 %), d' α -phellandrène (7,80 % / 14,39 %), de 1,8-cinéole (8,91 % / 13,29 %) et de germacrone (46,64 % / 6,64 %) (Shunying *et al.*, 2006).

Au Vietnam, 8 espèces du genre *Asarum* sont recensées (Tuan *et al.*, 2012a), parmi lesquelles *Asarum cordifolium* et *Asarum glabrum*. A ce jour, ces deux espèces n'ont fait l'objet que de très peu d'études. A notre connaissance, *A. cordifolium* a fait l'objet de deux études botanique (Tuan *et al.*, 2012b) et morphologique (Sugawara *et al.*, 2005) et très récemment, d'une étude de sa composition chimique postérieure à notre article (Thai *et al.*, 2013a). Cette dernière, concerne plus particulièrement l'analyse par CPG-SM de la composition chimique d'huiles essentielles de quatre espèces du genre *Asarum*, et notamment *Asarum cordifolium* (huile essentielle obtenue à partir de l'intégralité de la plante). Les deux composés majoritaires identifiés, l'élémicine (84,38 %) et le méthyleugénol (3,63 %), appartiennent à la famille des phénylpropanoïdes. Concernant l'espèce *A. glabrum*, nous ne recensons qu'une étude relative à la composition chimique de l'huile essentielle obtenue à partir des parties aériennes. Son analyse par CPG-SM indique trois phénylpropanoïdes comme constituants majoritaires, le safrole (42,24 %), l'apiole (27,11 %) et la myristicine (6,13 %) (Thai *et al.*, 2010). Une autre étude a montré les propriétés anti-inflammatoires d'un extrait éthanolique d'*A. glabrum* ainsi que de sa fraction extraite au dichlorométhane (Juan *et al.*, 2007).

Cette étude bibliographique montre qu'au moment où nous menions nos travaux sur les huiles essentielles de ces deux espèces du genre *Asarum*, seule *Asarum glabrum* avait fait l'objet d'une étude phytochimique. Aussi, dans la continuité des travaux réalisés depuis une vingtaine d'année en collaboration avec l'Institut d'Ecologie et des Ressources Biologiques du Vietnam, nous nous sommes intéressés à la caractérisation chimique des huiles essentielles produites par *A. cordifolium* et *A. glabrum*. Dans ce paragraphe, nous décrivons leur composition chimique, étudiée par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ¹³C. L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une publication en 2013 parue dans le journal Natural Product Communications (Thai *et al.*, 2013b).

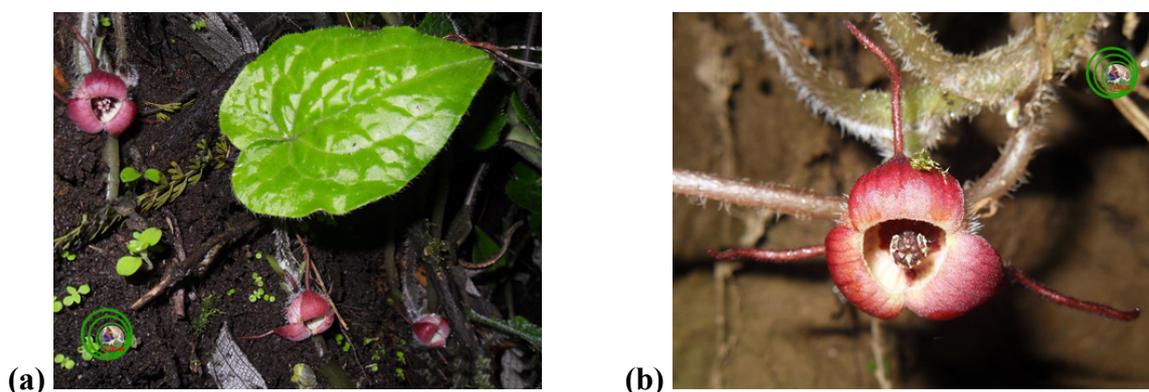
II. L'huile essentielle d'*Asarum cordifolium* : nouvelle espèce recensée au Vietnam

II.1. Description botanique

Asarum cordifolium C.E.C. Fischer est une plante herbacée d'environ 15-25 cm de haut (**Figure II.7**). Répandue dans les forêts denses et les vallées humides (1500-1600 m d'altitude) de quelques pays de l'est du continent asiatique (Birmanie, Inde, Chine et Vietnam), cette espèce n'a été découverte que récemment au Vietnam (Sa Pa, Lao Cai

province) (Tuan *et al.*, 2012b). D'un point de vue morphologique, les fleurs d'*Asarum cordifolium* sont solitaires, possédant trois sépales libres et un ovaire infère, caractéristiques des espèces du sous-genre *Asarum*, section *Asarum*. En revanche, *A. cordifolium* se distingue de la plupart des espèces de la section *Asarum* par ses feuilles solitaires alternées entre elles (Sugawara *et al.*, 2005 ; Tuan *et al.*, 2012b). Des études phylogénétiques menées par Sugarawa *et al.* (2005) ont mis en évidence la proximité d'*A. cordifolium* avec *A. caudigerum* et *A. cardiophyllum*, les regroupant ainsi au sein d'une même clade. En médecine traditionnelle, les feuilles et les racines d'*A. cordifolium* sont utilisées en décoction pour soigner la dyspepsie et les douleurs abdominales.

Figure II.7 : (a) Feuille de *A. cordifolium* ; (b) Fleur de *A. cordifolium* (Source : <http://vncreatures.net> ; photos prises par Phung my Trung)



II.2. Etude de la composition chimique de l'huile essentielle

L'huile essentielle d'*Asarum cordifolium* (de couleur jaune pâle) a été obtenue par hydrodistillation de l'ensemble de la plante (feuilles, tiges, fleurs et racines) séché à l'air libre, avec un rendement de 0,22 % (m/m, calculé par rapport à la masse de végétal sec). Nous avons analysé cette huile essentielle par combinaison de techniques chromatographiques et spectroscopiques : CPG(Ir), CPG-SM et RMN ^{13}C . Dans une première partie de l'étude, l'analyse de l'échantillon par CPG(Ir) et RMN ^{13}C a conduit à l'identification de 12 composés représentant 95,0 % de la composition chimique globale (**Tableau II.6**). Deux d'entre eux sont très largement majoritaires et appartiennent à la famille des phénylpropanoïdes, il s'agit de l'élémicine (82,5 %) et du méthyleugénol (6,2 %). Parmi les dix autres composés (7 monoterpènes hydrocarbonés, 2 sesquiterpènes hydrocarbonés et 1 phénylpropanoïde), seul le *p*-cymène atteint une teneur supérieure à 1 % (1,3 %) et l'*(E)*-isoélémicine est présente à 0,9 %. Les teneurs des composés restants oscillent entre 0,3 et 0,7 %. Pour l'ensemble des

composés identifiés, la totalité des signaux des carbones hydrogénés sont repérés sur le spectre RMN ^{13}C de cet échantillon. Seuls les signaux des carbones quaternaires des composés minoritaires n'ont pu être repérés, ce qui ne gêne en rien l'identification de ces molécules.

Dans un second temps, nous avons analysé cet échantillon par CPG-SM, afin d'identifier d'autres composés minoritaires (tr-0,3 %). Onze composés supplémentaires représentant 1,5 % de la composition chimique totale ont ainsi été identifiés, principalement des monoterpènes hydrocarbonés (7 monoterpènes hydrocarbonés, 3 monoterpènes oxygénés et 1 sesquiterpène hydrocarboné). Au total, 23 composés représentant 96,5 % de la composition chimique globale (17 monoterpènes, 3 sesquiterpènes et 3 phénylpropanoïdes) ont été identifiés, il s'agit très majoritairement de composés appartenant à la famille des phénylpropanoïdes (89,6 % ; 3 composés) (**Tableau II.6**).

A l'instar d'autres huiles essentielles du genre *Asarum* (cf. paragraphe C.I, p.82-83), l'huile essentielle d'*A. cordifolium* voit sa composition très largement dominée par des phénylpropanoïdes et plus particulièrement par l'élémicine. Compte tenu du fait qu'il s'agit d'une molécule d'intérêt pour laquelle plusieurs études ont montré l'implication dans les activités antibactériennes et antifongiques de certaines huiles essentielles et que ce composé pur n'est pas disponible, *A. cordifolium* pourrait être considérée comme source naturelle potentielle d'élémicine. A ce titre, nous pouvons citer une étude menée sur l'huile essentielle de *Daucus carota* L. spp. *carota* contenant 16,3 % d'élémicine et qui s'est montrée active sur des souches de *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*) à l'origine de la gastro-entérite. L'élémicine alors concentrée à 98 % dans une sous-fraction inhibe la croissance de souches *Campylobacter jejuni* (MIC = 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et représente donc un candidat potentiel dans le traitement des infections par *Campylobacter* (Rossi *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'huile essentielle obtenue à partir des ombelles mûres de *Daucus carota* ssp. *halophilus*, contenant 26,0 % d'élémicine, présente une activité antifongique non négligeable (MIC allant de 0,16 à 0,32 $\mu\text{g}/\text{mL}$), plus marquée sur les dermatophytes que sur les levures et autres champignons filamenteux. En revanche, cette même étude démontre qu'aucune activité cytotoxique n'existe pour des concentrations en huile essentielle variant de 0,16 à 0,64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sur une durée d'étude de 24h (Tavares *et al.*, 2008). Quant au potentiel génotoxique de l'élémicine, celui-ci reste incertain (De Vincenzi *et al.*, 2004).

Tableau II.6 : Composition chimique de l'huile essentielle d'*Asarum cordifolium*.

Composés	Ir ^a	Ir ^p	HE %	Identification
α-Thujène	924	1028	tr	Ir, SM
α-Pinène	932	1026	0,7	Ir, SM, RMN ¹³ C
Camphène	945	1071	0,3	Ir, SM, RMN ¹³ C
Sabinène	966	1124	tr	Ir, SM
β-Pinène	972	1114	0,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
Myrcène	981	1162	0,1	Ir, SM
α-Phellandrène	998	1168	0,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
δ-3-Carène	1008	1152	0,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
<i>p</i> -Cymène	1013	1273	1,3	Ir, SM, RMN ¹³ C
Limonène *	1022	1203	0,3	Ir, SM
β-Phellandrène*	1022	1212	0,3	Ir, SM
(<i>Z</i>)-β-Ocimène	1026	1234	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
(<i>E</i>)-β-Ocimène	1037	1251	0,3	Ir, SM
γ-Terpinène	1049	1247	tr	Ir, SM
Linalol	1083	1543	0,2	Ir, SM
Terpinèn-4-ol	1162	1598	tr	Ir, SM
α-Terpinéol	1172	1691	tr	Ir, SM
Méthyleugénol	1370	2008	6,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
β-Elémène	1388	1593	0,3	Ir, SM
β-Sélinène	1483	1717	0,7	Ir, SM, RMN ¹³ C
Elémicine	1516	2242	82,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
(<i>E</i>)-α-Bisabolène	1534	1772	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
(<i>E</i>)-Isoélémicine	1612	2392	0,9	Ir, SM, RMN ¹³ C
Total			96,5	

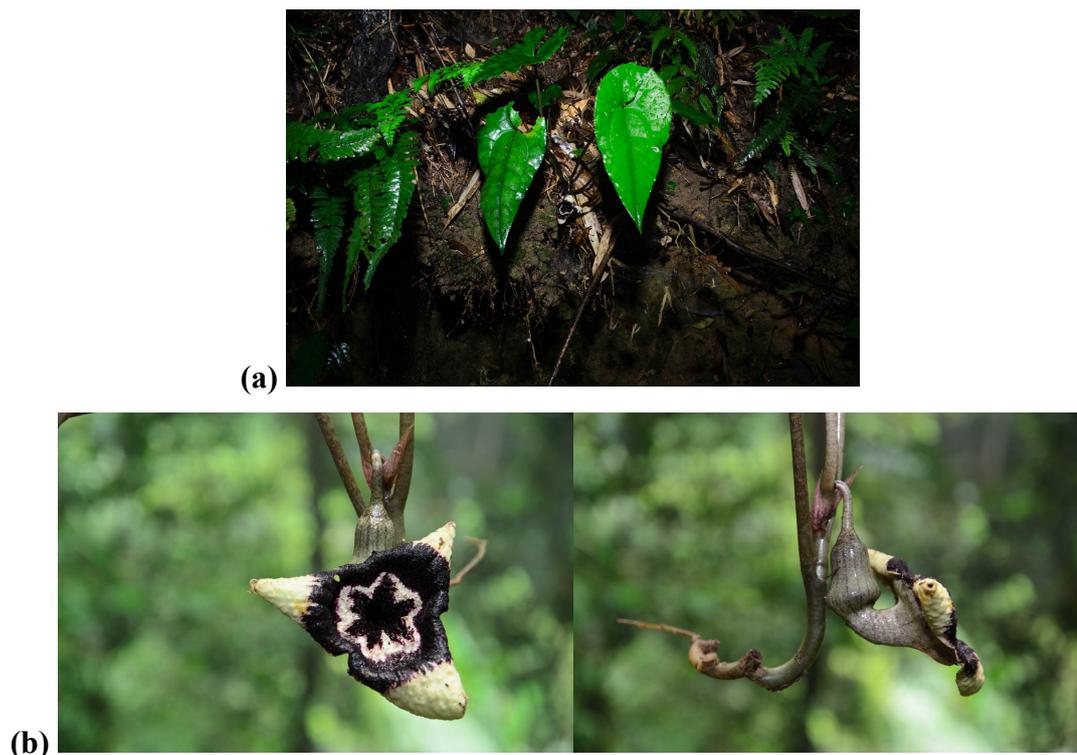
L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés suivis d'un astérisque (colonne polaire). Ir^a et Ir^p : indices de rétention mesurés respectivement sur colonnes apolaire (BP-1) et polaire (BP-20). tr = traces.

III. L'huile essentielle d'*Asarum glabrum*.

III.1. Description botanique

Asarum glabrum Merrill est une plante herbacée vivace d'environ 20-30 cm de haut (**Figure II.8**). Elle pousse sur des sols humides (humus) dans les forêts sempervirentes, denses et humides du Vietnam, à des altitudes supérieures à 1000 m (provinces de Hà Giang et Vĩnh Phúc, nord du Vietnam). La floraison se produit généralement vers mai-juin, les feuilles en forme de cœur sont alternes. *A. glabrum* est répertoriée dans le « Vietnam's Red Data Book » et citée par le Décret Gouvernemental 32/2006/NĐ/CP parmi les espèces vulnérables.

Figure II.8 : (a) Feuilles d'*A. glabrum* ; (b) Fleurs d'*A. glabrum* (Source : www.flickrriver.com ; photos : Johannes Lundberg)



En médecine traditionnelle, les feuilles et les racines d'*A. glabrum* sont, tout comme celles d'*A. cordifolium*, utilisées en décoction pour soigner la dyspepsie et les douleurs abdominales. Cette décoction est également utilisée comme boisson tonique.

III.2. Etude de la composition chimique de l'huile essentielle

L'huile essentielle, de couleur jaune, a été obtenue par hydrodistillation de l'intégralité de la plante (feuilles, tiges, fleurs et racines) durant 3 heures. Son rendement, calculé par rapport à la masse de végétal sec, est de 0,12 % (m/m).

L'échantillon a dans un premier temps été analysé par CPG(Ir) et RMN ¹³C, ce qui nous a permis d'identifier 22 composés, principalement des composés oxygénés (9 phénylpropanoïdes, 6 monoterpènes oxygénés, 5 monoterpènes hydrocarbonés et 2 sesquiterpènes oxygénés) (**Tableau II.7**). Le composé majoritaire de cette huile essentielle est le safrole (41,9 %), accompagné de plusieurs autres composés appartenant également à la famille des phénylpropanoïdes. Il s'agit de l'apiole parsley (8,2 %), du méthyleugénol (6,9 %), de la (*E*)-asarone (5,3 %), de la γ -asarone (4,7 %), de la myristicine (4,3 %), du 4-méthoxysafrole (3,2 %), de l'apiole dill (3,0 %) et de l'élémicine (1,6 %). Le sesquicinéole (2,6 %) est le seul sesquiterpène oxygéné dont la teneur dépasse 1 %.

Nous avons souhaité compléter l'identification des composés minoritaires en analysant cet échantillon par CPG-SM. Nous avons ainsi identifié 14 composés supplémentaires, dont 9 monoterpènes hydrocarbonés, 3 sesquiterpènes hydrocarbonés, 1 monoterpène oxygéné et 1 phénylpropanoïde. Parmi les 12 composés déjà identifiés par CPG(Ir) et RMN ^{13}C , seuls le 4-méthoxysafrole et la (*E*)-asarone n'ont pas été identifiés en spectrométrie de masse. En effet, pour un même pic en CPG, chacun de ces deux composés est suggéré avec un score faible, aux côtés d'autres molécules (squelettes proches) proposées avec des scores similaires voire meilleurs. Même si les indices de rétention de ces dernières ne coïncident pas avec l'ordre d'éluion, il reste difficile d'affirmer avec certitude l'identification du 4-méthoxysafrole et de la (*E*)-asarone. Ainsi, dans ce cas là, la RMN ^{13}C constitue une technique de choix pour identifier avec certitude ces deux composés. De la même façon, l' α -bisabolol (0,4 %) a été suggéré par la SM mais la stéréochimie relative des deux carbones asymétriques ne peut être assurément déterminée que par RMN. En effet, l' α -bisabolol et l' α -*épi*-bisabolol présentent des spectres de masses similaires et leurs indices de rétention sur colonnes polaire et apolaire ne diffèrent que de quelques points ($\text{Ir}^a/\text{Ir}^p = 1675/2210$ et $1677/2214$, respectivement). En revanche, les spectres de RMN ^{13}C des deux diastéréoisomères sont différents.

Au total, 36 composés représentant 93,7 % de la composition globale de l'huile essentielle d'*Asarum glabrum* ont été identifiés. Il s'agit très majoritairement de phénylpropanoïdes (79,3 %, 10 composés) (**Tableau II.7 et Figure II.9 p.96**).

En raison de sa forte teneur en safrole (composé majoritaire, 41,9 %), cette huile essentielle d'*Asarum glabrum* doit être utilisée avec précaution. En effet, suite à la découverte de sa cancérrogénicité chez les rats, le safrole qui était autrefois utilisé comme additif alimentaire et comme arôme dans les médicaments, a été banni en 1960 par la Food and Drug Administration (FDA). Même si sa cancérrogénicité chez l'homme reste encore à prouver, il est aujourd'hui considéré comme génotoxique et carcinogène par la Direction Générale de la Santé et de la Protection des Consommateurs de l'Union Européenne. Le safrole est également utilisé pour synthétiser la 3,4-méthylendioxyamphétamine (MDMA), drogue illicite également connue sous le nom d'ecstasy. Aussi, il est classé parmi les précurseurs sous contrôle de la Catégorie I No 273/2004 de la Communauté Européenne et au sein des substances chimiques de la Liste I des Etats Unis. C'est aussi un précurseur dans la synthèse du butoxyde pipéronilique, composé synergisant utilisé dans un grand nombre d'insecticides pour accroître les propriétés pesticides des ingrédients actifs. Ainsi, présent en petites

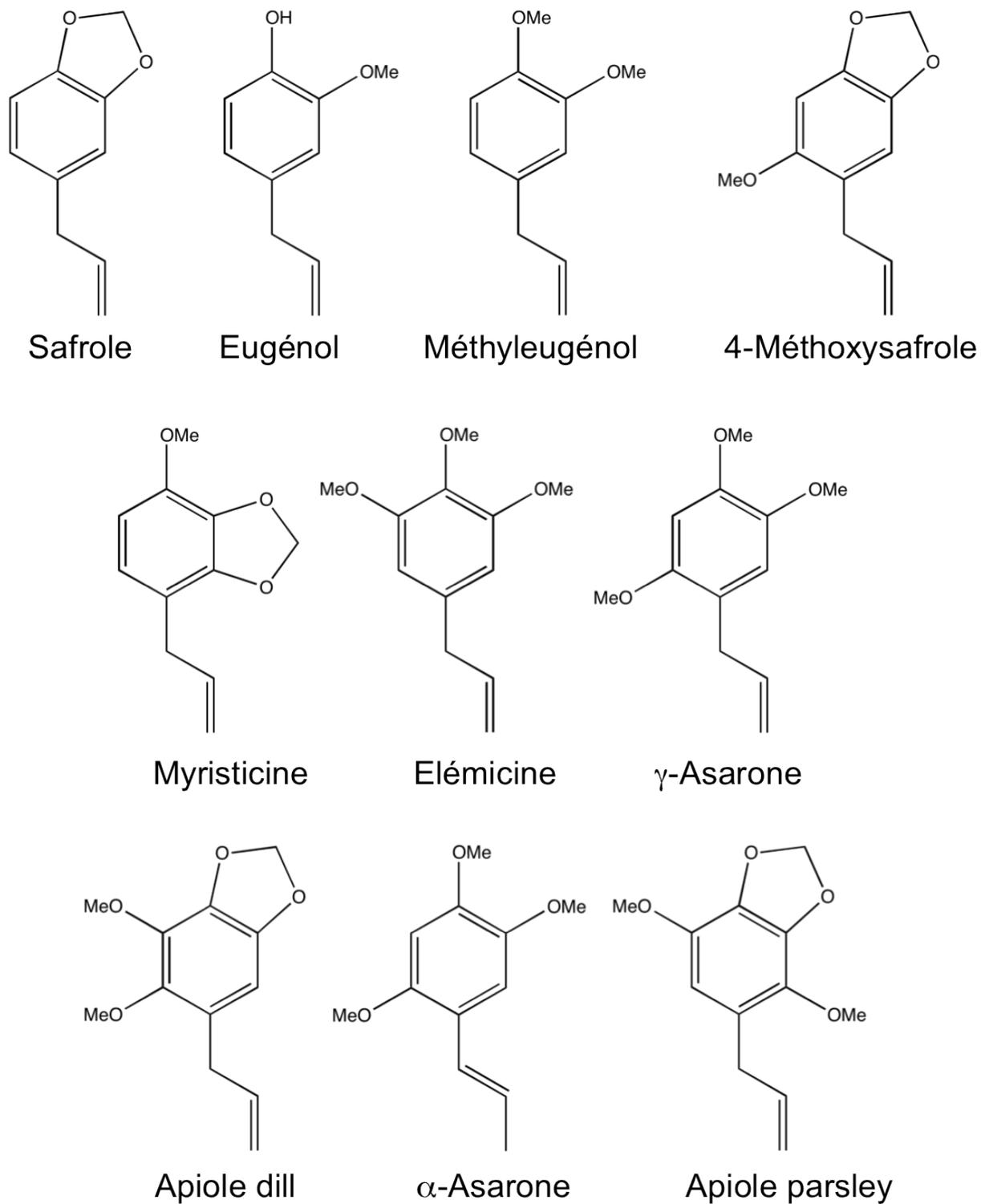
quantités dans les végétaux, le saffrole les protège de l'attaque de certains insectes. Enfin, depuis 1976, l'International Fragrance Association (IFRA) limite la teneur en saffrole dans certains savons et parfums à 0,01% (National Toxicology Program, 2011).

Tableau II.7 : Composition chimique de l'huile essentielle d'*Asarum glabrum*.

Composés	Ir ^a	Ir ^p	HE %	Identification
α -Thujène	924	1028	1,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Pinène	932	1026	0,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
Camphène	945	1071	0,2	Ir, SM
Sabinène	966	1124	0,1	Ir, SM
β -Pinène	972	1114	1,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
Myrcène	981	1162	0,3	Ir, SM
α -Phellandrène	998	1168	tr	Ir, SM
α -Terpinène	1010	1183	0,3	Ir, SM
<i>p</i> -Cymène	1013	1273	0,8	Ir, SM, RMN ¹³ C
Limonène *	1022	1203	0,3	Ir, SM
1,8-Cinéole*	1022	1211	0,3	Ir, SM
(<i>Z</i>)- β -Ocimène	1026	1234	0,2	Ir, SM
(<i>E</i>)- β -Ocimène	1037	1251	0,1	Ir, SM
γ -Terpinène	1049	1247	0,9	Ir, SM, RMN ¹³ C
<i>trans</i> -hydrate de sabinène	1053	1460	0,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
Terpinolène	1079	1285	0,1	Ir, SM
Linalol	1083	1543	0,9	Ir, SM, RMN ¹³ C
Bornéol	1150	1696	0,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
Terpinèn-4-ol	1162	1598	1,1	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Terpinéol	1172	1691	0,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
Saffrole	1265	1873	41,9	Ir, SM, RMN ¹³ C
Eugénol	1328	2175	0,2	Ir, SM
Acétate d' α -terpinyle	1332	1693	1,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
Méthyleugénol	1370	2008	6,9	Ir, SM, RMN ¹³ C
β -Elémène	1388	1593	0,1	Ir, SM
4-Méthoxysaffrole (sarisane)	1463	2211	3,2	Ir, RMN ¹³ C
α -Curcumène	1470	1771	0,2	Ir, SM
γ -Curcumène	1472	1689	0,1	Ir, SM
Myristicine	1487	2280	4,3	Ir, SM, RMN ¹³ C
Sesquicinéole	1503	1740	2,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
Elémicine	1516	2242	1,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
γ -Asarone	1536	2277	4,7	Ir, SM, RMN ¹³ C
Apiole dill	1590	2360	3,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
(<i>E</i>)-Asarone	1639	2452	5,3	Ir, RMN ¹³ C
Apiole parsley	1645	2476	8,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Bisabolol	1666	2229	0,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
Total			93,7	

L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés suivis d'un astérisque (colonne polaire). Ir^a et Ir^p : indices de rétention mesurés respectivement sur colonnes apolaire (BP-1) et polaire (BP-20).

Figure II.9 : Phénylpropanoïdes identifiés dans l'huile essentielle d'*Asarum glabrum*.

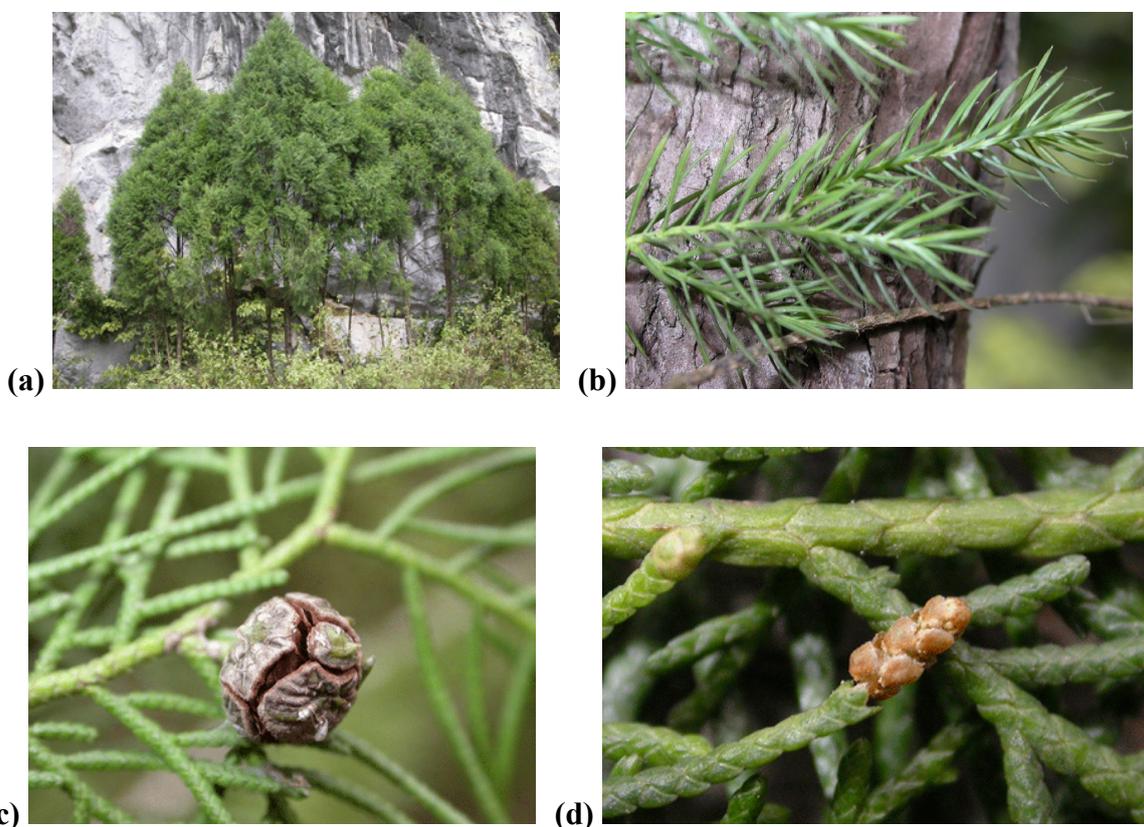


Ainsi, à l'image d'autres espèces du même genre, *Asarum glabrum* produit une huile essentielle caractérisée par une grande variété de phénylpropanoïdes qui constituent près de 80 % de sa composition chimique totale. Celle-ci possède une composition très proche de celle décrite par Thai *et al.* (2010), toutes deux originaires du Vietnam et renfermant majoritairement du safrole (41,9 % dans notre échantillon et 42,24 % dans celui de la littérature). Néanmoins, la teneur en apiole est nettement plus élevée dans l'échantillon de la littérature (27,11 %) que dans notre huile essentielle (8,2 %). Par ailleurs, notre échantillon se distingue par la présence d'un plus grand nombre de phénylpropanoïdes à des teneurs non négligeables (1,6 % à 6,9 %) ainsi que d'un sesquiterpène oxygéné (sesquicinéole, 2,6 %). Concernant l'huile essentielle d'*A. cordifolium*, sa composition chimique est similaire à celle décrite par Thai *et al.* (2013a) et remarquable par sa forte teneur en élémicine (plus de 80 %).

D. Les huiles essentielles de *Cupressus tonkinensis*.

Cupressus tonkinensis Silba appartient à la famille des Cupressacées. C'est un arbre au feuillage persistant et au port retombant, pouvant atteindre 15 mètres de haut. Les tiges sont cylindriques et le tronc (environ 40 cm de diamètre) possède une écorce grise-brune et épaisse. Les feuilles juvéniles sont petites et pointues tandis qu'une fois matures, celles-ci sont semblables à des écailles, étroitement collées. Il s'agit d'une espèce monoïque, elle possède sur un même pied des cônes mâles et femelles unisexués. Ces derniers apparaissent entre les mois de mars et de mai. Les cônes femelles (1,5 cm de diamètre, sous-globulaires à maturité) renferment des graines brunes (3 mm de long) atteignant leur maturité entre mai et novembre (**Figure II.10**).

Figure II.10 : (a) *Cupressus tonkinensis* (b) Feuillage juvénile (c) Feuilles matures en forme d'écaille et cône femelle (d) Feuilles matures et cône mâle. (Source : *PlantSystematics.org*, photos : ©Dennis Stevenson)



I. Etude bibliographique

L'espèce *C. tonkinensis* Silba n'a été reconnue qu'en 1994 (Silba, 1994). Jusqu'à lors, elle était confondue avec *Cupressus torulosa* D. Don, une espèce originaire de l'Himalaya et de l'ouest de la Chine (Malizia *et al.*, 2000). Or, ces deux espèces présentent des caractéristiques botaniques différentes. *C. tonkinensis* possède des feuilles dimorphes et de nombreuses glandes résineuses contrairement à *C. torulosa*. De même, ses cônes femelles sont plus petits (Little *et al.*, 2011). Les deux espèces ont également été différenciées sur la base de leur ADN, grâce à la technique d'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (Rushforth *et al.*, 2003).

C. tonkinensis est une espèce endémique locale. Son aire de répartition naturelle est limitée au massif montagneux de Cai Kinh au nord du Vietnam (district de Hữu Lũng, province de Lạng Sơn), soit au total 42 000 hectares, avec une altitude maximale de 700 m. Cette zone est marquée par un climat de mousson (hivers doux, étés humides) et une pluviométrie annuelle d'environ 1400-1500 mm (The *et al.*, 2013).

Aujourd'hui, *C. tonkinensis* est répertoriée dans le « Vietnam Red Data Book » (2007, catégorie « Critique ») et dans le décret gouvernemental 32/2006/NĐ/CP (Liste des plantes et des animaux de la forêt en voie de disparition) parmi les espèces en danger critique d'extinction, notamment en raison de sa surexploitation due à la popularité de son bois. En effet, le bois de *Cupressus tonkinensis* est résistant aux termites et insectes, ce qui en fait un matériau de choix dans la fabrication de meubles et objets d'art. Ainsi, afin de préserver l'espèce, des plantations ont été établies (conservation *ex-situ*) à proximité du massif de Cai Kinh (Réserve naturelle de Huu Lien), malgré le faible taux de germination des graines si l'on se réfère aux récentes études menées par le Groupe Spécialiste des Conifères (Vietnam) (The *et al.*, 2009, 2013 ; Padalia *et al.*, 2013). En médecine traditionnelle, l'écorce de *C. tonkinensis* est employée en décoction pour soigner les maux d'estomac. L'huile essentielle isolée à partir des racines est utilisée en cosmétique et comme anti-inflammatoire (Padalia *et al.*, 2013).

Dans la littérature, de nombreuses études ont été menées sur la composition chimique des huiles essentielles produites par différentes espèces du genre *Cupressus* (Lawrence, 1995, 2001 ; Pierre-Leandri *et al.*, 2003). Au sein de notre laboratoire, l'analyse d'une huile essentielle et d'une huile pyrolytique de *Cupressus funebris* a montré, dans les deux cas, une composition chimique dominée par des dérivés du cédrane (Duquesnoy *et al.*, 2006 ; Hoi *et*

al., 1997). En revanche, nous n'avons recensé que peu d'articles concernant les huiles essentielles isolées à partir des parties aériennes de *C. torulosa* et *C. tonkinensis*.

Nous exposerons d'abord le bilan des travaux concernant les huiles essentielles isolées à partir de différents organes de *C. torulosa*. Ainsi, la composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de *Cupressus torulosa* D. Don originaire de Chine, d'Argentine et d'Inde a été étudiée respectivement par Cool *et al.* (1998), Malizia *et al.* (2000) et récemment par Lohani *et al.* (2012). L' α -pinène est le composé majoritaire commun à l'ensemble de ces huiles essentielles. Ainsi, l' α -pinène (25,8 %), le sabinène (22,3 %) et le terpinèn-4-ol (9,3 %) sont les trois composés majoritaires de l'huile essentielle de feuilles de *C. torulosa*, cultivé en Patagonie Argentine (Malizia *et al.*, 2000) L'analyse de 3 échantillons d'huiles essentielles de feuilles de *C. torulosa* originaires de 3 stations bien distinctes en Inde (Kalsi Dehradun, Joshimath Chamoli et Jehrikhal Pauri) révèle des compositions chimiques riches en monoterpènes hydrocarbonés. Outre l' α -pinène (30,30 à 34,26 %), les composés majoritaires sont variables d'une station à l'autre : le δ -3-carène (18,67 %, Kalsi Dehradun), le sabinène (19,23 %, Joshimath Chamoli) et le limonène (23,79 %, Jehrikhal Pauri) (Lohani *et al.*, 2012). En revanche, divers sesquiterpènes, notamment les *cis*-muurol-5-en-4 α -ol (5,3 %) et *cis*-muurol-5-en-4 β -ol (4,8 %), ont été identifiés dans l'huile essentielle obtenue à partir du feuillage de *C. torulosa* var. *cashmeriana*, cultivé dans la province de Yunnan (Chine), au côté de l' α -pinène (14,1 %) et du δ -3-carène (9,6 %) (Cool *et al.*, 1998). Concernant les huiles essentielles isolées à partir des rameaux de *C. torulosa* « mâles » et « femelles » originaires d'Inde, celles-ci se distinguent entre elles par la teneur du terpinèn-4-ol, composé majoritaire dans l'huile essentielle de rameaux « mâles » (19,64 %), contre une teneur de 0,1% dans l'huile essentielles de rameaux « femelles ». Les autres composés majoritaires sont similaires dans les deux types d'huiles essentielles (respectivement, l'umbellulone, 16,26/21,62 % ; le limonène 13,27/14,56 % ; l' α -pinène, 9,62/17,76 % ; et le sabinène, 9,26/5,87 %) (Padalia *et al.*, 2013). Enfin, nous recensons deux études concernant l'huile essentielle de cônes de *C. torulosa* originaire d'Inde. L'une fait état d'une composition riche en sesquiterpènes (teneur globale supérieure à 50%) avec notamment l' α -cubébène (10,54 %), composé majoritaire au côté d'un monoterpène oxygéné, le terpinèn-4-ol (25,91 %) (Sellapan *et al.*, 2007). En revanche, l'autre (cônes « femelles ») montre une composition dominée par les monoterpènes (90 %), parmi lesquels l'umbellulone (26,66 %), l' α -pinène (14,64 %), le sabinène (14,33 %) et le limonène (13,86 %) sont les composés majoritaires ; le terpinèn-4-ol n'étant présent qu'à 0,91 % (Padalia *et al.*, 2013).

Concernant *Cupressus tonkinensis*, nous recensons seulement deux études récentes relatives aux composés volatils contenus dans ses huiles essentielles. La première décrit la composition chimique de l'huile essentielle isolée à partir des feuilles de *C. tonkinensis* originaire du Vietnam (Huu Lien, province de Lạng Sơn). La famille des monoterpènes y représente plus de 90 % avec le sabinène (29,34 %), l' α -pinène (25,40 %) et le terpinèn-4-ol (13,91 %) identifiés comme composés majoritaires (Thai *et al.*, 2009). La seconde, postérieure à notre article (Thai *et al.*, 2013c), concerne l'huile essentielle de bois (Huu Lien, province de Lạng Sơn, Vietnam) et présente le même profil chimique : plus de 80 % de monoterpènes avec le sabinène (22,3 %), l' α -pinène (15,2 %) et le terpinèn-4-ol (15,5 %) majoritaires. L'élémol est le seul sesquiterpène présent à une teneur notable de 5 % (Dai *et al.*, 2013).

Le but de ce travail était de caractériser l'espèce *Cupressus tonkinensis* Silba au travers de la composition chimique de ses huiles essentielles. Nous avons ainsi analysé deux échantillons d'huiles essentielles obtenus par hydrodistillation de différentes parties aériennes de *C. tonkinensis* provenant de la Réserve Naturelle de Huu Lien (province de Lạng Sơn, Vietnam) :

- un échantillon d'huile essentielle de feuilles analysé par CPG-SM, CPG(Ir) et RMN ^{13}C puis soumis à un fractionnement sur colonne ouverte de silice de type « flash » ;
- un échantillon d'huile essentielle de tiges analysé par CPG-SM, CPG(Ir) et RMN ^{13}C , sans fractionnement préalable.

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une publication en 2013, parue dans Journal of Essential Oil Research (Thai *et al.*, 2013c).

II. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de feuilles.

Nous disposions d'un échantillon d'huile essentielle de feuilles de *Cupressus tonkinensis* fourni par le Docteur Tran Huy Thai de l'Institut d'Ecologie et de Ressources Biologiques (IERB) du Vietnam. Celle-ci a été obtenue par hydrodistillation de feuilles séchées dans un appareil de type Clevenger durant 2 heures, avec un rendement de 0,16 % (m/m). Les feuilles ont été récoltées au mois de mars 2009 dans la Réserve Naturelle de Huu Lien (Vietnam). Un échantillon de référence est stocké dans l'herbier de l'IERB.

II.1. Analyse directe de l'huile essentielle par CPG-SM, CPG(Ir) et RMN ¹³C

L'analyse par CPG-SM, CPG(Ir) et RMN ¹³C a permis d'identifier 40 composés représentant 95,4 % de la composition globale de l'huile essentielle (**Tableau II.8 p.104**). Au sein de cette composition, le groupe des monoterpènes hydrocarbonés est largement représenté (71,0 %) avec la présence majoritaire de l' α -pinène (25,7 %) et du sabinène (23,3 %). Le principal monoterpène oxygéné est le terpinèn-4-ol (12,6 %), troisième composé majoritaire. Par ailleurs, nous pouvons dès à présent noter que le β -élémol est le seul sesquiterpène présent à une teneur appréciable dans cette huile essentielle de feuilles (3,8 %) tandis que parmi les diterpènes, l'abiéta-7,13-diène est le plus abondant (0,7 %).

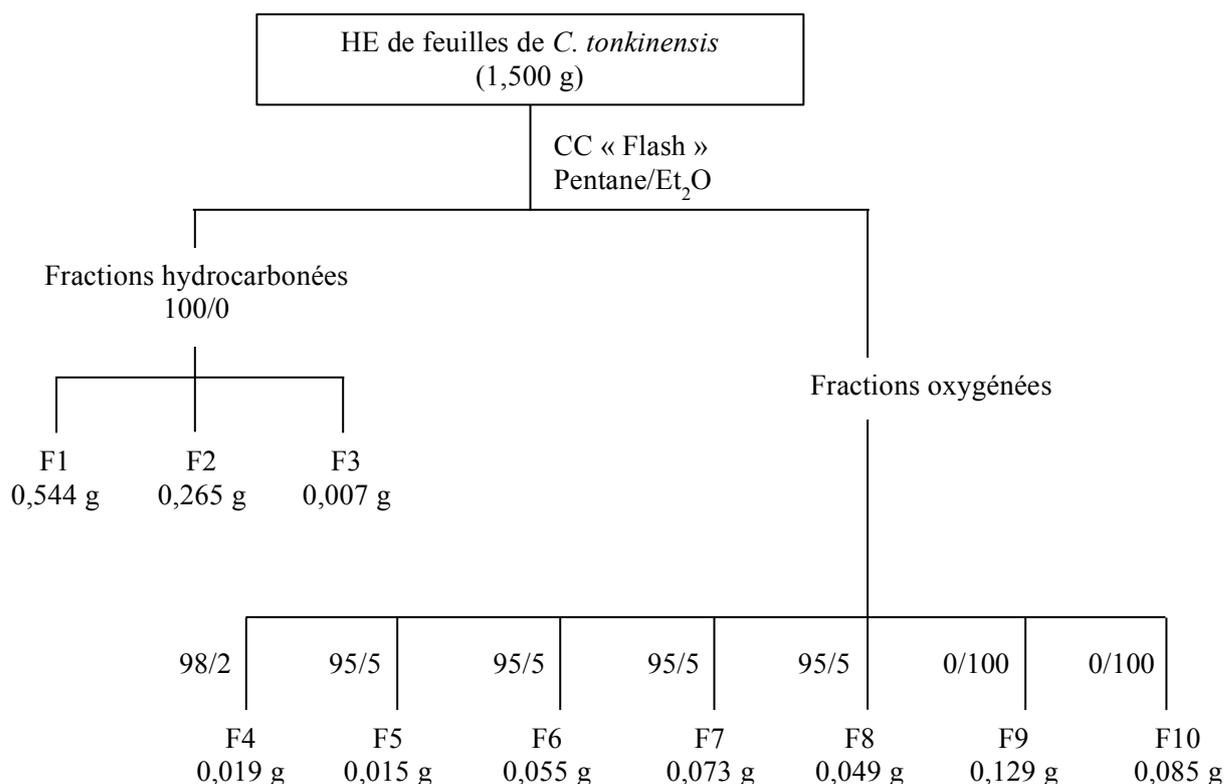
Afin de confirmer la présence de plusieurs composés minoritaires suggérés par CPG-SM, mais avec des notes de concordances non satisfaisantes, nous avons réalisé un fractionnement de cette huile essentielle de feuilles de *C. tonkinensis* et soumis les nouvelles fractions à une analyse par RMN ¹³C.

II.2. Fractionnement de l'huile essentielle de feuilles

Nous avons soumis 1,500 g de cet échantillon à un fractionnement par chromatographie sur gel de silice de type « flash » (250-500 μ m). Dix fractions ont été éluées avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle croissant (100/0 – 0/100). Les différentes étapes du fractionnement sont détaillées dans la **Figure II.11**.

II.2.1. Etude des fractions hydrocarbonées

Aucun composé supplémentaire n'a été identifié lors de l'analyse des trois fractions hydrocarbonées F1, F2 et F3 par CPG(Ir) et RMN ¹³C. Seule la présence de trois composés minoritaires et identifiés uniquement par CPG-SM dans l'huile essentielle totale a été confirmée : le *p*-cymène (2,8 %, F2), l' α -humulène (1,2 %, F2) et l'abiétatriène (5,9 %, F3) (**Annexe A**).

Figure II.11 : Fractionnement de l'huile essentielle de feuilles de *Cupressus tonkinensis*.

1.1.2. Etude des fractions oxygénées

L'analyse par RMN ^{13}C et CPG(Ir) des fractions oxygénées F4 à F10 a permis de confirmer la présence de 8 composés (identifiés uniquement par CPG-SM dans l'huile essentielle totale) : le *trans*-hydrate de sabinène (4,2 %, F9), le *cis*-hydrate de sabinène (3,5 %, F10), le camphre (1,6 %, F5), l'acétate de bornyle (5,5 %, F4), l'acétate d' α -terpinyle (29,4 %, F4), l'isovalérate de bornyle (3,3 %, F4), l'oxyde de caryophyllène (8,2 %, F5) et le cédrol (3,6 %, F8) (**Annexe A**). Sept composés supplémentaires ont également été identifiés par interrogation directe de la bibliothèque de spectres « Terpènes ». Quatre d'entre eux sont présents à l'état de traces dans l'huile essentielle globale (*cis* et *trans*-pipéritol, acétate de fenchyle, 4-méthoxysafrole), les 3 autres étant légèrement plus abondants : hydrate de camphène (OH *exo*) (0,2 %), oxyde de manoyle (0,1 %) et *trans*-totarol (0,2 %).

Ainsi, la combinaison de différentes techniques (CC, CPG(Ir), CPG-SM et RMN ^{13}C) a permis l'identification de 47 composés représentant 95,7 % de la composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de *Cupressus tonkinensis* : 28 monoterpènes, 14 sesquiterpènes et 5 diterpènes (**Tableau II.8**).

Tableau II.8 : Composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de *C. tonkinensis*.

Composés	Ir ^a	Ir ^p	HE %	Identification
Tricyclène	921	1027	0,1	Ir, SM
α -Thujène	924	1027	3,3	Ir, SM, RMN ¹³ C [†]
α -Pinène	932	1027	25,7	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Fenchène	943	1062	0,1	Ir, SM
Camphène	945	1071	0,2	Ir, SM
Sabinène	967	1126	23,3	Ir, SM, RMN ¹³ C
β -Pinène	972	1114	0,8	Ir, SM, RMN ¹³ C
Myrcène	981	1163	4,9	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Phellandrène	998	1168	0,1	Ir, SM
δ -3-Carène	1006	1151	tr	Ir, SM
α -Terpinène	1010	1183	3,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
<i>p</i> -Cymène	1012	1273	0,3	Ir, SM, RMN ¹³ C (F2)
Limonène*	1022	1203	1,7	Ir, SM, RMN ¹³ C
β -Phellandrène*	1022	1212	0,3	Ir, SM, RMN ¹³ C
(<i>E</i>)- β -Ocimène	1037	1251	0,1	Ir, SM
γ -Terpinène	1049	1248	4,9	Ir, SM, RMN ¹³ C
<i>trans</i> -Hydrate de sabinène	1053	1460	0,4	Ir, SM, RMN ¹³ C (F9)
Terpinolène	1079	1285	2,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
<i>cis</i> -Hydrate de sabinène	1083	1543	0,4	Ir, SM, RMN ¹³ C (F10)
Camphre	1121	1515	tr	Ir, SM, RMN ¹³ C (F5)
Hydrate de camphène (OH <i>exo</i>)	1133	1592	0,2	Ir, RMN ¹³ C (F8)
Terpinèn-4-ol	1163	1599	12,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Terpinéol	1172	1691	0,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
<i>cis</i> -Pipéritol	1180	1675	tr	Ir, RMN ¹³ C (F8)
<i>trans</i> -Pipéritol	1190	1740	tr	Ir, RMN ¹³ C (F9)
Acétate de fenchyle	1207	1468	tr	Ir, RMN ¹³ C (F4)
Acétate de bornyle	1269	1578	tr	Ir, SM, RMN ¹³ C (F4)
Acétate d' α -terpinyle	1332	1693	0,2	Ir, SM, RMN ¹³ C (F4)
(<i>E</i>)- β -Caryophyllène	1417	1596	0,9	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Humulène	1450	1667	0,3	Ir, SM, RMN ¹³ C (F2)
4-Méthoxysafrole	1464	2174	tr	Ir, RMN ¹³ C (F4)
Germacrène D	1476	1706	1,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
γ -Humulène	1481	1716	tr	Ir, SM
2-Méthylbutyrate de bornyle	1491	1719	0,1	Ir, SM
Isovalérate de bornyle	1502	1752	tr	Ir, SM, RMN ¹³ C (F4)
δ -Cadinène	1514	1755	0,2	Ir, SM
β -Elémol	1534	2072	3,8	Ir, RMN ¹³ C
Oxyde de caryophyllène	1569	1975	0,2	Ir, SM, RMN ¹³ C (F5)
Cédrol	1589	2111	0,1	Ir, SM, RMN ¹³ C (F8)
γ -Eudesmol	1617	2175	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
β -Eudesmol	1634	2241	0,8	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Eudesmol	1640	2232	0,7	Ir, RMN ¹³ C
Oxyde de manoyle	1983	2348	0,1	Ir, RMN ¹³ C (F4)
Abiétatriène (déhydroabiétane)	2034	2487	0,2	Ir, SM, RMN ¹³ C (F3)
Abiéta-7,13-diène	2072	2451	0,7	Ir, SM, RMN ¹³ C
Isoabiéanol	2085	2660	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
<i>trans</i> -Totarol	2263	nd	0,2	Ir, RMN ¹³ C (F5)
Total			95,7	

L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés suivis d'un astérisque (colonne polaire). Ir^a et Ir^p : indices de rétention mesurés respectivement sur colonnes apolaire (BP-1) et polaire (BP-20). [†] Identification par RMN ¹³C : composés identifiés dans l'HE et les fractions de chromatographie ; italique = composés identifiés dans les fractions de chromatographie. tr : traces (<0,05 %) ; nd = non déterminé, non élué dans les conditions standards de CPG.

III. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de tiges.

L'huile essentielle a été obtenue par hydrodistillation des tiges de *Cupressus tonkinensis* (récoltées en mars 2009, Réserve Naturelle de Huu Lien) dans un appareil de type Clevenger durant 3 heures, avec un très faible rendement de 0,05 % (m/m).

L'échantillon obtenu a été analysé par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ¹³C. La présence du β-élémol (0,3 %), non identifié par CPG-SM, a été déterminée par comparaison de ses indices de rétention avec ceux du même composé déjà identifié par RMN ¹³C dans l'huile essentielle de feuilles (cf. paragraphe II). Au total, 46 composés représentant 89,1 % de la composition chimique totale ont été identifiés : 27 monoterpènes, 14 sesquiterpènes et 5 diterpènes (**Tableau II.9**). Tout comme pour l'huile essentielle de feuilles, le groupe des monoterpènes hydrocarbonés est prépondérant (71,3 %). L'α-pinène est très nettement majoritaire avec une teneur de 48,3 %, suivi du myrcène (11,6 %), tandis que la teneur en sabinène est très faible (0,6 % contre 23,3 % dans l'huile essentielle de feuilles). Le cédrol est le principal sesquiterpène oxygéné, présent à 8,7 % (ultra minoritaire dans l'huile essentielle de feuilles). Les sesquiterpènes oléfiniques sont peu abondants et seul le thujopsène est présent à une teneur dépassant 0,6 % (1,3 %).

Ainsi, nous constatons que la composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de *C. tonkinensis* que nous décrivons est similaire à celle décrite par Thai *et al.* (2009) mais également à celle de l'huile essentielle de bois décrite plus récemment par Dai *et al.* (2013). Toutes ces huiles essentielles, originaires du Vietnam, sont caractérisées par la présence majoritaire de trois monoterpènes : l'α-pinène, le sabinène et le terpinèn-4-ol. Par ailleurs, le β-élémol est le seul sesquiterpène identifié à environ 4 % dans notre échantillon d'huile essentielle de feuilles, ainsi que dans l'huile essentielle de bois de la littérature (Dai *et al.*, 2013). En revanche, notre huile essentielle de tiges se distingue nettement par sa teneur plus élevée en α-pinène, myrcène et cédrol.

Tableau II.9 : Composition chimique de l'huile essentielle de tiges de *C. tonkinensis*.

Composés	Ir ^a	Ir ^p	HE %	Identification
Tricyclène	921	1027	0,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Thujène	924	1027	0,3	Ir, SM
α -Pinène	932	1027	48,3	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Fenchène	943	1062	0,1	Ir, SM
Camphène	945	1071	1,8	Ir, SM, RMN ¹³ C
Sabinène	967	1126	0,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
β -Pinène	972	1114	1,8	Ir, SM, RMN ¹³ C
Myrcène	981	1163	11,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Phellandrène	998	1168	0,1	Ir, SM
δ -3-Carène	1006	1151	1,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Terpinène	1010	1183	0,2	Ir, SM
<i>p</i> -Cymène	1012	1273	0,1	Ir, SM
Limonène*	1022	1203	1,9	Ir, SM, RMN ¹³ C
β -Phellandrène*	1022	1212	1,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
(<i>E</i>)- β -Ocimène	1037	1251	0,1	Ir, SM
γ -Terpinène	1049	1248	0,3	Ir, SM
<i>trans</i> -Hydrate de sabinène	1053	1460	tr	Ir, SM
Terpinolène	1079	1285	1,3	Ir, SM, RMN ¹³ C
<i>cis</i> -Hydrate de sabinène	1083	1543	0,1	Ir, SM
Camphre	1121	1515	0,2	Ir, SM
Hydrate de camphène (OH <i>exo</i>)	1133	1592	1,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
Terpinèn-4-ol	1163	1599	0,7	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Terpinéol	1172	1691	0,1	Ir, SM
<i>cis</i> -Pipéritol	1180	1675	0,1	Ir, SM
Acétate de fenchyle	1207	1468	tr	Ir, SM
Acétate de bornyle	1269	1578	tr	Ir, SM
Acétate d' α -terpinyle	1332	1693	tr	Ir, SM
(<i>E</i>)- β -Caryophyllène	1417	1596	0,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
Thujopsène	1429	1620	1,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Humulène	1450	1667	0,6	Ir, SM
Germacrène-D	1476	1706	0,1	Ir, SM
γ -Humulène	1481	1716	0,2	Ir, SM
2-Méthylbutyrate de bornyle	1491	1719	0,1	Ir, SM
Isovalérate de bornyle	1502	1752	2,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
δ -Cadinène	1514	1755	0,3	Ir, SM
β -Elémol	1534	2072	0,4	Ir, RMN ¹³ C
Oxyde de caryophyllène	1569	1975	0,1	Ir, SM
Cédrol	1589	2111	8,7	Ir, SM, RMN ¹³ C
γ -Eudesmol	1617	2175	0,1	Ir, SM
β -Eudesmol	1634	2241	0,2	Ir, SM
α -Eudesmol	1640	2232	0,1	Ir, SM
Oxyde de manoyle	1983	2348	tr	Ir, SM
Abiétatriène (déhydroabiétane)	2034	2487	0,3	Ir, SM
Abiéta-7,13-diène	2072	2451	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
Isoabiéanol	2085	2660	0,1	Ir, SM
<i>trans</i> -Totarol	2263	nd	tr	Ir, SM
Total			89,1	

L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés suivis d'un astérisque (colonne polaire). Ir^a et Ir^p : indices de rétention mesurés respectivement sur colonnes apolaire (BP-1) et polaire (BP-20).

Cette étude semble également corroborer la distinction aujourd'hui faite entre les deux espèces *C. tonkinensis* et *C. torulosa*, confondues entre elles pendant de nombreuses années. En effet, la composition chimique de notre huile essentielle de feuilles de *C. tonkinensis* originaire du Vietnam diffère d'une part, de celle de l'huile essentielle de feuilles de *C. torulosa* var. *cashmeriana* originaire de Chine décrite par Cool *et al.* (1998) et d'autre part, de celles de trois échantillons d'huile essentielle de feuilles de *C. torulosa* originaires de trois régions d'Inde décrites par Padalia *et al.* (2013). En effet, la première est caractérisée par la présence majoritaire de deux monoterpènes hydrocarbonés, l' α -pinène (14,1 %) et le δ -3-carène (9,6 %), suivis de nombreux sesquiterpènes. Les dernières contiennent l' α -pinène (34,26 ; 32,00 et 30,30 %) comme composé majoritaire commun, ainsi que trois autres monoterpènes hydrocarbonés selon l'échantillon (δ -3-carène, 18,67 % ou sabinène, 19,23 % ou limonène, 23,79 %, respectivement). De plus, la teneur du terpinèn-4-ol, identifié à 12,6 % dans notre échantillon, n'excède jamais 4 % dans les échantillons de la littérature. Nous notons cependant une exception qui concerne un échantillon d'huile essentielle de feuilles de *C. torulosa* d'Argentine dont la composition chimique, décrite par Malizia *et al.* (2000) est très proche de nos résultats. Enfin, concernant notre échantillon d'huile essentielle isolée à partir des tiges de *C. tonkinensis* (Vietnam), celui-ci se distingue très nettement de l'huile essentielle de rameaux mâles et de l'huile essentielle de rameaux femelles de *C. torulosa* (Inde) décrites par Padalia *et al.* (2013) par sa forte teneur en α -pinène (48,3 %), en myrcène (11,6 %) mais aussi en cédrol (8,7 %). Les deux échantillons d'huile essentielle de rameaux renferment notamment un monoterpène oxygéné, l'umbellulone (16,76 et 21,62 %, respectivement), absent dans notre échantillon.

E. Extraction des données de RMN ^{13}C : application à l'identification des constituants de l'huile essentielle de *Xanthocyparis vietnamensis* Farjon et Hiep.

I. Etude bibliographique

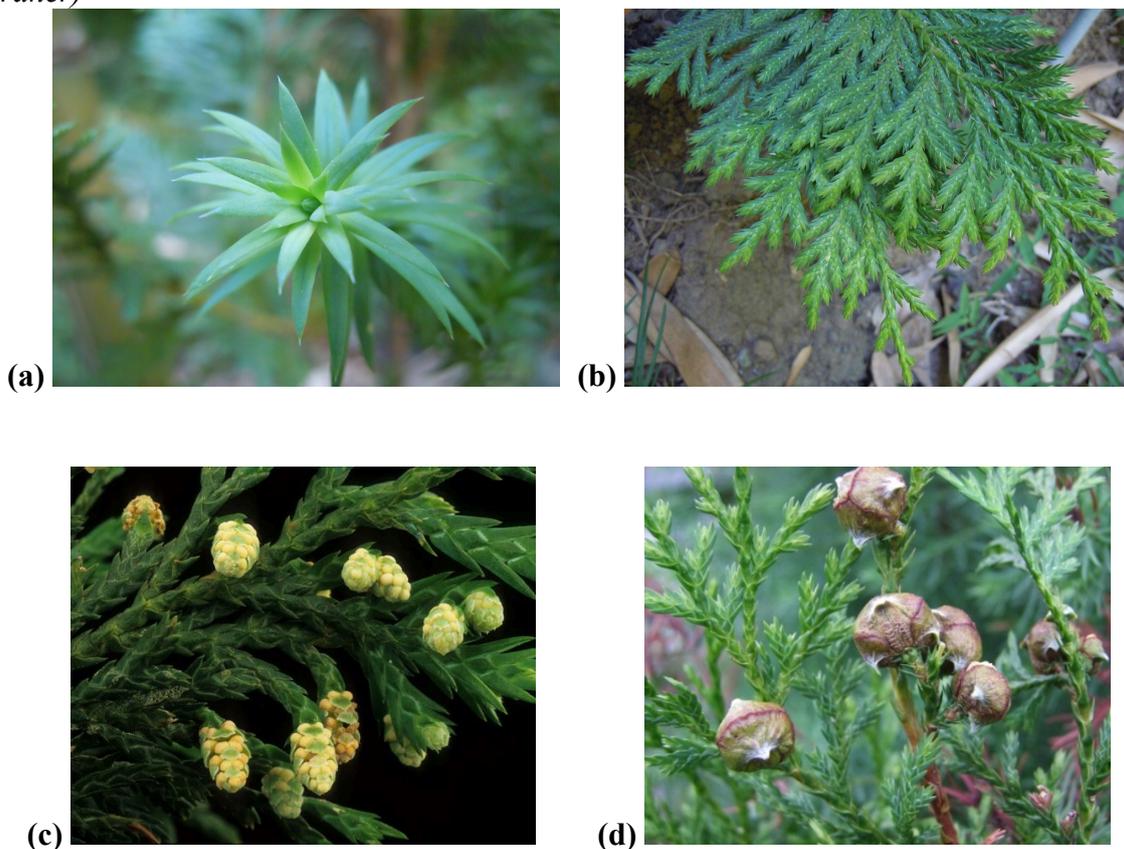
Xanthocyparis vietnamensis Farjon et Hiep est une espèce appartenant à la famille des Cupressacées. Egalement connu sous le nom de Cyprès doré vietnamien (du grec : xantho = jaune et cyparis = cyprès), ce conifère a été découvert en octobre 1999 par le botaniste Nguyen Thien Hiep, dans les montagnes calcaires du nord du Vietnam (Quản Bả, province de Hà Giang), près de la frontière avec la Chine (Farjon, 2002a).

La découverte de cette nouvelle espèce a conduit à l'identification d'un nouveau genre de conifère en 2002, le genre *Xanthocyparis* (Farjon, 2002b). D'un point de vue taxonomique, l'analyse de 54 caractères morphologiques a montré la proximité de *X. vietnamensis* avec *Chamaecyparis nootkatensis* (D. Don) Spach, ce qui a conduit Farjon (2002a, 2002b) à transférer cette dernière espèce dans le genre *Xanthocyparis* pour devenir *Xanthocyparis nootkatensis* (D. Don) Farjon et Harder. Ainsi, *Chamaecyparis nootkatensis* a successivement été rattachée à 4 genres différents : *Cupressus* (1824), *Chamaecyparis* (1842), *Callitropsis* (1864) et *Xanthocyparis* (2002) (Little *et al.*, 2004). *X. vietnamensis* et *X. nootkatensis* étant alors classés au sein du même genre, Little *et al.* proposent en 2004 de revenir à l'appellation d'origine *Callitropsis*, nom correct selon le Code International de Nomenclature Botanique. *Xanthocyparis vietnamensis* et *X. nootkatensis* deviennent alors temporairement *Callitropsis vietnamensis* et *C. nootkatensis*. Ce n'est qu'en 2006 que Mill et Farjon proposent de conserver finalement le nom *Xanthocyparis* et cette proposition est ensuite acceptée lors de la conférence de l'Association Internationale pour la Taxonomie des Plantes à Melbourne en juillet 2011 (Russell, 2012).

Concernant sa morphologie, *Xanthocyparis vietnamensis* est un arbre pouvant atteindre 10-15 m de hauteur, avec un tronc d'au moins 50 cm de diamètre au stade adulte. Son écorce brun rougeâtre ou brun pourpré est fine, lisse puis fibreuse et laminée. Il possède des cônes mâles et des cônes femelles (jusqu'à 3 groupés) terminaux atteignant leur maturité en 2 ans (**Figure II.12**) (Farjon, 2002b). La particularité morphologique de cet arbre est de posséder au stade adulte, deux types de feuillage sur ses branches : des aiguilles (feuillage juvénile semblable à celui des espèces du genre *Cunninghamia*) et des écailles (feuillage mature)

(Regalado *et al.*, 2006). Cette caractéristique est assez rare dans la famille des Cupressacées, même si on la retrouve chez *Juniperus chinensis* par exemple (Little *et al.*, 2004). Son bois, très odorant et de très bonne qualité, est très prisé et est utilisé dans l'artisanat local (construction de maisons et meubles) et comme bois de chauffage (Farjon, 2002b). La surexploitation de cet arbre est problématique car l'aire de répartition de *X. vietnamensis* est limitée et de ce fait, peu d'individus atteignent le stade adulte. Si dans un premier temps, cette espèce n'avait été identifiée que dans la région montagneuse de Bat Dai Son (province de Hà Giang), d'autres localités sont aujourd'hui recensées au Vietnam (Bắc Mê, Cao Bằng, Tuyên Quang et les districts de Đổng Văn et Mèo Vạc) et très ponctuellement en Chine (Réserve naturelle de Mulun à Guangxi, un seul arbre). Sa population reste néanmoins faible, elle est en effet estimée entre 500 et 1000 individus, majoritairement situés dans la région de Bát Đại Sơn (Vietnam). *Xanthocyparis vietnamensis* est ainsi classée parmi les espèces en danger d'extinction (IUCN 2012).

Figure II.12 : (a) Feuillage juvénile de *X. vietnamensis* (b) Feuillage mature (Source : flickr.com, photo : ©Tim Waters) (b) Cônes mâles (Source : threatenedconifers.rbge.org.uk, photo : ©D. White) (c) Cônes femelles (Source : threatenedconifers.rbge.org.uk, photo : ©M. Gardner)



Aujourd'hui, *X. vietnamensis* fait l'objet d'un plan d'action pour la conservation de l'espèce, mené par le Centre pour la Conservation et le Développement Durable et l'Institut d'Ecologie et de Ressources Biologiques de l'Académie des Sciences du Vietnam et de la Technologie à Hanoi. Des boutures et des plants sont réalisés et cultivés au sein de la réserve naturelle de Bat Dai puis réintroduits par la population locale dans les zones calcaires dégradées où l'espèce peut avoir existé dans le passé (**Figure II.13**). Un programme de conservation ex-situ est également développé dans les districts de Dong Van et Meo Vac (Vietnam) où l'espèce a très récemment été découverte. D'autre part, *Xanthocyparis vietnamensis* fait aujourd'hui partie du groupe prioritaire de la Liste Nationale de faune et de flore rares et précieuses, un décret gouvernemental qui fournit une protection juridique complète et interdit strictement l'exploitation et l'utilisation à des fins commerciales.

Figure II.13 : Plan d'action pour la conservation de *Xanthocyparis vietnamensis* au Vietnam (Source : www.mobot.org/plantscience/ccsd/programs/cb/cbcloc/vietnam.shtml)



A ce jour, seuls deux articles reportent la composition chimique de l'huile essentielle de *Xanthocyparis vietnamensis*. Adams *et al.* (2007b) ont étudié 3 échantillons obtenus par entraînement à la vapeur des feuilles fraîches de *X. vietnamensis* cultivé dans le jardin botanique royal d'Edimbourg et analysés directement par CPG-SM. Au total, de 87,7 % à

92,7 % (selon l'échantillon) de la composition chimique a été identifiée. Les familles des sesquiterpènes et diterpènes dominent cette composition avec le germacrène D (3,7-7,9 %), l'hédycaryol (1,4-34,4 %), le sandaracopimara-8(14),15-diène (0,7-8,9 %) et le phyllocladène (0,9-37,8 %) identifiés comme composés majoritaires. L' α -pinène (0,8-14,9 %) et le myrcène (0,3-7,9 %) sont les seuls monoterpènes présents à des teneurs notables. Néanmoins, un pourcentage relativement important de composés non identifiés demeure. Nous pouvons remarquer que les teneurs de ces composés majoritaires sont très variables d'un échantillon à l'autre. La deuxième étude, menée par Thai *et al.* (2007b) concerne un échantillon d'huile essentielle isolé à partir des feuilles de *X. vietnamensis* poussant spontanément au Vietnam. Son analyse par CPG-SM a permis d'identifier le germacrène D (14,6 %), l'ent-pimara-6(14)-15-diène (9,4 %), le cyclohexèn-1,5-dienthényl-3-ène (12,7 %) et l'*épi*-bicyclosesquiphellandène (6,4 %) comme composés majoritaires.

L'objectif de nos travaux était de contribuer à une meilleure connaissance des composés volatils produits par *Xanthocypris vietnamensis* en analysant un échantillon d'huile essentielle isolé à partir du bois de cette espèce. Pour cela, nous avons réalisé cette étude par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ^{13}C en appliquant l'extraction des données pour l'identification de cinq molécules cibles.

II. Analyse par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ^{13}C de l'huile essentielle brute.

L'huile essentielle étudiée (de couleur jaune-pâle) a été obtenue par hydrodistillation du bois séché à l'air libre (province de Hà Giang) dans un appareil de type Clevenger, durant 3 heures, avec un rendement de 0,20 % (v/m).

Elle a dans un premier temps été analysée par CPG(Ir) et RMN ^{13}C , ce qui a conduit à l'identification de 21 composés représentant 81,2 % de la composition chimique globale (**Tableau II.10 p.130**). Les deux composés majoritaires présentent un squelette éremophilane. Il s'agit du nootkatène (20,7 %), un sesquiterpène hydrocarboné, et de la 11,12,13-tri-nor-éremophil-1(10)-èn-7-one (17,2 %). Tous les autres composés identifiés sont présents à des teneurs comprises entre 0,5 % et 5,1 % chacun, il s'agit principalement de sesquiterpènes mais également de monoterpènes. Les composés non identifiés ont pour la plupart des teneurs inférieures à 1,0 % et ponctuellement égales à 1,2 et 2,3 %. Nous avons aussi analysé l'échantillon par CPG-SM et identifié 7 composés supplémentaires mais il s'agit de composés minoritaires ne représentant, au total, que 1,6 %.

Au total, 28 composés ont été identifiés représentant 82,8 % de la composition chimique globale de l'huile essentielle de bois de *X. vietnamensis* (**Tableau II.10 p.130**). Plus précisément, 17 d'entre eux ont été identifiés par les trois techniques utilisées (CPG(Ir), CPG-SM et RMN ^{13}C), 7 autres par CPG(Ir) et CPG-SM et enfin, 4 composés ont été uniquement identifiés par CPG(Ir) et surtout RMN ^{13}C . Il s'agit de la 13-nor-éremophil-1(10)-èn-11-one (2,6 %), du τ -cadinol (0,7 %), de l' α -cadinol (1,9 %) et de la nootkatone (4,7 %), composés pour lesquels la comparaison des données de spectrométrie de masse obtenues avec celles des bibliothèques commerciales et locales n'a pas donné de résultats concluants. En revanche, les valeurs des déplacements chimiques en RMN ^{13}C de ces composés coïncidaient parfaitement avec les données de notre bibliothèque de spectres « Terpènes ». Afin d'identifier un plus grand nombre de composés, nous avons soumis cet échantillon à un premier fractionnement sur colonne ouverte de silice de type « flash » (**Figure II.14 p.116-117**). Un second fractionnement réalisé avec une silice plus fine concerne trois des dix fractions obtenues (F2, F8 et F9) afin de concentrer des composés ciblés lors du premier fractionnement.

III. Fractionnement de l'huile essentielle de *X. vietnamensis*.

III.1. Chromatographie sur colonne ouverte de silice de type « flash ».

Nous avons soumis 2,2 g d'huile essentielle à un fractionnement sur colonne ouverte de silice de type « flash » (250-500 μm), en utilisant un gradient d'élution pentane/oxyde de diéthyle (100/0-0/100). Dix fractions ont été obtenues, une fraction hydrocarbonée (F1) et neuf fractions oxygénées (F2-F7, 95/5 ; F8-F10, 0/100). Toutes ont été analysées par CPG(Ir) et RMN ^{13}C .

L'étude de la fraction hydrocarbonée F1 a permis de confirmer la présence du sabinène, du myrcène, du limonène et du cadalène, et d'identifier deux composés supplémentaires présents dans notre bibliothèque de spectres « Terpènes ». Il s'agit de deux sesquiterpènes hydrocarbonés, l' α -sélinène et le γ -cadinène (respectivement 0,7 % et 1 % dans F1, 0,3 % chacun dans l'huile essentielle brute). Au sein de la fraction oxygénée F2, le 1,4-cinéole, précédemment identifié par CPG-SM dans l'huile essentielle brute et absent de nos bibliothèques de spectres, a été concentré à une teneur de 6 %. Ainsi, l'ensemble des signaux de ses carbones, y compris ceux des quaternaires, a pu être observé sur le spectre

RMN ^{13}C de la fraction et son identification a pu être réalisée par rapport aux données de la littérature (Asakawa *et al.*, 1988). L'acétate d' α -terpinyle a été identifié (1,3 % dans F2, 0,1 % dans l'HE) et l'identification de l'oxyde de méthylcarvacryle (1 % dans F2, 0,2 % dans l'HE) a également été confirmée par comparaison des données RMN ^{13}C avec celles compilées dans la bibliothèque de spectres conçue au laboratoire. Par ailleurs, un sesquiterpène oxygéné supplémentaire, le déhydrojinkoh-érémol (2 % dans F2, 0,2 % dans l'HE), a aussi été identifié dans cette même fraction à partir des données RMN ^{13}C de la littérature (Ishihara *et al.*, 1993). Nous décrivons l'identification détaillée du 1,4-cinéole et du déhydrojinkoh-érémol dans les paragraphes IV.1 p.113 et IV.2 p.114 (respectivement). L'étude des autres fractions F3 à F10 ne conduit à l'identification d'aucun composé supplémentaire.

Ainsi, après le premier fractionnement de l'huile essentielle brute et l'analyse des fractions obtenues par CPG(Ir) et RMN ^{13}C , nous sommes parvenus à identifier 4 composés supplémentaires, soit 32 composés au total, représentant 83,7 % de la composition chimique globale (**Tableau II.10 p.130**). Cependant l'extraction des données RMN ^{13}C de quelques fractions permet d'obtenir des séries de raies de résonance de composés non identifiés, qui présentent des teneurs de l'ordre de 1 % dans l'HE (ponctuellement jusqu'à 2,3 %) et que nous avons choisi de concentrer par de nouveaux fractionnements. Ces fractionnements avec de la silice fine (60-200 μm) ont concerné les fractions (F2, F8 et F9).

III.2. Fractionnements sur colonne ouverte de silice (F2, F8 et F9)

La fraction F2 (120 mg) a de nouveau été chromatographiée sur colonne ouverte de silice plus fine (60-200 μm). Six fractions (F2-1 à F2-6) ont été éluées avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle de polarité croissante (98/2 ; 0/100). Toutes ont été analysées par CPG(Ir) et RMN ^{13}C . L'objectif de ce nouveau fractionnement était de concentrer deux composés présents à des teneurs non négligeables dans l'huile essentielle. Si le premier composé dont nous supposons qu'il s'agissait d'un monoterpène oxygéné, ($\text{Ir}^{\text{a}}=1056$, $\text{Ir}^{\text{p}}=1322$) n'a pu être suffisamment concentré pour être analysé, le second, noté **A** a été identifié. Ce composé représente 8,5 % de la fraction F2 (0,9 % de l'huile essentielle) et possède un couple d'indices de rétention ($\text{Ir}^{\text{a}}=1555$, $\text{Ir}^{\text{p}}=2040$) en accord avec un sesquiterpène oxygéné. Il a été concentré à 40,4 % dans la fraction F2-2 (gradient pentane/oxyde de diéthyle, 98/2), où il est le composé majoritaire, suivi de la

13-nor-érérophil-1(10)-èn-11-one (11,6 %). Le composé **A** n'était pas présent dans les bibliothèques de spectres « Terpènes » et « Littérature » du laboratoire, mais nous sommes parvenus à l'identifier par RMN comme étant une molécule avec une structure nor-sesquiterpénique possédant le squelette eudesmane. Nous décrivons son identification plus en détail dans le paragraphe IV.3 p.114.

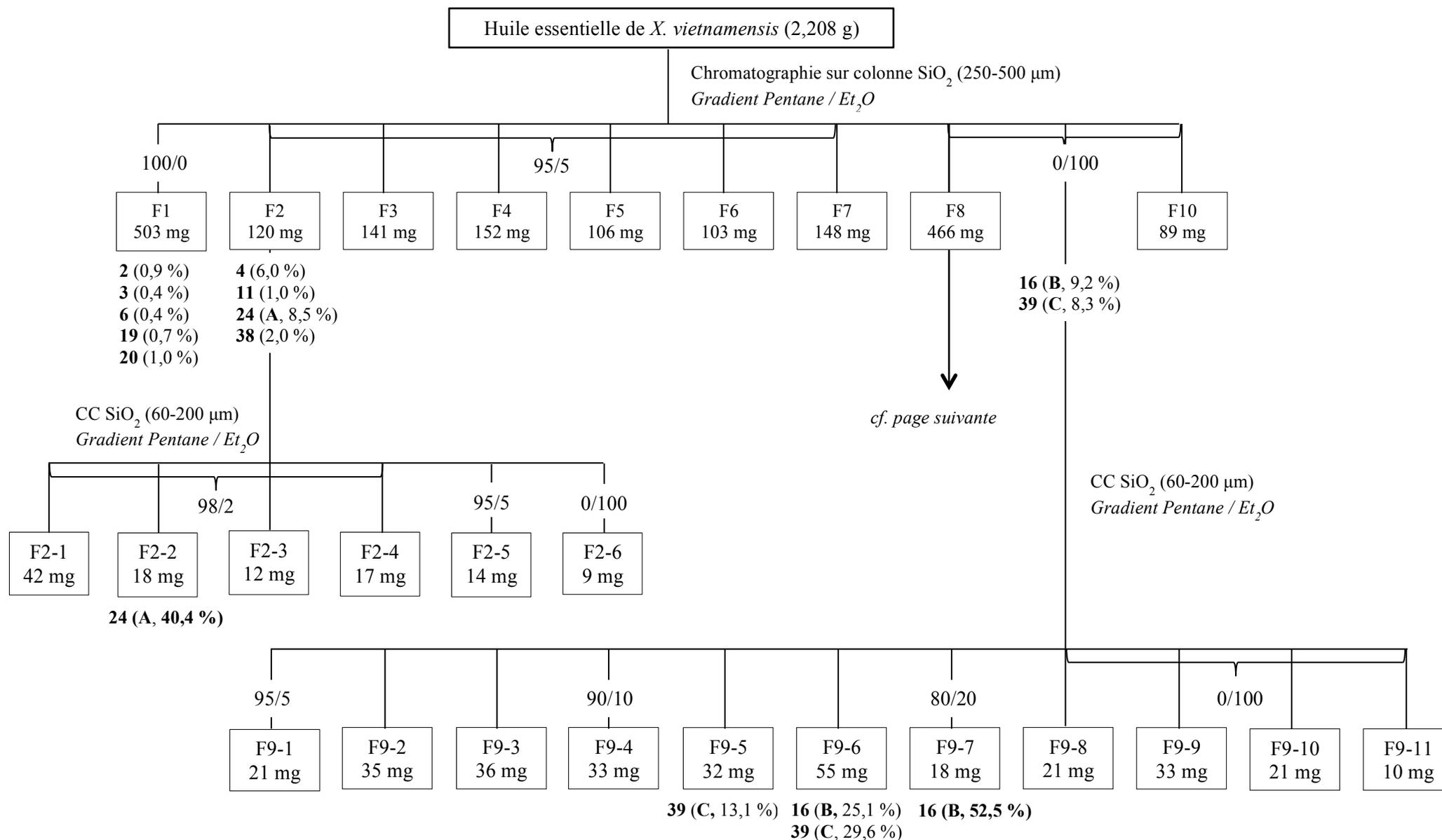
Suivant la même méthode, la fraction F9 (345 mg) a été chromatographiée et onze fractions (F0-1 à F9-11) ont été éluées avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle de polarité croissante (95/5-0/100). Toutes ont été analysées par CPG(Ir) et RMN ¹³C. Notre objectif était de concentrer deux produits, notés **B** et **C**, représentant respectivement 9,2 % (0,4 % dans l'huile essentielle), et 8,3 % (1,1 % dans l'HE) de la fraction F9. D'après leurs indices de rétention sur colonnes apolaire et polaire, le composé **B** (Ira=1457, Irp=2173) et le composé **C** (Ira=1742, Irp=2446) sont vraisemblablement des sesquiterpènes oxygénés. Le composé **C** a été concentré à 29,6 % dans la fraction F9-6. Ce composé est absent des bibliothèques de spectres de RMN « Terpènes » et « Littérature » du laboratoire. En conséquence, son identification nécessite la mise en œuvre de la RMN bidimensionnelle. Néanmoins, celle-ci s'avère délicate car le composé **C** n'est pas l'unique composé abondant dans cette fraction. D'autres composés non identifiés sont également présents à des teneurs supérieures à 7 % et avoisinant parfois même 20 %, ce qui rend difficile l'interprétation des spectres de RMN bidimensionnelle. Aussi, nous avons préféré réaliser l'identification du composé à partir du fractionnement de la fraction F8. En revanche, le composé **B** a été concentré à 52,5 % dans la fraction F9-7 (gradient pentane/oxyde de diéthyle, 80/20), au sein de laquelle il constitue le composé majoritaire. Absent de nos bibliothèques de spectres « Terpènes » et « Littérature », nous décrivons son identification par RMN dans le paragraphe IV.4 p.119.

Enfin, la fraction F8 (465 mg) a également été soumise à une chromatographie sur colonne ouverte de silice fine (60-200 µm). Dix-huit fractions (F8-1 à F8-18) ont ainsi été éluées avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle de polarité croissante (95/5-0/100). L'objectif de ce fractionnement était de concentrer davantage le composé **C**. L'étude de l'ensemble des fractions obtenues par CPG(Ir) et RMN ¹³C a permis l'identification de six composés supplémentaires. Parmi ces composés, cinq ont été identifiés par consultation directe de la bibliothèque de spectres «Terpènes». Il s'agit de l'érérophil-9(10)-èn-11-ol (F8-2, 95/5), de l'érémoligénol (F8-2, 95/5), du δ-cadinol (F8-10, 90/10), du valérianol (F8-4, 90/10) et du sélina-11-en-4α-ol (F8-4, 90/10). Le sixième composé, noté **C** (F8-15, 90/10,

60,1 %), était absent de notre bibliothèque de spectres « Terpènes ». Nous décrivons son identification dans le paragraphe IV.5 p.121.

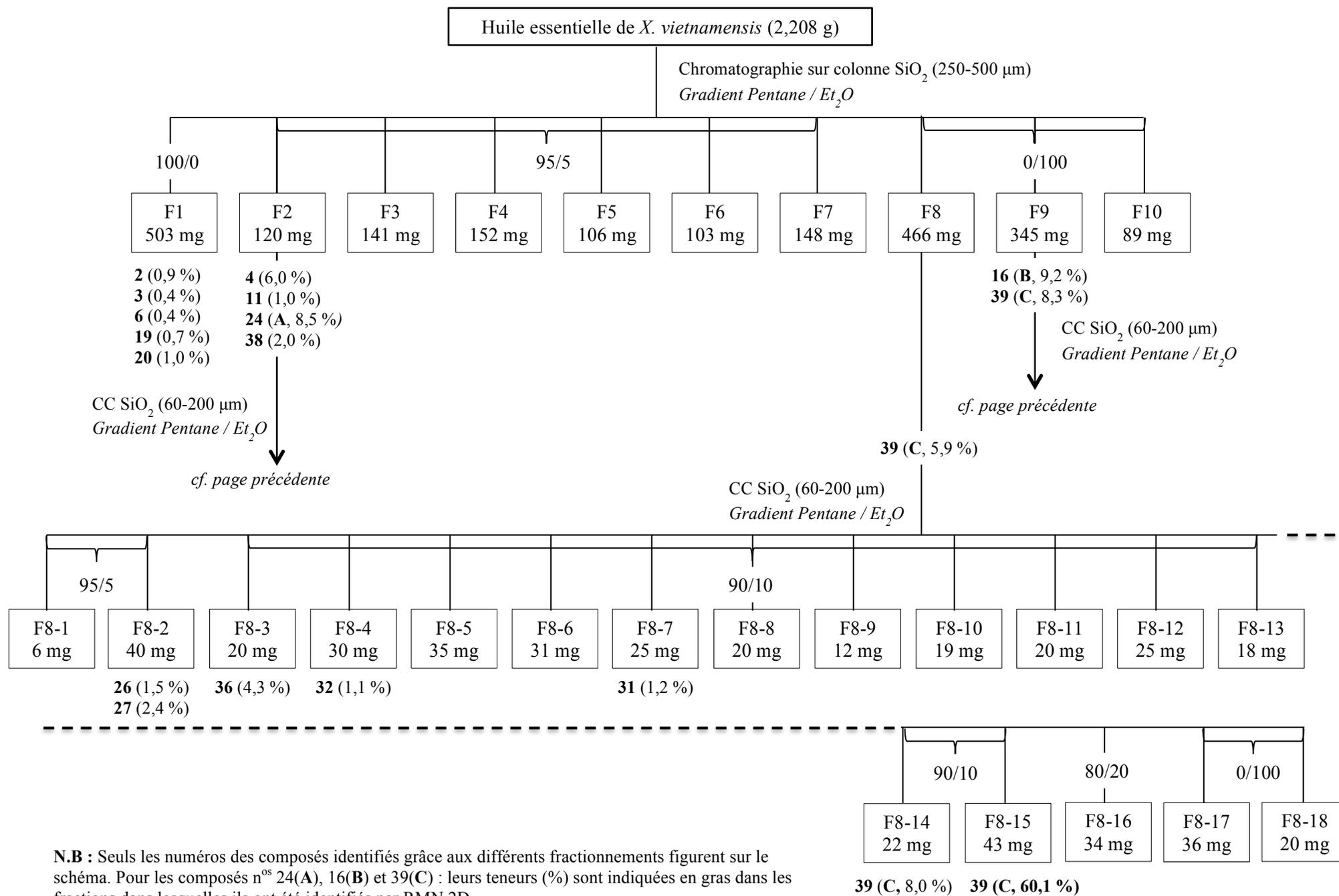
L'ensemble des fractionnements réalisés sur notre échantillon d'huile essentielle de bois de *Xanthocyparis vietnamensis* nous a permis d'identifier 40 composés représentant 87,9 % de la composition chimique globale. (**Tableau II.10 p.130**)

Figure II.14 : Fractionnement de l'huile essentielle de *Xanthocyparis vietnamensis*.



N.B : Seuls les numéros des composés identifiés grâce aux différents fractionnements figurent sur le schéma. Pour les composés n^{os} 24(A), 16(B) et 39(C) : leurs teneurs (%) sont indiquées en gras dans les fractions dans lesquelles ils ont été identifiés par RMN 2D.

Figure II.14 (suite) : Fractionnement de l'huile essentielle de *Xanthocyparis vietnamensis*.



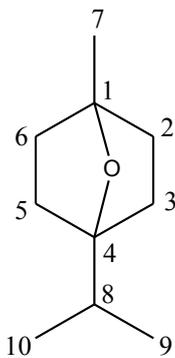
IV. Identification de composés absents de la banque « Terpènes ».

Dans ce paragraphe, nous décrivons l'identification de molécules absentes de notre bibliothèque de spectres « Terpènes ». Les valeurs de déplacements chimiques utilisées sont celles présentes sur les spectres de RMN ^{13}C des fractions dans lesquelles les composés sont le plus concentrés.

IV.1. Identification du 1,4-cinéole

La présence du 1,4-cinéole dans l'huile essentielle brute de *X. vietnamensis* (0,6 %) a dans un premier temps été proposée par CPG-SM. Cette faible teneur ne nous permettait pas de distinguer l'ensemble de ses signaux de RMN ^{13}C , notamment les carbones quaternaires. Néanmoins, ce composé a été concentré à 6,0 % dans la fraction de chromatographie F2 et les déplacements chimiques des dix carbones de ce composé ont ainsi pu être relevés sur le spectre RMN ^{13}C de cette fraction. Ils correspondent parfaitement à ceux décrits dans la littérature par Asakawa *et al.* (1988) (**Tableau II.11**). L'indice de rétention sur colonne apolaire de ce monoterpène oxygéné ($\text{Ir}^a = 1003$) est tout à fait en accord avec celui cité par Goodner ($\text{Ir}^a = 1001$) (Goodner, 2008). L'identification de ce composé a ainsi été confirmée par RMN ^{13}C , contribuant à l'enrichissement de notre banque de données spectrales « Terpènes ».

Tableau II.11 : Structure et déplacements chimiques du 1,4-cinéole.

1,4-cinéole	C	δC (ppm) Asakawa <i>et al.</i> , 1988	δC (ppm)
		1	82,9
2		37,4	37,27
3		33,2	33,08
4		89,6	89,78
5		33,2	33,08
6		37,4	37,27
7		21,3	21,25
8		33,1	32,95
9		18,2	18,19
10		18,2	18,19

IV.2. Identification du déhydrojinkoh-éremol

Les déplacements chimiques de tous les carbones du déhydrojinkoh-éremol, alcool sesquiterpénique au squelette de type valencane, ont pu être aisément repérés sur le spectre RMN ^{13}C de la fraction F2, dans laquelle celui-ci est présent à 2,0 %, et correspondent parfaitement avec ceux décrits dans la littérature par Ishihara *et al.*, 1993 (**Tableau II.12**). La valeur de l'indice de rétention de ce composé sur la colonne apolaire ($\text{I}^{\text{r}}=1671$) concorde avec celle décrite par Tajuddin *et al.* (2010) ($\text{I}^{\text{r}}=1673$).

Tableau II.12 : Structure et déplacements chimiques du déhydrojinkoh-éremol.

Déhydrojinkoh-éremol	C	δC (ppm) Ishihara <i>et al.</i> , 1993	δC (ppm)
	1	128,5	128,68
	2	125,8	125,76
	3	32,3	32,35
	4	39,0	38,90
	5	36,1	36,22
	6	35,8	35,94
	7	40,7	40,93
	8	27,2	27,31
	9	122,6	122,68
	10	142,1	142,05
	11	72,7	72,68
	12	26,3	26,38
	13	27,6	27,60
	14	17,2	17,31
	15	14,8	14,75

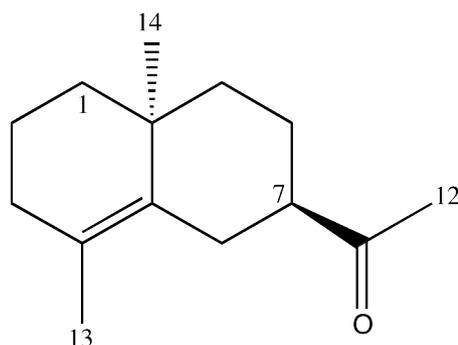
IV.3. Identification du composé A.

Le composé majoritaire de la fraction F2-2 (40,4 % ; $\text{I}^{\text{r}}/\text{I}^{\text{p}} = 1556/2041$), noté **A**, est absent de nos bibliothèques de spectres « Terpènes » et « Littérature ». Sur le spectre RMN ^{13}C de cette fraction, nous relevons 14 raies de résonance appartenant à la molécule recherchée. La séquence DEPT nous a permis de distinguer :

- i) 4 atomes de carbone quaternaire dont 1 carbonyle ($\delta = 211,19$ ppm), 2 éthyléniques ($\delta = 131,73$ et $126,29$ ppm) et 1 aliphatique ($\delta = 34,57$ ppm) ;
- ii) 1 méthine aliphatique ($\delta = 49,02$ ppm) ;
- iii) 6 méthylènes aliphatiques ($\delta = 39,99$; $38,29$; $32,96$; $25,89$; $22,70$ et $18,88$ ppm) ;
- iv) 3 méthyles ($\delta = 28,06$; $24,56$ et $19,55$ ppm).

A partir de ces informations, nous avançons la formule brute $C_{14}H_{22}O$. Nous déduisons alors la présence de 4 centres d'insaturation, parmi lesquels une cétone ($\delta = 211,19$ ppm) et une double liaison carbone-carbone ($\delta = 131,73$ et $126,29$ ppm). Les deux autres centres d'insaturation correspondent donc à deux cycles. L'interrogation de la bibliothèque de spectres « Terpènes » nous oriente vers une molécule à squelette eudesmane. L'ensemble de ces informations nous permet alors d'orienter nos recherches vers une cétone nor-sesquiterpénique bicyclique insaturée.

La mise en œuvre des séquences de RMN 2D (HSQC, HMBC, COSY et NOESY) a permis de confirmer la structure de type eudesmane, en particulier par l'observation des corrélations 1H - ^{13}C sur les spectres HSQC, HMBC. Ainsi, bien que le spectre 1H de la fraction F2-2 soit complexe, le spectre HSQC a permis d'identifier les protons appartenant au composé A (**Tableau II.13**). Par ces informations, nous avons notamment pu déduire que la fonction cétone appartenait à un groupement acétyle ($\delta C_{11}=211,19$ ppm ; $\delta C_{12}=28,06$ ppm, $\delta H_{12(s)}=2,14$ ppm) lié à un motif diméthylbicyclo[4.4.0]décane. D'autre part, les corrélations longues distances reportées dans le **Tableau II.13** nous ont conduit à reconstituer la structure de A. En effet, la connexion du groupement acétyle au carbone C7 a été confirmée par la corrélation des protons H12 avec le carbone C7. De plus, la proximité des valeurs des déplacements chimiques de RMN ^{13}C du composé A avec celles du γ -eudesmol et de son épimère, le 10-*épi*- γ -eudesmol (Van Beek *et al.*, 1989 ; Itokawa *et al.*, 1985) confirment la structure proposée (**Tableau II.14 p.123**). Enfin, la stéréochimie *cis* ou *trans* du méthyle porté par le carbone C10 et du groupement acétyle porté par le carbone C7 n'a pu être déterminée par les quelques données apportées par le spectre NOESY. Néanmoins, dans les deux cas, le groupement acétyle devrait se situer en position équatoriale (ou pseudo-équatoriale). Cela est confirmé par la multiplicité (dt) et les valeurs des constantes de couplage ($J=14,8$ et $2,2$ Hz) du proton $H_{6_{eq}}$ ($^2J_{H_{6_{eq}}-H_{6_{ax}}} = 14,8$ Hz ; $^3J_{H_6-H_7} = 2,2$ Hz et $^4J_{H_{6_{eq}}-H_{8_{eq}}} = 2,2$ Hz indique un couplage dit en « W ») et est en accord avec la corrélation entre $H_{6_{eq}}$ et H13 sur le spectre NOESY.

Tableau II.13 : Structure et données RMN ^1H et ^{13}C du composé A

C	δC (ppm)	DEPT	δH (ppm)	Multiplicité (J, Hz)	HMBC	COSY	NOESY
1	39,99	CH ₂	1,42 (a)	m	-	-	-
			1,28 (b)	m	-	-	-
2	18,88	CH ₂	1,53	m	-	-	-
3	32,96	CH ₂	1,98 (a)	m	-	-	-
			1,86 (b)	m	-	-	-
4	126,29	C	-	-	-	-	-
5	131,73	C	-	-	-	-	-
6	25,89	CH ₂	3,01 (a)	dt (14,8 ; 2,2)	C4 ; C5 ; C7 ; C8 ; C10	H12	H12 ; H13
			1,96 (b)	m	C12	-	-
7	49,02	CH	2,62	m	C5 ; C6 ; C8 ; C9	H12	H12
8	22,7	CH ₂	2,02 (a)	m	-	-	H8b
			1,84 (b)	m	C5 ; C6 ; C7 ; C9 ; C10 ; C11	H9	H8a
9	38,29	CH ₂	1,32	s	C1 ; C5 ; C7 ; C8 ; C10 ; C14	H8b	-
10	34,57	C	-	-	-	-	-
11	211,19	C	-	-	-	-	-
12	28,06	CH ₃	2,14	s	C7 ; C11	H6a ; H7	H7 ; H6a
13	19,55	CH ₃	1,67	s	C3 ; C4 ; C5 ; C14	-	H6a
14	24,56	CH ₃	1,06	s	C1 ; C5 ; C9 ; C10	-	-

Afin d'en savoir plus quant à la stéréochimie de A, nous avons procédé à la comparaison de ses déplacements chimiques RMN ^{13}C et RMN ^1H avec ceux du γ -eudesmol et du 10-*épi*- γ -eudesmol, décrits dans la littérature. Tout d'abord, concernant la RMN ^{13}C de ces composés (**Tableau II.14**), nous notons dans un premier temps que la valeur du déplacement chimique du carbone C7 ne peut constituer un élément de comparaison dans la mesure où A possède un groupement acétyle lié à C7 tandis que pour le γ -eudesmol et le 10-*épi*- γ -eudesmol, c'est un groupement isopropanol qui est lié à ce même carbone. Cependant, nous observons une différence importante entre la valeur du déplacement chimique du carbone C4 (124,5 ppm) du γ -eudesmol et celle du C4 (125,7 ppm) du 10-*épi*- γ -eudesmol, cette dernière étant plus proche de celle du C4 du composé A (126,29 ppm). La stéréochimie *trans* du groupement acétyle et du méthyle C14 est corroborée par les valeurs des déplacements chimiques des carbones C1 et C9 (39,99 et 38,29 ppm) du composé A, qui sont plus proches de celles du 10-*épi*- γ -eudesmol (39,4 et 38,1 ppm) que de celles du γ -eudesmol (42,3 et 40,3 ppm). Elle est également vérifiée par l'observation du spectre de RMN ^1H du composé A, sur lequel on note que les valeurs des déplacements chimiques des protons H13 et H14 (1,67 et 1,06 ppm, respectivement) correspondent parfaitement avec celles du 10-*épi*- γ -eudesmol (1,68 et 1,09 ppm). Enfin, la multiplicité (dt) et les valeurs des constantes de couplage (14,8 et 2,2 Hz) du H6_{éq} du composé A sont en accord avec celles du 10-*épi*- γ -eudesmol (dd, 14,8 et 2,8 Hz) (**Tableau II.15 p.124**).

Une cétone, présentant la même structure que le composé A recherché et la même stéréochimie que le γ -eudesmol (**Tableau II.15 p.124**), est partiellement décrite dans la littérature par Marshall *et al.* (1966) et permet également d'établir quelques comparaisons. Dans l'article, cette molécule constitue un intermédiaire de synthèse du γ -eudesmol et les données spectrales sont limitées aux déplacements chimiques des protons des trois méthyles : 2,06 ppm, CH_3CO ; 1,61 ppm, C13- CH_3 ; 1,04 ppm, C14- CH_3 . Nous constatons que les valeurs des déplacements chimiques des protons C13- CH_3 (1,61 ppm) et C14- CH_3 (1,04 ppm) coïncident parfaitement avec celles observées sur le spectre de RMN ^1H du γ -eudesmol (1,60 et 1,01 ppm) (**Tableau II.15 p.124**). Ces éléments de comparaison peuvent ainsi indiquer la stéréochimie *cis* du groupement acétyle et du méthyle C14 de la cétone décrite par Marshall *et al.* et par conséquent, confirmer la stéréochimie *trans* de ces mêmes groupements dans le composé A.

Tableau II.14 : Valeurs des déplacements chimiques RMN ^{13}C (ppm) du composé A, du 10-épi- γ -eudesmol et du γ -eudesmol.

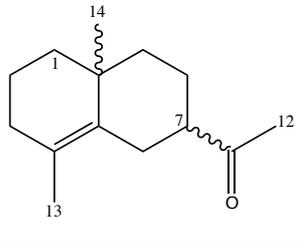
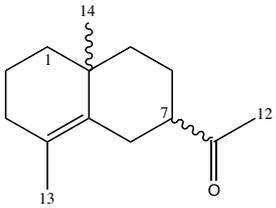
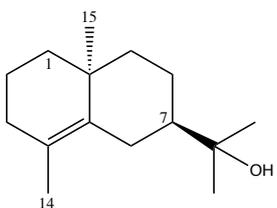
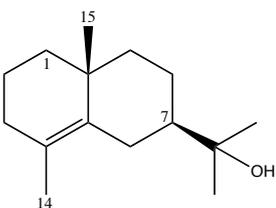
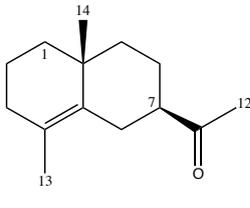
C	Composé A	10-épi- γ -eudesmol		γ -eudesmol	
		Itokawa <i>et al.</i> , 1985	Valeurs enregistrées au laboratoire	Van Beek <i>et al.</i> , 1989	Valeurs enregistrées au laboratoire
1		39,4	39,46	42,3	42,28
2		19,0	18,93	19,2	19,12
3		32,7	32,73	33,2	33,16
4		125,7	125,91	124,5	124,36
5		134,9	134,99	134,9	134,88
6		25,3	25,38	26,4	26,37
7		44,2	44,13	50,6	50,47
8		22,5	22,58	23,3	23,27
9		38,1	38,13	40,3	40,22
10		34,4	34,43	34,5	34,45
11		74,3	74,57	72,8	72,78
12		27,8	27,87	26,9	26,76
13		29,6	29,81	27,2	27,09
14		19,6	19,53	19,2	19,25
15		26,0	25,94	24,7	24,61

Tableau II.15 : Valeurs de quelques déplacements chimiques RMN ^1H (ppm) du composé A, du 10-*épi*- γ -eudesmol, du γ -eudesmol et de la « cétone ».

	Composé A	10-<i>épi</i>-γ-eudesmol	γ-eudesmol	« Cétone »
C				
		Van Beek <i>et al.</i> , 1989	Van Beek <i>et al.</i> , 1989	Marshall <i>et al.</i> , 1966
6	H6 _{éq} : 3,01 (dt : 14,8 ; 2,2 Hz)	H6 _{éq} : 2,71 (dd : 14,8 ; 2,8 Hz)	H6 _{éq} : 2,62 (ddd : 13,8 ; 3,6 ; 2,0)	
12	3H : 2,14 (s)			3H : 2,06
13	3H : 1,67 (s)			3H : 1,61
14	3H : 1,06 (s)	3H : 1,68 (br s)	3H : 1,60 (br s)	3H : 1,04
15		3H : 1,09 (s)	3H : 1,01 (s)	

En conclusion, l'ensemble de ces éléments de comparaison nous permet d'indiquer la stéréochimie *trans* du groupement acétyle et du méthyle C14 du composé A. Il s'agit donc de la 10-*épi*-nor- γ -eudesmène-11-one.

IV.4. Identification du composé B.

L'analyse de la sous fraction F9-7 par CPG(Ir) montre la présence d'un seul composé majoritaire et inconnu que nous notons **B** (52,5 % ; $I_{\text{ra/p}} = 1458/1779$). Le spectre de RMN ^{13}C de cette fraction laisse apparaître 12 raies de résonance de forte intensité appartenant au composé recherché. La séquence DEPT nous a permis de distinguer :

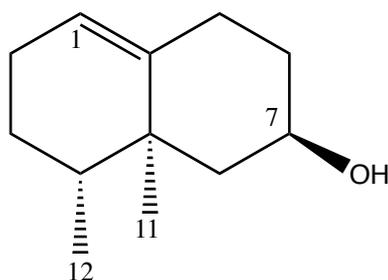
- i) 2 atomes de carbone quaternaires dont 1 éthylénique ($\delta = 141,40$ ppm) ;
- ii) 3 méthines dont 1 éthylénique ($\delta = 121,02$ ppm) ;
- iii) 5 méthylènes aliphatiques ($\delta = 25,82 ; 26,55 ; 31,00 ; 37,03$ et $48,46$ ppm) et
- iv) 2 méthyles ($\delta = 15,62$ et $18,80$ ppm).

Nous notons également une valeur de déplacement chimique à 67,87 ppm (CH) suggérant la présence d'une fonction alcool. Ces informations nous permettent d'avancer la formule brute $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}$. Nous en déduisons la présence de 3 centres d'insaturation dont une double liaison carbone-carbone ($\delta = 121,02$ et $141,40$ ppm), les deux autres étant par

conséquent des cycles. Ainsi l'ensemble de ces observations nous conduit à orienter nos recherches vers un alcool tri-nor-sesquiterpénique bicyclique insaturé.

La mise en œuvre des séquences de RMN 2D, en particulier les corrélations ^1H - ^{13}C obtenues par le spectre HMBC, suggèrent le 11,12,13-tri-nor-érémophil-1(10)-èn-7-ol pour le composé B (**Tableau II.16**). Nous remarquons, en effet, que les valeurs des déplacements chimiques de 7 des 12 carbones appartenant à B sont très proches de celles de la 11,12,13-tri-nor-érémophil-1(10)-èn-7-one, identifiée parmi les composés majoritaires de l'huile essentielle de *Xanthocyparis vietnamensis*. De plus, la position axiale du proton H7 est confirmée par la valeur de sa constante de couplage (tt, $^3\text{JH7} = 11,3$ et $4,2$ Hz).

Tableau II.16 : Structure et données RMN ^1H et ^{13}C du composé B



C	δC (ppm)	DEPT	δH (ppm)	Multiplicité (J, Hz)	δC (ppm) Revia <i>et al.</i> , 2001
1	121,02	CH	5,37	m	120,88
2	25,82	CH ₂	2,01 (a) 1,93 (b)	m m	25,68
3	26,55	CH ₂	1,39 (a) 1,21 (b)	d (3,8) t (12,8)	26,42
4	40,82	CH	1,41	d (4,3)	40,70
5	38,30	C	-	-	38,17
6	48,46	CH ₂	2,12 (a) 0,97 (b)	m m	48,33
7	67,87	CH	3,90	tt (11,3 ; 4,2)	67,73
8	37,03	CH ₂	2,02 (a) 1,19 (b)	m m	36,90
9	31,00	CH ₂	2,29 (a) 2,08 (b)	m m	30,87
10	141,40	C	-	-	141,27
11	18,80	CH ₃	0,92	s	18,66
12	15,62	CH ₃	0,89	d (6,4)	15,47

Une recherche dans la base de données « SciFinder » nous indique que cette molécule est connue. Elle a été obtenue et décrite par Revial *et al.* (2001) dans le cadre d'une synthèse du (+)-valencenol. La différence de déplacement chimique entre les deux séries est de l'ordre de 0,15 ppm. Notre composé **B** est manifestement le 11,12,13-tri-nor-érémophil-1(10)-èn-7-ol.

IV.5. Identification du composé C

Le composé majoritaire de la fraction F8-15 (60,1 % ; Ira/p = 1747/2452) est absent de nos bibliothèques de spectres. Sur le spectre RMN ^{13}C de cette fraction, nous repérons aisément une série de 15 raies de résonances appartenant au composé recherché. L'enregistrement d'une séquence DEPT nous a permis de distinguer :

- i) 3 atomes de carbone quaternaires aliphatiques dont 2 ayant des déplacements chimiques très déblindés ($\delta = 88,21$ et $82,91$ ppm) suggérant la présence d'un oxyde ;
- ii) 2 méthines aliphatiques ($\delta = 32,23$ et $32,08$ ppm) ;
- iii) 7 méthylènes aliphatiques dont 1 révélateur d'une fonction alcool ($\delta = 69,29$ ppm) ;
- iv) 3 méthyles ($\delta = 23,69$; $17,76$ et $15,52$ ppm).

Ces informations nous permettent d'avancer la formule brute $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_2$. Nous en déduisons la présence de 3 centres d'insaturation correspondant à trois cycles. Par ailleurs, la présence de deux carbones quaternaires liés à un oxygène ($\delta = 88,21$ et $82,91$ ppm) associée à une structure tricyclique et l'interrogation de notre bibliothèque « Terpènes » nous conduisent à une molécule du type « dihydroagarofurane ». Comme nous savons que le composé recherché possède une fonction alcool primaire, nous avons orienté nos recherches vers un alcool dérivé du dihydroagarofurane.

Afin de déterminer la position du groupement alcool primaire, nous avons comparé les valeurs des déplacements chimiques des carbones des 3 groupements méthyles du composé **C** avec celles des 4 groupements méthyles appartenant à 4 isomères du dihydroagarofurane (isodihydroagarofurane, *cis*-dihydroagarofurane, 4-*épi-cis*-dihydroagarofurane et *trans*-dihydroagarofurane) décrits dans la littérature par Cavalli *et al.* (2004a). Les deux derniers isomères présentent des valeurs de déplacements chimiques qui ne concordent pas avec celle du composé **C**, notamment un CH_2 autour de 17 ppm : 17,7/17,0 ppm vs. 21,33 ppm dans notre série. Nous retrouvons aussi dans la série de déplacements chimiques du composé **C**,

deux méthyles à 23,69 ppm et 15,52 ppm proches des valeurs trouvées pour les isomères isodihydroagarofurane et *cis*-dihydroagarofurane : 23,0 et 22,5 ppm (C14) et 15,7 et 15,0 ppm (C15), respectivement. Ainsi, nous pouvons déduire que la fonction alcool n'est pas positionnée sur les carbones C14 et C15 et ne peut être, à fortiori, située que sur les carbones géminés C12 ou C13. De ce fait, le déplacement chimique du troisième groupement méthyle (C12 ou C13), qui se trouve donc en position gamma par rapport au groupement OH, devrait être affecté par un effet électronique blindant d'environ 6 ppm.

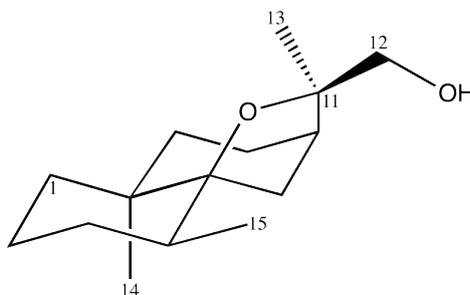
Dans les deux isomères, isodihydroagarofurane et *cis*-dihydroagarofurane, les déplacements chimiques du C12 et du C13 sont respectivement proches de 30 ppm (30,2 et 30,1 ppm) et de 23 ppm (23,5 et 23,1 ppm). Le composé **C** présente un déplacement chimique de 17,76 ppm pour le dernier méthyle, en accord avec un effet γ blindant de 6 ppm sur le carbone C13. Nous en déduisons que le groupement OH est situé sur le carbone C12. Cette structure a été confirmée par la mise en œuvre des séquences RMN 2D (HSQC, HMBC, COSY et NOESY) (**Tableau II.18**).

Il reste néanmoins à déterminer la stéréochimie du composé **C**. De manière assez étonnante, les interactions NOESY sont faibles et ne permettent pas de conclure. Sur la base du spectre de RMN ^{13}C , les comparaisons avec les séries de déplacements chimiques des isomères isodihydroagarofurane et *cis*-dihydroagarofurane n'apportent pas d'information supplémentaire. En effet, ces deux composés présentent des valeurs de déplacements chimiques extrêmement proches, exceptée celle du carbone C6 (isodihydroagarofurane : 38,1 ppm ; *cis*-dihydroagarofurane : 30,7 ppm). Néanmoins, cette valeur n'est pas discriminante puisque dans le composé **C**, le carbone C6 résonne à 33,39 ppm.

Aussi, nous nous sommes intéressés au spectre de RMN ^1H de chacun de ces deux isomères. Nous avons remarqué que les valeurs des déplacements chimiques des protons des méthyles C14 et C15 étaient suffisamment différentes entre les deux isomères pour constituer un élément de comparaison (**Tableau II.17**). Pour l'isodihydroagarofurane, ces protons résonnent respectivement à 1,00 et 0,88 ppm et pour le *cis*-dihydroagarofurane, ils résonnent à 0,88 et 0,82 ppm. Dans le composé **C**, les protons des méthyles C14 et C15 résonnent respectivement à 1,01 et 0,85 ppm, ce qui nous oriente vers un dérivé de l'isodihydroagarofurane. Le composé **C** est donc le 12-hydroxy-isodihydroagarofurane (**Tableau II.18**).

Tableau II.17 : Valeurs des déplacements chimiques des protons (ppm) des méthyles C14 et C15 du composé A, de l'isodihydroagarofurane et du *cis*-dihydroagarofurane.

C	Composé C	Isodihydroagarofurane	<i>cis</i> -Dihydroagarofurane
14	3H : 1,01	3H : 1,00	3H : 0,88
15	3H : 0,85	3H : 0,88	3H : 0,82

Tableau II.18 : Structure et données RMN ^1H et ^{13}C du composé C

C	δC (ppm)	DEPT	δH (ppm)	Multiplicité (J, Hz)	HMBC	COSY	NOESY
1	37,9	CH ₂	1,12 (a)	s	-		
			1,55 (b)	m	-		
2	21,33	CH ₂	1,44 (a)	t (3,0)	-		
			0,92 (b)	d (7,0)	C 15		
3	32,08	CH ₂	1,44 (a)	t (3,0)	-		
			1,35 (b)	m	-		
4	32,23	CH	1,74	m	C7	H15	
5	88,21	C	-	-	-	-	-
6	33,39	CH ₂	1,98 (a)	dd (11,7; 4,3)	C4 ; C5 ; C7 ; C8 ; C10	H6b ; H8	H12a
			1,55 (b)	s	C7 ; C8 ; C10 ; C11	H6a	
7	39,99	CH	1,87	m	C6 ; C8 ; C9 ; C12		
8	24,84	CH ₂	1,70	m	C9		
9	36,12	CH ₂	1,67 (a)	m	C14		
			1,20 (b)	m	C8		
10	38,83	C	-	-	-	-	-
11	82,91	C	-	-	-	-	-
12	69,29	CH ₂	3,40 (a)	d (10,4)	C7 ; C11 ; C13	H12a ; H13	H6a ; H15
			3,24 (b)	d (10,4)	C13	H12b ; H13	
13	17,76	CH ₃	1,41	s	C7 ; C11 ; C12		
14	23,69	CH ₃	1,01	s	C1 ; C5 ; C9 ; C10		
15	15,52	CH ₃	0,85	d (7,0)	C3 ; C4 ; C5	H4	

La composition de l'huile essentielle de bois de *Xanthocyparis vietnamensis* est détaillée dans le **Tableau II.10 p.130**. Les molécules présentant un squelette éremophilane (composés majoritaires : le nootkatène **21**, 20,7 % et la 11,12,13-tri-nor-éremophil-1(10)-èn-7-one **15**, 17,2 %), ainsi que celles ayant un squelette eudesmane, cadinane-muurolane ou élémmane, sont largement représentées dans l'échantillon étudié. Au total, nous sommes parvenus à identifier 40 composés représentant 87,9 % de la composition globale dans l'huile essentielle de bois de *Xanthocyparis vietnamensis*, dont 5 étaient absents de nos bibliothèques de spectres. Pour 3 d'entre eux (1,4-cinéole, déhydrojinkoh-éremol, composé B), l'identification a été réalisée par comparaison avec les données RMN ^{13}C ou RMN ^1H de la littérature. Pour les deux autres (composés A et C), la mise en œuvre de séquences de RMN bidimensionnelle a permis de déterminer leur structure ainsi que leur stéréochimie. Ces deux composés sont, à notre connaissance, identifiés et décrits pour la première fois. La complexité de la composition chimique de l'huile essentielle et le manque de quantité de matière ne nous a, en effet, pas permis de mener un fractionnement optimal.

Tableau II.10 : Composition chimique de l'huile essentielle de bois de *X. vietnamensis*.

	Composés	Ira	Irp	HE %	Identification
1	α -Thujène	922	1015	0,1	Ir, SM
2	Sabinène	966	1124	tr	Ir, SM, <i>RMN</i> ¹³ C (F1)
3	Myrcène	979	1161	0,2	Ir, SM, <i>RMN</i> ¹³ C (F1)
4	1,4-Cinéole	1003	1178	0,6	Ir, SM, <i>RMN</i> ¹³ C (F2)
5	<i>p</i> -Cymène	1011	1271	1,3	Ir, SM, <i>RMN</i> ¹³ C
6	Limonène	1020	1202	0,2	Ir, SM, <i>RMN</i> ¹³ C (F1)
7	<i>p</i> -Cymenène	1072	1436	2,4	Ir, SM, <i>RMN</i> ¹³ C
8	<i>p</i> -Cymèn-8-ol	1159	1842	4,1	Ir, SM, <i>RMN</i> ¹³ C
9	Terpinèn-4-ol	1161	1597	3,0	Ir, SM, <i>RMN</i> ¹³ C
10	α -Terpinéol	1171	1690	0,5	Ir, SM, <i>RMN</i> ¹³ C
11	Oxyde de méthylcarvacryle	1223	1602	0,2	Ir, SM, <i>RMN</i> ¹³ C (F2)
12	Carvacrol	1275	2204	2,1	Ir, SM, <i>RMN</i> ¹³ C
13	Acétate d' α -terpinyle	1330	1685	0,1	Ir, <i>RMN</i> ¹³ C (F2)
14	β -Elémène	1386	1588	0,8	Ir, SM, <i>RMN</i> ¹³ C
15	11,12,13-tri-nor-Erémophil-1(10)-èn-7-one	1438	1996	17,2	Ir, SM, <i>RMN</i> ¹³ C
16	11,12,13-tri-nor-Erémophil-1(10)-èn-7-ol (B)	1458	2173	0,4	Ir, <i>RMN</i> ¹³ C, <i>RMN</i> 2D
17	β -Sélinène	1480	1720	0,8	Ir, SM, <i>RMN</i> ¹³ C
18	Valencène	1487	1715	3,5	Ir, SM, <i>RMN</i> ¹³ C
19	α -Sélinène	1490	1723	0,3	Ir, <i>RMN</i> ¹³ C (F1)
20	γ -Cadinène	1492	1750	0,3	Ir, <i>RMN</i> ¹³ C (F1)
21	Nootkatène	1507	1811	20,7	Ir, SM, <i>RMN</i> ¹³ C
22	δ -Cadinène	1512	1753	1,2	Ir, SM, <i>RMN</i> ¹³ C
23	β -Elémol	1532	2070	0,9	Ir, SM, <i>RMN</i> ¹³ C
24	10- <i>épi</i> -nor- γ -Eudesmèn-11-one (A)	1553	2039	0,9	Ir, <i>RMN</i> ¹³ C, <i>RMN</i> 2D
25	13-nor-Erémophil-1(10)-èn-11-one	1594	2133	2,6	Ir, <i>RMN</i> ¹³ C
26	Erémophil-9(10)-èn-11-ol	nr	nr	tr	Ir, <i>RMN</i> ¹³ C (F8-2)
27	Erémoligénol	nr	nr	tr	Ir, <i>RMN</i> ¹³ C (F8-2)
28	γ -Eudesmol	1617	2159	5,1	Ir, SM, <i>RMN</i> ¹³ C
29	τ -Cadinol	1625	2159	0,7	Ir, <i>RMN</i> ¹³ C
30	τ -Muurolol	1627	2176	0,7	Ir, SM, <i>RMN</i> ¹³ C
31	δ -Cadinol (torréyol)	1629	2193	0,3	Ir, <i>RMN</i> ¹³ C (F8-7)
32	Valérianol	nr	nr	tr	Ir, <i>RMN</i> ¹³ C (F8-4)
33	β -Eudesmol	1634	2219	3,7	Ir, SM, <i>RMN</i> ¹³ C
34	α -Cadinol	1636	2221	1,9	Ir, <i>RMN</i> ¹³ C
35	α -Eudesmol	1639	2210	3,3	Ir, SM, <i>RMN</i> ¹³ C
36	Sélina-11-èn-4 α -ol	1643	2241	0,3	Ir, <i>RMN</i> ¹³ C (F8-3)
37	Cadalène	1653	2204	0,3	Ir, SM, <i>RMN</i> ¹³ C (F1)
38	Déhydro-jinkohérémol	1671	2214	0,2	Ir, <i>RMN</i> ¹³ C (F2)
39	12-Hydroxy-isodihydroagarofurane (C)	1742	2245	2,3	Ir, <i>RMN</i> ¹³ C, <i>RMN</i> 2D
40	Nootkatone	1774	2501	4,7	Ir, <i>RMN</i> ¹³ C
	Total			87,9	

L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire. Ir^a et Ir^p : indices de rétention mesurés respectivement sur colonnes apolaire (BP-1) et polaire (BP-20). tr : traces (<0,05%) ; nr : non repéré. Identification par *RMN*¹³C : italique = composés identifiés dans les fractions de chromatographie.

Chapitre III

Caractérisation chimique de deux espèces du genre
Myrtus : *M. nivellei* et *M. communis*

Le myrte est une plante connue depuis l'Antiquité. Symbole d'amour, de pureté et de grâce, le myrte est alors dédié à Vénus et à Aphrodite (déesse romaine et grecque de l'amour) (Gençler Özkan et Gençler Güray, 2009). Son feuillage était utilisé pour confectionner des couronnes honorifiques, portées notamment lors des mariages des jeunes filles, et dont une reproduction en or est visible au British Museum (**Figure III.1**). Théophraste (IV^{ème} siècle av. JC), puis Dioscoride et Pline (I^{er} siècle ap. JC) attribuaient au myrte des vertus médicinales, notamment liées à ses propriétés antiseptiques. Tombé dans l'oubli au cours de Moyen-Âge, le myrte est ensuite de nouveau employé pour ses vertus thérapeutiques (fumigations, préparation d'huile et onguents parfumés) et pour ses qualités olfactives et gustatives, notamment. L'eau distillée à partir des feuilles et des fleurs de l'arbuste, connue sous le nom d' « Eau d'Ange », entre dans la composition d'eaux de toilette très appréciées des femmes au XVI^{ème} siècle en Italie. Ses baies sont séchées, broyées puis consommées en guise de poivre en raison de leur saveur piquante. Les tanneurs grasseois utilisaient les feuilles et les fleurs séchées puis broyées pour traiter le cuir. Aujourd'hui, le myrte est cité dans les traités de plantes médicinales (Migliore, 2011, p.196-197).

Figure III.1 : Couronne de myrte en or exposée au British Museum (*Source : fr.pinterest.com, photo : ©Mary Harrsch*)



I. Aspects botaniques

Le myrte appartient au genre *Myrtus* (famille des Myrtacées), pour lequel on distingue deux espèces: *Myrtus communis* L. et *Myrtus nivellei* Batt. & Trab. Il s'agit des deux seuls taxons officiellement reconnus du genre *Myrtus*.

I.1. *Myrtus communis*

Myrtus communis est très répandu sur l'ensemble du pourtour méditerranéen et dans les îles, ainsi qu'en Macaronésie et en Asie occidentale (Migliore, 2011, p.66). Cette espèce pousse spontanément et en abondance sur tout le littoral de la Corse et en Sardaigne. Elle est également cultivée comme plante ornementale dans toute la France méridionale et sur le littoral atlantique, jusqu'en Bretagne (**Figure III.2**). *Myrtus communis* est un arbuste à feuilles persistantes, pouvant atteindre 3 mètres de hauteur et dont la longévité peut dépasser 300 ans (Migliore, 2011, p.67). Ses feuilles vert foncé à très court pétiole, ovales-lancéolées, opposées et rapprochées, sont très odorantes (notamment au froissement, car elles renferment de nombreuses petites glandes translucides à huiles essentielles), tout comme ses fleurs blanches, très ouvertes et solitaires (floraison de mai/juin à août). Utilisées comme aromates dans des préparations culinaires, les feuilles de myrte permettent également la confection de la liqueur de myrte blanche, une spécialité sarde. Les baies sont ovoïdes, noir-violacé lorsqu'elles sont mûres et conservent à leur partie supérieure les restes du calice. Leur chair blanche a une saveur âpre, résineuse et astringente (**Figure III.3**). Elles apparaissent de novembre à janvier et constituent l'ingrédient principal de la célèbre liqueur de myrte rouge.

Figure III.2 : Distribution géographique de *Myrtus communis* et *M. nivellei*.



- Distribution géographique de *Myrtus communis*
- Distribution géographique de *Myrtus nivellei*
- Zones correspondant aux origines des huiles essentielles étudiées

Figure III.3 : (a) Arbuste de *Myrtus communis* ; (b) Baies de myrte noir-violacé ; (c) Chair blanche d'une baie de myrte ; (d) Fleurs de myrte



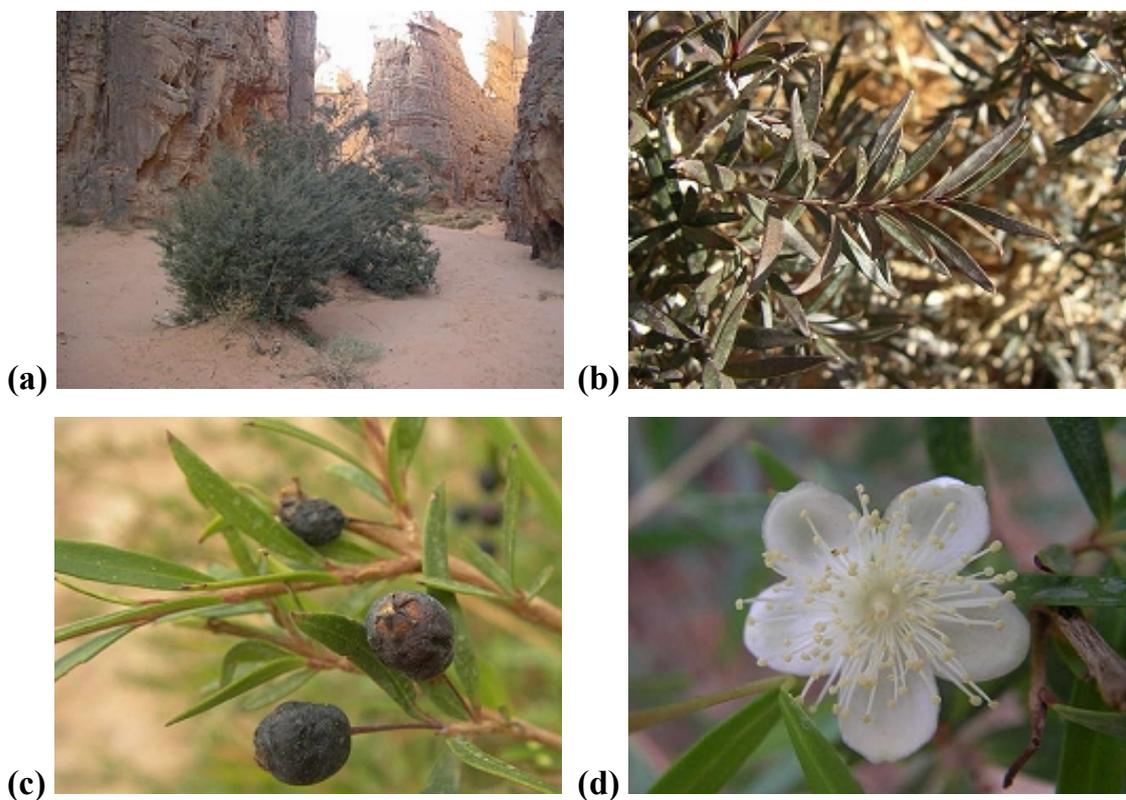
1.2. *Myrtus nivellei*

Le myrte de nivelles (*Myrtus nivellei*) a été découvert au début du XX^{ème} siècle par le lieutenant René Nivelles des chasseurs à pied de l'armée française et a été décrit en 1911 par Battandier et Trabut. C'est une espèce endémique des montagnes du Sahara central (massifs du Hoggar, de la Tassili n'Ajjer, de la Tefedest et de la Tassili n'Immidir en Algérie ; massif du Tibesti au Tchad), localisée dans les vallons et bords d'oueds rocheux ou sableux temporairement humides, à plus de 1400 m d'altitude (**Figure III.2 p.133**). C'est un arbuste pouvant atteindre 2 mètres de haut. Il présente une morphologie très proche de celle de *Myrtus communis* mais possède des feuilles plus linéaires, épaisses et lancéolées (4-5 cm de long), qui sont également très odorantes au froissement. Les fleurs et les fruits sont semblables à ceux de *Myrtus communis* (**Figure III.4**).

Ces deux espèces sont étroitement liées. Il semblerait que la biogéographie (répartition géographique bien distincte) de ces deux espèces soit une réponse aux changements paléoenvironnementaux successifs. Leur distribution géographique actuelle peut être expliquée par la capacité remarquable de cette plante, non seulement à persister localement

dans divers refuges, mais aussi à la migration (au moins trois épisodes de migration de semences puis d'isolation dans les montagnes sahariennes au Pléistocène) (Migliore *et al.*, 2012, 2013). Une étude approfondie a d'ailleurs été menée par J. Migliore au cours de ses travaux de thèse (Migliore, 2011).

Figure III.4 : (a) Arbuste de *Myrtus nivellei* (massif de Tassili N'Ajjer) (b) Feuilles (c) Baies (d) Fleur (Source : www.sahara-nature.com)



II. Usages populaires

II.1. *Myrtus communis*

Dans la médecine populaire, les feuilles de myrte commun (décoctions, tisanes) sont utilisées pour traiter les maladies des voies respiratoires et urinaires, les sinusites et les otites (Bouzabata *et al.*, 2010). Elles soignent également les diarrhées, les leucorrhées, les hémorragies, les douleurs gastriques. En décoction très concentrée, les feuilles servent à noircir les cheveux et à se débarrasser des poux. Ecrasées, elles désinfectent et aident à la cicatrisation. Au nord de l'Algérie (région de Collo), les fruits de *M. communis* sont consommés frais pour soulager les douleurs gastriques et les colites. En Tunisie, l'huile obtenue à partir des fruits est employée en usage externe pour soulager les douleurs

rhumatismales (Migliore, 2011, p.196). Plus particulièrement en Corse, les feuilles de myrte s'utilisent en tisane pour soigner les cystites. Séchées, elles aromatisent les grillades. Les rameaux peuvent recouvrir les charcuteries. Les baies sont employées dans la confection de spécialités telles que la célèbre liqueur de myrte mais également le vin de myrte, les confitures, les gelées, les nougats, les confiseries, les moutardes ou encore les terrines. Le bois sert à la fabrication de paniers, de nasses à poissons et de pièges à crustacés (appelés également gireliers) (**Figure III.5**). Il est aussi utilisé en marqueterie ou brûlé pour son odeur d'encens. Selon les croyances, le myrte est à la fois symbole d'amour et symbole de mort. Dans certains endroits (notamment en Corse et dans le Languedoc), les rameaux servent à confectionner des couronnes et des arches de mariage car le myrte constitue dans ce cas un symbole d'amour, de joie, d'abondance et apporterait la chance. En revanche, à Corte et dans le Nebbiu (Corse), on faisait des bouquets de myrte lors du décès d'une personne, qui étaient déposés dans la maison du défunt ou dans l'église.

Figure III.5 : Ajaccio - « Constantin Sanna renoue avec la fabrication de nasses en myrte » (*Article Corse Matin*)



II.2. *Myrtus nivellei*

De nombreuses propriétés médicinales sont attribuées aux feuilles de *Myrtus nivellei*. Séchées, elles sont utilisées pour préparer le thé ou consommées en infusion pour soigner la toux, les diarrhées, la fièvre et le diabète. Elles sont également ajoutées à des galettes d'orge pour traiter les diarrhées et la blennorragie, ou écrasées et additionnées d'huile ou de beurre pommade pour guérir les dermatoses et redonner brillance aux cheveux des femmes

(Hammiche et Maiza, 2006). Les Touaregs exportent d'ailleurs des sacs entiers de feuilles séchées vers les pays voisins : Soudan, Niger et Mali (Migliore, 2011, p.199).

III. Phytochimie et activités biologiques

Le myrte contient de nombreux composés extractibles, parmi lesquels des flavonoïdes, des tanins, des sucres ou encore des terpènes, parfois biologiquement actifs. Ces derniers sont isolés de la plante par extractions aux solvants ou par hydrodistillation (huile essentielle). Les études concernant les extraits et les huiles essentielles sont très nombreuses pour ce qui est de *Myrtus communis* et beaucoup plus rares pour *Myrtus nivellei*.

III.1. *Myrtus communis*

Myrtus communis est une plante très abondante. Nombre d'articles répertorient les compositions chimiques ainsi que les propriétés pharmacologiques et les applications potentielles de son huile essentielle et de ses extraits (Aleksic *et al.*, 2014 ; Alipour *et al.*, 2014 ; Sumbul *et al.*, 2011 ; Vicidomini, 2007).

En ce qui concerne les extraits de *M. communis* L., il a été montré que ceux-ci possèdent une forte activité antibactérienne, anti-inflammatoire, anti-hyperglycémique ou encore antioxydante. Les composés antioxydants de ces extraits les plus connus sont des flavonoïdes, des acides phénols et des tannins (Shaheen *et al.*, 2006 ; Wannes *et al.*, 2010 ; Amensour *et al.*, 2009). Taheri *et al.* (2013) ont décrit l'activité antibactérienne d'un extrait hydroalcoolique de feuilles de *M. communis* sur *Staphylococcus aureus* et *Vibrio cholerae*. Par ailleurs, l'activité antibactérienne et anti-inflammatoire des extraits est imputable à la présence de phloroglucinols, particulièrement la semi-myrtucommulone (S-MC), la myrtucommulone A (MC-A) et la gallomyrtucommulone B (Appendino *et al.*, 2002, 2006 ; Rossi *et al.*, 2009). Ces derniers sont isolés des feuilles de *Myrtus communis*. La myrtucommulone A est un composé thérapeutique potentiel. Sa cytotoxicité et sa capacité à induire l'apoptose des cellules cancéreuses, ainsi qu'à stopper la prolifération et la migration des cellules cancéreuses, ont été démontrées (Izgi *et al.*, 2015). Rosa *et al.* (2008) ont également mis en évidence le puissant effet protecteur de la S-MC et de la MC-A dans la dégradation oxydative du cholestérol et du LDL, deux processus impliqués dans les maladies cardiovasculaires.

L'huile essentielle de *M. communis* L. est obtenue par hydrodistillation des parties aériennes (feuilles et branches, parfois fleurs ou baies). Elle est très étudiée et reconnue sur le marché des produits naturels en raison de son utilisation dans la composition de parfums et arômes (Chalchat *et al.*, 1998). Préparée à partir des feuilles, elle possède une odeur très agréable et ses propriétés antimicrobienne, tonique et balsamique, en font un produit utilisé non seulement dans la parfumerie mais également dans les domaines pharmaceutique, thérapeutique et cosmétique (Wannes *et al.*, 2009). La composition chimique de l'huile essentielle de *M. communis* L. a fait l'objet de nombreuses études, qui ont été recensées par Lawrence (1976-1977 ; 1979-1980 ; 1981-1987 ; 1990 ; 1993 ; 1996 ; 2002 ; 2007). Les premières études remontent à 1907 et mettent en évidence la présence de composés oxygénés à squelette pinanique (Semmler *et al.*, 1907). En 1970, Peyron identifie les principaux monoterpènes caractéristiques de l'huile essentielle de myrte (α - et β -pinène, 1,8-cinéole, linalol, nérol, géraniol et quelques esters, les acétates de linalyle, géranyle et myrtényle) et en 1973, Scora quantifie les composés majoritaires par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Depuis, les compositions chimiques des huiles essentielles de *M. communis* isolées de différentes parties de la plante poussant dans diverses localités du bassin méditerranéen, ont été reportées. Il y a près d'une vingtaine d'années, les travaux menés à l'Université de Corse ont permis de proposer, très schématiquement, un classement de ces huiles essentielles sur la base de la présence à une teneur appréciable ou de l'absence de l'acétate de myrtényle (Bradesi *et al.*, 1997). Approximativement à la même période, Chalchat *et al.* (1998) ont classé les huiles essentielles de feuilles de myrte d'origines diverses en deux groupes, en fonction de leur teneur en α -pinène : supérieure à 50 % (Corse et Tunisie), inférieure à 35 % (autres provenances). Quoi qu'il en soit, l'huile essentielle de feuilles de myrte produite en région méditerranéenne présente une variabilité chimique.

Aujourd'hui, étant donné que le nombre de publications relatives à la composition chimique de l'huile essentielle de myrte est nettement plus important, nous proposons un nouveau classement permettant de distinguer, sur la base des composés majoritaires (acétate de myrtényle, 1,8-cinéole, α -pinène, limonène et linalol), plusieurs types de composition chimique :

- les huiles essentielles riches en acétate de myrtényle en provenance d'Espagne (32,9-35,9 %, Boelens et Jimenez, 1991), du Portugal (7,4-37,6 %, Pereira *et al.*, 2009) et de l'île grecque de Zakynthos (23,7-39,0 %, Gardeli *et al.*, 2008) ;

- les huiles essentielles riches en 1,8-cinéole, décrites au Liban (40,0 %, Traboulsi *et al.*, 2002), sur l'île de Chypre (50,1 %, Akin *et al.*, 2010) et au Maroc (43,1 %, Farah *et al.*, 2006) ;

- les huiles essentielles riches en α -pinène avec une teneur appréciable en 1,8-cinéole, que l'on retrouve en Corse (α -pinène, 47,9-61,1 % ; 1,8-cinéole, 19,8-38,5 %, Bradesi *et al.*, 1997 ; α -pinène, 52,8 % ; 1,8-cinéole, 27,0 %, Paolini *et al.*, 2008) en Sardaigne (α -pinène, 50,0-59,5 % ; 1,8-cinéole, 20,9-30,4 %, Tuberoso *et al.*, 2006), en Tunisie (α -pinène, 51,2-52,9 % ; 1,8-cinéole, 24,2-24,8 %, Chalchat *et al.*, 1998) et au Nord-est de l'Algérie (α -pinène, 40,5-64,0% ; 1,8-cinéole, 10,9-29,1 %, Bouzabata *et al.*, 2010). Nous noterons que les échantillons de Corse et de Sardaigne sont caractérisés par l'absence d'acétate de myrtényle ;

- les huiles essentielles dont la teneur en 1,8-cinéole, α -pinène, limonène et acétate de myrtényle est appréciable : en Albanie (respectivement : 16,63-21,77 % ; 19,40-20,25 % ; 10,94-12,34 % et 11,35-12,26 %, Asllani, 2000), en Yougoslavie (respectivement 21,6-23,0 % ; 23,8-24,8 % ; 12,0-12,7 % ; 14,0-15,2 %, Chalchat *et al.*, 1998), en Croatie (1,8-cinéole + limonène, 12,6-29,8 % ; α -pinène, 6,6-16,4 % ; acétate de myrtényle, 13,5-30,7 %, linalol, 10,8-18,3 %, Jerkovic *et al.*, 2002), en Turquie (respectivement : 10,5-18,2 % ; 6,4-9,0 % ; 3,4-7,5 % ; 10,8-14,5 % et linalol, 16,3-18,6 %, Özek *et al.*, 2000), au Montenegro (α -pinène, 14,7-35,9 % ; limonène, 4,1-4,5 % ; 1,8-cinéole, 25,7-23,9 % ; linalol, 10,1-10,9 % ; acétate de myrtényle, 5,4-21,6 %, Mimica-Dukić *et al.*, 2010), en Tunisie (α -pinène, 15,59 % ; limonène, 8,94 % ; 1,8-cinéole, 16,55 % ; linalol, 13,30 % ; acétate de myrtényle, 20,75 %, Ben Hsouna *et al.*, 2014) ;

- les huiles essentielles ayant une teneur importante en 1,8-cinéole, α -pinène et limonène et ne contenant pas d'acétate de myrtényle : en Italie continentale (respectivement : 24,2-25,5 % ; 28,9-41,6 % et 5,2-9,5 %, Flamini *et al.*, 2004), en Sardaigne (respectivement : 15,9-41,7 % ; 30,0-39,5 % et 5,2-29,8 %, Tuberoso *et al.*, 2006). Ce groupe comprend également plusieurs échantillons d'Iran (respectivement : 18,0 % ; 29,4 % et 21,2 %, Rasooli *et al.*, 2002 ; 17,9 % ; 29,1 % et 21,5 %, Yadegarinia *et al.*, 2006 ; 28,5 % ; 35,2 % et 11,0 %, Weyerstahl *et al.*, 1994). Pour ces derniers, le linalol (respectivement : 10,6 ; 10,4 et 8,7 %) et l' α -terpinéol (3,1 ; 3,2 et 5,2 %) sont également présents dans des quantités relativement importantes.

- Enfin, des compositions tout à fait atypiques ont été ponctuellement décrites. En Grèce, Koukos *et al.* (2001) identifient l'acétate de linalyle (31,4 %), le limonène (21,8 %) et l' α -pinène (18,0 %) comme composés majoritaires de l'huile essentielle de myrte. Dans cet

échantillon, ni l'acétate de myrtényle ni le 1,8-cinéole n'ont été identifiés. Très récemment, Henna *et al.* (2015) décrivent la composition chimique d'un échantillon d'huile essentielle de *M. communis* d'Algérie. Les principaux composés identifiés sont le limonène (23,4 %), le linalol (15,4 %), l'acétate de géranyle (10,9 %), l' α -pinène (10,7 %), l'acétate de linalyle (8,2 %) et le 1,8-cinéole (6,6 %).

Les propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle de *Myrtus communis* sont reportées dans plusieurs articles. Elle est notamment active contre des bactéries Gram-négatives telles que *Pseudomonas aeruginosa* (Owlia *et al.*, 2009), *Helicobacter pylori* (Deriu *et al.*, 2007), *Escherichia coli* (Djenane *et al.*, 2011), *Serratia marcescens* (Salvagnini *et al.*, 2008) ou encore *Salmonella typhimurium* (Gündüz *et al.*, 2009). Dans le cas de cette dernière bactérie, l'étude réalisée a montré que l'huile essentielle de myrte diluée pourrait être une bonne alternative aux désinfectants synthétiques utilisés pour les fruits et légumes. D'autres études ont mis en évidence l'activité antibactérienne de cette huile essentielle dans le cas de bactéries Gram-positives telles que *Staphylococcus aureus* (Salvagnini *et al.*, 2008 ; Djenane *et al.*, 2011), *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* (Salvagnini *et al.*, 2008) mais aussi d'autres bactéries parmi lesquelles *Mycobacterium tuberculosis* (Zanetti *et al.*, 2010). Récemment, Ben Housna *et al.* (2014) ont démontré l'activité antibactérienne d'une huile essentielle de myrte de Tunisie par le biais de deux méthodes : l'évaluation de la zone d'inhibition (ZI) et la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI). Ainsi, l'huile essentielle testée sur des bactéries Gram-positives et Gram-négatives a donné des valeurs de ZI comprises entre 16 et 28 mm (Gram-positives : *Listeria monocytogenes*, 28 mm ; *Bacillus cereus*, 26 mm ; *Staphylococcus aureus*, 25 mm / Gram-négatives : *Pseudomonas aeruginosa*, 20 mm, pour les plus élevées), comparées à la valeur de ZI de la gentamicine (contrôle positif) comprise entre 12 et 25 mm. Les CMI les plus faibles (0,078-1,25 mg.mL⁻¹) ont été obtenues pour les bactéries Gram-positives testées (1,25-2,5 mg.mL⁻¹ pour les Gram-négatives). Cette activité peut être associée à la forte teneur en monoterpènes de l'huile essentielle de *M. communis*, parmi lesquels le 1,8-cinéole.

L'activité antifongique de deux échantillons d'huile essentielle de *Myrtus communis* d'Algérie ayant des compositions chimiques quantitativement différentes, a été évaluée (Bouzabata *et al.*, 2015). En effet, les teneurs des composés majoritaires varient considérablement : α -pinène (50,8 % et 33,6 %), 1,8-cinéole (21,9 % et 13,3 %), linalol (2,7 % et 14,6 %). Les CMI et les CML (concentrations minimales létales) de seize micro-

organismes de type levures, dermatophytes et souches d'*Aspergillus* ont été testées. La CMI la plus faible (0,64 mg/mL) a été mesurée dans le cas d'une levure (*Cryptococcus neoformans*) et de trois dermatophytes (*Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* et *Trichophyton rubrum*). Pour plusieurs dermatophytes, la CMI était équivalente à la CML, ce qui indique l'activité antifongique de l'huile essentielle. Néanmoins, les deux échantillons étaient moins actifs sur les levures du genre *Candida* et les souches d'*Aspergillus* (CMI : 1,25-5 mg/mL). En revanche, Cannas *et al.* (2013) ont conclu au pouvoir fongicide plus ou moins important de l'huile essentielle de myrte (origine : Italie) sur cinq espèces de levures du genre *Candida* : *C. albicans* et *C. tropicalis*, après 24 à 48h et *C. glabrata*, *C. krusei* et *C. parapsilosis*, après 48h. Il reste à noter que la CMI obtenue pour *C. albicans* reste nettement inférieure à celle obtenue par Mahboubi *et al.* (2010) avec une huile essentielle de myrte originaire de Turquie, plus riche en linalol et en acétate de linalyle. Ce résultat n'est pas surprenant puisqu'il a été démontré que le linalol présente une activité antifongique contre *Candida albicans* (Hsu *et al.*, 2013).

L'activité antioxydante de l'huile essentielle de myrte est limitée car il s'agit d'une huile essentielle riche en monoterpènes (α -pinène, β -pinène, 1,8-cinéole, linalol, etc.), qui sont des composés connus pour avoir un faible pouvoir antioxydant, contrairement aux dérivés du phénol tels que le thymol et le carvacrol (Wannes *et al.*, 2010). Ces résultats sont en accord avec ceux présentés par Yadegarinia *et al.* (2006), relatifs à une huile essentielle de myrte d'Iran.

Concernant les propriétés anti-inflammatoires, une étude menée par Nassar *et al.* (2010) a montré une importante activité de l'huile essentielle de *Myrtus communis* chez des rats albinos mâles à qui on avait au préalable fait ingérer du carraghénane, polysaccharide provoquant des inflammations intestinales. Dans ce cas, l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle s'est avérée très proche de celle de la molécule de référence, l'indométacine. De même, Maxia *et al.* (2011) ont mis en évidence la capacité de l'huile essentielle de myrte à inhiber la migration des neutrophiles vers la zone d'inflammation, chez des souris à qui un œdème des oreilles avait été provoqué par application locale d'huile essentielle de croton. Enfin, Bouzabata *et al.* (2015) ont démontré le pouvoir inhibiteur de cette huile essentielle sur la production d'oxyde nitrique (médiateur d'inflammation) dans les macrophages stimulés par des lipopolysaccharides (LPS, activateurs d'inflammation).

L'huile essentielle de *Myrtus communis* présente également une activité insecticide. Toudert-Taleb *et al.* (2014) ont étudié les effets de plusieurs huiles essentielles de Kabylie (Algérie), dont celle de myrte, sur *Callosobruchus maculatus*, un insecte destructeur appelé plus couramment bruche du niébé. L'échantillon testé contenait majoritairement du 1,8-cinéole et de l' α -pinène, et les bio-tests ont été réalisés par contact, fumigation et répulsion, en conditions de laboratoire. Les résultats les plus probants ont été obtenus pour les tests par contact, qui ont montré l'atteinte de tous les paramètres biologiques de *C. maculatus* (fertilité et viabilité embryonnaire et post-embryonnaire des œufs pondus).

III.2. *Myrtus nivellei*

Les extraits de la plante ont fait l'objet de seulement quelques études. La première est assez récente, elle a été réalisée par Rached *et al.* (2010) et concerne un extrait aqueux de feuilles, dans lequel les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes ont été évaluées à $242,68 \pm 9,79$ mg d'équivalent (éq) par gramme d'extrait sec (ES) et $28,53 \pm 4,51$ mg éq/g ES. Ces auteurs indiquent également une bonne activité antioxydante de cet extrait (tests DPPH et β -carotène positifs, concentration inhibitrice médiane $CI_{50} = 4,90 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) directement liée à sa teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes. Ainsi, la fraction à l'acétate d'éthyle issue de ce même extrait est celle qui présente la meilleure activité antioxydante ($CI_{50} = 3,08 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Postérieurement à nos travaux publiés dans *Journal of Ethnopharmacology* en 2013 (Bouzabata *et al.*, 2013b), d'autres études, ont été publiées par une équipe de l'Université Saad Dahleb de Blida en Algérie. Dans les différents articles, Touaibia *et al.* (2014a, 2014b, 2015) ont décrit la composition chimique d'un échantillon d'huile essentielle ainsi que les compositions chimiques et activités biologiques des extraits alcooliques (éthanol et méthanol) et aqueux. En ce qui concerne l'extrait aqueux, celui-ci contient $466,5 \mu\text{g} \text{ éq/mg ES}$ de polyphénols totaux, $135,5 \mu\text{g} \text{ éq/mg ES}$ de flavonoïdes et $40,5 \mu\text{g} \text{ éq/mg ES}$ de flavonols. Son activité anti-oxydante, évaluée par test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), est intéressante (concentration efficace médiane $CE_{50} = 0,71 \text{ mg/mL}$) mais reste moindre par rapport au contrôle positif (acide ascorbique, $CE_{50} = 0,39 \text{ mg/mL}$), tout comme celle de l'extrait éthanolique ($CE_{50} = 0,59 \text{ mg/mL}$) (Touaibia et Chaouch, 2014a). Ce dernier contient $734 \mu\text{g} \text{ éq/mg ES}$ de polyphénols totaux, $181,1 \mu\text{g} \text{ éq/mg ES}$ de flavonoïdes, $71,75 \mu\text{g} \text{ éq/mg ES}$ de flavonols, $139,2 \mu\text{g} \text{ éq/mg ES}$ de tanins, $25,5 \mu\text{g} \text{ éq/mg ES}$ d'anthocyanes et $17,3 \mu\text{g} \text{ éq/mg ES}$ de sucres totaux. C'est l'extrait qui

présente le meilleur pouvoir chélateur (64,85 % de chélation des ions Fe^{2+}), plus important que celui du contrôle positif (acide ascorbique, 43,22 %), probablement en lien avec sa forte teneur en composés phénoliques (Touaibia *et al.*, 2014a, 2014b). Enfin, si l'activité antioxydante et le pouvoir chélateur de l'extrait méthanolique restent inférieurs à ceux des extraits éthanolique et aqueux, Touaibia et Chaouch (2015) ont démontré son activité anti-inflammatoire. Pour cela, une solution de carraghénane a été injectée dans les pattes de plusieurs souris afin de provoquer un œdème. L'extrait méthanolique de *Myrtus nivellei*, injecté à une dose de 400 mg/kg, a montré une activité anti-inflammatoire (œdème inhibé à 80,41 %) similaire à celle du diclofénac (contrôle positif, œdème inhibé à 80,76 %) injecté toutefois à une dose plus faible (50 mg/kg). Nous notons également la composition de l'extrait au méthanol : 348,1 μg eq/mg ES de polyphénols totaux, 152,2 μg eq/mg ES de flavonoïdes, 38,5 μg eq/mg ES de flavonols, 155,3 μg eq/mg ES de tanins, 17,2 μg eq/mg ES d'anthocyanes et 2,3 μg eq/mg ES de sucres totaux (Touaibia *et al.*, 2014b).

Enfin, une seule étude (Touaibia et Chaouch, 2014b) postérieure à notre article publié dans *Journal of Ethnopharmacology* (Bouzabata *et al.*, 2013b), décrit la composition chimique de l'huile essentielle. Dans cet article, l'huile essentielle a été obtenue par distillation à la vapeur des feuilles et des tiges de *Myrtus nivellei* collectées dans le massif de Tassili n'Ajjer, avec un rendement de 0,29 %. L'analyse de sa composition chimique par CPG-SM a mis en évidence la présence majoritaire de δ -élémane (15,7 %), d' α -terpinéol (13,0 %), de 1,8-cinéole (12,1 %) et de citral (11,7 %, mélange d'isomères).

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude était double :

- contribuer à la caractérisation chimique par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ^{13}C de l'huile essentielle de *Myrtus nivellei*, jamais décrite jusqu'alors, en prenant part à un projet commun associant trois universités : Annaba (étude ethnopharmacologique), Corse (détermination de la composition chimique avec étude structurale de molécules présentes à des teneurs non négligeables et absentes de nos bibliothèques de spectres) et Coimbra (activités antifongiques et cytotoxiques) ;
- étudier les huiles essentielles de *Myrtus communis* du pourtour méditerranéen au travers de leur composition chimique et de leur aspect olfactif, en portant une attention particulière aux composés oxygénés minoritaires, notamment des esters à chaîne courte.

A. *Myrtus nivellei* Batt. et Trab.

Ce paragraphe est consacré au myrte endémique du Sahara, *Myrtus nivellei*. Nous développerons principalement les travaux qui concernent l'identification de deux molécules nouvelles présentes dans l'huile essentielle de *Myrtus nivellei*.

Pour la première fois, la caractérisation chimique de l'huile essentielle de *Myrtus nivellei* a été réalisée, et ce par combinaison de techniques chromatographiques (CC, CPG(Ir)) et spectroscopiques (SM, RMN ^{13}C et RMN 2D). La composition chimique détaillée de 10 échantillons provenant de deux stations différentes situées dans le Sahara central (massifs de Tassili et du Hoggar) a ainsi été décrite. Notre contribution a résidé dans le fractionnement de l'huile essentielle brute afin de mener à bien la séparation et l'identification de deux molécules qui n'avaient, jusqu'alors, jamais été citées ou décrites dans la littérature.

L'ensemble des résultats obtenus a ensuite permis de réaliser une étude susceptible de mettre en évidence une variabilité chimique et enfin, de s'intéresser au potentiel biologique de cette huile essentielle, ce qui n'avait jamais été réalisé auparavant.

I. Caractérisation chimique de l'huile essentielle de *Myrtus nivellei* Batt. & Trab.

I.1. Analyse détaillée d'un échantillon d'huile essentielle de feuilles de *M. nivellei*.

Parmi la dizaine d'échantillons étudiés provenant de deux stations différentes, notre choix pour mener à bien la caractérisation chimique de l'huile essentielle de feuilles de *Myrtus nivellei* s'est porté sur TAS2 (Massif du Tassili), en raison de la quantité disponible mais également de sa teneur importante en composés à isoler et identifier (A et B).

L'analyse par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ^{13}C de l'huile essentielle de feuilles de *M. nivellei* a conduit à l'identification de 22 composés, représentant 89,3 % de la composition chimique globale (**Tableau III.1 p.152**). Il s'agit en large majorité de composés monoterpéniques avec le 1,8-cinéole (37,5 %) et le limonène (25,0 %) identifiés comme composés majoritaires, mais aussi d'autres composés présents à des teneurs appréciables tels que : l'acétate de géranyle (5,1 %), l' α -terpinéol (5,0 %), l'acétate de linalyle (4,2 %), l'acétate d' α -terpinyle (3,8 %) et l' α -pinène (3,2 %). Cependant, nous remarquons sur l'ensemble des analyses la présence de deux composés absents de nos bibliothèques de

spectres « Terpènes » et « Littérature », que nous noterons A ($Ir^a/Ir^p = 1582/2179$) et B ($Ir^a/Ir^p = 1594/2270$) dans un premier temps, à des teneurs respectives de 4,3 % et 0,9 %. Afin de parvenir à leur identification, nous avons procédé à plusieurs fractionnements successifs de l'échantillon TAS2 (**Figure III.6 p.147**) par chromatographie sur colonne ouverte de silice de faible granulométrie (63-200 μm).

1.1.1. Fractionnement de l'huile essentielle brute

Une masse de 1,055 g d'huile essentielle de feuilles de *Myrtus nivellei* a été fractionnée sur colonne ouverte de silice (63-200 μm , 20,5 g) en utilisant un gradient pentane/oxyde de diéthyle de polarité croissante (100/0, 98/2, 0/100) (**Figure III.6 p.147**). Nous avons ainsi isolé 2 fractions hydrocarbonées (F1, 159 mg et F2, 61 mg) et 2 fractions oxygénées (F3, 98/2, 501 mg et F4, 0/100, 334 mg) qui ont été analysées par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ^{13}C .

L'analyse des fractions hydrocarbonées F1 et F2 a permis d'identifier le (*Z*)- β -ocimène (F2, 0,4% ; HE, 0,1 %) et de confirmer l'identification des monoterpènes et d'un sesquiterpène hydrocarbonés, identifiés préalablement par CPG-SM mais présents à des teneurs inférieures à 0,4 % dans l'huile essentielle globale (**Tableau III.1 p.152**).

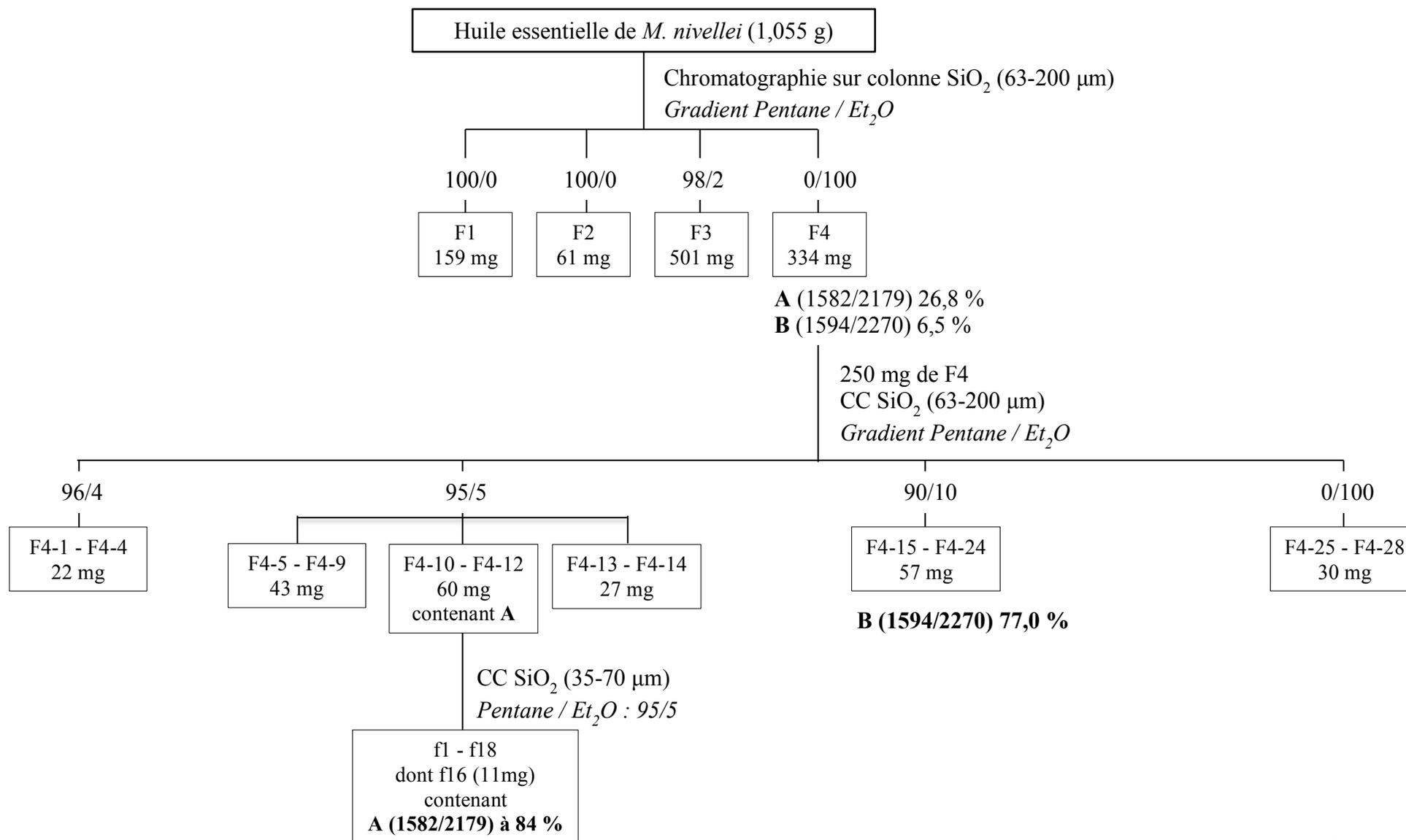
En ce qui concerne la fraction F3, élue avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle 98/2, son analyse a simplement permis la confirmation des différents monoterpènes oxygénés déjà identifiés dans l'huile essentielle (**Tableau III.1 p.152**).

Enfin, la fraction F4 est celle qui a le plus attiré notre attention. En effet, élue à l'oxyde de diéthyle, elle est celle dans laquelle nous sommes parvenus à concentrer les composés A ($Ir^a/Ir^p = 1582/2179$; 26,8 %) et B ($Ir^a/Ir^p = 1594/2270$; 6,5 %) que nous cherchions à identifier. Nous y avons également identifié le géraniol (F4, 1,5 % ; HE, 0,1 %). Néanmoins, afin de concentrer davantage A et B pour mener à bien une analyse structurale par RMN bidimensionnelle, nous avons de nouveau procédé à un fractionnement d'une partie de F4 (250 mg) sur colonne ouverte de silice (63-200 μm) avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle de polarité croissante (96/4-0/100) (**Figure III.6 p.147**). Vingt-huit fractions (F4.1-F4.28) ont ainsi été éluées et analysées par CPG(Ir) et RMN ^{13}C . Le composé B a été concentré dans la fraction F4-23 (P/E : 90/10, 5 mg) à 77 % et le composé A était présent dans les fractions F4-10 à F4-12 (P/E : 95/5, 19-20 mg chacune). Aussi, ces trois fractions

(F4-10, F4-11 et F4-12) ont été réunies et de nouveau fractionnées sur une colonne ouverte de silice d'une granulométrie plus fine (35-70 μm) (**Figure III.6 p.147**). Dix-huit fractions (f1-f16) ont été éluées parmi lesquelles f16 (P/E : 95/5, 11mg) contenant **A** à 84 %.

Ainsi, afin d'identifier les composés **A** et **B**, nous avons mené une étude par RMN bidimensionnelle sur les fractions f16 (**A**, 84 %) et F4.23 (**B**, 77 %), que nous détaillons dans la suite de ce paragraphe. La présence de composés minoritaires au sein de ces fractions n'a pas été un obstacle à l'élucidation structurale.

Figure III.6 : Schéma de fractionnement de l'huile essentielle de *M. nivellei* (TAS2).



- *Identification des composés A et B par RMN bidimensionnelle.*

* **Composé A**

L'analyse de la sous fraction f16 par CPG(Ir) montre la présence du composé A majoritaire à 84 % et ayant pour couple d'indices de rétention $Ir^a/Ir^p = 1582/2179$. Le spectre de RMN ^{13}C de cette fraction laisse apparaître 15 raies de résonance de forte intensité appartenant au composé recherché. La séquence DEPT nous a permis de distinguer :

- v) 5 atomes de carbone quaternaires dont 1 éthylénique ($\delta = 131,34$ ppm) ;
- vi) 3 méthines dont 1 éthylénique ($\delta = 130,07$ ppm) ;
- vii) 1 méthylène aliphatique ($\delta = 39,33$ ppm) et
- viii) 6 méthyles ($\delta = 18,59 ; 20,94 ; 24,03 ; 24,45 ; 26,72$ et $27,17$ ppm).

Nous notons également la présence d'une fonction cétone ($\delta = 215,46$ ppm) et d'une fonction ester ($\delta = 170,73$ ppm). Plus précisément, les valeurs de déplacements chimiques déblindés à 81,15 et 77,26 ppm confirment l'existence d'un groupement acétate (méthyle avec $\delta_C=20,94$ ppm et $\delta_H=2,17$ ppm) et suggèrent la présence d'une autre fonction oxygénée, à savoir un alcool. Ces informations nous permettent d'avancer la formule brute $C_{15}H_{24}O_4$, confirmée par l'analyse CPG-SM-TOF qui donne pour A une masse exacte $m/z=268,1684$ (valeur calculée : 268,1668). Nous en déduisons ainsi la présence de 4 centres d'insaturation parmi lesquels une fonction cétone, une fonction ester, une double liaison trisubstituée, la quatrième insaturation correspondant à un cycle. D'autre part, le motif 3-méthylbutoxy $[-CO-CH_2-CH(CH_3)_2]$, courant dans les composés naturels, est mis en évidence par la présence de signaux caractéristiques sur les spectres de RMN ^{13}C et RMN 1H , et confirmé par les corrélations $^1H-^{13}C$ observées sur le spectre HMBC (**Tableau III.2, Figure III.7**). Il reste ainsi 3 groupements méthyle et par déduction, un motif cyclopentène substitué. La mise en œuvre des séquences de RMN 2D (COSY, HMBC) nous indique que l'ensemble des groupements fonctionnels (acétate, 3-méthylbutoxy, alcool) ainsi que les trois méthyles sont rattachés au cyclopentène (**Tableau III.2, Figure III.7**). Le composé A a ainsi été identifié comme étant le 1-hydroxy-1-(3-méthylbutoxy)-2-acétoxy-3,5,5-triméthyl-3-cyclopentène. En revanche, ni les valeurs des déplacements chimiques des 1H et ^{13}C , ni les corrélations spatiales $^1H-^{13}C$ du spectre NOESY (aucune information supplémentaire apportée) ne nous ont permis de déterminer la stéréochimie des groupements oxygénés présents dans le composé A.

Figure III.7 : Structure du composé A et principales corrélations ^1H - ^{13}C observées sur le spectre HMBC.

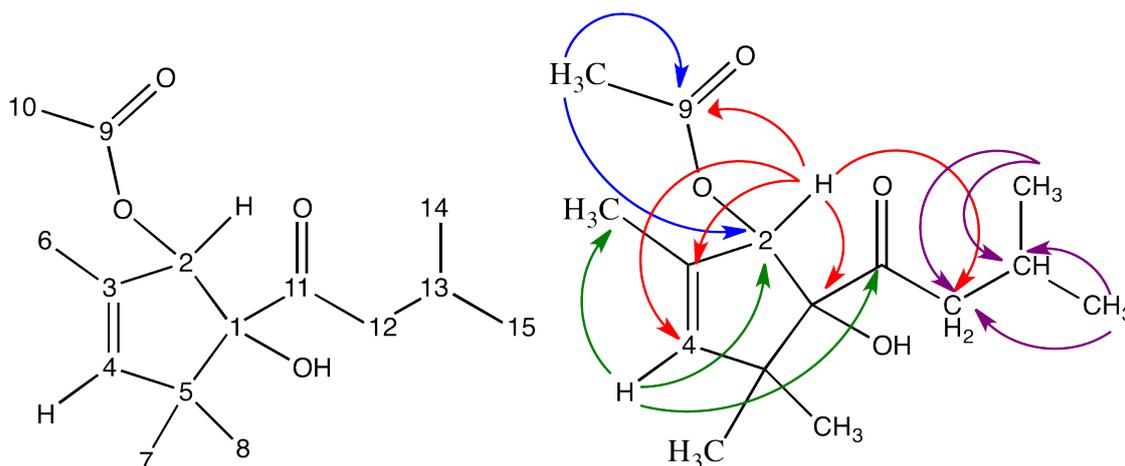


Tableau III.2 : Données RMN ^1H et ^{13}C relatives au composé A.

C	$\delta(^{13}\text{C})$	DEPT	$\delta(^1\text{H})$	Proton	Multiplicité (J, Hz)	COSY ^1H - ^1H	HMBC (H \rightarrow C)
C1	81,15	C					
C2	77,26	CH	5,62		m	4, 6	1, 3, 4, 9, 12
C3	131,34	C					
C4	130,07	CH	5,36		m	2, 6	2, 5, 6, 7, 11
C5	44,32	C					
C6	18,59	CH ₃	1,68		t (1,3)	2, 4	2, 3, 4, 8
C7	27,17	CH ₃	1,26		s		4, 5, 8, 11
C8	26,72	CH ₃	1,24		s		1, 4, 5, 7, 11
C9	170,43	C					
C10	20,94	CH ₃	2,17		s		2, 9
C11	215,46	C					
C12	39,33	CH ₂	1,87	a	dd (14,7 ; 8,6)	12b, 13	1, 2, 11, 13, 14
			1,78	b	dd (14,7 ; 4,0)	12a, 13	1, 2, 11, 13, 14
C13	24,26	CH	1,50		m	12, 14, 15	
C14	24,03	CH ₃	0,97		d (6,7)	13	12, 13
C15	24,45	CH ₃	0,83		d (6,7)	13	12, 13

δ : ppm ; J : Hz ; d : doublet ; t : triplet ; m : multiplet ; dd : doublet de doublet

*** Composé B**

L'analyse de la sous fraction F4-23 par CPG(Ir) montre la présence du composé B majoritaire à 77 % et ayant pour couple d'indices de rétention $Ir^a/Ir^p = 1594/2270$. Le spectre de RMN ^{13}C de cette fraction laisse apparaître 15 raies de résonance de forte intensité appartenant au composé recherché. La séquence DEPT nous a permis de distinguer :

- i) 6 atomes de carbone quaternaires dont 2 éthyléniques ($\delta = 130,87$ et $141,98$ ppm) ;
- ii) 3 méthines dont 2 éthyléniques ($\delta = 120,41$ et $130,54$ ppm) et
- iii) 6 méthyles ($\delta = 18,56$; $18,64$; $20,99$; $25,99$; $26,89$ et $27,92$ ppm).

L'observation des valeurs des déplacements chimiques sur les spectres 1H et ^{13}C , ainsi que la masse exacte $m/z=266,1552$ mesurée par CPG-SM-TOF (valeur calculée : $266,1512$), nous ont permis de déduire la formule brute du composé B comme étant $C_{15}H_{22}O_4$. Ces informations nous permettent de dire dans un premier temps que la formule du composé B ne diffère de celle du composé A que par la perte de deux atomes d'hydrogène. D'autre part, l'examen des spectres 1H et ^{13}C montre une similarité de la plupart des valeurs du composé B avec celle du composé A et met en évidence la présence d'une double liaison supplémentaire ($\delta=120,41$ et $141,98$ ppm). Le groupement acétate (valeurs $\delta=170,73$ et $77,90$ ppm avec un méthyle $\delta_C=20,94$ ppm et $\delta_H=2,17$ ppm), la fonction alcool ($79,48$ ppm) et les trois groupements méthyle ($\delta = 18,64$; $25,99$ et $27,92$ ppm) sont présents. Seul le motif 3-méthylbutoxy observé dans le composé A n'est pas retrouvé dans le composé B. En revanche, les valeurs des déplacements chimiques en RMN 1H et RMN ^{13}C , associées aux corrélations observées sur le spectre HMBC, mettent en évidence la présence d'un motif isopentényloxy. En effet, nous observons :

- d'une part, la présence d'un motif isopentényl ($\delta=120,41$ et $141,98$ ppm pour la double liaison, $\delta=18,56$ et $26,89$ pour les méthyles et corrélation des protons H14 et H15 avec H12) ;
- d'autre part, une fonction carbonyle avec une valeur de déplacement chimique de $211,80$ ppm, plus blindée que dans le composé A ;
- enfin, les corrélations du proton H12 avec les carbones C11, C14 et C15 nous permettent de déduire le motif isopentényloxy, et sa corrélation avec C1 nous indique que ce motif est directement relié au cyclopentène.

Plus largement, l'ensemble des corrélations observées sur le spectre HMBC (**Tableau III.3, Figure III.8**) de la sous fraction nous permettent de dire que, de la même façon que pour le composé A, les différentes fonctions et motifs sont reliés directement au cyclopentène.

Le composé B a ainsi été identifié comme étant le 1-hydroxy-1-(3-méthyl-2-buténoxy)-2-acétoxy-3,5,5-triméthyl-3-cyclopentène. Pour les mêmes raisons que pour le composé A, nous n'avons pu conclure quant à la stéréochimie des groupements fonctionnels (spectre NOESY non concluant).

Figure III.8 : Structure du composé B et principales corrélations ^1H - ^{13}C observées sur le spectre HMBC.

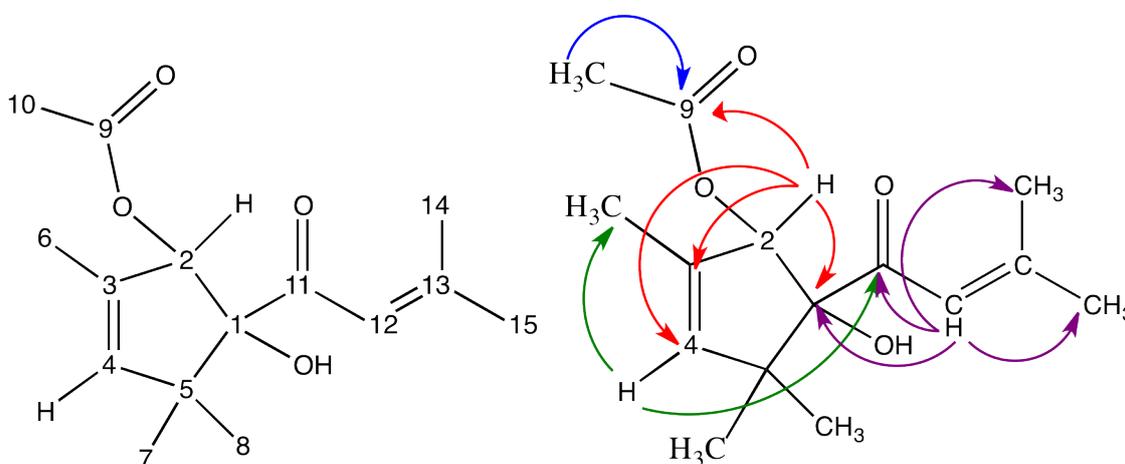


Tableau III.3 : Données RMN ^1H et ^{13}C relatives au composé B.

C	$\delta(^{13}\text{C})$	DEPT	$\delta(^1\text{H})$	Multiplicité (J)	COSY ^1H - ^1H	HMBC (H→C)
C1	79,48	C				
C2	77,90	CH	5,55	m	4, 6	1, 3, 4, 9
C3	130,87	C				
C4	130,54	CH	5,33	m	2, 6	2, 5, 6, 11
C5	45,02	C				
C6	18,64	CH ₃	1,72	t (1,3)	2, 4	2, 3, 4, 8
C7	27,92	CH ₃	1,21	s		4, 5, 8, 11
C8	25,99	CH ₃	1,16	s		4, 5, 7, 11
C9	170,73	C				
C10	20,99	CH ₃	2,17	s		9
C11	211,80	C				
C12	120,41	CH	5,55	m	14, 15	1, 11, 14, 15
C13	141,98	C				
C14	18,56	CH ₃	1,57	d (1,3)	12	11, 12, 13, 15
C15	26,89	CH ₃	1,74	d (1,3)	12	11, 12, 13, 15

δ : ppm ; J : Hz ; d : doublet ; t : triplet ; m : multiplet

Tableau III.1 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Myrtus nivellei* (TAS2)

	Composés	Ir ^a	Ir ^p	HE %	Identification
1	α -Thujène	923	1013	tr	Ir, SM, RMN ¹³ C
2	α -Pinène	930	996	3,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
3	β -Pinène	971	1114	0,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
4	Myrcène	981	1163	0,2	Ir, SM
5	α -Phellandrène	997	1168	0,1	Ir, SM, RMN ¹³ C
6	δ -3-Carène	1005	1151	0,1	Ir, SM, RMN ¹³ C
7	α -Terpinène	1009	1183	0,1	Ir, SM, RMN ¹³ C
8	<i>p</i> -Cymène	1011	1273	0,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
9	1,8-Cinéole*	1020	1213	37,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
10	Limonène*	1021	1204	25,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
11	(<i>Z</i>)- β -Ocimène	1025	1235	0,1	Ir, RMN ¹³ C
12	(<i>E</i>)- β -Ocimène	1036	1252	0,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
13	γ -Terpinène	1048	1248	0,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
14	Terpinolène	1079	1285	0,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
15	Linalol	1082	1544	1,7	Ir, SM, RMN ¹³ C
16	Terpinèn-4-ol	1161	1600	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
17	α -Terpinéol	1172	1693	5,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
18	Géranol	1233	1829	0,1	Ir, RMN ¹³ C
19	Acétate de linalyle	1239	1556	4,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
20	Acétate d' α -terpinyne	1332	1694	3,8	Ir, SM, RMN ¹³ C
21	Acétate de néryle	1341	1725	0,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
22	Acétate de géranyle	1359	1755	5,1	Ir, SM, RMN ¹³ C
23	(<i>E</i>)- β -Caryophyllène	1417	1596	0,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
24	α -Humulène	1451	1665	0,4	Ir, RMN ¹³ C
25	Composé A	1582	2179	4,3	Ir, SM, RMN [†]
26	Composé B	1594	2270	0,9	Ir, SM, RMN [†]
	Total			94,7	

Les pourcentages sont mesurés sur colonne apolaire. Ceux notés d'un astérisque (*) sont mesurés sur colonne polaire car les composés coéluent sur colonne apolaire. [†] Identification RMN 1D et 2D.

II. Etude de la variabilité chimique et du potentiel biologique de l'huile essentielle de *M. nivellei*.

Afin de mettre en évidence l'existence ou l'absence d'une variabilité chimique, la composition chimique de 10 échantillons a été étudiée. Ceux-ci ont été isolés à partir de plants poussant dans deux stations distinctes du Sahara central, Djanet (massif de Tassili N'Ajjer, échantillons TAS1-TAS5) et Tamanrasset (massif du Hoggar, échantillons TAM1-TAM5). Tous ont été analysés par CPG(Ir) et RMN ¹³C, selon la méthode développée au laboratoire. Au total, 26 composés représentant 77,3 % à 94,7 % de la composition chimique totale ont été identifiés. Tous présentent la même composition chimique, dominée par le 1,8-cinéole (33,6-50,4 %) et le limonène (17,5-25,0 %), et contiennent les deux nouveaux composés A et

B à des teneurs non négligeables. Nous notons que leur teneur est nettement plus importante dans les échantillons du massif du Hoggar (A : 4,8-9,8 % ; B : 1,0-2,1 %) que dans ceux du massif de Tassili N-Ajjer (A : 2,4-4,5 % ; B : 0,4-0,9 %) (**Tableau III.4**).

Tableau III.4 : Principaux constituants des huiles essentielles de feuilles de *Myrtus nivellei*.

Composés	TAS 1-5				TAM 1-5			
	Min.	Max.	Moy.	ET	Min.	Max.	Moy.	ET
α -Pinène	2,9	3,3	3,1	0,2	3,6	5,8	5,2	1,0
<i>p</i> -Cymène	0,6	0,7	0,6	0,0	0,9	1,0	0,9	0,0
1,8-Cinéole*	36,6	50,4	43,9	6,3	33,6	40,7	39,0	3,7
Limonène*	17,5	25,0	20,5	3,7	18,8	20,6	19,9	1,4
γ -Terpinène	0,0	0,6	0,4	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0
Linalol	0,7	1,7	1,1	0,5	0,6	1,0	0,8	0,1
Terpinèn-4-ol	0,5	0,6	0,5	0,1	0,3	0,3	0,3	0,0
α -Terpinéol	3,5	5,2	4,4	0,8	4,7	5,5	5,0	0,3
Acétate de linalyle	1,7	4,2	2,8	1,3	1,5	2,1	1,6	0,3
Acétate d' α -terpinyle	3,6	7,8	5,7	2,0	3,6	4,7	4,0	0,4
Acétate de géranyle	5,0	5,3	5,1	0,1	3,2	4,1	3,6	0,4
(<i>E</i>)- β -Caryophyllène	0,2	0,2	0,2	0,0	0,4	0,6	0,5	0,1
α -Humulène	0,3	0,4	0,4	0,0	0,8	1,3	1,0	0,2
Composé A	2,4	4,5	3,4	0,9	4,8	9,8	6,7	2,0
Composé B	0,4	0,9	0,6	0,3	1,0	2,1	1,5	0,4

Les pourcentages des composés sont mesurés sur colonne apolaire (BP-1), excepté pour les composés notés d'un astérisque (% mesurés sur colonne polaire, BP-20). Moy. : % Moyens, ET : Ecart Type.

Ainsi, la composition chimique de l'huile essentielle de *Myrtus nivellei* diffère de celle de *Myrtus communis* (quel que soit le groupe). Elle diffère aussi de celle décrite par Touaibia et Chaouch, qui ne comporte cependant que 8 composés dont le δ -élémane (15,7 %), l' α -terpinéol (13,0 %) et 1,8-cinéole (12,1 %). La somme des composés identifiés dépasse 90 % mais nous notons des incohérences: citral (11,7 %, mélange d'isomères ?) ou encore 1,2-« benzenediol,3,5-bis », nom qui semble tronqué. Le limonène n'a pas été cité et les deux nouveaux composés A et B ne sont pas non plus identifiés. Cette publication semble souffrir de graves lacunes dans le domaine de l'identification des molécules et ne paraît pas fiable.

Pour notre part, les deux nouveaux composés A et B, absents dans les huiles essentielles de *M. communis*, peuvent être considérés comme des marqueurs potentiels de l'espèce *M. nivellei*.

D'un point de vue activité biologique, nos partenaires de l'université de Coimbra au Portugal ont montré que l'huile essentielle de *Myrtus nivellei* présente une activité antifongique sur *Cryptococcus neoformans* (CMI=0,16 $\mu\text{L}/\text{mL}$; CML=0,32 $\mu\text{L}/\text{mL}$), principal agent responsable des méningo-encéphalites d'origine fongique. Elle est également active sur des dermatophytes, particulièrement *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum* et *Epidermophyton floccosum* (CMI et CML=0,64 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Ces résultats sont cohérents avec l'utilisation traditionnelle de *Myrtus nivellei* par les Touaregs pour soigner les problèmes de peau.

B. *Myrtus communis* L.

En Corse, *Myrtus communis* L. fait partie des 23 espèces exploitées en tant que Plantes à Parfum Aromatiques et Médicinales (PPAM). Ce secteur (18 exploitations) bénéficie d'une très bonne image de marque autour de deux produits phares (l'immortelle et le romarin) ainsi que d'une ressource végétale diversifiée et spécifique. La production d'huiles essentielles, entièrement certifiée Agriculture Biologique, est largement réalisée à partir de plantes spontanées, mais elle s'étend également aux plantes et aux arbres introduits. L'huile essentielle de myrte, préparée à partir des parties aériennes, possède une odeur très agréable. Elle est exploitée pour ses propriétés médicinales (antibactérienne, antiseptique, etc.) et rentre également dans la composition de cosmétiques (soins du corps et du visage).

Malgré des compositions chimiques différentes (voir p.138-140), l'huile essentielle de *M. communis* possède une odeur caractéristique, y compris pour les échantillons riches en acétate de myrtényle. Cette odeur typique est marquée notamment par la présence de composés majoritaires comme l' α -pinène, le 1,8-cinéole, ou encore le limonène, l'acétate de myrtényle et le linalol. La présence majoritaire d'acétate de myrtényle dans certaines huiles essentielles, notamment en provenance d'Espagne, du Portugal et du Maroc (voir p.138-140), pourrait expliquer cette note olfactive. Cependant, certains échantillons sont caractérisés par une très faible teneur (voir une absence) en acétate de myrtényle (échantillons de Corse, Tunisie, Algérie, Sardaigne, etc.) et possèdent tout de même l'odeur typique de l'huile essentielle de myrte. Lawrence (2002) s'est d'ailleurs demandé si de telles huiles pouvaient être quand même commercialisées comme des huiles essentielles de myrte. Il ne fait aujourd'hui plus aucun doute que ces huiles essentielles de *Myrtus communis*, dépourvues d'acétate de myrtényle, ont non seulement leur place sur le marché des huiles essentielles, mais sont surtout très appréciées. Ainsi, malgré une base commune, cette odeur se décline sous différentes variantes, manifestement imputables à la présence de composés minoritaires, parmi lesquels les esters. D'ailleurs, dans une étude de 2006, les auteurs indiquent que les composés minoritaires et plus particulièrement des acétates monoterpéniques participent probablement à la note fruitée de l'odeur de l'huile essentielle de myrte du Maroc (Farah *et al.*, 2006). Parmi les acétates monoterpéniques identifiés dans les huiles essentielles de myrte, les plus fréquemment cités sont les acétates de linalyle, de bornyle, d' α -terpinyle et de géranyle, dont les teneurs sont appréciables et varient selon l'échantillon. Ces composés contribuent vraisemblablement à cette note olfactive. D'autres esters que des acétates sont cités ponctuellement à des teneurs moindres. Ainsi, dès 1970, Lawrence *et al.* identifient

plusieurs esters monoterpéniques dans une huile essentielle de myrte d'Espagne : les isobutyrate de géranyle et de myrtényle ainsi que les 2-méthylbutyrate de géranyle et de myrtényle. Depuis lors, d'autres esters monoterpéniques ont été reportés dans certaines huiles essentielles de myrte, parfois par erreur si l'on observe l'ordre d'élution des constituants identifiés.

Nous avons recensé dans la littérature une centaine de publications qui décrivent la composition chimique des huiles essentielles de myrte de diverses origines. Au total, près de 300 composés y sont reportés, principalement des monoterpènes mais également des molécules à chaîne courte, des sesquiterpènes et des phénylpropanoïdes à des teneurs moindres, voire à l'état de trace. Si l' α -pinène, le 1,8-cinéole, le linalol, le limonène, l' α -terpinéol, l'acétate de géranyle, l'acétate de myrtényle et l'isobutyrate d'isobutyle sont les composés les plus fréquemment identifiés, d'autres ne sont cités, à l'inverse, que très ponctuellement, que ce soit des sesquiterpènes oléfiniques ou des esters à chaîne courte. Or, tous ces esters, terpéniques ou non, et particulièrement les esters à chaîne courte, très volatils, sont susceptibles de contribuer significativement à la note de tête (odeur florale, odeur sucrée) de l'huile essentielle de myrte.

L'objectif de ce travail était donc d'appréhender la composition chimique des huiles essentielles de myrte de Corse et d'autres provenances, en accordant une importance particulière aux composés oxygénés minoritaires comme les esters qui peuvent contribuer à l'odeur de cette huile essentielle, notamment au niveau de la note de tête. Afin de mener à bien notre étude, nous avons mis à profit la complémentarité de différentes techniques chromatographiques et spectroscopiques (CC, CPG(Ir), CPG-SM, CPG-O et RMN ^{13}C).

Dans une première partie, nous détaillerons l'analyse d'un échantillon d'huile essentielle de myrte de Corse par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ^{13}C , après fractionnement sur colonne de silice. La combinaison de ces techniques a notamment permis l'identification de 4 esters à chaînes courtes (8 à 10 carbones).

Dans une seconde partie, nous décrivons la caractérisation chimique de diverses huiles essentielles de myrte de Corse de plusieurs localités du pourtour méditerranéen (Algérie, Maroc, Portugal, Sardaigne, Tunisie), qui a permis de mettre en évidence la présence de ces 4 esters dans tous les échantillons, quel que soit le groupe chimique d'appartenance.

Enfin, dans la dernière partie, nous reportons une caractérisation olfactive de l'huile essentielle de myrte en relation avec la présence des esters minoritaires, réalisée avec le concours de Dr. Patrick Paquet, gérant de la société Corsica Essences. Nous décrivons également une étude préliminaire menée par CPG-Olfactométrie (en collaboration avec le Dr. Nicolas Baldovini, Institut de Chimie de Nice) sur un échantillon commercial de Corse.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication en 2012, parue dans la revue *Flavour and Fragrance Journal* (Bazzali *et al.*, 2012).

I. Analyse détaillée d'un échantillon commercial d'huile essentielle de *Myrtus communis* L. de Corse.

Afin d'étudier de façon précise la composition chimique de l'huile essentielle de myrte, nous avons utilisé la complémentarité de plusieurs techniques analytiques (CPG(Ir), CPG-SM et RMN ^{13}C) et l'avons appliquée à divers échantillons. A titre d'exemple, nous présentons dans cette première partie l'analyse détaillée d'un échantillon d'huile essentielle de feuilles de *M. communis* L. collective qui nous a été fourni par un producteur local (GAEC de l'Astratella, Lumio, échantillon n°1). L'interrogation de la bibliothèque de spectres « Terpènes » du laboratoire nous a permis d'identifier 15 composés représentant 90,6 % de la composition globale. Cet échantillon contient deux composés majoritaires, en accord avec les analyses réalisées antérieurement à l'Université de Corse (Bradesi *et al.*, 1997 ; Paolini *et al.*, 2008) : l' α -pinène (42,8 %) et le 1,8-cinéole (25,4 %). Les 13 composés restants sont tous présents à des teneurs inférieures à 5,0 % chacun : l'acétate de géranyle (4,8 %), le linalol (3,9 %), le limonène (3,5 %), l' α -terpinéol (2,5 %), le (*E*)- β -caryophyllène (1,7 %), le méthyleugénol (1,2 %), le *p*-cymène (1,1 %), le β -pinène (0,5 %), l'acétate de linalyle (0,8 %), l'acétate d' α -terpinyle (0,8 %), l' α -humulène (0,7 %), l'oxyde de caryophyllène (0,5 %) et l'isobutyrate d'isobutyle (0,4 %).

L'analyse de ce même échantillon par CPG-SM, en combinaison avec les indices de rétention, a permis d'identifier 5 composés supplémentaires minoritaires, principalement des monoterpènes, représentant 1,2 % de la composition chimique totale. Il s'agit de du δ -3-carène (0,2 %), du camphre (0,1 %), du méthylchavicol (0,2 %), de la verbénone (0,4 %) et d'un sesquiterpène, le β -élémente (0,3 %). Nous notons cependant que pour le (*E*)- β -caryophyllène, sesquiterpène préalablement identifié par RMN ^{13}C , la CPG-SM propose prioritairement le γ -caryophyllène (à tort).

Au total, 20 composés (soit 91,8 %) ont été identifiés dans cette huile essentielle commerciale de *Myrtus communis*. Cependant :

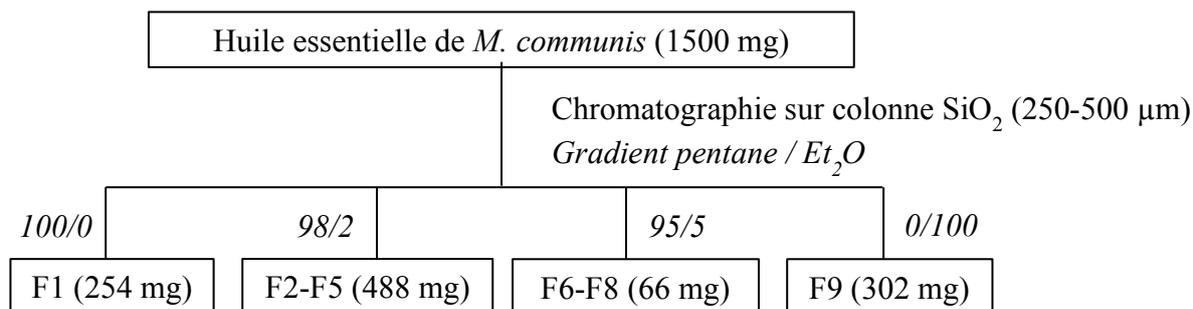
- l'identification de certains composés minoritaires uniquement identifiés par CPG-SM reste à confirmer, les notes de concordances obtenues n'étant pas satisfaisantes ;
- on observe la présence de divers composés non identifiés sur le chromatogramme qui se traduit par la présence de signaux non attribués sur le spectre RMN ^{13}C du mélange.

Concernant ce dernier point, la valeur des indices de rétention des composés non identifiés sur colonnes apolaire et polaire laisse supposer que certains de ces composés sont probablement des monoterpènes et des sesquiterpènes déjà décrits dans les huiles essentielles de myrte, d'autres méritent cependant plus d'attention. Aussi, nous nous sommes proposés de réaliser un fractionnement de cette huile essentielle sur colonne ouverte de silice. Nous pouvons espérer que certains composés minoritaires soient ainsi concentrés dans une fraction, ce qui permet une meilleure observation de leurs déplacements chimiques en RMN ^{13}C .

I.1. Fractionnement de l'huile essentielle commerciale

Nous avons mis en œuvre une chromatographie sur colonne ouverte de silice flash (250- 500 μm), à partir de 1,5 g d'huile essentielle, en utilisant un gradient d'élution pentane/oxyde de diéthyle de polarité croissante : 100/0 (F1), 98/2 (F2-F5), 95/5 (F6-8), 0/100 (F9) (**Figure III.9**). Chacune des 9 fractions obtenues a ensuite été analysée par CPG(Ir) et RMN ^{13}C .

Figure III.9 : Schéma de fractionnement de l'échantillon commercial d'huile essentielle de *M. communis* provenant de Corse.



1.1.1. Etude de la fraction hydrocarbonée (F1)

L'étude de la fraction hydrocarbonée F1 (100 % pentane) a permis de confirmer l'identification des monoterpènes et sesquiterpènes oléfiniques. Aucun composé supplémentaire n'a été identifié. L'ensemble des hydrocarbures présents dans cet échantillon représente 50,8 % de la composition chimique globale (**Tableau III.5 p.165**).

1.1.2. Etude des fractions oxygénées (F2-F9)

Les fractions F3 et F4, éluées avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle (98/2) sont marquées par la présence majoritaire d'un oxyde et d'un ester terpéniques : le 1,8-cinéole (F3, 64,5 % et F4, 72,7 %) et l'acétate de géranyle (F3, 22,1 % et F4, 23,0 %), déjà identifiés dans l'huile essentielle globale. Un acétate supplémentaire a été identifié : l'acétate de bornyle (F3, 2,1 % et HE, 0,4 %). Nous notons d'ailleurs que l'analyse de l'huile essentielle brute par CPG-SM proposait, à tort et avec un très bon score, l'acétate d'isobornyle à la place de l'acétate de bornyle. Enfin, l'étude de la fraction F3 permet de confirmer la présence des acétates de linalyle et d' α -terpinyle (**Tableau III.5 p.165**).

L'analyse de la fraction F5 (pentane/oxyde de diéthyle, 98/2) met en évidence, à côté de l'acétate de géranyle (F5, 17,9 % ; HE, 4,8 %), la tridécan-2-one (F5, 20,7 % ; HE, tr), une cétone linéaire qui n'avait pu être identifiée dans l'huile essentielle globale.

Les fractions F6, F7 et F8, éluées avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle (95/5), sont marquées par la prédominance soit d'oxydes sesquiterpéniques (oxyde d'humulène, F6, 15,7 % et oxyde de caryophyllène, F6, 51,6 %), soit du méthyleugénol (F7, 82,2 % et F8, 72,4 %). L'oxyde d'humulène n'avait pas pu être identifié dans l'huile essentielle brute en raison de sa faible teneur de 0,1 %. L'étude de ces fractions a permis de confirmer la présence du linalol et d'identifier deux composés carbonylés monoterpéniques supplémentaires, la carvone (F6, 4,2 % et F7, 3,4 % ; HE, tr) et le géraniol (F8, 3,2 % ; HE, tr), ainsi qu'un alcool monoterpénique, le terpinèn-4-ol (F8, 4,6 % ; HE, 0,3 %) (**Tableau III.5 p.165**).

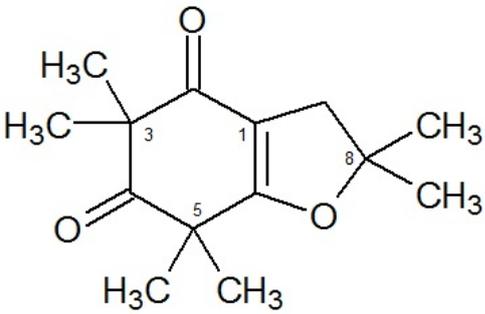
Enfin, deux fractions ont attiré tout particulièrement notre attention, la fraction F9 éluée à l'oxyde de diéthyle et de la fraction F2 éluée avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle, 98/2.

- **Fraction F9 :**

Dans cette fraction, l'analyse par RMN ^{13}C et CPG(Ir) a permis d'identifier cinq alcools et une cétone terpéniques, quatre d'entre eux n'avaient pu l'être directement dans l'huile essentielle globale en raison de leur trop faible teneur : le *trans*-pinocarvéol (F9, 3,3 % ; HE, 0,2 %), le *trans*-verbénol (F9, 5,4 % ; HE, 0,5 %), le terpinèn-4-ol (F9, 1,9 % ; HE, 0,3 % et également identifié dans F8) et la verbénone (F9, 3,7 % ; HE, 0,4 %, identifiée uniquement par CPG-SM dans l'huile essentielle totale). Par ailleurs, l'interrogation de la bibliothèque de spectres « Littérature » du laboratoire a permis de mettre en évidence la présence d'une dione bicyclique isolée en 1994 dans une huile essentielle de myrte d'Iran par Weyerstahl *et al.* (la 3,3,5,5,8,8-hexaméthyl-7-oxabicyclo[4.3.0]non-1(6)-èn-2,4-dione ; F9, 4,4 % ; HE, 0,6 %). L'analyse de l'huile essentielle brute par CPG-SM n'avait pas permis son identification. En effet, le spectre de masse de cette dione bicyclique est absent des bibliothèques de spectres interrogées et seulement partiellement décrit dans l'article précédemment cité. En revanche, les valeurs des déplacements chimiques des carbones observées dans le spectre de la fraction correspondent parfaitement avec celles de la littérature. Seuls les carbones quaternaires ne sont pas observés (**Tableau III.6**). Les indices de rétention de cette dione, calculés à partir du chromatogramme de la fraction F9 ($\text{Ir}^a/\text{Ir}^p = 1488/2030$) nous permettent d'évaluer sa teneur dans la fraction F9 (4,4 %) et dans l'huile essentielle (0,6 %). L'indice de rétention sur colonne apolaire est proche de celui décrit dans la littérature ($\text{Ir}^a : 1496$; Weyerstahl *et al.*, 1994).

Par ailleurs, nous avons également identifié cette dione bicyclique dans un hydrolat de *Myrtus communis* de Corse où elle constitue le second composé majoritaire (22,1 %) à côté de l' α -terpinéol (25,4 %). Cet hydrolat a été obtenu conjointement à l'échantillon n°10 d'huile essentielle de myrte de Corse. La forte teneur de la dione dans l'hydrolat (22,1 %) permet de relever et de confirmer l'ensemble des valeurs des déplacements chimiques de ses carbones sur le spectre RMN ^{13}C (**Tableau III.6**). Les principaux composés identifiés sont reportés en **Annexe B**.

Tableau III.6 : Structure et valeurs des déplacements chimiques de la 3,3,5,5,8,8-hexaméthyl-7-oxabicyclo[4.3.0]non-1(6)-èn-2,4-dione.

3,3,5,5,8,8-hexaméthyl-7-oxabicyclo[4.3.0]non-1(6)-èn-2,4-dione	C	δ_C (ppm) Weyerstahl <i>et al.</i> , 1994	δ_C (ppm) F9	δ_C (ppm) Hydrolat
	1	176,5	-	176,68
	2	194,9	-	195,02
	3	55,1	55,06	55,07
	3- (Me ₂)	24,2	24,23	24,23
	4	214,0	-	214,01
	5	45,3	45,34	45,34
	5- (Me ₂)	24,6	24,65	24,65
	6	90,8	90,91	90,90
	8	109,4	109,43	109,44
	8- (Me ₂)	28,1	28,09	28,09
	9	39,5	39,55	39,55

- **Fraction F2 :**

L'analyse de cette fraction par RMN ¹³C et CPG(Ir) a permis dans un premier temps, de confirmer la présence de constituants déjà identifiés dans l'huile essentielle ou dans des fractions de chromatographie : isobutyrate d'isobutyle, 1,8-cinéole, acétate de linalyle, acétate d' α -terpinyle et acétate de bornyle. Ont également été identifiés, le méthylchavicol (F2, 4,4 % ; HE, 0,2 %) et l'acétate de fenchyle (F2, 0,8 % ; HE, tr). Néanmoins, 3 composés présents à des teneurs importantes [A : 9,5 % (Ir^a = 983 ; Ir^p = 1173), B : 5,8 % (Ir^a = 996 ; Ir^p = 1193), C : 17,5 % (Ir^a = 1085 ; Ir^p = 1277)], demeurent non identifiés et attirent notre attention. Nous notons d'ailleurs la présence de plusieurs signaux non attribués dans le spectre RMN ¹³C, correspondant vraisemblablement à ces trois produits inconnus. D'après les valeurs des déplacements chimiques de signaux caractéristiques (δ = 177,19 ; 176,81 ; 176,75 ; 70,23 ; 68,82 et 68,73 ppm), il s'agit manifestement de trois esters. L'enregistrement d'un spectre DEPT-135 de cette fraction nous permet de confirmer que les signaux à 70,23 ; 68,82 et 68,73 ppm correspondent à des méthylènes.

Or, dans cette fraction, nous avons identifié un ester à chaîne courte, l'isobutyrate d'isobutyle (6,2 %), présent dans nos bibliothèques de spectres. Les valeurs de ses indices de rétention sur les deux colonnes (Ir^a = 894 et Ir^p = 1088) sont inférieures d'environ 100 points de celles des composés A et B et 200 points de celles du composé C. En conséquence, il est probable que les composés A, B et C soient des esters non cycliques et ramifiés du même type que l'isobutyrate d'isobutyle, mais possédant un carbone de plus pour A et B et deux de plus

pour C. Par ailleurs, l'examen des valeurs des déplacements chimiques de ces trois composés montre qu'il ne s'agit ni d'acétates (absence de signal à 21 ppm), ni de molécules linéaires (absence de signal à 14 ppm). Nous nous orientons donc vers des composés à chaînes ramifiées de quatre ou cinq carbones de part et d'autre de l'oxygène sp³. La présence des motifs suivants est ainsi suggérée :

- deux groupements O-2-méthylbutyle : CH₂ à 68,82 et 68,73 ppm associés à un méthyle à 11,61 ou 11,20 ppm ;
- un groupement O-isobutyle : CH₂ à 70,23 ppm associé à deux méthyles aux alentours de 19 ppm ;
- deux groupements 2-méthylbutyrate : CH à 41,20 et 41,19 ppm associés à un méthyle à 11,61 ou 11,20 ppm ;
- un groupement isobutyrate : CH à 34,08 ppm associé à deux méthyles aux alentours de 19 ppm.

Compte tenu de ces données et en considérant d'une part, l'intensité des signaux de RMN ¹³C caractéristiques et non superposés de ces esters ($\delta = 177,19 ; 176,81 ; 176,75 ; 70,23 ; 68,82$ et $68,73$ ppm), et d'autre part, leur pourcentage mesuré en CPG(Ir), il résulte que les composés A, B et C pourraient être respectivement le 2-méthylbutyrate d'isobutyle, l'isobutyrate de 2-méthylbutyle, et le 2-méthylbutyrate de 2-méthylbutyle.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous nous sommes procuré ces trois esters purs dont nous avons ensuite enregistré les spectres RMN ¹³C et les chromatogrammes respectifs. Ainsi, nous avons pu connaître avec certitude les valeurs des déplacements chimiques de ces trois esters ainsi que leurs indices de rétention sur colonnes apolaire et polaire (**Tableau III.7**). L'attribution des valeurs des déplacements chimiques des carbones a été réalisée par comparaison avec les valeurs de l'isobutyrate d'isobutyle et en tenant compte des effets stériques et électroniques habituels.

Tableau III.7 : Structures et valeurs des déplacements chimiques (ppm) du 2-méthylbutyrate d'isobutyle (A), de l'isobutyrate de 2-méthylbutyle (B) et du 2-méthylbutyrate de 2-méthylbutyle (C), purs, en mélange (A+B+C+ isobutyrate d'isobutyle) et dans la fraction F2.

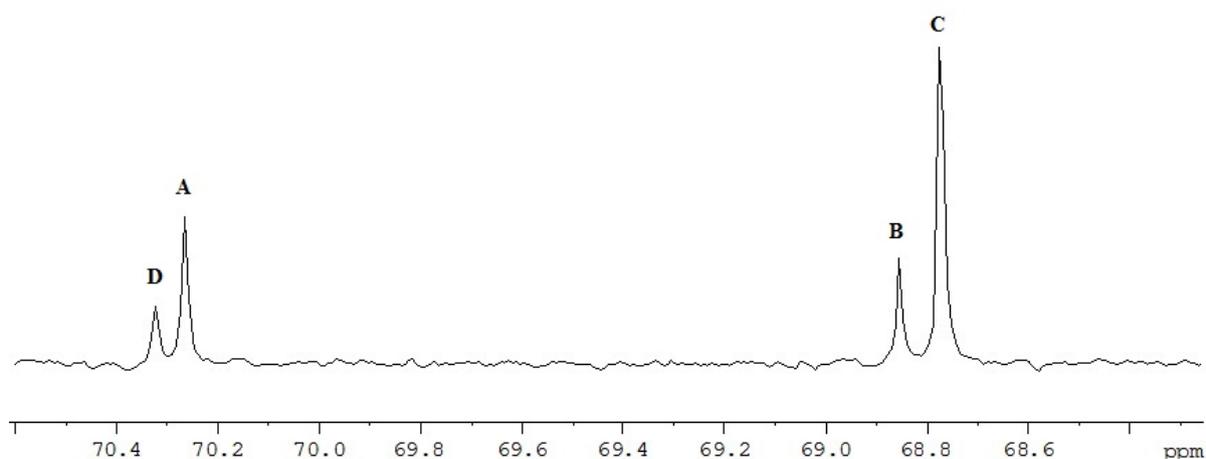
2-méthylbutyrate d'isobutyle (A) Ir ^a /Ir ^p (produit pur) = 991/1182 Ir ^a /Ir ^p (F2) = 983/1173	C	δ_C (ppm) Produit pur	δ_C (ppm) Produit en mélange	δ_C (ppm) F2
	1	176,82	176,79	176,75
	2	41,24	41,26	41,20
	3	26,86	26,85	26,80
	4	11,68	11,66	11,61
	5	16,72	16,69	16,64
	6	70,29	70,30	70,23
	7	27,81	27,84	27,76
	8	19,12	19,12	19,00
	9	19,12	19,12	19,00
isobutyrate de 2-méthylbutyle (B) Ir ^a /Ir ^p (produit pur) = 1003/1199 Ir ^a /Ir ^p (F2) = 996/1193	C	δ_C (ppm) Produit pur	δ_C (ppm) Produit en mélange	δ_C (ppm) F2
	1	177,27	177,25	177,19
	2*	34,28	34,26	34,18
	3	19,06	19,09	19,00
	4	19,06	19,09	19,00
	5	68,91	68,89	68,82
	6*	34,18	34,17	34,16
	7	26,12	26,10	26,09
	8	11,26	11,24	11,25
	9	16,43	16,42	16,41
2-méthylbutyrate de 2-méthylbutyle (C) Ir ^a /Ir ^p (Produit pur) = 1092/1286 Ir ^a /Ir ^p (F2) = 1085/1277	C	δ_C (ppm) Produit pur	δ_C (ppm) Produit en mélange	δ_C (ppm) F2
	1	176,90	176,86	176,81
	2	41,25	41,28	41,19
	3	26,83	26,85	26,80
	4	11,66	11,66	11,61
	5	16,44	16,45	16,40
	6	68,79	68,80	68,73
	7	34,20	34,17	34,18
	8	26,07	26,10	26,03
	9	11,25	11,24	11,20
	10	16,69	16,69	16,64

Ces données nous ont permis de confirmer la présence de ces esters au sein de la fraction de chromatographie F2, malgré la présence de quelques superpositions de signaux dans le spectre RMN ^{13}C du mélange. Ceci n'est pas surprenant compte tenu des similitudes de structure entre les différents esters. Néanmoins, nous notons que les signaux de certains carbones caractéristiques, notamment $\text{C}=\text{O}$ et $\text{O}-\text{CH}_2$, ne présentent jamais de superposition (**Figure III.10**). Par ailleurs, nous avons pu repérer la plupart des signaux de ces quatre esters dans le spectre de l'huile essentielle avant fractionnement, malgré leur faible teneur (0,3-0,8 %).

Figure III.10 : Spectre RMN ^{13}C partiel ($\text{O}-\text{CH}_2$) de la fraction oxygénée F2 de l'huile essentielle de feuilles de *M. communis* (échantillon 1)

A : 2-méthylbutyrate d'isobutyle (9,5 %) ; **B** : isobutyrate de 2-méthylbutyle (5,8 %) ;

C : 2-méthylbutyrate de 2-méthylbutyle (17,5 %) ; **D** : isobutyrate d'isobutyle (6,2 %)



Ainsi, l'utilisation conjointe de la CPG(Ir), de la CPG-SM et de la RMN ^{13}C , associées à un fractionnement par chromatographie sur colonne ouverte de silice, a permis d'identifier 33 composés (22 monoterpènes, 5 sesquiterpènes, 2 cétones non terpéniques et 4 esters à chaîne courte) représentant 95,5 % de la composition chimique globale d'un échantillon d'huile essentielle de myrte de Corse (**Tableau III.5 p.165**).

Tableau III.5 : Composition chimique détaillée d'une huile essentielle de feuilles de *M. communis* L. commerciale (échantillon n° 1).

COMPOSES	Ir ^a	Ir ^p	HE %	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
Polarité (P/E)				100/0	98/2	98/2	98/2	98/2	95/5	95/5	95/5	0/100
masse (mg)				254	89	183	190	26	20	21	25	302
Isobutyrate d'isobutyle	894	1088	0,4	-	6,2	-	-	-	-	-	-	-
α-Pinène	928	1025	42,8	61,4	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Pinène	966	1110	0,5	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Méthylbutyrate d'isobutyle	983	1173	0,5	-	9,5	-	-	-	-	-	-	-
Isobutyrate de 2-méthylbutyle	996	1193	0,3	-	5,8	-	-	-	-	-	-	-
δ-3-Carène	1002	1148	0,2	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-
p-Cymène	1008	1271	1,1	3,8	-	-	-	-	-	-	-	-
Limonène *	1018	1201	3,5	11,7	-	-	-	-	-	-	-	-
1,8-Cinéole *	1018	1209	25,4	-	6,3	64,5	72,7	-	-	-	-	-
Linalol	1080	1542	3,9	-	-	-	-	-	-	-	1,2	34,3
2-Méthylbutyrate de 2-méthylbutyle	1085	1277	0,8	-	17,5	-	-	-	-	-	-	-
Camphre	1116	1512	0,1	-	-	-	-	-	2,7	0,5	-	-
trans-Pinocarvéol	1120	1650	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	3,3
trans-Verbénol	1155	1672	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	5,4
Terpinèn-4-ol	1158	1596	0,3	-	-	-	-	-	-	-	4,6	1,9
α-Terpinéol	1168	1691	2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	23,0
Méthylchavicol	1170	1669	0,2	-	4,4	-	-	-	-	-	-	-
Verbénone	1177	1699	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	3,7
Acétate de fenchyle	1210	1469	t	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-
Carvone	1210	1727	t	-	-	-	-	-	4,2	3,4	-	-
Acétate de linalyle	1235	1553	0,8	-	11,2	2,6	-	-	-	-	-	-
Géranial	1237	1725	t	-	-	-	-	-	-	-	3,2	-
Acétate de bornyle	1265	1576	0,4	-	2,6	2,1	-	-	-	-	-	-
Acétate d'α-terpinyle	1327	1691	0,8	-	11,9	1,9	-	-	-	-	-	-
Acétate de géranyle	1355	1751	4,8	-	4,5	22,1	23,0	17,9	1,9	-	-	-
Méthyleugénol	1364	2006	1,2	-	-	-	-	1,8	4,8	82,2	72,4	-
β-Elémène	1384	1587	0,3	1,6	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)-β-Caryophyllène	1414	1594	1,7	8,9	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Humulène	1446	1665	0,7	3,3	-	-	-	-	-	-	-	-
Tridécan-2-one	1471	1802	t	-	-	-	-	20,7	-	-	-	-
Dione #	1488	2030	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	4,4
Oxyde de caryophyllène	1565	1974	0,5	-	-	-	-	-	51,6	7,8	-	-
Oxyde d'humulène	1589	2028	0,1	-	-	-	-	1,4	15,7	1,2	-	-
Total			95,5	92,4	80,7	93,2	95,7	41,8	80,9	95,1	81,4	76,0

Les pourcentages sont mesurés sur colonne apolaire. Ceux notés d'une astérisque (*) sont mesurés sur colonne polaire car les composés coéluent sur colonne apolaire. # : 3,3,5,5,8,8-hexaméthyl-7-oxabicyclo[4.3.0]non-1(6)-èn-2,4-dione

D'un point de vue olfactif, les trois esters à chaîne courte identifiés (2-méthylbutyrate d'isobutyle, isobutyrate de 2-méthylbutyle et 2-méthylbutyrate de 2-méthylbutyle), ainsi que l'isobutyrate d'isobutyle, possèdent une odeur fruitée très agréable. Ils pourraient donc contribuer à la note de tête de l'huile essentielle étudiée. Or, ces 3 esters ne sont reportés que très ponctuellement dans la littérature, malgré le nombre important d'articles décrivant la composition chimique de l'huile essentielle de myrte. En 1970, Lawrence *et al.* identifient l'isobutyrate d'isobutyle (obtenu par distillation fractionnée, en mélange avec le β -pinène) et le 2-méthylbutyrate de 2-méthylbutyle (en mélange avec le myrcène) dans une huile essentielle de myrte du Maroc. Ce n'est ensuite qu'en 1992 que Boelens et Jimenez identifient simultanément l'isobutyrate d'isobutyle (0,04-0,45 %), le 2-méthylbutyrate d'isobutyle (0,07-0,40 %), l'isobutyrate de 2-méthylbutyle (tr-0,04 %) et le 2-méthylbutyrate de 2-méthylbutyle (0,25-0,54 %) dans des huiles essentielles isolées à partir de différentes parties (feuilles, fleurs et fruits) de myrte d'Espagne. Depuis, seul l'isobutyrate d'isobutyle est fréquemment cités dans les compositions chimiques des huiles essentielles de myrte. Les 3 autres esters à chaîne courte ne sont reportés que très rarement, et jamais ensemble :

- le 2-méthylbutyrate d'isobutyle dans les huiles essentielles de feuilles de myrte de Corse (jusqu'à 1,4 %) (Bradesi *et al.*, 1997), de Turquie (jusqu'à 0,1 %) (Özek *et al.*, 2000), de Tunisie (0,4 %) (Bouzouita *et al.*, 2003 ; Snoussi *et al.*, 2011) et d'Italie (0,08–0,45 %) (Vidrich *et al.*, 2006) ;
- l'isobutyrate de 2-méthylbutyle dans les huiles essentielles de feuilles de myrte de Turquie (jusqu'à 0,1 %) (Özek *et al.*, 2000) et d'Italie (0,14-0,30 %) (De Laurentis *et al.*, 2006) ;
- le 2-méthylbutyrate de 2-méthylbutyle dans les huiles essentielles de feuilles de myrte d'Italie (0,09-0,47 %) (Vidrich *et al.*, 2006) et de Californie (0,32-0,66 %) (Scora, 1973).

Compte tenu de ces observations, nous nous sommes interrogés sur la présence de ces esters à chaîne courte dans les huiles essentielles de myrte. Leur présence est-elle corrélée à des paramètres environnementaux ou génétiques ? Leurs spectres de masses insuffisamment différenciés peuvent-ils expliquer le fait qu'ils ne soient pas reportés plus fréquemment dans les huiles essentielles de myrte ? Dans ce contexte, nous nous sommes alors proposés de vérifier si ces esters volatils sont ponctuellement ou, au contraire, systématiquement présents dans des huiles essentielles de *Myrtus communis* de différentes provenances.

Ainsi, dans une deuxième partie de ce chapitre, nous reportons les résultats de notre étude élargie aux huiles essentielles de *M. communis* du bassin méditerranéen, plus précisément des échantillons en provenance de Corse (28), d'Algérie (27), du Maroc (5), de Sardaigne (2), du Portugal (2) et de Tunisie (1). La plupart de ces échantillons ont été soit hydrodistillés au laboratoire, soit fournis par des collaborateurs (voir Partie Expérimentale).

II. Etude de la composition chimique d'huiles essentielles de *Myrtus communis* L. de Corse et du bassin méditerranéen.

Afin de mener à bien cette partie de notre travail, nous avons procédé à l'analyse par CPG(Ir) et RMN ¹³C de 65 échantillons d'origines diverses : Corse, Algérie, Maroc, Sardaigne, Portugal et Tunisie. Six échantillons (un de chaque origine) ont été également analysés par CPG-SM.

Sur l'ensemble des échantillons d'huile essentielle de *Myrtus communis*, nous avons identifié 43 constituants représentant de 87,9 à 98,1 % de la composition chimique globale. Tous ces composés ont été identifiés par RMN ¹³C (dans l'huile essentielle ou dans les fractions de chromatographie) lorsque leur teneur était supérieure au seuil de détection de notre spectromètre (0,3-0,4 %) et 16 d'entre eux sont présents dans tous les échantillons. Le **Tableau III.8** regroupe les teneurs minimales et maximales des principaux constituants des échantillons analysés. Leurs compositions chimiques sont détaillées en **Annexes C1, C2 et C3**. Parmi les composés identifiés, on dénombre 19 monoterpènes oxygénés, 12 monoterpènes oléfiniques, 3 sesquiterpènes oléfiniques, 3 sesquiterpènes oxygénés, 2 cétones non terpéniques et 4 esters à chaîne courte.

Tableau III.8 : Teneurs minimales et maximales des principaux constituants des 65 échantillons d'huile essentielle de *M. communis* du pourtour méditerranéen.

Composés (Nb. d'échantillons)	Corse min-max (28)	Algérie min-max (27)	Maroc min-max (5)	Sardaigne (2)	Portugal (2)	Tunisie (1)
Isobutyrate d'isobutyle	0,1-2,2	0,1-1,8	0,2-0,4	0,6/0,7	0,1/0,1	0,4
α -Pinène	42,8-68,0	40,6-64,0	5,7-25,7	54,0/60,7	43,5/43,7	52,2
2-Méthylbutyrate d'isobutyle	0,2-0,9	0,1-2,2	0,2-0,6	0,2/1,2	0,4/0,1	0,4
Isobutyrate de 2-méthylbutyle	0,1-0,5	0,1-1,1	0,1-0,2	0,1/0,5	0,1/0,1	0,2
Limonène *	3,5-9,7	2,9-13,0	9,5-11,4	7,5/5,4	15,0/15,5	8,4
1,8-Cinéole *	9,8-31,9	10,9-29,1	29,7-32,8	20,6/18,3	25,3/22,9	21,9
Linalol	0,3-5,3	1,3-4,5	1,3-2,7	1,4/0,3	2,2/2,7	2,8
2-Méthylbutyrate de 2-méthylbutyle	0,1-1,4	0,1-1,5	0,2-0,5	0,2/1,0	0,7/0,3	0,4
α -Terpinéol	0,8-3,0	2,5-3,9	2,9-5,0	2,7/2,0	1,8/1,5	1,7
Acétate de myrtényle	-	-	14,9-33,0	-	-/0,5	-
Acétate de géranyle	0,8-4,8	1,1-3,7	2,0-3,8	1,7/1,8	1,6/0,9	2,1
Méthyleugénol	0,4-1,3	0,7-2,1	0,6-1,6	0,9/1,2	2,1/0,7	0,5
(<i>E</i>)- β -Caryophyllène	0,1-1,9	0,3-0,9	0,1-0,4	1,0/0,2	0,4/0,4	0,7
Dione #	0,2-1,3	0,5-2,3	0,2-0,6	1,0/1,2	0,1/0,1	0,1

* : composés pour lesquels les pourcentages sont mesurés sur colonne polaire car ils coéluent sur colonne apolaire.

: 3,3,5,5,8,8-hexaméthyl-7-oxabicyclo[4.3.0]non-1(6)-èn-2,4-dione

La composition chimique des échantillons de Corse, d'Algérie, de Sardaigne et de Tunisie (58 échantillons au total), caractérisée par l' α -pinène (40,6-68,0 %) et le 1,8-cinéole (9,8-31,9 %), présente une homogénéité. Néanmoins, 8 échantillons se distinguent par une très forte teneur en α -pinène (60,1-68,0 %) et 6 d'entre eux ont parallèlement une teneur plus faible en 1,8-cinéole (9,8-12,4 %). D'autres composés sont présents à des teneurs non négligeables dans tous les échantillons, même si l'on note quelques variations d'un échantillon à l'autre : limonène (2,9-13,0 %), linalol (0,3-5,3 %), α -terpinéol (0,8-3,9 %) et acétate de géranyle (0,8-4,8 %). Nous pouvons ainsi classer ces 58 échantillons dans le groupe des huiles essentielles *M. communis* riches en α -pinène avec une teneur appréciable en 1,8-cinéole.

Les huiles essentielles de *M. communis* du Portugal étudiées contiennent majoritairement de l' α -pinène (43,5 et 43,7 %), du 1,8-cinéole (25,3 et 22,9 %) et du limonène (15,0 et 15,5 %). Nous notons de nouveau des teneurs appréciables en linalol (2,2 et 2,7 %) et en α -terpinéol (1,8 et 1,5 %), ainsi qu'en acétate de géranyle et en méthyleugénol pour l'échantillon n°34 (1,6 et 2,1 % respectivement) alors que l'échantillon n°35 n'en contient que 0,9 et 0,7 % respectivement. Ces échantillons du Portugal se rapprochent ainsi du groupe des huiles essentielles de myrte riches en α -pinène, 1,8-cinéole et limonène, ne contenant pas d'acétate de myrtényle.

Enfin, les échantillons n°s 29 à 33 en provenance du Maroc ont une composition chimique qui se distingue de tous les échantillons précédents par la présence de l'acétate de myrtényle parmi les composés majoritaires : 1,8-cinéole (29,7-32,8 %), α -pinène (5,7-25,7 %), acétate de myrtényle (14,9-33,0 %) et limonène (9,5-11,4 %). Parmi ces échantillons, le n°33 (seul échantillon commercial) présente la plus faible teneur en α -pinène (5,7 %) au profit de la teneur la plus élevée en acétate de myrtényle (33,0 %). Tous renferment également l' α -terpinéol (2,9-5,0 %), le linalol (1,3-2,7 %), l'acétate de géranyle (2,0-3,8 %) et le myrténol (0,3-1,3 %) à des teneurs appréciables. Nous remarquons que ce dernier composé n'est identifié que dans ces cinq échantillons. Ainsi, ces huiles essentielles de *Myrtus communis* du Maroc peuvent être classées dans le groupe des échantillons dont la composition est dominée par le 1,8-cinéole, l' α -pinène, l'acétate de myrtényle et le limonène.

En ce qui concerne les composés minoritaires, nous avons mis en évidence, dans tous les échantillons, la présence d'une dione bicyclique dont l'identification est décrite dans le **Tableau III.6 p.161**. Sa teneur varie de 0,1 à 2,3 % sur l'ensemble des échantillons, et de 0,2 à 1,3 % pour la Corse. Il est à noter que malgré le nombre important de publications relatives à la composition de l'huile essentielle de *M. communis*, seuls Weyerstahl *et al.*, en 1994, ont montré la présence de ce composé dans un échantillon d'Iran. De même, les trois esters à chaîne courte (2-méthylbutyrate d'isobutyle, isobutyrate de 2-méthylbutyle et 2-méthylbutyrate de 2-méthylbutyle), dont la caractérisation est décrite dans le **Tableau III.7 p.163**, ont tous été identifiés dans l'ensemble des échantillons. Leur teneur individuelle varie de 0,1 à 2,2 % d'un échantillon à l'autre. Ensemble, ils représentent de 0,5 à 6,5 % (teneur maximale observée dans un échantillon d'Algérie) de la composition globale, leur teneur globale moyenne étant de 1,5 %. En Corse, leur teneur individuelle varie 0,2 à 2,2 % d'un échantillon à l'autre et ensemble, ils représentent de 0,5 à 3,5 % de la composition globale (teneur maximale observée dans l'échantillon n°12).

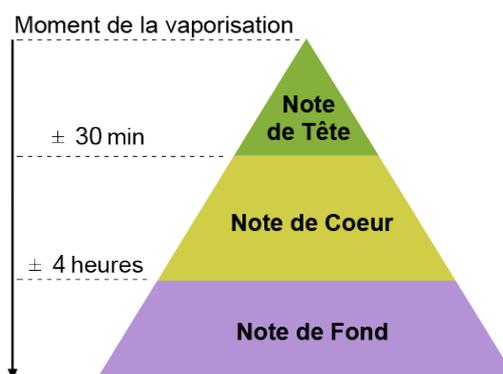
III. Caractérisation olfactive des huiles essentielles de feuilles de *M. communis* L. Contribution des esters à chaîne courte.

Les huiles essentielles sont des produits naturels très utilisés dans les secteurs de l'agroalimentaire, de l'aromathérapie, des cosmétiques et de la parfumerie. Elles contiennent souvent plusieurs dizaines de composés, parmi lesquels des molécules de faible masse moléculaire, très volatiles et odorantes.

Pour caractériser un parfum, les parfumeurs utilisent trois notes qui constituent une pyramide olfactive (**Figure III.11**) :

- la note de tête : il s'agit de la plus volatile et de ce fait de la plus éphémère. Elle est perçue dès la vaporisation du parfum et pendant quelques minutes (environ 30 min) ;
- la note de cœur : moins intense mais plus persistante que la note de tête (de 30 min à 4h après la vaporisation), elle est la note qui donne la personnalité du parfum ;
- la note de fond : elle fixe le parfum pour le faire durer dans le temps (jusqu'à plusieurs jours) et faciliter son souvenir.

Figure III.11 : Pyramide olfactive



III.1. Analyse sensorielle des esters et de quelques huiles essentielles de myrte.

Les esters contribuent fortement à l'odeur agréable de certaines huiles essentielles, notamment au niveau de la note de tête. Au travers de cette expérience, nous souhaitons étudier la relation entre la présence de certaines molécules dans l'huile essentielle de *M. communis* (tout particulièrement les esters) et leur contribution olfactive.

Grâce à l'obligeance de Dr. Patrick Paquet et sous son contrôle, nous avons tout d'abord procédé à l'analyse sensorielle des quatre esters à chaîne courte identifiés. Nous avons ainsi mis en évidence une odeur fruitée pour chacun d'entre eux, sensiblement plus prononcée pour l'isobutyrate de 2-méthylbutyle et le 2-méthylbutyrate et 2-méthylbutyle. L'odeur de l'isobutyrate d'isobutyle rappelle la banane, tandis que celle du 2-méthylbutyrate d'isobutyle possède une note « pomme, fermentation, légèrement gras ». Nous avons également caractérisé l'odeur de l'acétate de myrtényle (sucrée) et de l'acétate de géranyle (florale, douce, fruitée, note « rose et lavande »), en raison de leurs fortes proportions dans certaines huiles essentielles de myrte. Il est à noter que l'acétate de géranyle contribue davantage à la note de cœur qu'à la note de tête.

Parallèlement, nous avons caractérisé l'odeur de plusieurs échantillons d'huile essentielle de *M. communis* appartenant à trois groupes chimiques distincts (Corse, Maroc et Portugal). L'analyse olfactive de ces échantillons a montré que tous sont caractérisés par une odeur typique de base, induite notamment par la présence simultanée d' α -pinène (odeur âpre, terpénique, conifère) et de 1,8-cinéole (puissante odeur d'eucalyptus, rafraîchissant) en proportions assez importantes. Malgré des caractéristiques olfactives communes, ces échantillons présentent néanmoins une grande diversité olfactive. Afin d'illustrer ce constat, nous reporterons l'odeur de trois échantillons bien marqués, en relation avec la composition chimique (**Tableau III.9**).

Ainsi, pour l'échantillon n°30 en provenance du Maroc, la note de tête sucrée et légèrement fruitée est donnée par l'acétate de myrtényle, dont la teneur est relativement importante (16,2 %), et par les quatre esters à chaîne courte (moins de 1,0 % au total). L'analyse olfactive d'un échantillon de Corse (n°12) renvoie à une odeur bien plus fruitée que celle de l'échantillon précédent. Or, il ne contient pas d'acétate de myrtényle, en revanche il possède une teneur en esters à chaîne courte plus élevée (3,5 %). Enfin, en ce qui concerne l'échantillon n°34 originaire du Portugal, celui-ci est nettement différent des échantillons précédents d'un point de vue olfactif. Il se distingue en effet par une odeur dite terpénique et une note de tête dite verte, relevée par l'évaporation du limonène présent à une teneur importante (15,0 %).

Tableau III.9 : Caractérisation olfactive de trois échantillons d'huile essentielle de *M. communis*.

CORSE échantillon n°12	MAROC échantillon n°30	PORTUGAL échantillon n°34
3,5 % d'esters à chaîne courte	0,8 % d'esters à chaîne courte 16,2 % d'acétate de myrtényle	1,3 % d'esters à chaîne courte
Odeur commune : α -pinène, 1,8-cinéole		
Note de tête très fruitée	Note de tête sucrée et légèrement fruitée	Note de tête verte, odeur « terpénique »

En conclusion de cette expérience olfactive, il ressort que les esters à chaîne courte contribuent de façon significative à la note de tête fruitée des huiles essentielles de myrte.

Il est également possible de réaliser une analyse sensorielle au moyen d'une technique analytique utilisée dans le domaine de l'agroalimentaire (œnologie, arômes) et pour laquelle on constate depuis quelques années un intérêt grandissant pour les huiles essentielles : la CPG-Olfactométrie. Or, à ce jour et à notre connaissance, aucune étude de ce type n'a été menée sur l'huile essentielle de myrte. C'est pourquoi nous avons décidé d'entreprendre un travail d'initiation en CPG-O sur un échantillon commercial d'huile essentielle de *Myrtus communis* de Corse. La réalisation d'une étude approfondie aurait nécessité plus de temps et un entraînement bien plus poussé pour parvenir à sentir et qualifier correctement l'odeur d'une molécule.

III.2. Analyse sensorielle d'un échantillon d'huile essentielle de myrte de Corse par CPG-O.

Nous avons choisi de mener notre étude sur un échantillon commercial de Corse (n°5). Ce travail d'initiation à la CPG-O a été réalisé à l'Institut de Chimie de Nice, sous l'encadrement de Dr. Nicolas Baldovini. Dans ce paragraphe, nous faisons donc une brève présentation de l'étude réalisée.

Le seuil de perception des odeurs par le nez humain est extrêmement bas. On peut ainsi sentir en CPG-O des odeurs que l'ont pourrait qualifier de désagréables, dues à des composés dont la teneur ne permet parfois pas de les détecter via les méthodes d'analyse traditionnelles. Ces composés ont un fort impact odorant, il s'agit notamment des acides. Ainsi, une étape préalable à l'analyse par CPG-O consiste à séparer ces composés (résidu acide noté RA) du

reste de l'huile essentielle. Pour se faire, nous avons dans un premier temps réalisé une extraction acido-basique sur 3,30 grammes d'huile essentielle et avons ainsi séparé 2,94 grammes de RN (résidu neutre) et 18 mg de RA. Dans un second temps, la partie neutre de l'huile essentielle (RN) a été soumise à un fractionnement par chromatographie sur colonne avec une silice de type flash. En effet, une pratique courante en CPG-O consiste à travailler sur l'huile essentielle mais également sur les fractions de chromatographie, diluées pour l'analyse.

L'expérience de CPG-O réalisée sur l'huile essentielle brute, diluée à environ 10 % dans du dichlorométhane (CH_2Cl_2), et sur les différentes fractions de chromatographie contenant les esters, diluées à environ 2 % (CH_2Cl_2), ne nous a pas permis d'établir de corrélation entre l'odeur typique de l'huile essentielle de *Myrtus communis* et la présence des esters à chaîne courte. Notre inexpérience en matière d'olfaction et la courte durée du stage réalisé ne nous permettait pas de mener une étude complète et précise de cette huile essentielle en CPG-O, il s'agissait plutôt d'un travail d'initiation. Nous avons pu établir les caractéristiques olfactives de 2 des 4 esters : l'odeur de l'isobutyrate d'isobutyle a été qualifiée de « douce et fruitée » tandis que celle du 2-méthylbutyrate de 2-méthylbutyle était plutôt « sucrée et florale ».

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. En effet, outre son utilisation à des fins énergétiques, la biomasse représente un vaste réservoir de produits naturels à forte valeur ajoutée. L'exploitation de ces produits pourrait donc contribuer à rendre l'utilisation de la biomasse 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 différents produits naturels peuvent notamment intéresser les industries de la cosmétique, de l'aromathérapie/phytothérapie et de la parfumerie. Néanmoins, leur valorisation passe nécessairement par une étape d'analyse afin de les caractériser, d'en contrôler la qualité ou encore de mettre en évidence une éventuelle spécificité.

Actuellement, deux stratégies d'analyse sont privilégiées :

- la première consiste à mettre en œuvre le couplage « en ligne » d'une technique chromatographique (CPG ou CLHP notamment), qui individualise les constituants du mélange, avec une technique spectroscopique (SM ou RMN ^1H , par exemple), qui permet de les identifier par comparaison avec les données spectrales de composés de référence ;
- la seconde s'apparente à la démarche employée lors de l'analyse structurale d'une nouvelle molécule puisqu'elle consiste à purifier les constituants d'un mélange complexe (par des techniques chromatographiques telles que la chromatographie sur colonne ou la CPG Préparative) avant de les identifier par comparaison de leurs caractéristiques spectrales (incluant les informations fournies par la RMN ^1H et la RMN ^{13}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}C comme outil d'identification des constituants, et éventuellement pour 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, des sucres dans les miels ou encore des lipides dans les huiles végétales.

Ces différentes démarches analytiques, qui ont été développées dans le premier chapitre, en particulier lorsqu'elles sont appliquées aux huiles essentielles, ont permis d'affiner le double objectif de notre travail :

- étudier la composition chimique d'huiles essentielles isolées à partir de différentes espèces originaires du Vietnam, en adaptant la stratégie analytique à la complexité du mélange ;
- contribuer à la caractérisation chimique des huiles essentielles de deux espèces du genre *Myrtus*. Tout d'abord l'huile essentielle de *Myrtus nivellei*, jamais décrite jusqu'alors, en déterminant sa composition chimique par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ¹³C et en procédant à l'étude structurale de molécules présentes à des teneurs non négligeables et absentes de nos bibliothèques de spectres. Ensuite, en étudiant les huiles essentielles de *Myrtus communis* du pourtour méditerranéen à travers leur composition chimique et leur aspect olfactif, en portant une attention particulière aux composés oxygénés minoritaires, notamment des esters à chaîne courte.

Ainsi, le deuxième chapitre de cette thèse a été consacré aux huiles essentielles du Vietnam, présentées par ordre de difficulté analytique croissante :

- i) les huiles essentielles de *Clausena indica*, *Clausena anisum-olens*, *Cunninghamia konishii*, *Asarum glabrum* et *Asarum cordifolium* qui ont été analysées par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ¹³C, sans fractionnement au préalable,
- ii) les huiles essentielles de *Cupressus tonkinensis* et *Xanthocyparis vietnamensis* pour lesquelles l'analyse par CPG(Ir), CPG-SM et RMN a été combinée à un (ou plusieurs) fractionnement(s) sur colonne ouverte de silice.

L'analyse directe de 2 échantillons d'huile essentielle de feuilles de *Clausena indica* nous a permis d'identifier 22 et 23 composés représentant respectivement 95,8 % et 92,3 % de la composition chimique, majoritairement des monoterpènes hydrocarbonés (terpinolène, 53,9/56,1 % et δ -3-carène, 8,2/10,0 %) et un phénylpropanoïde (myristicine, 17,9/7,3 %). En revanche, l'échantillon d'huile essentielle des parties aériennes de *Clausena anisum-olens*, dans lequel nous sommes parvenus à identifier 36 composés représentant 97,9 % de la composition chimique, est caractérisé par des aldéhydes monoterpéniques (citronellal, 22,8% ; géraniol, 21,4 % et néral, 16,8 %). Deux autres aldéhydes monoterpéniques,

l'isogéranial (1,0 %) et l'isonéral (0,7 %), absents de nos bibliothèques de spectres de RMN, ont été identifiés grâce aux données de la littérature. L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'une publication dans la revue *Natural Product Communications* (2014).

L'huile essentielle de bois de *Cunninghamia konishii* s'est avérée riche en composés sesquiterpéniques, particulièrement en molécules à squelette cédrane (α - et β -funébrène, α - et β -cédrène et cédrool, 38 % au total). L'identification de l' α -duprézianène (0,8 %) par RMN ^{13}C , grâce aux données de la littérature, a contribué à l'enrichissement de la bibliothèque de spectres « Terpènes ». Ces résultats ont été publiés dans la revue *American Journal of Essential Oils and Natural Products* (2015).

Concernant les deux huiles essentielles du genre *Asarum* que nous avons étudiées (*A. cordifolium* et *A. glabrum*), les données de la littérature relatives à leur composition chimique sont rares (un seul article pour chacune d'entre elles). Nos analyses ont mis en évidence des compositions chimiques présentant une teneur très élevée en phénylpropanoïdes. Ainsi, dans l'huile essentielle d'*Asarum cordifolium* (espèce très récemment découverte au Vietnam), 23 composés ont été identifiés (96,5 % de la composition chimique), parmi lesquels les majoritaires sont deux phénylpropanoïdes : l'élémicine (82,5 %) et le méthyleugénol (6,2 %). Dans l'huile essentielle d'*Asarum glabrum*, nous avons identifié 33 composés représentant 93,7 % de la composition chimique, dix d'entre eux (79,3 %) appartenant à la famille des phénylpropanoïdes. L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'une publication dans la revue *Natural Product Communications* (2013).

Nous disposons également de deux échantillons d'huile essentielle de *Cupressus tonkinensis*. Le premier, isolé à partir des feuilles, a été analysé par CPG-SM, CPG(Ir) et RMN ^{13}C puis soumis à un fractionnement par chromatographie sur colonne ouverte de silice. L'ensemble des fractions ainsi obtenues a été analysé par CPG(Ir) et RMN ^{13}C . La combinaison de ces différentes techniques a conduit à l'identification de 47 composés représentant 95,7 % de la composition chimique, principalement des composés monoterpéniques (α -pinène, 25,7 % ; sabinène, 23,3 % et terpinène-4-ol, 12,6 %). Le second échantillon a été isolé à partir des tiges de *C. tonkinensis* et analysé par CPG-SM, CPG(Ir) et RMN ^{13}C , sans fractionnement au préalable. Sa composition chimique est qualitativement semblable à celle de l'huile essentielle de feuilles (46 composés : 80,5 %), dominée par l' α -pinène (48,3 %), le myrcène (11,6 %) et le cédrool (8,7 %). Ces résultats ont été publiés dans la revue *Journal of Essential Oil Research* (2013).

Enfin, le deuxième chapitre s'achève par l'analyse de la composition chimique d'un échantillon d'huile essentielle de bois de *Xanthocyparis vietnamensis*, une espèce découverte récemment au Vietnam et n'ayant fait l'objet que de deux études au sujet des volatils qu'elle produit. Tout d'abord, l'huile essentielle a été analysée par CPG-SM, CPG(Ir) et RMN ^{13}C , puis soumise à plusieurs fractionnements successifs par chromatographie sur colonne ouverte de silice. Cette stratégie analytique a conduit à l'identification de 40 composés représentant 87,9 % de la composition chimique globale. Les molécules qui présentent un squelette éremophilane (composés majoritaires : nootkatène, 20,7 % et 11,12,13-tri-nor-éremophil-1(10)-èn-7-one, 17,2 %), eudesmane, cadinane-muurolane et élémmane y sont largement représentées. Parmi les composés identifiés, 5 étaient absents de nos bibliothèques de spectres de RMN. Pour 3 d'entre eux (1,4-cinéole, déhydrojinkoh-éremol et le composé B : 11,12,13-tri-nor-éremophil-1(10)-èn-7-ol), l'identification a été réalisée par comparaison avec les données RMN ^{13}C et RMN ^1H de la littérature. Pour les 2 autres (composés A, 10-épi-nor- γ -eudesmèn-11-one et C, 12-hydroxy-isodihydroagarofurane), la mise en œuvre de séquences de RMN bidimensionnelle a permis de déterminer leur structure ainsi que leur stéréochimie. Ces deux dernières molécules sont, à notre connaissance, décrites pour la première fois.

Dans un troisième et dernier chapitre de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux huiles essentielles de *Myrtus nivellei* et *Myrtus communis*. Concernant *M. nivellei*, espèce endémique au Sahara, nous avons étudié pour la première fois la composition chimique de son huile essentielle, isolée à partir des feuilles, par combinaison de différentes techniques (CC, CPG-SM, CPG(Ir), RMN ^{13}C et RMN 2D). Ce travail s'insérait dans le cadre d'une collaboration avec les universités d'Annaba (Algérie) et de Coimbra (Portugal). Notre contribution a consisté dans le fractionnement de l'huile essentielle et son analyse chimique. Nous avons ainsi identifié 26 composés représentant 94,7 % de la composition chimique de l'huile essentielle, parmi lesquels les deux composés majoritaires sont le 1,8-cinéole (37,5 %) et le limonène (25,0 %). Nous sommes parvenus à déterminer par RMN, après séparation, la structure de deux nouveaux composés : le 1-hydroxy-1-(3-méthylbutoxy)-2-acétoxy-3,5,5-triméthyl-3-cyclopentène (composé A, 4,3 %) et le 1-hydroxy-1-(3-méthyl-2-buténoxy)-2-acétoxy-3,5,5-triméthyl-3-cyclopentène (composé B, 0,9 %). L'ensemble des résultats obtenus grâce à cette collaboration a été publié dans la revue *Journal of Ethnopharmacology* (2013).

Nous avons également appréhendé la composition chimique des huiles essentielles de feuilles de *M. communis* de Corse et d'autres provenances, en accordant une importance particulière aux composés oxygénés minoritaires, tels que les esters, qui peuvent contribuer à l'odeur de cette huile essentielle, notamment au niveau de la note de tête. Pour cela, nous avons mis à profit la complémentarité de différentes techniques (CC, CPG(Ir), CPG-SM, CPG-O et RMN ^{13}C). L'analyse détaillée d'un échantillon commercial de Corse a notamment conduit à l'identification d'une dione bicyclique (la 3,3,5,5,8,8-hexaméthyl-7-oxabicyclo[4.3.0]non-1(6)-èn-2,4-dione), grâce aux données spectrales de RMN ^{13}C de la littérature et de 4 esters à chaîne courte minoritaires dans l'huile essentielle : l'isobutyrate d'isobutyle, le 2-méthylbutyrate d'isobutyle, l'isobutyrate de 2-méthylbutyle et le 2-méthylbutyrate de 2-méthylbutyle. L'élargissement de notre étude aux huiles essentielles de myrte (65 échantillons) de Corse et de plusieurs localités du bassin méditerranéen (Algérie, Maroc, Portugal, Tunisie et Sardaigne) a permis de mettre en évidence dans l'ensemble des échantillons étudiés, i) la dione bicyclique, qui présente des teneurs allant de 0,1 à 2,3 %, ii) les 4 esters à chaîne courte, avec des teneurs individuelles pouvant varier de 0,1 à 2,2 %. Ensemble, ils représentent entre 0,5 et 6,5 % de la composition chimique globale de l'huile essentielle.

Nous avons ensuite entrepris une analyse sensorielle de ces esters ainsi que des huiles essentielles de myrte appartenant à 3 groupes chimiques distincts (α -pinène/1,8-cinéole ; α -pinène/1,8-cinéole/limonène ; α -pinène/1,8-cinéole/limonène/acétate de myrtényle). Nous avons ainsi constaté la contribution notable de ces esters, avec une intensité variable, à la note de tête fruitée des huiles essentielles de myrte. Les résultats obtenus au cours de cette étude ont été publiés dans la revue *Flavour and Fragrance Journal* (2012).

Ainsi, ces travaux de thèse ont contribué à l'enrichissement de la bibliothèque de spectres de RMN « Terpènes » du laboratoire de 10 composés. Parmi ces composés, quatre sont à notre connaissance identifiés et décrits pour la première fois : la 10-*épi*-nor- γ -eudesmèn-11-one, le 12-hydroxy-isodihydroagarofurane, le 1-hydroxy-1-(3-méthylbutoxy)-2-acétoxy-3,5,5-triméthyl-3-cyclopentène et le 1-hydroxy-1-(3-méthyl-2-buténoxy)-2-acétoxy-3,5,5-triméthyl-3-cyclopentène. Enfin, nos travaux participent à une meilleure connaissance et à la valorisation de diverses plantes poussant à l'état spontané au Vietnam et de deux espèces du genre *Myrtus* du pourtour méditerranéen, *M. communis* et *M. nivellei*, par l'identification des composés volatils qu'elles produisent.

Partie Expérimentale

I. Matériel végétal, huiles essentielles et composés purs.

- **Matériel végétal :**

Les feuilles de *Myrtus communis* ont été récoltées sur des pieds individuels situés en Corse entre janvier et juin 2010 (échantillons n^{os} 10, Ajaccio-Vignola (site du laboratoire) ; 12, Vignola (plage de la Terre sacrée) ; 13, Ajaccio-Capo di Feno ; 14, Mezzavia ; 15 et 16, Sarrola Carcopino ; 18, Cauro ; 19, Pianotolli Caldarello ; 20, Figari ; 21, Arca Pianelli ; 22, Roccapina ; 23, Santa Giulia ; 24, Erbalonga ; 25, Cervione (village) ; 26, Cervione (plaine) ; 27 et 28, Folelli) ainsi qu'en octobre et novembre 2010 (échantillons n^{os} 9, Ajaccio-Vignola (site du laboratoire) ; 11, Vignola (plage de la Terre sacrée) ; 17, Cala d'Orzu), de même qu'en Sardaigne au début d'avril 2010 (échantillons n^{os} 36, Golfo Aranci ; 37, Capo Ceraso).

- **Huiles essentielles de *Myrtus communis* :**

Les huiles essentielles commerciales de myrte de Corse nous ont été fournies par différents producteurs locaux (échantillons n^{os} 1, GAEC L'Astratella – 20260 Lumio ; 2 et 3, Mardys Garden – 20260 Calvi ; 4 et 5, Corsica PAM-SARL La maison des senteurs – 20117 Ocana ; 6, 7 et 8, Huiles essentielles Kalyptos – 20270 Aghione).

L'huile essentielle commerciale de myrte de Tunisie a été acquise auprès de la société Aromazone (Clermont-Ferrand, France).

Les huiles essentielles de myrte du Maroc nous ont été fournies par des producteurs locaux (échantillons n^{os} 30, Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques ; 31, Producteur près de Dar Chaoui ; 32, Coopérative de Ben Karrich ; 33, Souk L'qolla) et par la société Pranarôm (France, échantillon n^o 29).

Les huiles essentielles de myrte du Portugal nous ont été fournies par des partenaires de l'Université de Coimbra (échantillons n^{os} 34 et 35).

Les 27 échantillons d'huile essentielle de myrte d'Algérie nous ont été fournis par Mlle Amel Bouzabata (Université d'Annaba, Algérie) et ont déjà fait l'objet d'une publication en 2010 (Bouzabata *et al.*, 2010).

- **Huiles essentielles de *Myrtus nivellei* :**

Les 10 échantillons nous ont été fournis par Mlle Amel Bouzabata (Université d'Annaba, Algérie) et ont été obtenus à partir de plants poussant dans deux stations distinctes du Sahara central, Djanet (massif de Tassili N'Ajjer, 5 échantillons TAS1-TAS5) et Tamanrasset (massif du Hoggar, 5 échantillons TAM1-TAM5).

- **Huiles essentielles de plantes du Vietnam :**

Toutes les huiles essentielles nous ont été fournies par Dr Tran Huy Thai (Institut d'Ecologie et des Ressources Biologiques, Hanoi, Vietnam).

- **Composés purs :**

Le 2-méthylbutyrate d'isobutyle et le 2-méthylbutyrate de 2-méthylbutyle ont été acquis auprès des sociétés Graü Aromatics[®] (Allemagne) et Sigma-Aldrich[®] (France), respectivement. Quant à l'isobutyrate de 2-méthylbutyle, le Dr Hugues Brevart (Directeur du Développement Analytique, Robertet, Grasse) nous en a gracieusement fourni un échantillon pur obtenu par synthèse.

II. Hydrodistillations

Les huiles essentielles de *Myrtus communis* ont été préparées au laboratoire par hydrodistillation avec un appareil de type Clevenger (réacteurs de 1L ou 2L), selon la quantité de matériel végétal disponible, pendant une durée de 4 heures environ. Les rendements, calculés par rapport à la masse de végétal frais, sont compris entre 0,10 et 0,59 %.

III. Chromatographie sur colonne de silice (CC)

Pour l'ensemble des chromatographies sur colonne réalisées, les solvants utilisés sont le pentane préalablement distillé et l'oxyde de diéthyle séché sur alumine basique.

- ***Myrtus nivellei* :**

La chromatographie sur colonne de silice (CC) a été réalisée avec de la silice de granulométrie 63-200 μm (20,5 g), sur 1,055 gramme d'huile essentielle (échantillon TAS2). On élue deux fractions hydrocarbonées F1 et F2 (au total, 220 mg) au pentane et deux fractions oxygénées F3 et F4 avec l'oxyde de diéthyle pur (au total, 835 mg).

Une partie de la fraction F4 (250 mg) a été chromatographiée sur colonne de silice (granulométrie 63-200 μm , 5 g). On élue quatre nouvelles fractions F4-1 à F4-4 (au total, 22 mg) avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle 96/4, dix fractions F4-5 à F4-14 (au total, 130 mg) avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle 95/5, dix fractions F4-15 à F4-24 (au total 57 mg) avec un gradient pentane/oxyde de diéthyle 90/10 et enfin, quatre fractions F4-25 à F4-28 (au total, 30 mg) avec l'oxyde de diéthyle pur.

Les fractions F4-10 à F4-12 (au total, 60 mg) ont été réunies et fractionnées sur colonne de silice (granulométrie 35-70 μm , 1 g). On élue dix-huit fractions f1-f18 avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle 95/5.

- ***Myrtus communis*** :

Echantillon n°1 : La chromatographie sur colonne de silice (CC) de type «flash» a été réalisée avec de la silice de granulométrie 200-500 μm , 60 Å (25 g), sur 1,5 grammes d'huile essentielle. On élue une première fraction hydrocarbonée F1 (254 mg) au pentane, quatre fractions F2-F5 (au total, 488 mg) avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle 98/2. Les fractions F6-F8 (au total, 66 mg) ont été éluées avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle 95/5 et la dernière fraction F9 avec l'oxyde de diéthyle pur (302 mg).

Echantillon n°5 : La chromatographie sur colonne de silice (CC) de type «flash» a été réalisée avec de la silice de granulométrie 200-500 μm , 60 Å (36 g), sur 2,94 grammes du résidu neutre (RN) de l'huile essentielle. On élue une première fraction hydrocarbonée F1 (1,480 mg) au pentane, six fractions F2-F7 (au total, 930 mg) avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle 98/2. La fraction F8 (50 mg) a été éluée avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle 95/5 et la dernière fraction F9 avec l'oxyde de diéthyle pur (137 mg).

- ***Cupressus tonkinensis*** :

La chromatographie sur colonne de silice (CC) de type «flash» a été réalisée avec de la silice de granulométrie 250-500 μm , 60 Å (25 g), sur environ 1,5 grammes d'huile essentielle. On élue trois fractions hydrocarbonées F1-F3 (au total, 816 mg) au pentane, une fraction F4 (19 mg) avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle 98/2. Les fractions F5-F8 (au total, 192 mg) ont été éluées avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle 95/5 et les deux fractions F9 et F10 avec l'oxyde de diéthyle pur (au total, 214 mg).

- *Xanthocypris vietnamensis* :

La chromatographie sur colonne de silice de type «flash» a été réalisée avec de la silice de granulométrie 250-500 µm, 60 Å (35 g), sur 2,208 g d'huile essentielle. On élue une fraction hydrocarbonée F1 (503 mg) au pentane, six fractions F2-F7 (au total, 770 mg) avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle 95/5 et trois fractions F8-F10 (au total, 900 mg) avec l'oxyde de diéthyle pur.

La chromatographie sur colonne de silice de la fraction F2 (120 mg) a été réalisée avec une silice plus fine (granulométrie 60-200 µm, 2,2 g). On élue trois fractions F2-1 à F2-4 (au total, 89 mg) avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle 98/2, une fraction F2-5 (14 mg) avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle 95/5 et une dernière fraction F2-6 (9 mg) avec l'oxyde de diéthyle pur.

La chromatographie sur colonne de silice de la fraction F8 (466 mg) a été réalisée avec une silice fine (granulométrie 60-200 µm, 14 g). On élue deux fractions F8-1 et F8-2 (au total, 46 mg) avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle 95/5, treize fractions F8-3 à F8-15 (au total, 320 mg) avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle 90/10, une fraction F8-16 (34 mg) avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle 80/20 et deux dernières fractions F8-17 et F8-18 (au total, 56 mg) avec l'oxyde de diéthyle pur.

La chromatographie sur colonne de silice de la fraction F9 (345 mg) a été réalisée avec une silice fine (granulométrie 60-200 µm, 10 g). On élue une fraction F9-1 (21 mg) avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle 95/5, cinq fractions F9-2 à F9-6 (au total, 191 mg) avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle 90/10, une fraction F9-7 (18 mg) avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle 80/20 et quatre dernières fractions F9-8 et F9-11 (au total, 85 mg) avec l'oxyde de diéthyle pur.

IV. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

Les analyses de chromatographie en phase gazeuse ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Clarus 500, équipé d'un injecteur diviseur, de deux colonnes capillaires (50 m x 0,22 mm d.i ; épaisseur du film : 0,25 µm), polaire (BP-20, polyéthylène glycol) et apolaire (BP-1, polyméthylsiloxane) et de détecteurs à ionisation de flamme. Les conditions opératoires sont les suivantes : gaz vecteur : hélium (0,8 mL/min) ; pression en tête de colonne : 20 psi ; température de l'injecteur : 250°C ; température des détecteurs : 250°C ;

programmation de température : de 60 à 220°C à 2°C/min puis un palier de 20 min à 220°C ;
injection : mode diviseur 1/60. Les composés identifiés par RMN ¹³C sont aisément repérés sur les chromatogrammes grâce à leurs indices de rétention sur colonne polaire et apolaire, ce qui permet leur quantification relative.

V. Chromatographie en Phase Gazeuse associée à la Spectrométrie de Masse (CPG-SM)

Pour les huiles essentielles du Vietnam : 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 d.i ; épaisseur du film : 0,25 µm), 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 µL. La détection se fait par un analyseur à filtre quadripolaire. Les molécules sont généralement bombardées par un faisceau électronique de 70 eV. Les spectres de masse obtenus par impact électronique on été acquis sur la gamme de masse 35-350 Da.

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

VI. Chromatographie en Phase Gazeuse associée l'Olfactométrie (CPG-O)

Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un chromatographe Shimadzu GC-2010 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et relié à un cône de détection nasale ATAS OP 275. L'appareil est doté d'une colonne apolaire HP-5 (50 m x 0,32 mm ; épaisseur du film : 0,53 μm) et opère dans les conditions suivantes : programmation de température qui consiste en une élévation de température de 100°C à 250 °C à 5 °C/min, puis en un palier de 5 minutes à 250°C. Le gaz vecteur est l'azote (1,50 mL/min), l'injection se fait par mode splitless et le volume d'échantillon injecté est de 1,0 μL . Un diviseur d'effluent alimenté par un gaz « make-up » est installé dans le four de l'appareil afin de fournir un rapport 40/60 entre le cône de détection nasale et le détecteur à ionisation de flamme.

- **Protocole d'extraction acido-basique appliqué à l'huile essentielle de myrte n°5 :**

On prépare 50 mL d'une solution de NaOH (1 M) que l'on lave à deux reprises avec 30 mL d'oxyde de diéthyle (Et_2O). L'huile essentielle (HE ; 3,30 g) est diluée dans 18 mL d' Et_2O puis, on ajoute 2,5 mL de solution de soude (1M) et on place le tout sous agitation pendant 30 min. Le mélange est ensuite placé dans une ampoule à décanter et la phase organique est extraite avec 3x1,5 mL de solution de soude (1M), lavée avec 10 mL de solution saturée de Na_2CO_3 puis évaporée. On obtient le résidu neutre de l'HE (RN ; $m = 2,94 \text{ g}$). Les phases aqueuses basiques sont réunies et lavées avec 3x2,5 mL d' Et_2O puis placées dans un erlenmeyer avec 2,5 mL d' Et_2O . Le mélange est placé dans un bain de glace et acidifié jusqu'à $\text{pH}=1$ par l'ajout goutte à goutte d'une solution concentrée d'HCl (environ 10 mL), le tout sous agitation. Les phases aqueuses ainsi acidifiées sont placées dans une ampoule à décanter et extraites avec 3x2,5 mL d' Et_2O et 3x0,5 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont réunies, lavées avec 2x5 mL d'eau salée (eau + NaCl), séchées sur MgSO_4 et évaporées. On obtient ainsi le résidu acide (RA ; $m = 18 \text{ mg}$).

- **Préparation des échantillons :**

- HE diluée à 10,3 % dans du dichlorométhane : $m_{\text{HE}} = 126 \text{ mg}$ et $m_{\text{CH}_2\text{Cl}_2} = 1,224 \text{ g}$
- Fractions de chromatographie diluées dans du dichlorométhane à environ 2 % : $m_{\text{F}} = 23 \text{ à } 27 \text{ mg}$ et $m_{\text{CH}_2\text{Cl}_2} = 1,265 \text{ à } 1,382 \text{ g}$

VII. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker 400 AVANCE, 9,4 Tesla, opérant à 400,132 MHz pour la RMN ^1H et à 100,623 MHz pour la RMN ^{13}C . Les spectres ont été enregistrés avec une sonde de 5 mm. Le solvant est le CDCl_3 additionné de tétraméthylsilane (TMS). Les déplacements chimiques sont donnés en ppm (δ) par rapport au TMS pris comme référence interne. Les spectres de RMN ont été enregistrés en dissolvant dans 0,5 mL de CDCl_3 , de 40 à 60 mg d'huiles essentielles et jusqu'à 60 mg de fraction de chromatographie. Pour le noyau ^{13}C , les données du signal de précession libre (FID) sont multipliées avant la transformée de Fourier par une fonction exponentielle ($\text{LB} = 1,0 \text{ Hz}$). Pour le noyau ^1H , aucun traitement mathématique du signal n'est appliqué avant la transformée de Fourier.

Les spectres de RMN ^{13}C utilisés pour l'identification des composés ont été enregistrés avec les paramètres suivants : angle d'impulsion 45° ; 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 $D1 = 0,1 \text{ s}$; résolution digitale de 0,183 Hz/pt. Le nombre d'accumulations est compris entre 1000 et 3000 pour chaque enregistrement. Les spectres RMN ^1H ont été enregistrés avec les paramètres suivants : angle d'impulsion 30° ; 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, COSY et NOESY) nous avons utilisé les séquences impulsionnelles définies par les programmes Bruker.

Références Bibliographiques

- Adams RP. 1989. *Identification of essential oils by Ion Trap Mass Spectroscopy*. Academic Press. Inc.: San Diego.
- Adams RP. 2001. *Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy*. Allured: Carol Stream.
- Adams RP. 2007a. *Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/mass spectroscopy. 4th edition*. Allured: Carol Stream.
- Adams RP, Thomas P, Rushforth K. 2007b. The leaf essential oils of the new conifer genus *Xanthocyparis* : *Xanthocyparis vietnamensis* and *X. nootkatensis*. *J Essent Oil Res* **19**: 30-33.
- Addae-Mensah I, Asomaning WA, Oteng-Yeboah A, Garneau FX, Gagnon H, Jean FI, Moudachirou M, Koumaglo KH. 1996. (E)-Anethole as a Major Essential Oil Constituent of *Clausena anisata*. *J Essent Oil Res* **8**: 513-516.
- Akin M, Aktumsek A, Nostro A. 2010. Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. and *Myrtus communis* L. growing in Northern Cyprus. *Afr J Biotechnol* **9**: 531-535.
- Aleksic V, Knezevic P. 2014. A review: antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiol Res* **169**: 240-254.
- Alipour G, Dashti S, Hosseinzadeh H. 2014. Review of pharmacological effects of *Myrtus communis* L. and its active constituents. *Phytother Res* **28**: 1125-1136.
- Allerhand A, Maple SR. 1987. Ultra-high resolution NMR. This new technique makes it possible to use NMR for the nonseparative structural and quantitative analysis of complex mixtures. *Anal Chem* **59**: 441A-452A.
- Amensour M, Sendra E, Abrini J, Bouhdid S, Pérez-Alvarez JA, Fernández-López J. 2009. Total phenolic content and antioxidant activity of myrtle (*Myrtus communis*) extracts. *Nat Prod Commun* **4**: 819-824.
- Appendino G, Bianchi F, Minassi A, Sterner O, Ballero M, Gibbons S. 2002. Oligomeric Acylphloroglucinols from Myrtle (*Myrtus communis*). *J Nat Prod* **65**: 334-338.
- Appendino G, Maxia L, Bettoni P, Locatelli M, Valdivia C, Ballero M, Stavri M, Gibbons S, Sterner O. 2006. Antibacterial galloylated alkylphloroglucinol glucosides from myrtle (*Myrtus communis*). *J Nat Prod* **69**: 251-254.
- Arbab IA, Abdul AB, Aspollah M, Abdullah R, Abdelwahab SI, Ibrahim MY, Ali LZ. 2012. A review of traditional uses, phytochemical and pharmacological aspects of selected members of *Clausena* genus (Rutaceae). *J Med Plants Res* **6**: 5107-5118.
- Asakawa Y, Matsuda R, Tori M, Hashimoto T. 1988. Preparation of biologically active substances and animal and microbial metabolites from menthols, cineoles and kauranes. *Phytochemistry* **27**: 3861-3869.
- Asllani U. 2000. Chemical composition of Albanian Myrtle oil (*Myrtus communis* L.). *J Essent Oil Res* **12**: 140-142.
- Avlessi F, Dangou J, Wotto VD, Alitonou GA, Sohounhloue DK, Menut C. 2004. Propriétés antioxydantes de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* (Willd) Hook. *C R Chim* **7**: 1057-1061.
- Ayedoun MA, Houenon JG, Sossou PV, Menut C, Lamaty G, Bessiere JM. 1997. Aromatic Plants of Tropical West Africa. V. Major Components of the Leaf and Fruit Essential Oils of *Clausena anisata* (Willd.) J.D. Hook from Benin. *J Essent Oil Res* **9**: 247-248.
- Baldovini N, Tomi F, Casanova J. 2001. Identification and Quantitative Determination NMR of Furanodiene, a Heat-sensitive Compound, in Essential Oils by ¹³C NMR. *Phytochem Anal* **12**: 58-63.
- Banta-Wright SA, Steiner RD. 2004. Tandem mass spectrometry in Newborn screening. A primer for neonatal and perinatal nurses. *J Perinat Neonat Nurs* **18**: 41-58.

- Barrero AF, Alvarez-Manzaneda E, Lara A. 1996. Novel tricyclic sesquiterpenes from *Juniperus thurifera* L. Chemical confirmation of the duprezianane skeleton. *Tetrahedron Lett* **37**: 3757-3760.
- Bazzali O, Tomi F, Casanova J, Bighelli A. 2012. Occurrence of C8-C10 esters in Mediterranean *Myrtus communis* L. leaf essential oil. *Flavour Fragrance J* **27**: 335-340.
- Begnaud F, Chaintreau A. 2005. Multidimensional gas chromatography using a double cool-strand interface. *J Chromatogr A* **1071**: 13-20.
- Begum R, Rahman MS, A. Chowdhury MS, Rahman MM, Rashid MA. 2008. *O*-Methyheptaphylline from *Clausena suffruticosa*. *Nat Prod Commun* **3**: 815-818.
- Bélanger A, Collin G, Garneau FX, Gagnon H, Pichette A. 2010. Aromas From Quebec. II. Composition of the Essential Oil of the Rhizomes and Roots of *Asarum canadense* L. *J Essent Oil Res* **22**: 164-169.
- Belhassen E, Baldovini N, Brevard H, Meierhenrich UJ, Filippi JJ. 2014. Unravelling the scent of vetiver: identification of character-impact compounds. *Chem Biodiversity* **11**: 1821-1842.
- Ben Hsouna A, Hamdi N, Miladi R, Abdelkafi S. 2014. *Myrtus communis* essential oil: chemical composition and antimicrobial activities against food spoilage pathogens. *Chem Biodiversity* **11**: 571-580.
- Bicchi C, Rubiolo P, Marshall H, Weyerstahl P, Laurent R. 1998. Constituents of *Artemisia roxburghiana* Besser essential oil. *Flavour Fragrance J* **13**: 40-46.
- Bielicka-Daszkiwicz K, D'bicka M, Voelkel A. 2004. Comparison of three derivatization ways in the separation of phenol and hydroquinone from water samples. *J Chromatogr A* **1052**: 233-236.
- Bighelli A, Muselli A, Casanova J, Nguyen Thi Tam, Vu Van Anh, Bessière JM. 2005. Chemical variability of *Litsea cubeba* leaf oil from Vietnam. *J Essent Oil Res* **17**: 86-88.
- Bighelli A, Casanova J. 2009. Analytical methods for *Cymbopogon* oils in essential oil-bearing grasses, the genus *Cymbopogon*. Taylor & Francis : London, 195- 215.
- Bighelli A, Lesueur D, Casanova J, Bui Thi Bang, Pham Van Y. 2010. Combined analysis of *Angelica acutiloba* Kitagawa seed oil by GC(RI), GC/MS and ¹³C-NMR. *J Essent Oil Res* **22**: 217-219.
- Blaise P, Wolff R, Farines M. 1997. Etude régiospécifique de triacylglycérols d'huiles végétales par clivage chimique et RMN ¹³C haute-résolution. *OCL*. **4**: 135-41.
- Boelens MH, Jimenez R. 1991. The chemical composition of Spanish myrtle leaf oils. Part I. *J Essent Oil Res* **3**: 173-177.
- Boelens MH, Jimenez R. 1992. The chemical composition of Spanish myrtle leaf oils. Part II. *J Essent Oil Res* **4**: 349-353.
- Bouzabata A, Boussaha F, Casanova J, Tomi F. 2010. Composition and chemical variability of leaf oil of *Myrtus communis* from North-Eastern Algeria. *Nat Prod Commun* **5**: 1659-1662.
- Bouzabata A, Castola V, Bighelli A, Abed L, Casanova J, Tomi F. 2013a. Chemical variability of Algerian *Myrtus communis* L. *Chem Biodiversity* **10**: 129-137.
- Bouzabata A, Bazzali O, Cabral C, Gonçalves MJ, Cruz MT, Bighelli A, Cavaleiro C, Casanova J, Salgueiro L, Tomi F. 2013b. New compounds, chemical composition, antifungal activity and cytotoxicity of the essential oil from *Myrtus nivellei* Batt. and Trab., an endemic species of Central Sahara. *J Ethnopharmacol* **149**: 613-620.
- Bouzabata A, Bighelli A, Abed L, Casanova J, Tomi F. 2014. Composition and chemical variability of *Eucalyptus bosistoana* essential oil from Algerian Sahara. *Nat Prod Commun* **9**: 701-702.

- Bouzabata A, Cabral C, Gonçalves MJ, Cruz MT, Bighelli A, Cavaleiro C, Casanova J, Tomi F, Salgueiro L. 2015. *Myrtus communis* L. as source of a bioactive and safe essential oil. *Food Chem Toxicol* **75**: 166-172.
- Bouzouita N, Kachouri F, Hamdi M, Chaabouni MM. 2003. Antimicrobial activity of essential oil from Tunisian aromatic plants. *Flavour Fragrance J* **18**: 380-383.
- Bradesi P, Bighelli A, Tomi F, Casanova J. 1996. L'analyse des mélanges complexes par RMN du carbone-13, *Can J Appl Spectrosc, Partie 1* **41**: 15-24 ; *Partie 2* **41**: 41-50.
- Bradesi P, Tomi F, Casanova J, Costa J, Bernardini AF. 1997. Chemical composition of myrtle leaf essential oil from Corsica (France). *J Essent Oil Res* **9**: 283-288.
- Brattoli M, de Gennaro G, de Pinto V, Demarinis Loiotile A, Lovascio S, Penza M. 2011. Odour detection methods: olfactometry and chemical sensors. *Sensors* **11**: 5290-5322.
- Brekke T, Barth T, Kvalheim OM, Sletten E. 1990. Multivariate analysis of carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra. Identification and quantification of average structures in petroleum distillates, *Anal Chem* **62**: 49-56.
- Brekke T, Kvalheim OM. 1996. Signal treatment and signal analysis in NMR, Chap. 20, Rutledge D.N. Ed., Elsevier: Amsterdam.
- Breme K, Tournayre P, Fernandez X, Meierhenrich UJ, Brevard H, Joulain D, Berdagué JL. 2009. Identification of odor impact compounds of *Tagetes minuta* L. essential oil: comparison of two GC-Olfactometry methods. *J Agric Food Chem* **57**: 8572-8580.
- Brooks BT. 1911. New Philippine essential oils. *Philipp J Sci* **6A**: 333-354.
- Bruins AP. 1979. Negative ion chemical ionisation mass spectrometry in the determination of components in essential oils. *Anal Chem* **51**: 967-972.
- Bruneton J. 2009. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (4e éd.). Lavoisier : Paris, p.588.
- 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. *For Ecol Manage* **257**: 1247-1254.
- Cannas S, Molicotti P, Ruggeri M, Cubeddu M, Sanguinetti M, Marongiu B, Zanetti S. 2013. Antimycotic activity of *Myrtus communis* L. towards *Candida* spp. from clinical isolates. *J Infect Dev Ctries* **7**: 295-298.
- 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 Sci Spectrosc* **42**: 90-94.
- Castola V, Bighelli A, Casanova J. 1999. Direct qualitative and quantitative analysis of triterpenes using ¹³C NMR spectroscopy exemplified by dichloromethane extracts of cork. *Appl Spectrosc* **53**: 344-350.
- 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 (*Quercus suber* L.). *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 CO₂ extracts. *Ind Crops Prod* **21**: 65-69.
- Cavaleiro C. *Oleos essenciais de Juniperus de Portugal*, 359 p. Thèse de Doctorat: pharmacie: Université de Coimbra: 2001.

- Cavaliere B, Macchione B, Sindona G, Tagarelli A. 2008. Tandem mass spectrometry in food safety assessment: The determination of phthalates in olive oil. *J Chromatogr A* **1205**: 137-143.
- Cavalli JF, Tomi F, Bernardini A-F, Casanova J. 2004a. Dihydroagarofurans: the fourth isomer isolated from *Cedrelopsis grevei* bark oil. *Magn Reson Chem* **42**: 709-711.
- Cavalli JF, Tomi F, Bernardini AF, Casanova J. 2004b. Combined analysis of *Chenopodium ambrosioides* essential oil by GC, GC-MS and ¹³C-NMR spectroscopy. Quantitative determination of Ascaridole, a heat-sensitive compound. *Phytochem Anal* **15**: 275-279.
- Chalchat JC, Garry RP, Michet A. 1998. Essential oils of myrtle (*Myrtus communis* L.) of the Mediterranean littoral. *J Essent Oil Res* **10**: 613-617.
- Chang CI, Li YC, Kuo CC, Chao CY, Chang HS, Wu JH, Wang SY, Kuo YH. 2013. Two new lignans from the wood of *Cunninghamia konishii*. *Nat Prod Commun* **8**: 805-806.
- Chang CI, Li YC, Hong YH, Cheng WY, Chao CY, Tsuzuki M, Amagaya S, Huang CJ, Kuo YH. 2014. Two new labdane-type diterpenes from the wood of *Cunninghamia konishii*. *Phytochem Lett* **7**: 107-110.
- Chen YC, Li YC, Chiu HL, Cheng WY, Hong YH, Sung PJ, Kuo CC, Wu BT, Kuo YH. 2013a. Diterpenoids from the wood of *Cunninghamia konishii*. *Helv Chim Acta* **96**: 2282-2287.
- Chen YC, Li YC, You BJ, Chang WT, Chao LK, Lo LC, Wang SY, Huang GJ, Kuo YH. 2013b. Diterpenoids with anti-inflammatory activity from the wood of *Cunninghamia konishii*. *Molecules* **18**: 682-689.
- Cheng SS, Lin CY, Gu HJ, Chang ST. 2011. Antifungal activities and chemical composition of wood and leaf essential oils from *Cunninghamia konishii*. *J Wood Chem Technol* **31**: 204-217.
- Cheng SS, Chung MJ, Lin CY, Wang YN, Chang ST. 2012. Phytochemicals from *Cunninghamia konishii* Hayata act as antifungal agents. *J Agric Food Chem* **60**: 124-128.
- Cheng SS, Lin CY, Chung MJ, Liu YH, Huang CG, Chang ST. 2013. Larvicidal activities of wood and leaf essential oils and ethanolic extracts from *Cunninghamia konishii* Hayata against the dengue mosquitoes. *Ind Crops Prod* **47**: 310-315.
- Cheng YS, Tsai MD. 1972. Terpenes and sterols of *Cunninghamia konishii*. *Phytochemistry* **11**: 2108-2109.
- Cheng YS, Lin CS. 1979. Study of the extractive constituents from the wood of *Cunninghamia konishii* Hayata. *J Chin Chem Soc* **26**: 169-172.
- Chokeprasert P, Charles AL, Sue KH, Huang TC. 2007. Volatile components of the leaves, fruits and seeds of wampee *Clausena lansium* (Lour.) Skeels. *J Food Compos Anal* **20**: 52-56.
- Chutia M, Deka Bhuyan P, Pathak MG, Sarma TC, Boruah P. 2009. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *Food Sci Technol* **42**: 777-780.
- 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.

- Cool LG, Hu ZL, Zavarin E. 1998. Foliage terpenoids of Chinese *Cupressus* species. *Biochem Syst Ecol* **26**: 899-913.
- Costantin MB, Sartorelli P, Limberger R, Henriques AT, Steppe M, Ferreira MJP, Ohara MT, Emerenciano VP, Kato MJ. 2001. Essential Oils from *Piper cernum* and *Piper regnellii*: Antimicrobial Activities and Analysis by GC/MS and ^{13}C NMR. *Planta Med* **67**: 771-773.
- Dahbi A, Bitar H, Bennouna C, Béguin CG, Faure R. 1992. Analyse quantitative de fractions d'huile de schistes bitumineux marocains par RMN ^{13}C utilisant les séquences multi-impulsionnelles GASPE et DEPT. *Analisis* **20**: 239-243.
- Dai DN, Hung NQ. 2012. Chemical composition of the essential oil from woods of *Cunningamia konishii* Hayata from Hà Giang. *J. Biol* **34**: 469-472 (in Vietnamese).
- Dai DN, Thang TD, Thai TH, Thanh BV, Ogunwande IA. 2013. Composition of the wood oils of *Calocedrus macrolepis*, *Calocedrus rupestris* and *Cupressus tonkinensis* (Cupressaceae) from Vietnam. *American J Essent Oils Nat Prod* **1**: 28-33.
- Dan Y, Liu HY, Gao WW, Chen SL. 2010. Activities of essential oils from *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* against five phytopathogens. *Crop Prot* **29**: 295-299.
- Dar MY, Shah WA, Rather MA, Qurishi Y, Hamid A, Qurishi MA. 2011. Chemical composition, in vitro cytotoxic and antioxidant activities of the essential and major constituents of *Cymbopogon jawarancusa* (Kashmir). *Food Chem* **129**: 1606-1611.
- Darriet F, Desjobert JM, Costa J, Muselli A. 2009. Identification of chrysanthenyl esters from the essential oil of *Anthemis maritima* L. investigated by GC/RI, GC-MS (EI and CI) and ^{13}C -NMR spectroscopy: chemical composition and variability. *Phytochem Anal* **20**: 279-292.
- De Laurentis N, Rosato A, Morlacchi Flaviano, Armenise D, Leone L, Milillo MA. 2006. Seasonal variation of chemical composition in *Myrtus communis* essential oil. *Riv Ital EPPOS* **42**: 3-7.
- De Vincenzi M, De Vincenzi A, Silano M. 2004. Constituents of aromatic plants: elemicin. *Fitoterapia* **75**: 615-618.
- Delort E, Jaquier A. 2009. Novel terpenyl esters from Australian finger lime (*Citrus australasica*) peel extract. *Flavour Fragrance J* **24**: 123-32.
- Deriu A, Branca G, Mollicotti P, Pintore G, Tirillini B, Paglietti B, Mura A, Sechi LA, Fadda G, Zanetti S. 2007. In vitro activity of essential oil of *Myrtus communis* L. against *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents* **30**: 562-565.
- Derome AE. 1987. Modern NMR techniques for chemistry research. Pergamon Press: Oxford. 250 p.
- Diep PTM, Pawlowska AM, Cioni PL, Minh CV, Huong LM, Braca A. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of *Clausena indica* (Dalz) Oliv. (Rutaceae) essential oil from Vietnam. *Nat Prod Commun* **4**: 869-872.
- Djenane D, Yangüela J, Amrouche T, Boubrit S, Boussad N, Roncalés P. 2011. Chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in minced beef. *Food Sci Technol Int* **17**: 505-515.
- Dung NX, Luu Dam Cu, Pham Van Khiên, Muselli A, Casanova J, Barthel A, Leclercq PA. 1998. Volatile constituents of the stem and leaf oils of *Eupatorium coelestinum* L. from Vietnam. *J Essent Oil Res* **10**: 478-482.

- Dung NX, Pham Van Khiên, Dô Dúc Nhuận, Hoi TM, Ninh Khắc Ban, Leclercq PA, Muselli A, Bighelli A, Casanova J. 1999. Composition of the seed oil of *Hibiscus abelmoschus* L. (Malvaceae) growing in Vietnam. *J Essent Oil Res* **11**: 447-452.
- Duquesnoy E, Dinh NH, Castola V, Casanova J. 2006. Composition of a pyrolytic oil from *Cupressus funebris* Endl. of Vietnamese origin. *Flavour Fragrance J* **21**: 453-457.
- Duquesnoy E, Castola V, Casanova J. 2008. Identification and quantitative determination of carbohydrates in ethanolic extracts of two conifers using ^{13}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}C -NMR spectroscopy. *Phytochem Anal* **20**: 246-52.
- Ekundayo O, Oguntimein B, Hammerschmidt FJ. 1986. Constituents of the essential oil of *Clausena anisata* leaves. *Planta Med* **52**: 505-506.
- Emerenciano VP, Roque NF, Furlan M, Torres LMB. 1990. Computer-aided carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy for identification of terpenoid mixtures. *Anal Chim Acta* **236**: 501-504.
- Erm A, Siirde K, Pehk T, Lääts K. 1979. Study of ion-catalytic telomerization. XVII. Composition of synthetic citral. *Russian J Org Chem* **15**: 1593-1598.
- Fan SL, Muhamad Awang R, Dzolkhifli O, Mawardi R. 2011. Insecticidal properties of *Citrus hystrix* DC leaves essential oil against *Spodoptera litura* Fabricius. *J Med Plants Res* **5**: 3739-3744.
- Farah A, Afifi A, Fechtal M, Chhen A, Satrani B, Talbi M, Chaouch A. 2006. Fractional distillation effect on the chemical composition of Moroccan myrtle (*Myrtus communis* L.) essential oils. *Flavour Fragrance J* **21**: 351-354.
- Farjon A. 2002a. The discovery of a new genus of conifer in northern Vietnam. *Dendrology* 142-144.
- Farjon A. 2002b. A new genus and species in Cupressaceae (Coniferales) from Northern Vietnam, *Xanthocyparis vietnamensis*. *Novon* **12**: 179-189.
- Fernandez X, Breme K, Varlet V. 2009. Couplage chromatographie en phase gazeuse/olfactométrie dans *Techniques de l'ingénieur - chromatographie et techniques séparatives*. Réf 42385210. Vol TA2, p.1488.
- Ferrari B, Tomi F, Casanova J. 2005a. Terpenes and acetylene derivatives from the roots of *Santolina corsica* (Asteraceae). *Biochem Syst Ecol* **33**: 445-449.
- Ferrari B, Castilho P, Tomi F, Rodrigues AI, do Ceu Costa M, Casanova J. 2005b. Direct identification and quantitative determination of costunolide and dehydrocostuslactone in *Laurus novocanariensis* fixed oil using ^{13}C -NMR spectroscopy. *Phytochem Anal* **16**: 104-107.
- 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}C NMR spectroscopy. *Anal Chim Acta* **447**: 125-134.
- Filippi JJ, Belhassen E, Baldovini N, Brevard H, Meierhenrich Uwe. 2013. Qualitative and quantitative analysis of vetiver oils by comprehensive two-dimensional gas chromatography and comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1288**: 127-148.
- Flamini G, Cioni PL, Morelli I, Maccioni S, Baldini R. 2004. Phytochemical typologies in some populations of *Myrtus communis* L. on Caprione Promontory (East Liguria, Italy). *Food Chem* **85**: 599-604.

- Formáček V, Kubeczka KH. 1982. ¹³C NMR analysis of essential oils in aromatic plants: basic and applied aspects. Margaris N, Koedam A, Vokou D, Ed. Martinus Nijhoff Publishers: La Haye, 177-181.
- Freeman R. 1988. *A handbook of nuclear magnetic resonance*. John Wiley & Sons: New York, 312p.
- García M, Aleixandre M, Gutiérrez J, Horrillo MC. 2006. Electronic nose for wine discrimination. *Sensors and Actuators B* **113**: 911-916.
- Gardeli C, Papageorgiou V, Mallouchos A, Theodosis K, Komaitis M. 2008. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chem* **107**: 1120-1130.
- Garneau FX, Pichette A, Gagnon H, Jean FI, Addae-Mensah I, Osei-Safu D, Asomaning WA, Oteng-Yeboah A, Moudachirou M, Koumaglo KH. 2000. (E)- and (Z)-Foeniculin, constituents of the leaf oil of a new chemovariety of *Clausena anisata*. *J Essent Oil Res* **12**: 757-762.
- Gençler Özkan AM, Gençler Güray Ç. 2009. In book: *Plants and Culture: Seeds of the Cultural Heritage of Europe*, Edition: First, Publisher: Centro Europeo per I Beni Culturali Ravello, Edipuglia Bari, Italy, Editors: Jean-Paul Morel, Anna Maria Mercuri, pp.159-168.
- Gonny M, Bradesi P, Casanova J. 2004. Identification of the components of the essential oil from wild Corsican *Daucus carota* L., using ¹³C-NMR spectroscopy. *Flavour Fragrance J* **19**: 424-433.
- Gonny M, Cavaleiro C, Salgueiro L, Casanova J. 2006. Analysis of *Juniperus communis* subsp. *alpina* needle, berry, wood and root oils by combination of GC, GC/MS and ¹³C-NMR. *Flavour Fragrance J* **21**: 99-106.
- Goodner KL, Mahattanatawee K, Plotto A, Sotomayor JA, Jordán MJ. 2006. Aromatic profiles of *Thymus hyemalis* and Spanish *T. vulgaris* essential oils by GC-MS/GC-O. *Ind Crops Prod* **24**: 164-168.
- Goodner KL. 2008. Practical retention index models of OV-101, DB-1, DB-5, and DB-Wax for flavor and fragrance compounds. *LWT-Food Sci Technol* **41**: 951-958.
- Govindarajan M. 2010. Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena anisata* (Willd.) Hook. f. ex Benth (Rutaceae) against three mosquito species. *Asian Pac J Trop Med* **3**: 874-877.
- Gower FB, Lees FH. 1902. VII. The constituents of the essential oil of *Asarum canadense*. *J Chem Soc Trans* **81**: 59-73.
- Gundidza M, Chinyanganya F, Chagonda L, De Pooter HL, Mavi S. 1994. Phytoconstituents and antimicrobial activity of the leaf essential oil of *Clausena anisata* (Wild.) J.D. Hook ex. Benth. *Flavour Fragrance J* **9**: 299-303.
- Gündüz GT, Gönül SA, Karapinar M. 2009. Efficacy of myrtle oil against *Salmonella typhimurium* on fresh produce. *Int J Food Microbiol* **130**: 147-150.
- 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.
- Hamliche V, Maiza K. 2006. Traditional medicine in Central Sahara: pharmacopeia of Tassili N'ajjer. *J Ethnopharmacol* **105**: 358-367.
- Hanaoka K, Sieffermann JM, Giampaoli P. 2000. Effects of the sniffing port air makeup in Gas Chromatography-Olfactometry. *J Agric Food Chem* **48**: 2368-2371.
- He K, Shi G, Zeng L, Ye Q, McLaughlin JL. 1997. Konishiol, a new sesquiterpene, and bioactive components from *Cunninghamia konishii*. *Planta Med* **63**: 158-160.

- Hennia A, Brada M, Nemmiche S, Fauconnier ML, Lognay G. 2015. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of Algerian *Myrtus communis* L. *J Essent Oil Res* **27**: 324-328.
- Hernández F, Cervera MI, Portolés T, Beltrán J, Pitarch E. 2013. The role of GC-MS/MS with triple quadrupole in pesticide residue analysis in food and the environment. *Anal Methods* **5**: 5875-5894.
- Hesse M, Meier H, Zeeh B. 2008. *Spectroscopic methods in organic chemistry* (2nd Ed.). Thieme: New-York, 453p.
- Högnadóttir A, Rouseff RL. 2003. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* **998**: 201-211.
- Hoi TM, Moi LD, Muselli A, Bighelli A, Casanova J. 1997. Analyse de l'huile essentielle de *Cupressus funebris* du Vietnam par RMN du carbone-13. *Riv Ital EPPOS n° special*: 632-637.
- Hoi TM, Thai TH, Lesueur D, Bighelli A, Casanova J. 2004. Volatile components of *Bursera tonkinensis* Guill. *J Essent Oil-Bear Plants* **7**: 228-231.
- Hsu CC, Lai WL, Chuang KC, Lee MH, Tsai YC. 2013. The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. *Med Mycol* **51**: 473-482.
- Hubert J, Nuzillard JM, Purson S, Hamzoui M, Borie N, Reynaud R, Renault JH. 2014. Identification of natural metabolites in mixture: a pattern recognition strategy based on ¹³C NMR. *Anal Chem* **86**: 2955-2962.
- Ikeda T, Fujita Y. 1929. Observations on Pinene of *Cunninghamia konishii* Hayata. *Nippon Kagaku Kaishi* **50**: 66-70.
- Ishihara M, Tsuneya T, Uneyama K. 1993. Fragrant sesquiterpenes from Agarwood. *Phytochemistry* **33**: 1147-1155.
- Itokawa H, Morita H, Watanabe K, Mihashi S, Itaka Y. 1985. Agarofuran-, Eudesmane- and Eremophilane-Type sesquiterpenoids from *Alpinia japonica* (Thunb.) Miq. *Chem Pharm Bull* **33**: 1148-1153.
- Izgi K, Iskender B, Jauch J, Sezen S, Cakir M, Charpentier M, Canatan H, Sakalar C. 2015. Myrtucommulone-A induces both extrinsic and intrinsic apoptotic pathways in cancer cells. *J Biochem Mol Toxicol* **29**: 432-439.
- Jantan I, Ahmad AS, Ahmad AR, Nor Azah Mohd Ali, Ayop N. 1996. Chemical composition of some *Citrus* oils from Malaysia. *J Essent Oil Res* **8**: 627-632.
- Jayaweera DMA. 1982. *Medicinal Plants (indigenous and exotic) Used in Ceylon, Part V*, A publication of the National Science Council of Sri Lanka. Colombo. pp. 18-19.
- Jerkovic I, Radonic A, Borcic I. 2002. Comparative study of leaf, fruit and flower essential oils of Croatian *Myrtus communis* (L.) during a one-year vegetative cycle. *J Essent Oil Res* **14**: 266-270.
- John JA, Kurup SRR, Pradeep NS, Sabulal B. 2011. Chemical composition and antibacterial activity of the leaf oil of *Clausena indica* from South India. *J Essent Oil-Bear Plants* **14**: 776-781.
- Joshi BS, Gawad DH. 1971. Rutaceae - Isolation of some furanocoumarins from *Clausena indica* and identity of chalepentin with xylotenin. *Phytochemistry* **10**: 480-481.
- Joshi BS, Gawad DH, Kamat VN. 1972. 6-Methoxyheptaphylline, a new carbazole alkaloid from *Clausena indica* Oliv. *Indian J Chem* **10**: 1123-1124.
- Joshi BS, Kamat VN, Gawad DH. 1974. Structure of Clausindine, a New Coumarin from *Clausena indica* Oliv. *Experientia* **30**: 223.
- Joshi BS, Gawad DH, Williams DJ. 1975. The Structure of Clausantalene, a new sesquiterpene from *Clausena indica* Oliv. *Experientia* **31**: 138-139.

- 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.
- Juan Q, Batmunkh T, Nga D, Eun-Mi S, Joo Y, Burm-Jong L, Ah Koo K. 2007. Anti-inflammatory effect of Mongolia and Vietnamese medicinal plants against LPS-induced NO release in the RAW 264.7 cell. *Planta Med* **73**: 534.
- Kafuku K, Katô R. 1934. On volatile oil of the leaf of *Clausena lunulata*, Hayata. *Nippon Kagaku Kaishi* **55**: 221-223.
- Kinani S, Bouchonnet S, Magne A. 2006. Détection et dosage de composés allergènes dans des compositions de parfumerie par couplage chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse. *Spectra anal* **248**: 28-38.
- 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.
- Koukos PK, Papadopoulou KI, Papagiannopoulos AD, Patiaka DTh. 2001. Chemicals from Greek forestry biomass: constituents of the leaf oil of *Myrtus communis* L. grown in Greece. *J Essent Oil Res* **13**: 245-246.
- Kováts E. 1965. Gas chromatographic characterisation of organic substances in the retention index system. *Adv Chromatogr* **1**: 229-247.
- Krueger RR, Navarro L. 2007. *Citrus. Genetics, Breeding and biotechnology*, Ed. I. Khan, pp.78-79.
- Krupčík J, Gorovenko R, Špánik I, Sandra P, Armstrong DW. 2015. Enantioselective comprehensive two-dimensional gas chromatography. A route to elucidate the authenticity and origin of *Rosa damascena* Miller essential oils. *J Sep Sci* **38**: 3397-3403.
- 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. 219-230.
- 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. 931-950.
- Lambert J, Burba P, Buddrus J. 1992. Quantification of partial structures in aquatic humic substances by volume integration of two-dimensional ¹³C nuclear magnetic resonance spectra. Comparison of one- and two-dimensional techniques, *Magn Reson Chem* **30**: 221-227.
- Lange G, Schultze W. 1988. *Differentiation of isopulegol isomers by chemical ionization mass spectrometry, in Bioflavour'87*. P. Schreier Ed., W. de Gruyter & Co.: Berlin: New-York: 115-122.
- Lawrence BM, Terhune SJ, Hogg JW. 1970. Essential oils and their constituents. V. The oil of *Myrtus communis* L. *Amer Perfum* **85**: 53-55.
- Lawrence BM. 1976-1977. Myrtle oil. *Essential oils*. Carol Stream: Allured Co. p.31.
- Lawrence BM. 1979-1980. Myrtle oil. *Essential oils*. Carol Stream: Allured Co. p.15, p.44.
- Lawrence BM. 1981-1987. Myrtle oil. *Essential oils*. Carol Stream : Allured Co. p.137.
- Lawrence BM. 1990. Myrtle oil. *Perfum Flav* **15**: 65.

- Lawrence BM. 1993. Myrtle oil. *Perfum Flav* **18**: 52.
- Lawrence BM. 1995. Cypress oil. *Perfumer & Flavorist* **20**: 34-35.
- Lawrence BM. 1996. Myrtle oil. *Perfum Flav* **21**: 57.
- Lawrence BM. 2001. Cypress oil. *Perfumer & Flavorist* **26**: 65-66.
- Lawrence BM. 2002. Myrtle oil. *Perfum Flav* **27**: 82.
- Lawrence BM. 2007. Myrtle oil. *Perfum Flav* **32**: 54.
- Le Sau. 1996. *Vietnam Forest Trees*. Agricultural publishing house, Hanoi, 21p.
- Lê Thanh, Nguyễn Xuân Dũng, Bighelli A, Casanova J, Leclercq PA. 1996/1997. Combination of capillary GC, GC/MS and ¹³C-NMR for the characterization of the rhizome oil of *Piper betle* L. (Piperaceae) from Vietnam. *Spectroscopy* **13**: 131-136.
- Leclercq PA, Dũng NX, Thin NN. 1994. Constituents of the leaf oil of Vietnamese *Clausena excavata* Burm.f. *J Essent Oil Res* **6**: 99-100.
- Lesueur D, Ninh Khac Ban, Bighelli A, Muselli A, Casanova J. 2006. Analysis of the root of *Fokiena hodginsii* (Dunn) Henry et Thomas (Cupressaceae) by GC, GC-MS and ¹³C-NMR. *Flavour Fragrance J* **21**: 171-174.
- Lesueur D, Bighelli A, Nguyen Thi Tam, Nguyen Viet Than, Pham Thi Kim Dung, Casanova J. 2007a. Combined Analysis by GC(RI), GC/MS and ¹³C NMR spectroscopy of *Elsholtzia blanda*, *E. penduliflora* and *E. winitiana* essential oils. *Nat Prod Commun* **2**: 857-861.
- Lesueur D, De Rocca Serra D, Bighelli A, Hoi TM, Ninh Khac Ban, Thai TH, Casanova J. 2007b. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Michelia foveolata* Merryll ex Dandy from Vietnam. *Flavour Fragrance J* **22**: 317-321.
- Lesueur D, De Rocca Serra D, Bighelli A, Hoi TM, Thai TH, Casanova J. 2008. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Acronychia pedunculata* (L.) Miq. from Vietnam. *Nat Prod Res* **22**: 393-398.
- Lesueur D, Bighelli A, Casanova J, Hoi TM, Thai TH. 2009. Composition of the Essential Oil of *Piper bavinum* C. DC. from Vietnam. *J Essent Oil Res* **21**: 16-18.
- Li YC, Kuo YH. 1998. Five new diterpenoids from the wood of *Cunninghamia konishii*. *J Nat Prod* **61**: 997-1000.
- Li YC, Kuo YH. 2002. Labdane-type diterpenoids from the wood of *Cunninghamia konishii*. *Chem Pharm Bull* **50**: 498-500.
- Liang YZ, Peng JY, Li Z, Liang HH. 2010a. Microwave-assisted extraction of flavonoids from the fruit of *Clausena indica* (Dalz) Oliv. *J Anhui Agric Sci* **14**: 7269-7271.
- Liang YZ, Peng JY, Yi L, Liang HH. 2010b. Study on microwave-assisted extraction technology of flavonoids from de leaves of *Clausena indica*. *Guangdong Agricultural Sciences*, **8**: 153-155.
- Lim LS. 2004. *Analysis of Flavonoids and Essential Oils from Clausena Excavata and Their Medicinal Properties (masters thesis)*. Universiti Putra Malaysia.
- Lisko JG, Stanfill SB, Duncan BW, Watson CH. 2013. Application of GC-MS/MS for the Analysis of Tobacco Alkaloids in Cigarette Filler and Various Tobacco Species. *Anal Chem* **85**: 3380-3384.
- Little DP, Schwarzbach AE, Adams RP, Hsieh CF. 2004. The circumscription and phylogenetic relationships of *Callitropsis* and the newly described genus *Xanthocyparis* (Cupressaceae). *Am J Bot* **91**: 1872-1881.
- Little DP, Thomas P, Nguyen HT, Phan LK. 2011. Before it had a name: diagnostic characteristics, geographic distribution, and the conservation of *Cupressus tonkinensis* (Cupressaceae). *Brittonia* **63**: 171-196.

- Liu K, Rossi PG, Ferrari B, Berti L, Casanova J, Tomi F. 2007. Composition, irregular terpenoids, chemical variability and antibacterial activity of the essential oil from *Santolina corsica* Jordan et Fourr. *Phytochemistry* **68**: 1698-1705.
- Liu K, Lota ML, Casanova J, Tomi F. 2009. The essential oil of *Bupleurum fruticosum* L. from Corsica: a comprehensive study. *Chem Biodiversity* **6**: 2244-2254.
- Liu Z, Philipps JB. 1991. Comprehensive two-dimensional gas chromatography using an on-column thermal modulator interface. *J Chromatogr Sci* **29**: 227.
- Lockwood GB. 1984. The essential oil from leaves of *Clausena heptaphylla*. *Fitoterapia* **55**: 123-124.
- Lohani H, Gwari G, Andola H, Bhandari U, Chauhan N. 2012. α -Pinene rich volatile constituents of *Cupressus torulosa* D. Don from Uttarakhand Himalaya. *Indian J Pharm Sci* **74**: 278-280.
- Lota ML, De Rocca Serra D, Tomi F, Jacquemond C, Casanova J. 2002. Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. *J Agric Food Chem* **50**: 796-805.
- Mahboubi M, Bidgoli FG. 2010. In vitro synergistic efficacy of combination of amphotericin B with *Myrtus communis* essential oil against clinical isolates of *Candida albicans*. *Phytomedicine* **17**: 771-774.
- Malarvannan S, Senthil Kumar S, Prabavathy VR, Sudha Nair. 2008. Individual and synergistic effects of leaf powder of few medicinal plants against American bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Noctuidae: Lepidoptera). *Asian J Exp Sci* **22**: 79-88.
- Malizia RA, Cardell DA, Molli JS, González S, Guerra PE, Grau RJ. 2000. Volatile constituents of leaf oils from the Cupressaceae family: Part I. *Cupressus macrocarpa* Hartw., *C. arizonica* Greene and *C. torulosa* Don species growing in Argentina. *J of Essent Oil Res* **12**: 59-63.
- Marshall JA, Plike MT. 1966. The stereoselective total synthesis of racemic γ -eudesmol. *Tetrahedron Lett* **41**: 4989-4992.
- Martin AJP, Syngé RLM. 1941. A new form of chromatogram employing two liquid phases. *Biochem J* **35**: 1358-1368.
- Matlengiewicz M, Henzel N, Laurens T, Nicole D, Rubini P, Rodehüser L. 1991. Computer aided analysis of ^{13}C NMR spectra of multicomponent mixtures. 1. Analysis of individual components in a synthetic mixture of monoaromatic hydrocarbons, *Analisis* **19**: 13-17.
- Matlengiewicz M, Henzel N, Lauer JC, Laurens T, Nicole D, Rubini P. 1992. Computer aided analysis of carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of multicomponent mixtures. Part 2. Determination of the content of alkadienes in a light gasoline, *Analyst* **117**: 387-393.
- Matlengiewicz M, Henzel N, Czachowska D, Schmit-Quites F, Nicole D, Lauer JC. 1994. Computer aided analysis of ^{13}C -NMR spectra of multicomponent mixture: 3. Analysis of individual components of a heavy gasoline from liquefaction of polish coal. *Fuel* **73**: 843-850.
- Maxia A, Frau MA, Falconieri D, Karchuli MS, Kasture S. 2011. Essential oil of *Myrtus communis* inhibits inflammation in rats by reducing serum IL-6 and TNF-alpha. *Nat Prod Commun* **6**: 1545-1548.
- Mazzoni V, Bradesi P, Tomi F, Casanova J. 1997. Direct qualitative and quantitative analysis of carbohydrate mixtures using ^{13}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.
- Meijer TM. 1947. The essential oil from the leaves of *Clausena anisata* Hook.f. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **66**: 395-400.
- Michon L, Martin D, Planche JP, Hanquet B. 1997. Estimation of average structural parameters of bitumens by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Fuel* **76**: 9-15.
- Migliore J. « Empreintes des changements environnementaux sur la phylogéographie du genre *Myrtus* en méditerranée et au Sahara. » Thèse de Doctorat, Université Paul Cézanne Aix-Marseille III, 2011.
- Migliore J, Baumel A, Juin M, Fady B, Roig A, Duong N, Médail F. 2013. Surviving in mountain climate refugia: new insights from the genetic diversity and structure of the relict shrub *Myrtus nivellei* (Myrtaceae) in the Sahara Desert. *Plos One* **8**: 1-10.
- Migliore J, Baumel A, Juin M, Médail F. 2012. From Mediterranean shores to central Saharan mountains : key phylogeographical insights from the genus *Myrtus*. *J Biogeogr* **39**: 942-956.
- Mill RR, Farjon A. 2006. Proposal to conserve the name *Xanthocyparis* against *Callitropsis* Oerst. (Cupressaceae). *Taxon* **55**: 229-231.
- Mimica-Dukić N, Bugarin D, Grbović S, Mitić-Ćulafić D, Vuković-Gačić B, Orčić D, Jovin E, Couladis M. 2010. Essential oil of *Myrtus communis* L. as a potential antioxidant and antimutagenic agents. *Molecules* **15**: 2759-2770.
- Mineeva IV, Kulinkovich OG. 2009. Preparation of 3-Bromomethyl-3-butenal Diethylacetal and its conversion into isoprenoid aldehydes derivatives. *Russian J Org Chem* **45**: 1623-1632.
- Molino JF. 1994. Révision du genre *Clausena* Burm. f. (Rutaceae). *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat., Adansonia* **16**: 105-153.
- Molino JF. 1995. Proposal to reject *Illicium san-ki* Perr., a threat to *Clausena anisum-olens* (Blanco) Merr. (Rutaceae). *Taxon* **44**: 427-428.
- Molino JF. 1999. *Clausena anisum-olens* (Blanco) Merrill. In *Plant resources of South-East Asia No.19. Essential oil plants*. Oyen LPA, Nguyen Xuan Dung (Eds.) Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands, 86-89.
- Molino JF. 2000. The inheritance of leaf oil composition in *Clausena anisum-olens* (Blanco) Merr. *J Essent Oil Res* **12**: 135-139.
- Mondello L, Casilli A, Tranchida PQ, Dugo P, Dugo G. 2005. Comprehensive two-dimensional GC for the analysis of citrus essential oils. *Flavour Fragrance J* **20**: 136-140.
- Motto MG, Secord NJ. 1985. Composition of the essential oil from *Asarum canadense*. *J Agric Food Chem* **33**: 789-791.
- Muselli A, Hoi TM, Luu Dam Cu, La Dinh Moi, Bessière JM, Bighelli A, Casanova J. 1999. Composition of the essential oil of *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr. (Araliaceae) from Vietnam. *Flavour Fragrance J* **14**: 41-44.
- Muselli A, Bighelli A, Hoi TM, Nguyen Thi Phuong Thao, Thai TH, Casanova J. 2000. Dihydroperillaldehydes from *Enhydra fluctuans* Lour. essential oil. *Flavour Fragrance J* **15**: 299-302.
- Nam AM, Paoli M, Castola V, Casanova J, Bighelli A. 2011. Identification and quantitative determination of lignans in *Cedrus atlantica* resins using ^{13}C NMR spectroscopy. *Nat Prod Commun* **6**: 379-385.

- Nam AM, Casanova J, Tomi F, Bighelli A. 2014. Composition and chemical variability of Corsican *Pinus halepensis* cone oil. *Nat Prod Commun* **9**: 1361-1364.
- Nassar MI, Aboutabi ESA, Ahmed RF, El-Khrisy EDA, Ibrahim KM, Sleem AA. 2010. Secondary metabolites and bioactivities of *Myrtus communis*. *Pharmacogn Res* **2**: 325-329.
- Nath SC, Bordoloi DN. 1992. Major components of the leaf and fruit oil of *Clausena heptaphylla* W&A growing in Northeast India. *J Essent Oil Res* **4**: 655-656.
- Nath SC, Hazarika AK, Sarma KK. 1996. Chemical composition of the leaf and fruit oil of *Clausena heptaphylla* W&A from Northeast India. *J Essent Oil Res* **8**: 197-198.
- National Institute of Standards and Technology. 1999. PC version 1.7 of *The NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library*, The Perkin Elmer Corporation.
- National Toxicology Program. 2011. NTP 12th Report on Carcinogens. *Report on carcinogens: carcinogen profiles/US Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program*, 12, 374-375.
- Nazaruk J, Kalemba D. 2009. Chemical Composition of the Essential Oils from the Roots of *Erigeron acris* L. and *Erigeron annuus* (L.) Pers. *Molecules* **14**: 2458-2465.
- Nelson G. 1994. *The Trees of Florida: A Reference and Field Guide*. Pineapple Press, p.347.
- Ngassoum MB, Jirovetz L, Buchbauer G, Schmaus G, Hammerschmidt FJ. 1999. Chemical composition and olfactory evaluation of the essential oils of leaves and seeds of *Clausena anisata* (Willd.) J.D. Hook. ex. Benth. from Cameroon. *J Essent Oil Res* **11**: 231-237.
- Núñez CV, Roque NF. 1999. Sesquiterpenes from the stem bark of *Guarea guidonia* (L.) Sleumer (Meliaceae). *J Essent Oil Res* **11**: 439-440.
- Okunade AL, Olaifa JI. 1987. Estragole: an acute toxic principle from the volatile oil of the leaves of *Clausena anisata*. *J Nat Prod* **50**: 990-991.
- Ottavioli J, Bighelli A, Casanova J, Bang BT, Van YP. 2009. GC (Retention Indices), GC-MS, and ¹³C NMR of two Citral-Rich *Cymbopogon* Leaf Oils: *C. flexuosus* and *C. tortilis*. *Spectrosc Lett* **42**: 516-522.
- 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 ¹³C-NMR. *Phytochem Anal* **24**: 574-580.
- Ouattara ZA, Boti JB, Ahibo AC, Sutour S, Casanova J, Tomi F, Bighelli A. 2014. The key role of ¹³C NMR analysis in the identification of individual components of *Polyalthia longifolia* leaf oil. *Flavour Fragrance J* **29**: 371-379.
- Owlia P, Saderi H, Rasooli I, Sefidkon F. 2009. Antimicrobial characteristics of some herbal oils on *Pseudomonas aeruginosa* with spectral reference to their chemical compositions. *Iran J Pharm Res* **8**: 107-114.
- Oyen LPA. 1999. Nguyen Xuan Dung. *Plant Resources of South-East Asia*, Backhuys Publishers, Leiden.
- Özek T, Demirci B, Baser KHC. 2000. Chemical composition of Turkish Myrtle oil. *J Essent Oil Res* **12**: 541-544.
- Padalia RC, Verma RS, Chauhan A, Chanotiya CS. 2013. Essential oil compositions of branchlets and cones of *Cupressus torulosa* D. Don. *J Essent Oil Res* **25**: 251-256.
- 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 Biodiversity* **8**: 344-351.
- 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**: 170-178.
- Paolini J, Costa J, Bernardini AF. 2007. Analysis of the essential oil from roots of *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* (L.) by GC, GC-MS and ¹³C-NMR. *Phytochem Anal* **18**: 235-244.
- Paolini J, Leandri C, Desjobert JM, Barboni T, Costa J. 2008. Comparison of liquid-liquid extraction with headspace methods for the characterization of volatile fractions of commercial hydrolats from typically Mediterranean species. *J Chromatogr A* **1193**: 37-49.
- Park MJ, Gwak KS, Yang I, Choi WS, Jo HJ, Chang JW, Jeung EB, Choi IG. 2007. Antifungal Activities of the Essential Oils in *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry and *Leptospermum petersonii* Bailey and their constituents against various dermatophytes. *J Microbiol* **45**: 460-465.
- Pažitná A, Jánošková N, Špáňik I. 2013. Multidimensional gas chromatography and its applications in food and environmental analysis. *Acta Chim Slovaca* **6**: 133-140.
- Peh TH. 2001. *Chemical constituents and biological activities of Clausena excavata and some citrus species (Rutaceae) (masters)*. Universiti Putra Malaysia.
- Péré V. 2015. Santé : Les plantes médicinales bourgeonnent, lepetitjournal.com/hochiminhville, article du 5 octobre 2015.
- Pereira PC, Cebola MJ, Bernardo-Gil MG. 2009. Evolution of the yields and composition of essential oil from Portuguese Myrtle (*Myrtus communis* L.) through the vegetative cycle. *Molecules* **14**: 3094-3105.
- Peyron L. 1970. L'essence de Myrte Estérel. *Plantes médicinales et phytothérapie* **4**: 279-285.
- Pierre-Leandri C, Fernandez X, Lizzani-Cuvelier L, Loiseau AM, Fellous R, Garnerio J, Andrioli C. 2003. Chemical composition of cypress essential oils: volatile constituents of leaf oils from seven cultivated *Cupressus* species. *J Essent Oil Res* **15**: 242-247.
- Pino JA, Marbot R, Fuentes V. 2006. Aromatic Plants from Western Cuba IV. Composition of the leaf oils of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels and *Swinglea glutinosa* (Blanco) Merr. *J Essent Oil Res* **18**: 139-141.
- Pradheep K, Michael Gomez S, Kalamani A. 2003. Possibilities of broadening the plant wealth of horticulture from existing flora of Tamilnadu, India an overview. *Asian J Plant Sci* **2**: 719-730.
- Prakash D, Raj K, Kapil RS, Popli SP. 1978. Coumarins from *Clausena indica*. *Phytochemistry* **17**: 1194-1195.
- Qu WY, Tan ZW, Yu AN, Quan JP. 2010. Analysis of the chemical constituents of volatile oil from *Asarum insigne* by GC-MS. *Zhong Yao Cai* **33**: 1095-1098.
- Rached W, Benamar H, Bennaceur M, Marouf A. 2010. Screening of the antioxidant potential of some Algerian indigenous plants. *J Biol Sci* **10**: 316-324.
- Rajkumar S, Jebanesan A. 2010. Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena dentata* (Willd) M. Roam. (Rutaceae) against the chikungunya vector, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae). *J Asia-Pac Entomol* **13**: 107-109.
- Ramezani H, Singh HP, Batish DR, Kohli RK, Dargan JS. 2002. Fungicidal effect of volatile oils from *Eucalyptus citriodora* and its major constituent citronellal. *N Z Plant Prot* **55**: 327-330.
- Rasooli I, Moosavi ML, Rezaei MB, Jaimand K. 2002. Susceptibility of microorganisms to *Myrtus communis* L. essential oil and its chemical composition. *J Agric Sci Technol* **4**: 127-133.

- Regalado JC Jr, Phan Ke Loc, Nguyen Tien Hiep, To Van Thao, Averyanov LV. 2006. The Vietnamese Golden Cypress (*Xanthocyparis vietnamensis*) Conservation Status Assessment (CSA) and Conservation Action Plan (CAP). *Fauna and Flora International, Hoang Lien Son Project*, pp.1-12.
- Revial G, Jabin I, Redolfi M, Pfau M. 2001. Enantioselective imine Michael reaction for the preparation of the (8'R,8a'S)-8,8a'-dimethyl-1',3',4',7',8',8a'-hexahydrospiro-[1,3-dioxolane-2,2'(6'H)naphthalen]-6'-one building block. A formal synthesis of (+)-valencenol. *Tetrahedron Asymmetry* **12**: 1683-1688.
- Rezzi S, Bighelli A, Castola V, Casanova J. 2002. Direct identification and quantitative determination of acidic and neutral diterpenes using ¹³C NMR spectroscopy. Application to the analysis of oleoresin of *Pinus nigra*. *Appl Spectro* **56**: 312-317.
- 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.
- Riemer B, Hofer O, Greger H. 1997. Tryptamine derived amides from *Clausena indica*. *Phytochemistry* **45**: 337-341.
- Rojas-Escudero E, Alarcón-Jiménez AL, Elizalde-Galván P, Rojo-Callejas F. 2004. Optimization of carbohydrate silylation for gas chromatography. *J Chromatogr A* **1027**: 117-120.
- Rosa A, Melis MP, Deiana M, Atzeri A, Appendino G, Corona G, Incani D, Loru D, Dessi MA. 2008. Protective effect of the oligomeric acylphloroglucinols from *Myrtus communis* on cholesterol and human low density lipoprotein oxidation. *Chem Phys Lipids* **155**: 16-23.
- Rossi A, Di Paola R, Mazzon E, Genovese T, Caminiti R, Bramanti P, Pergola C, Koeberle A, Werz O, Sautebin L, Cuzzocrea S. 2009. Myrtucommulone from *Myrtus communis* exhibits potent anti-inflammatory effectiveness in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **329**: 76-86.
- Rossi PG, Bao L, Luciani A, Panighi J, Desjobert JM, Costa J, Casanova J, Bolla JM, Berti L. 2007. (E)-Methylisoeugenol and elemicin: antibacterial components of *Daucus carota* L. essential oil against *Campylobacter jejuni*. *J Agric Food Chem* **55**: 7332-7336.
- Rouessac F, Rouessac A. 2004. *Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes* (6^{ème} Ed.). Dunod : Liège, 303p.
- Rushforth K, Adams R, Zhong M, Ma X. -qian, Pandey R. 2003. Variation among *Cupressus* species from the eastern hemisphere based on Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs). *Biochem Syst Ecol* **31**: 17-24.
- Russell J. 2012. A new conifer species affects taxonomic classification in the Cupressaceae. *TIC Talk*. **11**: 3-4.
- Saikia AK, Chetia D, D'Arrigo M, Smeriglio A, Strano T, Ruberto G. 2013. Screening of fruit and leaf essential oils of *Litsea cubeba* Pers. from north-east India - chemical composition and antimicrobial activity. *J Essent Res* **25**: 330-338.
- Salvagnini LE, Oliveira JRS, dos Santos LE, Moreira RRD, Pietro RCLR. 2008. Avaliação da atividade antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). *Braz J Pharmacogn* **18**: 242-244.
- Sandra P, Bicchi C. 1987. *Chromatographic methods – Capillary gas chromatography in essential oil analysis*. Verlag: New York.
- Sati S, Mathela CS. 2005. Essential oil composition of *Valeriana harwickii* var. *arnottiana* from the Himalayas. *Flavour Fragrance J* **20**: 299-301.

- Schomburg G, Husmann H, Hübinger E, König WA. 1984. Multidimensional capillary gas chromatography – Enantiomeric separations of selected cuts using a chiral second column. *J High Resolut Chromatogr Chromatogr Commun* **7**: 404-410.
- Schultze W, Lange G, Schmaus G. 1992. Isobutane and ammoniac chemical ionization mass spectrometry of sesquiterpene hydrocarbons. *Flavour Fragrance J* **7**: 55-64.
- Sciarrone D, Ragonese C, Carnovale C, Piperno A, Dugo P, Dugo G, Mondello L. 2010. Evaluation of tea tree oil quality and ascaridole: A deep study by means of chiral and multi heart-cuts multidimensional gas chromatography system coupled to mass spectrometry detection. *J Chromatogr A* **1217**: 6422-6427.
- Scora W. 1973. Essential leaf oil variability in green variegated and albino foliage of *Myrtus communis*. *Phytochemistry* **12**: 153-155.
- Sellappan M, Palanisamy D, Joghee N, Bhojraj S. 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of the volatile oil of the cones of *Cupressus torulosa* D. DON from Nilgiris, India. *Asian J Tradit Med* **2**: 206-211.
- Sellier N, Cazaussus A, Budzinski H, Lebon M. 1991. Structure determination of sesquiterpenes in chinese vetiver oil by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **557**: 451-458.
- Semmler FW, Bartelt K. 1907. Myrtenol, a primary alcohol C₁₀H₁₆O from the ethereal oil of *Myrtus communis* L. *I Chem Inst Univ Berlin* **40**: 1363-1377.
- Senthilkumar A, Venkatesalu V. 2009. Phytochemical analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Clausena anisata* (Willd.) Hook. f. ex Benth. *Int J Integr Biol* **5**: 116-120.
- Shaheen F, Ahmad M, Nahar Khan S, Samreen Hussain S, Anjum S, Tashkhodjaev, Kambarali Turgunov B, Sultankhodzhaev MN, Iqbal Choudhary M, Atta-ur-Rahman. 2006. New α -glucosidase inhibitors and antibacterial compounds from *Myrtus communis* L. *Eur J Org Chem* **10**: 2371-2377.
- Shi XJ, Ye G, Tang WJ, Zhao WM. 2010. A new coumarin and carbazole alkaloid from *Clausena vestita* D. D. Tao. *Helv Chim Acta* **93**: 985-990.
- Shunying Z, Yang Y, Huaidong Y, Yue Y, Dong L, Guolin Z. 2006. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Asarum caulescens*. *Wuhan Univ J Nat Sci* **11**: 699-703.
- Silba J. 1994. The trans-pacific relationship of *Cupressus* in India and North America. *Journal of the International Conifer Preservation Society* **1**: 23-25.
- Snoussi A, Kachouri F, Chaabouni MM, Bouzouita N. 2011. Comparative GC analyses of ripe fruits, leaves and floral buds essential oils of Tunisian *Myrtus communis* L. *Mediterr J Chem* **1**: 38-43.
- Standal IB, Axelson DE, Aursand M. 2010. ¹³C NMR as a tool for authentication of different gadoid fish species with emphasis on phospholipid profiles. *Food Chem* **121**: 608-615.
- Sterling EJ, Hurley MM. 2005. Conserving biodiversity in Vietnam: Applying biogeography to conservation research. In Proceedings of the California Academy of Sciences, Vol.56, Supplement I, No. 9, 98-118.
- Su XF. 2008. Analysis on chemical components of the essential oil from the leaves of *Clausena anisum-olens* (Blanco) Merr. by GC-MS. *J Anhui Agric Sci* 10956-10957.
- Su XF, Huang LJ, Feng PZ. 2011a. Chemical composition analysis and antimicrobial activity of volatile oil from the nutlets of *Clausena anisum-olens*. *Food Sci* **32**: 30-32.

- Su XF, Liang YZ. 2011b. Chemical constituents of essential oil of different organs from *Clausena anisum-olens*. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae* **12**: 87-89.
- Su YC, Ho CL, Wang EIC. 2006. Analysis of leaf essential oils from the indigenous five conifers of Taiwan. *Flavour Fragrance J* **21**: 447-452.
- Su YC, Hsu KP, Wang EI, Ho CL. 2012. Composition, anticancer, and antimicrobial activities in vitro of the heartwood essential oil of *Cunninghamia lanceolata* var. *konishii* from Taiwan. *Nat Prod Commun* **7**: 1245-1247.
- Sugawara T, Fujii N, Senni K, Murata J. 2005. Morphological and karyological characteristics and phylogenetic relationship of *Asarum cordifolium* C.E.C. Fisch. (Aristolochiaceae) occurring in Myanmar. *Acta Phytotax Geobot* **56**: 247-255.
- Sumbul S, Aftab AM, Asif M, Akhtar M. 2011. *Myrtus communis* Linn. A review. *Indian J Nat Prod Res* **2**: 395-402.
- Sutour S, Bradesi P, de Rocca-Serra D, Casanova J, Tomi F. 2008. Chemical composition and antibacterial of the essential oil *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* (Req.) Greuter. *Flavour Fragrance J* **23**: 107-114.
- 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. *Chem Biodiversity* **7**: 1002-1008.
- 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 ¹³C NMR spectroscopy. *Nat Prod Commun* **6**: 1-4.
- Sutour S, Bradesi P, Luro F, Casanova J, Tomi F. 2015a. Germacra-1(10),5-dien-4 α -ol in *Fortunella* sp. leaf oils. *Flavour Fragrance J* **30**: 445-450.
- Sutour S, Xu T, Casabianca H, Paoli M, de Rocca-Serra D, Tomi F, Garrido M, Pasqualini V, Aiello A, Castola V, Bighelli A. 2015b. Chemical composition of extracts from *Chaetomorpha linum* (Miller) Kütz. A potential use in the cosmetic industry. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients* **2**: 1-5.
- Taheri A, Seyfan A, Jalalinezhad S, Nasery F. 2013. Antibacterial effect of *Myrtus communis* hydro-alcoholic extract on pathogenic bacteria. *J Res Med Sci* **15**: 19-24.
- Tajuddin SN, Yusoff MM. 2010. Chemical composition of volatile oils of *Aquilaria malaccensis* (Thymelaeaceae) from Malaysia. *Nat Prod Commun* **5**: 1965-1968.
- Tam NT, Ha Lai An, Bighelli A, Casanova J. 1998a. Identification of the components of *Illicium griffithii* Hook. f. et Thoms. essential oil from Vietnam using Carbon-13 NMR spectroscopy. *J Essent Oil Res* **10**: 433-435.
- Tam NT, Ha Ai An, Muselli A, Bighelli A, Casanova J. 1998b. Essential oil of an unidentified *Illicium* species from Ninh Binh Province, Vietnam. *Flavour Fragrance J* **13**: 393-396.
- Tam NT, Duong Thi Thuam, Bighelli A, Castola V, Muselli A, Richomme P, Casanova J. 2004. *Baeckea frutescens* leaf oil from Vietnam: composition and chemical variability. *Flavour Fragrance J* **19**: 217-220.
- Tam NT, Ha Ai An, Bighelli A, Muselli A, Casanova J. 2005. Advances in the chemical composition of essential oils from *Illicium griffithii* Hook. f. et Thoms. From Vietnam. *J Essent Oil Res* **17**: 79-81.
- Tavares AC, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Cruz MT, Lopes MC, Canhoto J, Salgueiro LR. 2008. Essential oil of *Daucus carota* subsp. *halophilus*: Composition, antifungal activity and cytotoxicity. *J Ethnopharmacol* **119**: 129-134.

- Thai TH, Phùng Tuyết Hồng, Nguyễn Thị Minh. 2007a. Chemical composition of the essential oils of *Cunninghamia konishii* Hayata from Vietnam. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hanoi, 375-377.
- Thai TH, Nguyen Tien Hiep, Phung Tuyet Hong, Do Thi Minh. 2007b. Chemical composition of the essential oil of *Xanthocyparis vietnamensis* Farjon and Hiep from Vietnam. *Vietnam J Biol* **29**: 92-94.
- Thai TH, Hien NT, Minh DT, The PV. 2009. The chemical composition of leaf oil of *Cupressus tonkinensis* Silba. in Huu Lien, Lang Son province. *J Biol* **31**: 74-76.
- Thai TH, Hien NT, Minh DT, Tuan NA. 2010. Chemical composition of the essential oil of *Asarum glabrum* Merr. in Vietnam. *J Biol* **32**: 94-96.
- Thai TH, Hien NT, Hoi TM, Tuan NA, Dat NT, Hai NT. 2013a. Chemical composition of essential oil from some species of *Asarum* L. genus in Vietnam. *J Biol* **35**: 55-60.
- Thai TH, Bazzali O, Hoi TM, Tuan NA, Tomi F, Casanova J, Bighelli A. 2013b. Chemical composition of the essential oils from two Vietnamese *Asarum* species: *A. glabrum* and *A. cordifolium*. *Nat Prod Commun* **8**: 235-238.
- Thai TH, Bazzali O, Hien NT, The PV, Loc PK, Hoi TM, Tomi F, Casanova J, Bighelli A. 2013c. Chemical composition of leaf and stem oils from Vietnamese *Cupressus tonkinensis* Silba. *J Essent Oil Res* **25**: 11-16.
- Thai TH, Bazzali O, Hoi TM, Hien NT, Hung NV, Tomi F, Casanova J, Bighelli A. 2014. Chemical composition of the essential oils from Vietnamese *Clausena indica* and *C. anisum-olens*. *Nat Prod Commun* **9**: 1531-1534.
- Thai TH, Bazzali O, Hoi TM, Minh DT, Loc PK, Thi Thanh Nga Nguyen, Tomi F, Casanova J, Bighelli A. 2015. Chemical composition of the essential oil from *Cunninghamia konishii* Hayata growing wild in Vietnam. *American Journal of Essential Oils and Natural Products* **2**: 1-5.
- Thao NTP, Thuy NT, Hoi TM, Thai TH, Muselli A, Bighelli A, Castola V, Casanova J. 2004. *Artemisia vulgaris* L. from Vietnam: chemical variability and composition of the oil along the vegetative life of the plant. *J Essent Oil Res* **16**: 358-361.
- The PV, Thai TH, Hiep NT. 2009. Some additional data on the ecology and conservation of *Cupressus tonkinensis* Silba in Huu Lien Natural Reserve, Huu Lung District, Lang Son Province. In Proceedings of 3rd National Scientific Conference on Ecology and Biological Resources, Hanoi, pp. 1660-1667.
- The PV, Loc PK, Hiep NT, Silba J. 2013. The status of wild and cultivated populations of *Cupressus tonkinensis* Silba in Vietnam. *Bulletin of the Cupressus Conservation Project* **2**: 10-16.
- Theanphong O, Songsak T, Mingvanish W. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* (Sieber) Swingle leaf. *Mahidol University J Pharmaceutical Sciences* **35**: 57-61.
- Tian J, Ban X, Zeng H, He J, Huang B, Wang Y. 2011. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *Int J Food Microbiol* **145**: 464-470.
- Tomi F, Bradesi P, Bighelli A, Casanova J. 1995. Computer-aided identification of individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy. *J Magn Reson Anal* **1**: 25-34.
- Tomi F, Casanova J. 2000. Contribution de la RMN du carbone-13 à l'analyse des huiles essentielles. *Annales Fals & Expertise Chim* **93**: 313-330.
- Touaibia M, Chaouch FZ. 2014a. Evaluation of the antioxidant activity of aqueous, methanolic and ethanolic extracts of the Sahara-endemic species *Myrtus nivellei* Batt and Trab. (Myrtaceae). *Int J Innovation Appl Stud* **6**: 407-413.

- Touaibia M, Chaouch FZ, Chaouia C, Cherif H. 2014b. Caractérisation phytochimique de l'espèce saharo-endémique *Myrtus nivellei* Batt & Trab (Myrtaceae). *Algerian J Nat Prod* **2**: 27-34.
- Touaibia M, Chaouch FZ. 2015. Anti-inflammatory effect of *Myrtus nivellei* Batt & Trab (Myrtaceae) methanolic extract. *J Fundam Appl Sci* **7**: 77-82.
- Toudert-Taleb K, Hedjal-Chebheb M, Hami H, Debras JF, Kellouche A. 2014. Composition of essential oils extracted from six aromatic plants of Kabyle origin (Algeria) and evaluation of their bioactivity on *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Bruchidae). *African Entomology* **22**: 417-427.
- Traboulsi AF, Taoubi K, El-Haj S, Bessiere JM, Rammal S. 2002. Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera : Culicidae). *Pest Manag Sci* **58**: 491-495.
- Trung HD, Thang TD, Ban PH, Hoi TM, Dai DN, Ogunwande IA. 2014. Terpene constituents of the leaves of five Vietnamese species of *Clausena* (Rutaceae). *Nat Prod Res* **28**: 622-630.
- Tuan NA, Thai TH, Wang JC, Lu CT. 2012a. A new record of species *Asarum yunnanense* T. Sugaw., Ogisu & C. Y. Cheng (Aristolochiaceae) for the flora of Vietnam. *J Biol* **34**: 441-445.
- Tuan NA, Thai TH, Wang JC, Lu CT. 2012b. A new record of species *Asarum cordifolium* C. E. C. Fischer (Aristolochiaceae) for the flora of Vietnam. *J Biol* **34**: 197-200.
- Tuberoso CIG, Barra A, Angioni A, Sarritzu E, Pirisi FM. 2006. Chemical composition of volatiles in Sardinian Myrtle (*Myrtus communis* L.) alcoholic extracts and essential oils. *J Agric Food Chem* **54**: 1420-1426.
- Urdahl O, Brekke T, Sjöblöm J. 1992. ¹³C NMR and multivariate statistical analysis of adsorbed surface-active crude oil fractions and the corresponding crude oils. *Fuel* **71**: 739-746.
- Usman LA, Hamid AA, Olawore NO, Fakunle CO, Oladosu IA, Zubair MF. 2010. Chemical composition of leaf essential oil of *Clausena anisata* growing in North-Central Nigeria. *J Appl Sci Res* **6**: 891-894.
- Van Beek TA, Kleis R, Posthumus MA, Van Veldhuizen A. 1989. Essential oil of *Amyris balsamifera*. *Phytochemistry* **28**: 1909-1911.
- Van Den Dool H, Kratz PD. 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J Chromatogr* **11**: 463-471.
- 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. *Phytochemistry* **66**: 1956-1962.
- Verma RS, Padalia RC, Chauhan A, Yadav A, Chanotiya CS. 2015. Essential oil composition of Himalayan Peony (*Paeonia emodi* Royle). *J Essent Oil Res* **27**: 477-480.
- Vernin G, Boniface C, Metzger J, Ghiglione C, Hammoud A, Suon KN, Fraise D, Párkányi C. 1988. GC-MS-SPECMA bank analysis of *Juniperus communis* needles and berries. *Phytochemistry* **27**: 1061-1064.
- Vernin G, Lageot C. 1992. Couplage CG/SM pour l'analyse des arômes et des huiles essentielles. *Analysis* **20**: 34-39.
- Vernin G, Parkanyi C, Cozzolino F, Fellous R. 2004. GC/MS Analysis of the Volatile Constituents of *Corymbia citriodora* Hook. from Réunion Island. *J Essent Oils Res* **16**: 560-565.

- Vernin G, Petitjean M, Poite JC, Metzger J, Fraisse D, Suon KN. 1986. *Mass Spectra and Kováts Indices Databank of Volatile Aroma Compounds, Chapitre VII in Computer aids to chemistry*. Vernin G, Chanon M Ed.: Horwood E., Pub.,Chilchester: 294-333.
- Vicidomini S. 2007. Uso alternativo delle essenze da fronda recisa : i fitoestratti di *Myrtus communis* (Myrtaceae). Contributo sulla agro-ecologia delle colture oggetto del progetto Co.Al.Ta. *Il Naturalista Campano* **17**: 1-40.
- Vidrich V, Franci M, Michelozzi M, Fusi P. 2006. Variabilità della composizione di olii essenziali in diverse provenienze italiane di *Mirtus communis* L. *L'Italia Forestale e Montana* **1**: 87-92.
- Wang D, Wang X, Xia X. 1997. Analysis of season variation of methyleugenol and safrole in *Asarum heterotropoides* by gas chromatography. *Se Pu* **15**: 85-86.
- Wang YS, He HP, Yang JH, Shen YM, Zhou J, Hao XJ. 2005. A new cyclopeptide from *Clausena anisum-olens*. *Helv Chim Acta* **88**: 2345-2348.
- Wang YS, Huang R, Li L, Zhang HB, Yang JH. 2008a. *O*-terpenoidal coumarins from *Clausena anisum-olens*. *Biochem Syst Ecol* **36**: 801-803.
- Wang YS, He HP, Yang JH, Di YT, Hao XJ. 2008b. New monoterpenoid coumarins from *Clausena anisum-olens*. *Molecules* **13**: 931-937.
- Wang YS, Xu HY, Wang DX, Yang JH. 2009a. A new *O*-terpenoidal coumarin from *Clausena anisum-olens* Merr. *Molecules* **14**: 771-776.
- Wang YS, He HP, Yang JH, Di YT, Tan NH, Hao XJ. 2009b. Clausenain B, a phenylalanine-rich cyclic octapeptide from *Clausena anisum-olens*. *J Braz Chem Soc* **20**: 478-481.
- Wang YS, Huang R, Li NZ, Yang JH. 2010. Coumarins from *Clausena anisum-olens* Merr. *Biosci, Biotechnol Biochem* **74**: 1483-1484.
- Wannes WA, Mhamdi B, Marzouk B. 2009. Variations in essential oil and fatty acid composition during *Myrtus communis* var. *italica* maturation. *Food Chem* **112**: 621-626.
- Wannes WA, Mhamdi B, Sriti J, Ben Jemia M, Ouchikh O, Hamdaoui G, Kchouk ME, Marzouk B. 2010. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food Chem Toxicol* **48**: 1362-1370.
- Wei F, Furihata K, Koda M, Hu F, Kato R, Miyakawa T, Tanokura M. 2012. ¹³C NMR-Based metabolomics for the classification of green coffee beans according to variety and origin. *J Agric Food Chem* **60**: 10118-10125.
- Wei FL, Liang YZ, Huang QZ. 2011. Study on antimicrobial effect of the flavonoids in *Clausena indica* (Dalz) Oliv. fruits. *J Anhui Agric Sci* **26**: 15932-15933.
- Weyerstahl P, Marschall H, Rustaiyan A. 1994. Constituents of the essential oil of *Myrtus communis* L. from Iran. *Flavour Fragrance J* **6**: 333-337.
- Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D. 1996. New sesquiterpene ethers from vetiver oil. *Liebigs Ann* **7**: 1195-1199.
- Weyerstahl P, Schlicht V. 1997a. Synthesis of rac-bisabol-3(15),10-dien-7-ol. *Liebigs Ann* **8**: 1789-1790.
- Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D. 1997b. New cis-eudesm-6-ene derivatives from vetiver oil. *Liebigs Ann* **7**: 1783-1787.
- Weyerstahl P, Marschall H, Weirauch M, Thefeld K, Surburg H. 1998. Constituents of commercial *Labdanum* oil. *Flavour Fragrance 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 Fragrance J* **14**: 121-130.

- Weyerstahl P, Marschall H, Eckhardt A, Christiansen C. 1999b. Constituents of commercial Brazilian Lantana oil. *Flavour Fragrance J* **14**: 15-28.
- Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D. 2000a. 1,7-Cyclogermacrene-1(10),4-dien-15-al, a sesquiterpene with a novel skeleton, and other sesquiterpenes from Haitian vetiver oil. *Flavour Fragrance J* **15**: 61-83.
- Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D. 2000b. Analysis of the polar fraction of Haitian vetiver oil. *Flavour Fragrance J* **15**: 153-173.
- Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D, Surburg H. 2000c. Constituents of Haitian vetiver oil. *Flavour Fragrance J* **15**: 395-412.
- Wilczewska AZ, Ulman M, Chilmończyk Z, Maj J, Koprowicz T, Tomczyk M, Tomczykowa M. 2008. Comparison of volatile constituents of *Acorus calamus* and *Asarum europaeum* obtained by different techniques. *J Essent Oil Res* **20**: 390-395.
- Williamson M, Neuhaus D. 1989. *The nuclear overhauser effect in structural and conformational analysis*. VCH Publishers: New York, 522p.
- Wüst M. 2015. Advances in the analysis of volatile isoprenoid metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **148**: 201-213.
- Xu T, Gherib M, Bekhechi C, Atik-Bekkara F, Casabianca H, Tomi F, Casanova J, Bighelli A. 2015. Thymyl esters derivatives and a new natural product modhephanone from *Pulicaria mauritanica* Coss. (Asteraceae) root oil. *Flavour Fragrance J* **30**: 83-90.
- Yadegarinia D, Gachkar L, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rasooli I. 2006. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry* **67**: 1249-1255.
- Yaouba A, Tatsadjieu LN, Dongmo PMJ, Etoa FX, Mbofung CMF, Zollo PHA, Menut C. 2011. Evaluation of *Clausena anisata* essential oil from Cameroon for controlling food spoilage fungi and its potential use as an antiradical agent. *Nat Prod Commun* **6**: 1367-1371.
- Yapi TA, Boti JB, Attioua BK, Ahibo AC, Bighelli A, Casanova J, Tomi F. 2012a. Three new natural compounds from the root bark essential oil from *Xylopiya aethiopica*. *Phytochem Anal* **23**: 651-656.
- Yapi TA, Boti JB, Félix TZ, Ahibo AC, Tomi F, Bighelli A. 2012b. *Pachypodanthium staudtii* Engl & Diels from Côte d'Ivoire: composition of leaf, stem bark and roots oils. *Eur J Sci Res* **69**: 128-134.
- Yapi TA, Boti JB, Ahibo AC, Bighelli A, Casanova J, Tomi F. 2013. Combined analysis of *Xylopiya rubescens* Oliv. leaf oil using gas chromatography with flame ionization detection, gas chromatography with mass spectrometry and ¹³C nuclear magnetic resonance: structure elucidation of new compounds. *Flavour Fragrance J* **28**: 373-379.
- Yapi TA, Boti JB, Tonzibo ZF, Ahibo CA, Bighelli A, Casanova J, Tomi F. 2014. Chemical variability of *Xylopiya quintasii* Engl. & Diels leaf oil from Côte d'Ivoire. *Chem Biodiversity* **11**: 332-339.
- Yapi TA, Boti JB, Ahibo CA, Bighelli A, Casanova A, Tomi F. 2015. Composition and chemical variability of Ivoirian *Xylopiya staudtii* leaf oil. *Nat Prod Commun* **10**: 1059-1062.
- You CX, Jiang HY, Zhang WJ, Guo SS, Yang K, Lei N, Ma P, Geng ZF, Du SS. 2015. Contact toxicity and repellency of the main components from the essential oil of *Clausena anisum-olens* against two stored product insects. *J Insect Sci* **15**: 1-7.

- Yu T, Li YZ, Hua SJ, Gang L. 2009. Two steps extraction and analysis of volatile oil from the leaf of *Clausena indica* (Datz.) Oliv. by gas-chromatography-mass spectrometry. *J Guangxi Agriculture* **4**: 123-134.
- Zanetti S, Cannas S, Molicotti P, Bua A, Cubeddu M, Procedda S, Marongiu B, Sechi LA. 2010. Evaluation of the antimicrobial properties of the essential oil of *Myrtus communis* L. against clinical strains of *Mycobacterium* spp. *Interdiscip Perspect Infect Dis* **2010**: 1-4.
- Zhang F, Xu Q, Fu S, Ma X, Xiao H, Liang X. 2005. Chemical constituents of the essential oil of *Asarum forbesii* Maxim (Aristolochiaceae). *Flavour Fragrance J* **20**: 318-320.
- Zhao J, Nan P, Zhong Y. 2004. Chemical composition of the essential oils of *Clausena lansium* from Hainan Island, China. *Zeitschrift für Naturforschung., C. A. J Biosciences* **59**:153-156.
- Zhi N. 2006a. Chemical components of essential oil in *Clausena excavata* leaves. *Acta Bot Boreali-Occidentalia Sinica* **26**: 193-196.
- Zhi N. 2006b. Chemical constituents of essential oil from leaves of three species of *Clausena*. *Biomass Chemical Engineering* **2**: 19-22.
- Zhou H, Huang Ke-jian, Pan Zhi-wen, Huang G, Su T, Lin Cui-wu. 2008a. Analysis of Essential Oil from The Fruit Peel of *Clausena indica* (Datz.)Oliv by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Fine Chemicals* **1**.
- Zhou H, Huang KJ, Pan ZW, Lin CW, Huang G, Su T. 2008b. Headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry for analysis of volatile components from the fresh leaves and fresh fruit peel of *Clausena indica* (Datz.) Oliv. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni* **47**: 71-74.
- Zupanc M, Prošek M, Dušan M. 1992. Combined CI and EI mass spectra in the analysis of essential oils. *J High Resol Chromatogr* **15**: 510-513.

Annexes

Annexe A : Fractionnement de l'huile essentielle de feuilles de *C. tonkinensis*

Masses (mg)	HE F1 F2 F3 F4 F5 F6 F7 F8 F9 F10												Identification		
	1500	544	265	7	19	15	55	73	49	129	85				
Composés	Ira	Irp													
Tricylène	921	1027	0,1	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ir, SM
α -Thujène	924	1027	2,9	4,4	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ir, RMN ¹³ C [†]
α -Pinène	932	1027	23,2	46,0	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Fenchène	943	1062	0,1	0,1	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ir, SM
Camphène	945	1071	0,2	0,4	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ir, SM
Sabinène	967	1126	21,1	21,9	42,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
β -Pinène	972	1114	0,7	1,3	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
Myrcène	981	1163	4,4	5,5	12,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ir, RMN ¹³ C
α -Phellandrène	998	1168	0,1	0,2	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ir, SM
δ -3-Carène	1006	1151	tr	0,2	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ir, SM
α -Terpinène	1010	1183	2,7	2,7	5,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
<i>p</i> -Cymène	1012	1273	0,3	0,4	2,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
Limonène *	1022	1203	1,5	2,0	3,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
β -Phellandrène *	1022	1212	0,3	0,6	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
(<i>E</i>)- β -Ocimène	1037	1251	0,1	0,1	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ir, SM
γ -Terpinène	1049	1248	4,5	5,1	8,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
<i>trans</i> -Hydrate de sabinène	1053	1460	0,3	-	-	-	-	-	-	-	4,2	3,8	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
Terpinolène	1079	1285	2,0	2,3	4,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
<i>cis</i> -Hydrate de sabinène	1083	1543	0,4	-	-	-	-	-	-	-	1,1	3,5	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
Camphre	1121	1515	tr	-	-	-	-	1,6	-	-	-	-	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
Hydrate de camphène (OH <i>exo</i>)	1133	1592	0,2	-	-	-	-	-	-	0,3	2,7	1,2	-	-	Ir, RMN ¹³ C
Terpinèn-4-ol	1163	1599	11,5	-	-	-	-	61,6	96,5	94,7	72,2	-	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
α -Terpinéol	1172	1691	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	6,0	8,7	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
<i>cis</i> -Pipéritol	1180	1675	tr	-	-	-	-	-	-	0,5	2,5	0,2	-	-	Ir, RMN ¹³ C
<i>trans</i> -Pipéritol	1190	1740	tr	-	-	-	-	-	-	-	0,2	1,7	-	-	Ir, RMN ¹³ C
Acétate de fenchyle	1207	1468	tr	-	-	-	2,4	-	-	-	-	-	-	-	Ir, RMN ¹³ C
Acétate de bornyle	1269	1578	tr	-	-	-	5,5	-	-	-	-	-	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
Acétate d' α -terpinyle	1332	1693	0,2	-	-	-	29,4	-	-	-	-	-	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
(<i>E</i>)- β -Caryophyllène	1417	1596	0,8	1,0	2,6	2,4	-	-	-	-	-	-	-	-	Ir, RMN ¹³ C
α -Humulène	1450	1667	0,3	0,1	1,2	4,2	-	-	-	-	-	-	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
4-Méthoxysafrole *	1464	2174	tr	-	-	-	2,0	-	-	-	-	-	-	-	Ir, RMN ¹³ C
Germacrène D	1476	1706	0,9	0,6	3,7	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Ir, RMN ¹³ C
γ -Humulène	1481	1716	tr	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ir, SM
2-Méthylbutyrate de bornyle	1491	1719	0,1	-	-	-	1,1	-	-	-	-	-	-	-	Ir, SM
Isovalérate de bornyle	1502	1752	tr	-	-	-	3,3	-	-	-	-	-	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
δ -Cadinène	1514	1755	0,2	0,3	0,5	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	Ir, SM
β -Elémol	1534	2072	3,4	-	-	-	-	-	-	-	0,1	38,0	36,6	-	Ir, RMN ¹³ C
Oxyde de caryophyllène	1569	1975	0,2	-	-	-	-	8,2	-	-	-	-	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
Cédrol	1589	2111	0,1	-	-	-	-	-	-	0,5	3,6	-	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
γ -Eudesmol	1617	2175	0,4	-	-	-	-	-	-	-	0,6	6,3	4,2	-	Ir, RMN ¹³ C
β -Eudesmol	1634	2241	0,7	-	-	-	-	-	-	-	0,4	11,9	7,9	-	Ir, RMN ¹³ C
α -Eudesmol	1640	2232	0,6	-	-	-	-	-	-	-	tr	10,7	7,6	-	Ir, RMN ¹³ C
Oxyde de manoylé	1983	2348	0,1	-	-	-	15,0	-	-	-	-	-	-	-	Ir, RMN ¹³ C
Abiétatriène	2034	2487	0,2	0,1	0,7	5,9	-	-	-	-	-	-	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
Abiéta-7,13-diène	2072	2451	0,7	1,0	1,6	3,7	-	-	-	-	-	-	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
Isoabiéniol	2085	2660	0,4	-	-	-	-	-	0,5	1,4	9,4	1,1	-	-	Ir, RMN ¹³ C
<i>trans</i> -Totarol	2263	nd	0,2	-	-	-	-	13,8	-	-	-	-	-	-	Ir, RMN ¹³ C
Total			86,7	96,4	95,2	20,0	58,6	85,2	97,0	97,4	91,7	82,4	72,2		

L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés suivis d'un astérisque (colonne polaire). Ir^a et Ir^p : indices de rétention mesurés respectivement sur colonnes apolaire (BP-1) et polaire (BP-20). † Identification par RMN ¹³C : gras = composés identifiés dans l'HE et les fractions de chromatographie ; italique = composés identifiés dans les fractions de chromatographie. tr : traces (<0,05 %) ; nd = non déterminé, non élué dans les conditions standards de CPG.

Annexe B : Teneurs des principaux composés identifiés d'un hydrolat de *M. communis* de Corse.

Composés	Ir^a	Ir^p	%
(Z)-Hex-3-èn-1-ol	829	1378	2,8
1,8-Cinéole	1017	1208	8,4
Linalol	1080	1541	3,9
<i>trans</i> -Pinocarvéol	1120	1649	1,9
α -Terpinéol	1169	1690	25,5
Acétate de géranyle	1355	1751	1,6
Méthyleugénol	1365	2005	7,7
Dione #	1489	2030	22,1

: 3,3,5,5,8,8-hexaméthyl-7-oxabicyclo[4.3.0]non-1(6)-èn-2,4-dione

Annexe C1 : Compositions chimiques des huiles essentielles de *Myrtus communis* de Corse.

Composés	Ir ^a	Ir ^p	1	2	3	4	5	6	7	8
Isobutyrate d'isobutyle	894	1088	0,4	0,5	0,8	0,4	0,5	0,6	0,7	0,9
α -Thujène	920	1084	-	0,3	0,3	-	0,4	0,4	0,4	0,5
α -Pinène	928	1025	42,8	48,5	49,5	51,0	54,8	55,5	53,4	48,6
β -Pinène	966	1110	0,5	0,5	0,7	0,6	0,7	0,5	0,6	0,6
Myrcène	981	1163	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Méthylbutyrate d'isobutyle	983	1173	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,5
α -Phellandrène	994	1167	-	0,2	0,3	-	-	0,6	0,3	0,3
Isobutyrate de 2-méthylbutyle	996	1193	0,3	0,2	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
δ -3-Carène	1002	1148	0,2	0,3	0,4	0,3	0,4	0,6	0,5	0,6
α -Terpinène *	1008	1183	-	-	0,3	-	-	-	-	0,1
<i>p</i> -Cymène *	1008	1271	1,1	0,9	0,7	1,1	0,8	1,1	1,1	1,5
Limonène *	1018	1201	3,5	6,0	5,4	4,4	5,4	5,7	5,4	5,6
1,8-Cinéole *	1018	1209	25,4	29,7	26,4	21,0	24	20,9	25,2	29,1
(<i>E</i>)- β -Ocimène	1034	1249	-	0,1	0,3	0,1	0,4	0,8	0,3	0,2
γ -Terpinène	1045	1245	-	0,3	0,8	0,1	0,5	0,7	0,5	0,5
Terpinolène	1075	1283	-	0,3	0,6	0,2	0,5	0,9	0,6	0,5
Linalol	1080	1542	3,9	1,1	1,7	2,0	1,2	1,9	2,1	1,9
2-Méthylbutyrate de 2-méthylbutyrate	1085	1277	0,8	0,4	0,6	0,4	0,5	0,3	0,4	0,3
Camphre	1116	1512	0,1	-	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -Pinocarvéol	1120	1650	0,2	-	0,1	-	-	0,2	-	-
<i>trans</i> -Verbénol	1155	1672	0,5	-	-	-	-	-	-	-
Terpinèn-4-ol	1158	1596	0,3	0,2	0,3	t	0,2	0,3	0,3	0,4
α -Terpinéol *	1168	1691	2,5	1,2	1,1	0,8	0,8	1,8	1,6	2,0
Myrténol *	1168	1786	-	-	-	-	-	-	-	-
Méthylchavicol	1170	1669	0,2	0,2	-	-	-	-	-	-
Verbénone	1177	1699	0,4	-	-	-	-	-	-	-
Acétate de fenchyle *	1210	1469	t	-	-	-	-	-	-	-
Carvone *	1210	1727	t	-	-	-	-	-	-	-
Acétate de linalyle	1235	1553	0,8	0,2	0,1	0,1	0,5	0,1	0,1	0,1
Géranial	1237	1725	t	-	-	-	-	-	-	-
Acétate de bornyle	1265	1576	0,4	1,0	-	-	-	-	-	-
Acétate de myrtényle	1302	1685	-	-	-	-	-	-	-	-
Acétate d' α -terpinyle	1327	1691	0,8	0,6	0,4	-	0,5	0,2	0,2	0,3
Acétate de géranyle	1355	1751	4,8	2,0	1,9	1,7	2,5	1,3	1,5	1,5
Méthyleugénol	1364	2006	1,2	0,5	0,6	0,5	0,6	0,4	0,4	0,5
β -Elémène	1384	1587	0,3	0,1	0,2	0,2	-	0,2	t	0,1
(<i>E</i>)- β -Caryophyllène	1414	1594	1,7	0,7	1,0	1,3	0,8	1,3	0,9	0,8
α -Humulène	1446	1665	0,7	0,2	0,3	0,4	-	0,4	0,3	0,2
Tridécan-3-one	1471	1802	t	-	-	-	-	-	-	-
Dione [#]	1488	2030	0,6	0,2	0,3	0,5	0,2	0,3	0,2	0,2
Oxyde de caryophyllène	1565	1974	0,5	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1
Oxyde d'humulène	1589	2028	0,1	-	-	-	-	-	-	-
10- <i>épi</i> -Cubénol	1615	2059	-	0,1	-	-	-	-	-	-
TOTAL			95,5	97,0	95,8	87,9	97,1	97,7	97,8	98,0

1 : L'Astratella ; 2,3 : Mardys Garden ; 4,5 : Corsica PAM ; 6, 7, 8 : Kalyptos

* : composés pour lesquels les pourcentages sont mesurés sur colonne polaire car ils coéluent (deux à deux) sur colonne apolaire ; [#] : 3,3,5,5,8,8-hexaméthyl-7-oxabicyclo[4.3.0]non-1(6)-*én*-2,4-dione ; Cellules à fond bleu clair : 16 composés retrouvés dans l'ensemble des huiles essentielles.

Annexe C1 : Compositions chimiques des huiles essentielles de *Myrtus communis* de Corse.

Composés	Ir ^a	Ir ^p	9	10	11	12	13	14	15	16
Isobutyrate d'isobutyle	894	1088	0,8	0,7	0,5	1,2	1,0	0,2	0,8	0,1
α -Thujène	920	1084	-	-	-	-	-	-	-	-
α -Pinène	928	1025	54,0	59,3	60,1	53,9	57,6	54,2	53,0	60,5
β -Pinène	966	1110	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4	0,4	0,5	0,6
Myrcène	981	1163	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Méthylbutyrate d'isobutyle	983	1173	0,5	0,4	0,3	0,9	0,3	0,4	0,2	0,2
α -Phellandrène	994	1167	-	-	-	-	-	-	-	-
Isobutyrate de 2-méthylbutyle	996	1193	0,2	0,2	0,1	0,5	0,2	0,1	0,1	0,1
δ -3-Carène	1002	1148	0,2	0,2	0,3	0,1	0,3	0,3	0,3	0,2
α -Terpinène *	1008	1183	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>p</i> -Cymène *	1008	1271	0,4	0,4	0,6	0,3	0,5	0,6	0,7	0,4
Limonène *	1018	1201	5,4	5,8	5,4	5,3	5,2	5,3	3,5	5,7
1,8-Cinéole *	1018	1209	25,7	21,8	19,2	24,8	19,4	19,7	23,3	11,2
(<i>E</i>)- β -Ocimène	1034	1249	0,1	0,1	-	0,1	0,1	1	0,6	0,7
γ -Terpinène	1045	1245	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,5	0,3
Terpinolène	1075	1283	0,3	0,2	0,4	0,3	0,5	0,5	0,6	0,5
Linalol	1080	1542	1,2	1,8	1,4	1,8	2,9	3,5	1,1	4,9
2-Méthylbutyrate de 2-méthylbutyrate	1085	1277	0,3	0,2	0,2	0,9	0,3	0,5	0,2	0,4
Camphre	1116	1512	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -Pinocarvéol	1120	1650	-	0,4	-	0,4	-	-	-	-
<i>trans</i> -Verbénol	1155	1672	-	-	-	-	-	-	-	-
Terpinèn-4-ol	1158	1596	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2
α -Terpinéol *	1168	1691	2,2	1,9	3,0	2,5	2,6	2,4	3,0	2,1
Myrténol *	1168	1786	-	-	-	-	-	-	-	-
Méthylchavicol	1170	1669	-	0,2	-	0,1	-	-	-	0,2
Verbénone	1177	1699	-	-	-	-	-	-	-	-
Acétate de fenchyle *	1210	1469	-	-	-	-	-	-	-	-
Carvone *	1210	1727	-	-	-	-	-	-	-	-
Acétate de linalyle	1235	1553	0,1	-	-	0,2	0,1	-	0,2	-
Géranial	1237	1725	-	-	-	-	-	-	-	-
Acétate de bornyle	1265	1576	-	-	-	-	-	-	-	-
Acétate de myrtényle	1302	1685	-	-	-	-	-	-	-	0,1
Acétate d' α -terpinyle	1327	1691	0,4	0,2	-	0,3	0,1	-	0,7	-
Acétate de géranyle	1355	1751	1,8	1,3	1,5	1,4	0,8	1,1	2,4	1,7
Méthyleugénol	1364	2006	1,2	1,3	0,7	0,8	0,7	0,4	0,6	0,6
β -Elémène	1384	1587	-	-	-	-	0,1	-	0,2	0,3
(<i>E</i>)- β -Caryophyllène	1414	1594	0,1	0,2	0,3	0,3	0,8	1,9	1,0	1,3
α -Humulène	1446	1665	-	0,1	0,1	0,1	0,4	0,7	0,4	0,6
Tridécan-3-one	1471	1802	-	-	-	-	-	-	-	-
Dione [#]	1488	2030	0,6	0,7	0,8	0,6	1,1	0,9	1,1	1,3
Oxyde de caryophyllène	1565	1974	0,1	-	0,2	0,4	0,2	0,3	0,2	0,3
Oxyde d'humulène	1589	2028	-	-	-	-	-	-	-	-
10- <i>épi</i> -Cubénol	1615	2059	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL			96,4	98,4	96,2	98,1	96,1	94,9	95,5	94,5

9, 10 : Ajaccio-Vignola (Site du laboratoire) ; 11, 12 : Vignola (Plage de la Terre sacrée) ;

13 : Ajaccio – Capo di Feno ; 14 : Mezzavia ; 15, 16 : Sarrola Carcopino

* : composés pour lesquels les pourcentages sont mesurés sur colonne polaire car ils coéluent (deux à deux) sur colonne apolaire ; [#] : 3,3,5,5,8,8-hexaméthyl-7-oxabicyclo[4.3.0]non-1(6)-èn-2,4-dione ; Cellules à fond bleu clair : 16 composés retrouvés dans l'ensemble des huiles essentielles.

Annexe C1 : Compositions chimiques des huiles essentielles de *Myrtus communis* de Corse.

Composés	Ir ^a	Ir ^p	17	18	19	20	21	22	23	24
Isobutyrate d'isobutyle	894	1088	0,1	0,3	0,4	2,2	0,4	0,3	0,6	0,2
α -Thujène	920	1084	0,2	-	-	-	-	-	-	-
α -Pinène	928	1025	57,4	59,4	48,2	50,0	60,8	56,5	68,0	51,4
β -Pinène	966	1110	0,5	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5
Myrcène	981	1163	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Méthylbutyrate d'isobutyle	983	1173	0,2	0,5	0,5	0,3	0,9	0,5	0,2	0,4
α -Phellandrène	994	1167	-	-	-	-	-	-	-	-
Isobutyrate de 2-méthylbutyle	996	1193	0,1	0,3	0,3	0,1	0,4	0,2	0,1	0,1
δ -3-Carène	1002	1148	0,3	0,1	0,1	0,2	0,2	0,6	0,5	0,1
α -Terpinène *	1008	1183	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>p</i> -Cymène *	1008	1271	0,6	0,2	0,4	0,5	0,3	0,9	0,7	0,5
Limonène *	1018	1201	8,3	6,8	5,0	6,9	7,7	4,5	5,6	5,8
1,8-Cinéole *	1018	1209	20,2	19,7	28,8	25,0	9,8	19,8	10,8	28
(<i>E</i>)- β -Ocimène	1034	1249	0,2	0,1	1,0	0,3	0,2	0,4	0,3	0,2
γ -Terpinène	1045	1245	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,6	0,5	0,2
Terpinolène	1075	1283	0,3	0,2	0,2	0,3	0,5	0,7	0,6	0,3
Linalol	1080	1542	2,7	2,9	1,4	0,8	3,8	2,0	1,8	1
2-Méthylbutyrate de 2-méthylbutyrate	1085	1277	0,2	0,7	0,5	0,2	1,4	0,5	0,2	0,3
Camphre	1116	1512	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -Pinocarvéol	1120	1650	-	0,2	-	0,4	-	-	0,1	-
<i>trans</i> -Verbénol	1155	1672	-	-	-	-	-	-	-	-
Terpinèn-4-ol	1158	1596	0,3	0,1	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3
α -Terpinéol *	1168	1691	2,5	1,9	2,9	2,3	2,4	2,4	2,1	2,8
Myrténol *	1168	1786	-	-	-	-	-	-	-	-
Méthylchavicol	1170	1669	-	0,2	-	-	-	-	-	-
Verbénone	1177	1699	-	-	-	-	-	-	-	-
Acétate de fenchyle *	1210	1469	-	-	-	-	-	-	-	-
Carvone *	1210	1727	-	-	-	-	-	-	-	-
Acétate de linalyle	1235	1553	-	-	-	0,2	-	-	0,1	-
Géranial	1237	1725	-	-	-	-	-	-	-	-
Acétate de bornyle	1265	1576	-	-	-	-	-	-	-	-
Acétate de myrtényle	1302	1685	-	-	-	-	-	-	-	-
Acétate d' α -terpinyle	1327	1691	-	-	-	0,9	-	-	0,1	0,1
Acétate de géranyle	1355	1751	0,9	1,2	1,6	1,7	0,8	1,1	1,2	1
Méthyleugénol	1364	2006	0,6	0,9	0,7	1,1	0,4	0,7	0,8	0,5
β -Elémène	1384	1587	-	-	-	-	-	-	-	-
(<i>E</i>)- β -Caryophyllène	1414	1594	0,2	0,4	0,9	0,4	1,6	1,0	0,4	0,6
α -Humulène	1446	1665	-	0,1	0,4	0,2	0,7	0,4	0,2	0,2
Tridécan-3-one	1471	1802	-	-	-	-	-	-	-	-
Dione [#]	1488	2030	0,6	0,4	0,5	0,6	1,0	1,0	1,3	0,8
Oxyde de caryophyllène	1565	1974	-	-	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3
Oxyde d'humulène	1589	2028	-	-	-	-	-	-	-	-
10- <i>épi</i> -Cubénol	1615	2059	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL			96,4	97,2	95,1	95,7	94,4	95,0	97,0	95,6

17 : Cala d'Orzu ; 18 : Cauro ; 19 : Pianotolli Caldarello ; 20 : Figari ; 21 : Arca Pianelli ;
22 : Roccapina ; 23 : Santa Giulia ; 24 : Erbalonga

* : composés pour lesquels les pourcentages sont mesurés sur colonne polaire car ils coéluent (deux à deux) sur colonne apolaire ; [#] : 3,3,5,5,8,8-hexaméthyl-7-oxabicyclo[4.3.0]non-1(6)-*én*-2,4-dione ;
Cellules à fond bleu clair : 16 composés retrouvés dans l'ensemble des huiles essentielles.

Annexe C1 : Compositions chimiques des huiles essentielles de *Myrtus communis* de Corse.

Composés	Ir ^a	Ir ^P	25	26	27	28
Isobutyrate d'isobutyle	894	1088	0,7	0,2	0,2	0,3
α -Thujène	920	1084	-	-	-	-
α -Pinène	928	1025	63,2	63,9	48,7	48,0
β -Pinène	966	1110	0,3	0,3	0,4	0,6
Myrcène	981	1163	-	-	-	-
2-Méthylbutyrate d'isobutyle	983	1173	0,2	0,7	0,2	0,6
α -Phellandrène	994	1167	-	-	-	-
Isobutyrate de 2-méthylbutyle	996	1193	0,1	0,1	t	0,3
δ -3-Carène	1002	1148	0,4	0,1	0,2	0,1
α -Terpinène *	1008	1183	-	-	-	-
<i>p</i> -Cymène *	1008	1271	0,6	0,3	0,4	0,5
Limonène *	1018	1201	9,7	6,1	5,6	3,9
1,8-Cinéole *	1018	1209	12,4	11,6	29,3	31,9
(<i>E</i>)- β -Ocimène	1034	1249	0,1	0,1	0,4	t
γ -Terpinène	1045	1245	0,4	0,2	0,3	0,3
Terpinolène	1075	1283	0,5	0,3	0,4	0,3
Linalol	1080	1542	1,6	5,3	1,8	0,3
2-Méthylbutyrate de 2-méthylbutyrate	1085	1277	0,2	0,8	0,1	0,8
Camphre	1116	1512	-	-	-	-
<i>trans</i> -Pinocarvéol	1120	1650	0,3	0,3	0,4	0,1
<i>trans</i> -Verbénol	1155	1672	-	-	-	-
Terpinèn-4-ol	1158	1596	0,2	0,2	0,3	0,3
α -Terpinéol *	1168	1691	2,4	2,0	3	2,2
Myrtéol *	1168	1786	-	-	-	-
Méthylchavicol	1170	1669	-	-	-	0,1
Verbénone	1177	1699	-	-	-	-
Acétate de fenchyle *	1210	1469	-	-	-	-
Carvone *	1210	1727	-	-	-	-
Acétate de linalyle	1235	1553	-	-	-	-
Géranial	1237	1725	-	-	-	-
Acétate de bornyle	1265	1576	-	-	-	-
Acétate de myrtényle	1302	1685	-	-	-	-
Acétate d' α -terpinyle	1327	1691	-	-	t	0,6
Acétate de géranyle	1355	1751	0,8	0,8	1	2,9
Méthyleugénol	1364	2006	0,8	0,5	0,9	1,1
β -Elémène	1384	1587	-	-	0,1	-
(<i>E</i>)- β -Caryophyllène	1414	1594	0,6	0,3	0,3	0,3
α -Humulène	1446	1665	0,2	0,2	0,1	0,1
Tridécan-3-one	1471	1802	-	-	-	-
Dione [#]	1488	2030	1,1	1,0	0,9	0,4
Oxyde de caryophyllène	1565	1974	-	0,4	0,2	0,4
Oxyde d'humulène	1589	2028	-	-	-	-
10- <i>épi</i> -Cubénol	1615	2059	-	-	-	-
TOTAL			96,8	95,7	95,2	96,4

25 : Cervione (village) ; 26 : Cervione (plaine) ; 27, 28 : Folelli

* : composés pour lesquels les pourcentages sont mesurés sur colonne polaire car ils coéluent (deux à deux) sur colonne apolaire ; [#] : 3,3,5,5,8,8-hexaméthyl-7-oxabicyclo[4.3.0]non-1(6)-èn-2,4-dione ; Cellules à fond bleu clair : 16 composés retrouvés dans l'ensemble des huiles essentielles.

Annexe C2 : Compositions chimiques des huiles essentielles de *M. communis* du Maroc.

Composés	Ir ^a	Ir ^P	29	30	31	32	33
Isobutyrate d'isobutyle	894	1088	0,3	0,3	0,3	0,2	0,4
α -Thujène	920	1084	-	-	-	-	-
α -Pinène	928	1025	22,5	22,4	25,7	22,6	5,7
β -Pinène	966	1110	0,3	0,3	0,4	0,3	0,2
Myrcène	981	1163	-	-	-	-	-
2-Méthylbutyrate d'isobutyle	983	1173	0,2	0,2	0,2	0,3	0,6
α -Phellandrène	994	1167	t	-	-	-	-
Isobutyrate de 2-méthylbutyle	996	1193	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
δ -3-Carène	1002	1148	-	-	-	-	-
α -Terpinène *	1008	1183	-	-	-	-	-
<i>p</i> -Cymène *	1008	1271	0,4	0,5	0,5	0,2	0,6
Limonène *	1018	1201	11,1	10,3	9,7	11,4	9,5
1,8-Cinéole *	1018	1209	32,8	31,2	32,4	29,7	31
(<i>E</i>)- β -Ocimène	1034	1249	0,1	-	-	0,1	-
γ -Terpinène	1045	1245	0,3	-	-	0,2	0,1
Terpinolène	1075	1283	0,2	-	-	0,1	-
Linalol	1080	1542	1,4	2,7	2,6	2,7	1,3
2-Méthylbutyrate de 2-méthylbutyrate	1085	1277	0,2	0,2	0,2	0,4	0,5
Camphre	1116	1512	-	-	-	0,1	-
<i>trans</i> -Pinocarvéol	1120	1650	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -Verbénol	1155	1672	-	-	-	-	-
Terpinèn-4-ol	1158	1596	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3
α -Terpinéol *	1168	1691	3,9	3,4	2,9	3,8	5
Myrtéol *	1168	1786	0,3	1,3	1,3	0,3	0,6
Méthylchavicol	1170	1669	-	0,1	0,1	-	-
Verbénone	1177	1699	-	-	-	-	-
Acétate de fenchyle *	1210	1469	-	-	-	-	-
Carvone *	1210	1727	-	-	-	-	-
Acétate de linalyle	1235	1553	t	-	0,1	-	-
Géranial	1237	1725	-	-	-	-	-
Acétate de bornyle	1265	1576	-	-	-	-	-
Acétate de myrtényle	1302	1685	17,4	16,2	14,9	16,7	33
Acétate d' α -terpinyle	1327	1691	0,3	0,3	0,3	-	-
Acétate de géranyle	1355	1751	2,2	2,2	2,0	3,8	3,7
Méthyleugénol	1364	2006	0,6	0,8	0,7	1,6	1,5
β -Elémène	1384	1587	0,1	-	t	-	-
(<i>E</i>)- β -Caryophyllène	1414	1594	0,4	0,2	0,2	0,3	0,1
α -Humulène	1446	1665	0,2	-	0,1	-	-
Tridécan-3-one	1471	1802	-	-	-	-	-
Dione [#]	1488	2030	0,3	0,3	0,2	0,6	0,4
Oxyde de caryophyllène	1565	1974	-	-	0,1	0,2	0,2
Oxyde d'humulène	1589	2028	-	-	-	-	-
10- <i>épi</i> -Cubénol	1615	2059	-	-	-	-	-
TOTAL			95,8	88,5	91,0	95,9	94,9

29 : Prnarôm ; 30 : Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques ;
 31 : Producteur près de Dar Chaoui ; 32 : Coopérative de Ben Karrich ;
 33 : Souk L'qolla

* : composés pour lesquels les pourcentages sont mesurés sur colonne polaire car ils coéluent (deux à deux) sur colonne apolaire ; [#] : 3,3,5,5,8,8-hexaméthyl-7-oxabicyclo[4.3.0]non-1(6)-èn-2,4-dione ;
 Cellules à fond bleu clair : 16 composés retrouvés dans l'ensemble des huiles essentielles.

Annexe C3 : Compositions chimiques des huiles essentielles de *M. communis* du Portugal, de Sardaigne et de Tunisie.

Composés	Ir^a	Ir^p	34	35	36	37	38
Isobutyrate d'isobutyle	894	1088	0,1	0,1	0,6	0,7	0,4
α-Thujène	920	1084	-	-	-	-	0,5
α-Pinène	928	1025	43,5	43,7	54	60,7	52,2
β-Pinène	966	1110	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Myrcène	981	1163	-	-	-	-	0,1
2-Méthylbutyrate d'isobutyle	983	1173	0,4	0,1	0,2	1,2	0,4
α-Phellandrène	994	1167	-	-	-	-	-
Isobutyrate de 2-méthylbutyle	996	1193	0,1	0,1	0,1	0,5	0,2
δ-3-Carène	1002	1148	-	0,3	0,3	-	0,6
α-Terpinène *	1008	1183	-	-	-	-	-
p-Cymène *	1008	1271	0,2	0,3	0,5	0,2	1,7
Limonène *	1018	1201	15,0	15,5	7,5	5,4	8,4
1,8-Cinéole *	1018	1209	25,3	22,9	20,6	18,3	21,9
(E)-β-Ocimène	1034	1249	0,5	0,4	0,5	-	0,2
γ-Terpinène	1045	1245	0,1	0,5	0,4	0,1	0,3
Terpinolène	1075	1283	0,1	0,5	0,5	0,2	0,4
Linalol	1080	1542	2,2	2,7	1,4	0,3	2,8
2-Méthylbutyrate de 2-méthylbutyrate	1085	1277	0,7	0,3	0,2	1,0	0,4
Camphre	1116	1512	-	1,2	-	-	-
trans-Pinocarvéol	1120	1650	-	-	0,3	-	-
trans-Verbénol	1155	1672	-	-	-	-	-
Terpinèn-4-ol	1158	1596	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3
α-Terpinéol *	1168	1691	1,8	1,5	2,7	2,0	1,7
Myrtéol *	1168	1786	-	-	-	-	-
Méthylchavicol	1170	1669	0,1	0,1	-	-	-
Verbénone	1177	1699	-	-	-	-	-
Acétate de fenchyle *	1210	1469	-	-	-	-	-
Carvone *	1210	1727	-	-	-	-	-
Acétate de linalyle	1235	1553	-	-	-	-	0,6
Géranial	1237	1725	-	-	-	-	-
Acétate de bornyle	1265	1576	-	0,1	-	-	-
Acétate de myrtényle	1302	1685	-	0,5	-	-	-
Acétate d'α-terpinyle	1327	1691	-	-	0,1	0,6	0,5
Acétate de géranyle	1355	1751	1,6	0,9	1,7	1,8	2,1
Méthyleugénol	1364	2006	2,1	0,7	0,9	1,2	0,5
β-Elémène	1384	1587	-	-	-	-	-
(E)-β-Caryophyllène	1414	1594	0,4	0,4	1,0	0,2	0,7
α-Humulène	1446	1665	0,1	0,3	0,3	0,1	-
Tridécan-3-one	1471	1802	-	-	-	-	-
Dione #	1488	2030	0,1	0,1	1,0	1,2	0,1
Oxyde de caryophyllène	1565	1974	0,3	-	0,4	0,2	0,1
Oxyde d'humulène	1589	2028	-	-	-	-	-
10-épi-Cubéol	1615	2059	-	-	-	-	-
TOTAL			95,4	93,9	95,9	96,5	97,6

34, 35 : Portugal ; 36 : Sardaigne (Golfo Aranci) ; 37 : Sardaigne (Capo Ceraso) ;
38 : Tunisie (Aroma Zone)

* : composés pour lesquels les pourcentages sont mesurés sur colonne polaire car ils coéluent (deux à deux) sur colonne apolaire ; # : 3,3,5,5,8,8-hexaméthyl-7-oxabicyclo[4.3.0]non-1(6)-èn-2,4-dione ;
Cellules à fond bleu clair : 16 composés retrouvés dans l'ensemble des huiles essentielles.

Occurrence of C8–C10 esters in Mediterranean *Myrtus communis* L. leaf essential oil

Ophélie Bazzali, Félix Tomi, Joseph Casanova and Ange Bighelli*

ABSTRACT: *Myrtus communis* L. grows wild all around the Mediterranean basin and on the islands. Myrtle leaf essential oil has a characteristic pleasant odour although various compositions, which differ by the content of monoterpene esters, have been reported. Fractionation of an essential oil sample from Corsica, followed by analysis of the chromatographic fractions by GC (RI) and ^{13}C NMR allowed the identification of four C8–C10 esters, first identified 20 years ago in a Spanish essential oil sample and since that time very scarcely reported, despite the tremendous amount of work carried out on the composition of myrtle leaf essential oil. Therefore, the composition of 63 samples of *M. communis* L. leaf essential oil isolated from myrtle growing wild in various Mediterranean countries (Corsica, Sardinia, Portugal, Morocco, Algeria and Tunisia) has been investigated by GC(RI) and ^{13}C NMR and the four C8–C10 esters have been identified in all the samples. The occurrence of these esters merits great attention, since they contribute to the pleasant odour of the myrtle essential oil. In parallel, 3,3,5,5,8,8-hexamethyl-7-oxabicyclo[4.3.0]non-1(6)-ene-2,4-dione has been identified in all the samples. Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: *Myrtus communis* L.; essential oil composition; ^{13}C NMR; C8–C10 esters

Introduction

Myrtus communis L. (Myrtaceae family) is widespread all around the Mediterranean basin and on the islands. It is an evergreen shrub, 1.5–3 m in height, with linear and lanceolate leaves, white fragrant flowers and black berries when mature.^[1]

Myrtle is known as a medicinal plant for its anti-hyperglycaemic, antiseptic and anti-inflammatory activities.^[2] In popular medicine, it is used in the treatment of diseases of the urinary tract and respiratory organs, and is recommended for the treatment of bronchitis, sinusitis and otitis, as well as for diarrhoea and haemorrhoids.^[3] The plant contains significant amounts of phenolic compounds and the methanolic extracts exhibit fair antioxidant capacity.^[4]

The essential oil obtained by steam distillation of aerial parts (leaves and twigs, sometimes flowers and berries), is used both in flavour and fragrance compositions.^[5] Leaf essential oil is employed for its antimicrobial, tonic and balsamic properties^[6] and it is used in culinary, pharmaceutical, therapeutical, industrial and cosmetic fields.^[7]

The chemical composition of myrtle essential oil has been extensively investigated and the reported results have been reviewed by Lawrence.^[8–12] The first studies on the components of myrtle essential oil date back to 1907 and showed the occurrence of oxygenated compounds bearing the pinane skeleton.^[13] In 1970, Peyron^[14] identified the major monoterpene components characteristic of the myrtle essential oil (α - and β -pinene, 1,8-cineole, linalool, nerol, geraniol and various esters, linalyl acetate, geranyl acetate and myrtenyl acetate) and in 1973, using gas chromatography (GC), Scora^[15] quantified the major components. During the following 25 years, the compositions of myrtle essential oils isolated from various parts of plants growing wild all around the Mediterranean basin have been reported. At that time, the differentiation of myrtle leaf essential oils into two groups was based on the presence at appreciable content (Morocco, Spain) or the lack (Corsica, Sardinia, Tunisia) of myrtenyl acetate^[16] or achieved according to their content in α -pinene

(over 50%, Corsica and Tunisia and less than 35%, others).^[5] Nowadays, other compositions have been reported and the chemical variability may be summarized as follows:

- myrtenyl acetate-rich essential oils have been reported in Morocco,^[5,8,9,12] Spain,^[17] Portugal^[18] and in the Greek island of Zakynthos^[19]
- 1,8-cineole-rich essential oils were found in Lebanon,^[20] Cyprus^[21] and Morocco^[22]
- essential oils whose composition was dominated by α -pinene (30–60%) and 1,8-cineole (15–25%) and also characterized by the lack of myrtenyl acetate were isolated from leaves of myrtle growing wild in Corsica,^[5,16] Sardinia,^[23] Tunisia^[5,7,24] and north-eastern Algeria^[25]
- other samples from Mediterranean countries contained various components at appreciable contents: α -pinene, limonene, 1,8-cineole, linalool, myrtenyl acetate and linalyl acetate: Italy (Liguria),^[26] Yugoslavia,^[5] Croatia,^[27] Albania,^[9,28] Greece,^[29] Turkey,^[11,30] Iran^[31–33] and Tunisia.^[7,12]

Obviously, myrtle leaf essential oil produced all around the Mediterranean Sea and on the islands exhibits a fair chemical variability. Despite the chemical variability, myrtle essential oil has a characteristic odour. Indeed, a few components (among the major ones) are partially responsible of the odour of myrtle essential oil: 1,8-cineole, α -pinene, myrtenyl acetate, limonene and linalool. Other monoterpene acetates, present in appreciable amounts, depending of the investigated sample, contribute to the pleasant odour of myrtle essential oil. Among them, the

* Correspondence to: Ange Bighelli, Université de Corse–CNRS, UMR 6134 SPE, Equipe Chimie et Biomasse, Route des Sanguinaires, 20000 Ajaccio, France. E-mail: ange.bighelli@univ-corse.fr

Université de Corse–CNRS, UMR 6134 SPE, Equipe Chimie et Biomasse, Route des Sanguinaires, 20000 Ajaccio, France

most cited are linalyl acetate, bornyl acetate, terpinyl acetate and geranyl acetate. Esters other than acetates are present from time to time at lower content. In 1970, Lawrence *et al.* identified various monoterpene esters in Spanish myrtle essential oil: myrtenyl and geranyl isobutyrate, myrtenyl and geranyl 2-methylbutyrate.^[34] Since that time, a few monoterpene esters, other than acetates, have been reported, although they were sometimes obviously misidentified, taking into account the elution order of the components.

Although α -pinene and 1,8-cineole, two major components reported in almost all essential oil samples, contribute to the characteristic odour of the myrtle essential oil, obviously esters play an important role, myrtenyl acetate being the major component of some samples, particularly those from Spain, Portugal and Morocco. Conversely, some samples were characterized by a very low level or the lack of myrtenyl acetate (samples from Corsica, Sardinia, Tunisia, Algeria) and Lawrence asked himself if these essential oils may be considered commercially acceptable essential oils.^[11] Nowadays, myrtle essential oils from these countries are not only accepted but they are appreciated on the world myrtle essential oil market. Do components other than monoterpenes contribute to the characteristic odour of myrtle essential oil? A survey of the literature showed that around 100 papers have been published on the composition of myrtle essential oil and almost 300 individual components have been identified or tentatively identified. Although most compounds belong to the monoterpene family, sesquiterpenes and phenylpropanoids are also represented, all present at very low content or at trace level. Various compounds bearing unusual structures were also reported.

In the course of our studies related to the characterization of Mediterranean plants through the composition of their essential oils, we became interested in Corsican myrtle essential oil and some years ago, we reported that the composition of this essential oil is dominated by α -pinene and 1,8-cineole.^[16] The aim of the present work was to obtain better insight into the occurrence of oxygenated compounds in the essential oil from *M. communis*, emphasizing that these components may contribute to the odour of the essential oil. Therefore, the composition of an essential oil sample from Corsica has been investigated by a combination of chromatographic and spectroscopic techniques and the presence of C8–C10 esters has been shown. Then, the occurrence of these esters has also been investigated in 63 samples of myrtle essential oil originating from different countries all around the occidental Mediterranean basin and from the islands.

Experimental

Samples of Essential Oils

Leaves of Corsican *Myrtus communis* L. were collected in January–June 2010 and October 2010 from 27 individual plants in various locations all around the coast (north: Cap Corse; east: Casinca, Cervione; south: Sartène, Figari; west: Ajaccio, Sarròla–Carcopino). Leaves of *M. communis* L. from Sardinia (two samples) were collected in April 2010 in Capo Ceraso and Golfo Aranci. The essential oils were obtained by hydrodistillation of leaves (100–400 g) in a Clevenger-type apparatus during 4 h. Essential oil yields (0.10–0.59%) were estimated on the basis of the fresh weight of the plant material. Other essential oils from Corsica were supplied by local producers (L'Astratella, Corsica PAM, Huiles essentielles Kalyptos and Mardys Garden). Moroccan

essential oils were obtained from local producers (National Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Taounate; Cooperative Amal, Dar Chaoui, Province of Tanger). Myrtle essential oils from Algeria were supplied by Miss Bouzabata and have been the subject of previous work.^[25] The Tunisian essential oil sample was purchased from HYTECK-Aroma-zone (Clermont-Ferrand, France). Portuguese myrtle essential oil samples were supplied by Pr C. Cavaleiro, University of Coimbra, Portugal.

Essential Oil Fractionation

An essential oil sample from Corsica (1.535 g) supplied by the Society Mardys Garden was submitted to flash chromatography (silica gel, 250–500 μ m, 31 g). Twelve fractions (F1–F12) were eluted with a mixture of solvents of increasing polarity (pentane:diethyl ether, 100:0 to 0:100): pentane; F1 (0.361 g), F2 (0.323 g) and F3 (0.032 g); pentane:Et₂O, 98:2; F4 (0.015 g), F5 (0.143 g), F6 (0.125 g), F7 (0.072 g) and F8 (0.039 g); pentane:Et₂O, 95:5; F9 (0.019 g) and F10 (0.015 g); Et₂O, F11 (0.071 g) and F12 (0.016 g). The essential oil and the fractions of chromatography were analysed by GC(RI) and ¹³C NMR.

Analytical Gas Chromatography

GC analyses were carried out with a Clarus 500 Perkin–Elmer Autosystem apparatus equipped with two flame ionisation detectors (FIDs), and fused capillary columns (50 m \times 0.22 mm i.d., film thickness 0.25 μ m), BP-1 (polymethylsiloxane) and BP-20 (polyethylene glycol). The carrier gas was helium; with a linear velocity of 0.8 ml/min. The oven temperature was programmed from 60 °C to 220 °C at 2 °C/min and then held isothermal (20 min). Injector temperature was 250 °C (injection mode: split 1/60). Detectors temperature: 250 °C. The percentage composition of the essential oil (g/100 g) was computed by the normalization method from the GC peak areas, using the response factors reported in the literature.^[35,36]

¹³C Nuclear Magnetic Resonance

¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 Fourier Transform spectrometer operating at 100.623 MHz for ¹³C, equipped with a 5 mm probe, in deuterated chloroform (CDCl₃), with all shifts referred to internal tetramethylsilane (TMS). ¹³C NMR spectra were recorded with the following parameters: pulse width (PW), 4 μ s (flip angle 45°); acquisition time, 2.7 s for 128 K data table with a spectral width of 24 000 Hz (240 ppm); CPD mode decoupling; digital resolution, 0.183 Hz/pt. The number of accumulated scans was 3000 for each sample (50–60 mg for every essential oil sample and 15–60 mg for fractions of chromatography, in 0.5 ml of CDCl₃).

Identification of Individual Components

Identification of the individual components was based: (1) on comparison of their GC retention indices (RIs) on apolar and polar columns, determined relative to the retention times of a series of *n*-alkanes with linear interpolation ('Target Compounds' software of Perkin–Elmer), with those of authentic compounds, or literature data (component n° 27, Table 1^[31]); and (2) by ¹³C NMR spectroscopy, following a computerized method developed in our laboratory, using home-made software, by comparison of the chemical shift values of the signals in the essential oil

Table 1. Composition of a myrtle leaf essential oil from Corsica

No.	Components ^{a,b}	Ri ^{lit c}	Rla ^d , BP-1	Rlp ^d , BP-20	RF ^e	g/100 g ^f
1	Isobutyl isobutyrate	899 ⁺	900	1089	1.59	1.1
2	α -Thujene *	932	922	1027	1.03	0.3
3	α -Pinene *	936	931	1027	1.03	45.8
4	β -Pinene	978	970	1114	1.03	0.6
5	Myrcene	987	980	1163	1.03	0.2
6	Isobutyl 2-methylbutyrate	988 ⁺	986	1176	1.59	0.8
7	2-Methylbutyl isobutyrate	1001 ⁺	999	1197	1.59	0.4
8	δ -3-Carene	1010	1005	1151	1.03	0.3
9	<i>p</i> -Cymene	1015	1011	1273	0.99	0.7
10	Limonene	1025	1021	1204	1.03	5.0
11	1,8-Cineole	1024	1021	1213	1.28	30.7
12	(<i>E</i>)- β -Ocimene	1041	1035	1252	1.03	0.3
13	γ -Terpinene	1051	1048	1248	1.03	0.7
14	Terpinolene	1082	1078	1286	1.03	0.5
15	Linalool	1086	1082	1544	1.30	2.0
16	2-Methylbutyl 2-methylbutyrate	1090 ⁺	1088	1280	1.59	0.8
17	<i>trans</i> -Pinocarveol	1126	1123	1652	1.30	0.3
18	Terpinen-4-ol	1164	1161	1599	1.30	0.4
19	α -Terpineol *	1175	1171	1692	1.30	1.3
20	Estragole	1175	1174	1687	1.28	0.2
21	Linalyl acetate	1239	1238	1556	1.59	0.2
22	α -Terpinyl acetate *	1335	1331	1692	1.59	0.7
23	Geranyl acetate *	1362	1359	1755	1.59	2.7
24	Methyl eugenol	1369	1368	2009	1.28	1.0
25	(<i>E</i>)- β -Caryophyllene	1421	1417	1597	0.98	0.9
26	α -Humulene	1455	1450	1668	0.98	0.4
27	Dione [#]	1496 [#]	1491	2034	1.59	0.1
28	δ -Cadinene *	1520	1514	1755	0.98	0.4
29	Caryophyllene oxide	1578	1569	1977	1.53	0.2
30	10-epi-Cubanol	1626 ⁺	1615	2059	1.30	0.1
Total						99.1

^aOrder of elution is given on apolar column (BP-1).

^bAll the components have been identified by GC(RI) on apolar and polar columns and by ¹³C NMR in the essential oil and/or in the fractions of chromatography.

^cRi^{lit}: retention indices from literature (DB-1 column),^[37] except ⁺,^[38] and [#] dione: 3,3,5,5,8,8-hexamethyl-7-oxabicyclo[4.3.0]non-1(6)-ene-2,4-dione,^[31] and ⁺ RIs of pure compounds, see text.

^dRla, Rlp: retention indices calculated on apolar and polar column, respectively.

^eResponse factors, according to Bicchi *et al.*^[35] and Costa *et al.*^[36]

^fThe percentage composition of the essential oil was computed by the normalization method from the GC peak areas, using nonane as internal reference and the response factors reported in the literature.^[35,36] Quantitative data were calculated on polar column (BP-20), due to the co-elution of isobutyl isobutyrate with nonane on apolar column, excepted components with an asterisk (*), percentages given on BP-1 column.

spectrum with those of reference compounds compiled in a laboratory-built library and comparison with literature data (component n° 27, Table 1^[31]). This method allows the identification of individual components of the essential oil at a content as low as 0.3–0.4%.

Results and Discussion

The combination of chromatographic and spectroscopic techniques [CC, GC(RI) and ¹³C NMR] has been preferred to the usual GC(RI) and GC-MS analysis to investigate the composition of a commercial *Myrtus communis* L. essential oil sample

from Corsica. In a first step, the computerized analysis of the ¹³C NMR spectrum of the sample allowed the identification of the usual main components of myrtle essential oil (Table 1). Beside α -pinene (45.8%) and 1,8-cineole (30.7%), by far the major components, various monoterpene hydrocarbons, alcohols and esters, accounting for 2.0–5.0% each were also identified (limonene, linalool, and geranyl acetate), as well as methyl eugenol (1.0%) and (*E*)- β -caryophyllene (0.9%). Isobutyl isobutyrate was also present at moderate content (1.1%). As previously mentioned, Corsican myrtle essential oil is characterized by the lack of myrtenyl acetate. In the ¹³C NMR spectrum of the essential oil, various signals

exhibiting weak intensities remained unassigned. Three signals at 70.27, 68.87 and 68.78 ppm retained our attention since they are close to the chemical shift of the methylene linked to the oxygen atom of isobutyl isobutyrate (70.33 ppm). These signals obviously belong to three oxygenated components whose NMR data are not compiled in our ^{13}C NMR spectral data library, excluding *ipso facto* the usual oxygenated monoterpenes. In parallel, GC-MS analysis of the essential oil did not allow the unambiguous identification of these compounds.

In order to identify these three components, the essential oil sample was fractionated over silica gel and all the fractions of chromatography were analysed by GC(RI) and ^{13}C NMR. The spectrum of the first medium polar fraction (F4) exhibited the four signals at 68.87–70.33 ppm with strong intensities that associated with four signals at 176.74–177.19 ppm confirmed the occurrence of an ester function in all molecules (including isobutyl isobutyrate). Examination of the retention indices values (986/1176, 999/1197 and 1088/1280) with respect to those of isobutyl isobutyrate (900/1089) suggested that the three unidentified esters contained nine, nine and ten carbons. Characteristic signals around 11, 16 and 19 ppm, were easily attributed to isobutyl and 2-methylbutyl substructures and the three previously unidentified esters were supposed to be isobutyl 2-methylbutyrate, 2-methylbutyl isobutyrate and 2-methylbutyl 2-methylbutyrate, the fourth being isobutyl isobutyrate, whose NMR data are compiled in our home-made library. This hypothesis was confirmed by recording the ^{13}C NMR spectra of the four commercially available esters. The retention indices of the reference compounds were carefully measured on apolar and polar chromatography columns and therefore their signals could be assigned on the chromatograms of the fraction F4 (5.8–17.5%) and of the essential oil (Table 1). A ^{13}C NMR spectrum of a mixture of the four esters was also recorded and permitted the observation of characteristic signals on the one hand and overlapped signals on the other hand.

In total, 30 components accounting for 99.1% of the essential oil were identified, various minor components being identified by GC(RI) and by ^{13}C NMR in the fractions of chromatography. Special attention should be paid to the identification of the 3,3,5,5,8,8-hexamethyl-7-oxabicyclo[4.3.0]non-1(6)-ene-2,4-dione, using the ^{13}C NMR data reported by Weyerstahl *et al.*^[31] Indeed, the MS data of this bicyclic dione are absent from all the computerized mass spectra libraries at our disposal and are only partially reported in the previous paper. Conversely, ^{13}C NMR chemical shift values are fully reported and allowed the identification of the dione in the fraction of chromatography F12 and then in the essential oil. We recently reported the occurrence of this dione (0.5–2.3%) in leaf essential oil of myrtle collected in north-eastern Algeria.^[25]

Obviously, the occurrence of esters other than monoterpene esters in myrtle essential oil merits great attention, since they could strongly contribute to the pleasant odour of that essential oil. These esters have been scarcely reported in the literature despite the large number of papers (around 70) published on the chemical composition of myrtle leaf essential oil. Even in 1970, Lawrence used a combination of different techniques to identify, in a Moroccan myrtle essential oil sample, isobutyl isobutyrate (obtained by fractionated distillation in mixture with β -pinene) and 2-methylbutyl 2-methylbutyrate

(mixed with myrcene).^[8] A more precise insight into the occurrence of these esters in myrtle essential oils was given in 1992 by Boelens and Jimenez who investigated the composition of essential oil isolated from leaves, flowers and fruits of myrtle growing wild in Spain.^[17] They identified four esters: isobutyl isobutyrate (0.04–0.45%), isobutyl 2-methylbutyrate (0.07–0.40%), 2-methylbutyl isobutyrate (trace to 0.04%) and 2-methylbutyl 2-methylbutyrate (0.25–0.54%). Since that time, isobutyl isobutyrate was reported in most papers related to the analysis of myrtle essential oils. Conversely, the three other esters appeared very scarcely in the reported compositions:

- isobutyl 2-methylbutyrate has been identified in myrtle leaf essential oils from Corsica (up to 1.4%),^[16] Turkey (up to 0.1%),^[39] Tunisia (0.4%)^[40,41] and Italy (0.08–0.45%)^[42]
- 2-methylbutyl isobutyrate in myrtle leaf essential oils from Turkey (up to 0.1%)^[39] and Italy (0.14–0.30%)^[43]
- 2-methylbutyl 2-methylbutyrate in myrtle leaf essential oils from Italy (0.09–0.47%)^[42] and from California (0.32–0.66%)^[15]

Could these three esters be present only in a few samples with respect to environmental or genetic parameters? Could they not be identified despite the triteness of the structures of these molecules and the presence of their mass spectral data in commercial computerized libraries? It cannot be excluded that they were not identified, owing that their mass spectra were insufficiently differentiated and/or their retention indices insufficiently characteristic. Obviously, the identification by GC-MS in combination with retention indices of esters other than monoterpene esters present in myrtle essential oil needs a constant attention. In one of our studies on the composition of Corsican myrtle leaf essential oil carried out 14 years ago, we only identified two out of the four esters. Therefore, a screening of essential oil isolated from myrtle growing wild in various countries all around the western Mediterranean basin was undertaken. Essential oil samples obtained from commercial sources or laboratory distilled were submitted to GC(RI) and ^{13}C NMR. The results are reported in Table 2 in which are also reported the major components of the essential oil samples.

All the investigated samples contained the four esters: isobutyl isobutyrate (0.1–1.8%), isobutyl 2-methylbutyrate (0.1–2.2%), 2-methylbutyl isobutyrate (0.1–1.0%) and 2-methylbutyl 2-methylbutyrate (0.1–1.5%). The sum of the four esters ranged from 0.4 to 6.5% in north-eastern Algeria (27 samples), 0.5–3.5% in Corsica (27 samples), 0.8–1.7% in Morocco (four samples), 0.6% and 1.3% for the Portuguese samples, 1.1% and 3.4% for the Sardinian samples and 1.4% for the Tunisian sample. Our results are in full agreement with those of Boelens and Jimenez on Spanish samples (trace to 0.45% each).^[17]

Otherwise, the four C8–C10 esters showed a fruity odour, much more pronounced for 2-methylbutyl isobutyrate and 2-methylbutyl 2-methylbutyrate. According to Dr P. Paquet (Corsica Essences), although myrtle essential oil samples are characterized by a typical odour, resulting from the simultaneous presence of α -pinene and 1,8-cineole in large amounts, it appears that the presence of the four C8–C10 esters contributes significantly to the fruity top-note of the myrtle essential oil.

In parallel, it could be noted that 3,3,5,5,8,8-hexamethyl-7-oxabicyclo[4.3.0]non-1(6)-ene-2,4-dione was present in all the investigated samples of myrtle essential oil, the highest contents belonged to the Algerian samples.

Table 2. Range of % abundance of the main components of myrtle essential oil samples from various countries of the Mediterranean basin

Components ^a	Corsica, min–max (27 samples)	Algeria, min–max (27 samples)	Morocco, min–max (4 samples)	Sardinia (2 samples)	Portugal (2 samples)	Tunisia (1 sample)
Isobutyl isobutyrate	0.1–1.2	0.1–1.8	0.2–0.4	0.6/0.7	0.1/0.1	0.4
α -Pinene	42.8–68.0	40.6–64.0	5.7–25.7	54.0/60.7	43.5/43.7	52.2
Isobutyl 2-methylbutyrate	0.2–0.9	0.1–2.2	0.2–0.6	0.2/1.2	0.4/0.1	0.4
2-Methylbutyl isobutyrate	0.1–0.5	0.1–1.0	0.1–0.2	0.1/0.5	0.1/0.1	0.2
Limonene *	3.5–9.7	2.9–13.0	9.5–11.4	7.5/5.4	15.0/15.5	8.4
1,8-Cineole *	9.8–31.9	10.9–29.1	29.7–32.4	20.6/18.3	25.3/22.9	21.9
Linalool	0.3–5.3	1.3–4.5	1.3–2.7	1.4/0.3	2.2/2.7	2.8
2-Methylbutyl 2-methylbutyrate	0.1–1.4	0.1–1.5	0.2–0.5	0.2/1.0	0.7/0.3	0.4
α -Terpineol	0.8–3.0	2.5–3.9	2.9–5.0	2.7/2.0	1.8/1.5	1.7
Myrtenyl acetate	—	—	14.9–33.0	—	–/0.5	—
Geranyl acetate	0.8–4.8	1.1–3.7	2.0–3.8	1.7/1.8	1.6/0.9	2.1
Methyl eugenol	0.4–1.3	0.7–2.1	0.7–1.6	0.9/1.2	2.1/0.7	0.5
(<i>E</i>)- β -Caryophyllene	0.1–1.9	0.3–0.9	0.1–0.3	1.0/0.2	0.4/0.4	0.7
Dione [#]	0.2–1.3	0.5–2.3	0.2–0.6	1.0/1.2	0.1/0.1	0.1

^aOrder of elution and percentages are given on apolar column (BP-1), except components with an asterisk (*), percentages on polar column (BP-20).

[#]Dione: 3,3,5,5,8,8-hexamethyl-7-oxabicyclo[4.3.0]non-1(6)-ene-2,4-dione.

Conclusion

The fractionation of a *Myrtus communis* L. essential oil sample from Corsica, followed by ¹³C NMR analysis of the chromatographic fractions, allowed the identification of four C8–C10 esters, first reported by Boelens and Jimenez,^[17] 20 years ago in a Spanish essential oil sample. They were never identified all together since that time, despite of the tremendous quantity of papers published on this topic. Moreover, the presence of the four esters was evidenced in 63 myrtle essential oil samples isolated from plants growing wild in various countries all around the Mediterranean basin and on the islands. The four C8–C10 esters contribute significantly to the fruity top note of the myrtle essential oil. In parallel, 3,3,5,5,8,8-hexamethyl-7-oxabicyclo[4.3.0]non-1(6)-ene-2,4-dione was present in all the investigated samples.

Acknowledgements

The authors wish to thank Pr C. Cavaleiro (University of Coimbra, Portugal), Miss Amel Bouzabata (Algeria), the Corsican societies GAEC L'Astratella, Mardyseties Garden, Corsica PAM and Huiles Essentielles Kalyptos, as well as INPMA (Taounate, Morocco) and the cooperative Amal (Dar Chaoui, Morocco), for the gift of myrtle essential oil samples. They are indebted to Dr H. Brevard (Robertet, France) for the reference sample of 2-methylbutyl isobutyrate, to Dr P. Paquet for stimulating discussions and to Mr J.M. Desjobert (CPN-Lab, University of Corsica) for recording the mass spectra.

References

- P. Quezel, S. Santa, *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionale*. CNRS Editions: Paris, **1962**, 636–637.
- M. S. Elfellah, M. H. Akhter, M. T. Khan. *J. Ethnopharmacol.* **1984**, *11*, 275.
- A. Beloued. In *Plantes médicinales d'Algérie*, B. Aknoun (Ed). Office des Publications Universitaires: Alger, **1998**, 1–231.
- M. Amensour, E. Sendra, J. Abrini, S. Bouhdid, J. A. Pérez-Alvarez, J. Fernández-López. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4*, 819.
- J. C. Chalchat, R. Ph. Garry. *J. Essent. Oil Res.* **1998**, *10*, 613.
- C. Bourrel, G. Vilarem, G. Michel, A. Gaset. *Riv. Ital. EPPOS.* **1995**, *16*, 3.
- W. Aidi Wannes, B. Mhamdi, B. Marzouk. *Chromatographia* **2009**, *69*, 17.
- B. M. Lawrence. *Perfum. Flav.* **1990**, *15*, 65.
- B. M. Lawrence. *Perfum. Flav.* **1993**, *18*, 52.
- B. M. Lawrence. *Perfum. Flav.* **1996**, *21*, 57.
- B. M. Lawrence. *Perfum. Flav.* **2002**, *27*, 82.
- B. M. Lawrence. *Perfum. Flav.* **2007**, *32*, 54.
- F. W. Semmler, K. Bartelt. *I. Chem. Inst. Univ. Berlin* **1907**, *40*, 1363.
- L. Peyron. *Plantes Med. Phytother.* **1970**, *4*, 279.
- W. Scora. *Phytochemistry* **1973**, *12*, 153.
- P. Bradesi, F. Tomi, J. Casanova, J. Costa, A. F. Bernardini. *J. Essent. Oil Res.* **1997**, *9*, 283.
- M. H. Boelens, R. Jimenez. *J. Essent. Oil Res.* **1992**, *4*, 349.
- P. C. Pereira, M. J. Cebola, M. G. Bernardo-Gil. *Molecules* **2009**, *14*, 3094.
- C. Gardeli, V. Papageorgiou, A. Mallouchos, K. Theodosios, M. Komaitis. *Food Chem.* **2008**, *107*, 1120.
- A. F. Traboulsi, K. Taoubi, S. El-Haj, J. M. Bessière, S. Rammal. *Pest Manage. Sci.* **2002**, *58*, 491.
- M. Akin, A. Aktumsek, A. Nostro. *Afr. J. Biotechnol.* **2010**, *49*, 531.
- A. Farah, A. Affi, M. Fechtal, A. Chhen, B. Satrani, M. Talbi, A. Chaouch. *Flavour Fragr. J.* **2006**, *21*, 351.
- C. I. G. Tuberoso, A. Barra, A. Angioni, E. Sarritzu, F. M. Pirisi. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 1420.
- B. Jamoussi, M. Romdhane, A. Abderraba, B. Ben Hassine, A. El Gadri. *Flavour Fragr. J.* **2005**, *20*, 274.
- A. Bouzabata, F. Boussaha, J. Casanova, F. Tomi. *Nat. Prod. Commun.* **2010**, *5*, 1659.
- G. Flamini, P. L. Cioni, I. Morelli, S. Maccioni, R. Baldini. *Food Chem.* **2004**, *85*, 599.
- I. Jerkovic, A. Radonic, I. Borcic. *J. Essent. Oil Res.* **2002**, *14*, 266.
- U. Asllani. *J. Essent. Oil Res.* **2000**, *12*, 140.
- P. K. Koukos, K. I. Papadopoulou, A. D. Papagiannopoulos, D. Th. Patiaka. *J. Essent. Oil Res.* **2001**, *13*, 245.
- M. Oezcan, J. Chalchat. *Res. J. Chem. Environ.* **2004**, *8*, 70.
- P. Weyerstahl, H. Marschall, A. Rustaiyan. *Flavour Fragr. J.* **1994**, *9*, 333.
- I. Rasooli, M. L. Moosavi, M. B. Rezaee, K. Jaimand. *J. Agric. Sci. Technol.* **2002**, *4*, 127.

33. D. Yadegarinia, L. Gachkar, M. B. Rezaei, M. Taghizadeh, S. A. Astaneh, I. Rasooli. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1249.
34. B. M. Lawrence, S. J. Terhune, J. W. Hogg. *Am. Perfum.* **1970**, *85*, 53.
35. C. Bicchi, E. Liberto, M. Matteodo, B. Sgorbini, L. Mondello, B. d'Acampora Zellner, R. Costa, P. Rubiolo. *Flavour Fragr. J.* **2008**, *23*, 382.
36. R. Costa, B. d'Acampora Zellner, M. L. Crupi, M. R. De Fina, M. R. Valentino, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello. *Flavour Fragr. J.* **2008**, *23*, 40.
37. Terpenoids Library Website. http://massfinder.com/wiki/Terpenoids_Library
38. D. Kalembe, H. Marschall, P. Bradesi. *Flavour Fragr. J.* **2001**, *16*, 19.
39. T. Özek, B. Demirci, K. H. C. Baser. *J. Essent. Oil Res.* **2000**, *12*, 541.
40. N. Bouzouita, F. Kachouri, M. Hamdi, M. Moncef Chaabouni. *Flavour Fragr. J.* **2003**, *18*, 380.
41. A. Snoussi, F. Kachouri, M. Moncef Chaabouni, N. Bouzouita. *Med. J. Chem.* **2011**, *1*, 38.
42. V. Vidrich, M. Franci, M. Michelozzi, P. Fuzi. *L'Italia Forestale e Montana* **2006**, *1*, 87.
43. N. De Laurentis, A. Rosato, F. Morlacchi, D. Armenise, L. Leone, M. A. Milillo. *Riv. Ital. EPPOS.* **2006**, *42*, 3.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jep

New compounds, chemical composition, antifungal activity and cytotoxicity of the essential oil from *Myrtus nivellei* Batt. & Trab., an endemic species of Central Sahara



Amel Bouzabata^a, Ophélie Bazzali^a, Célia Cabral^b, Maria José Gonçalves^b, Maria Teresa Cruz^c, Ange Bighelli^a, Carlos Cavaleiro^b, Joseph Casanova^a, Ligia Salgueiro^b, Félix Tomi^{a,*}

^a Université de Corse-CNRS, UMR 6134 SPE, Equipe Chimie et Biomasse, Route des Sanguinaires, 20000 Ajaccio, France

^b Centro de Estudos Farmacêuticos/Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal

^c Centro de Neurociências e Biologia Celular e Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, 3000-295 Coimbra, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 April 2013

Received in revised form

26 June 2013

Accepted 27 June 2013

Available online 31 July 2013

Keywords:

Myrtus nivellei

Essential oil

Chemical composition

New terpenes

Antifungal activity

Cytotoxicity

ABSTRACT

Ethnopharmacologic relevance: *Myrtus nivellei* Batt. & Trab. (Myrtaceae) known as Sahara myrtle is appreciated by the Touaregs as medicinal plant. Infusion of leaves is employed against diarrhea and blennorrhoea. Crushed leaves added to oil or to butter ointment have been traditionally used for the treatment of dermatosis. Aim of the study is to consider the traditional medicinal uses and the lack of scientific studies on their biological activities, the present study was designed to elucidate the chemical composition, the antifungal activity of its essential oils against fungi responsible for human infections, as well as, its cytotoxicity in the mammalian keratinocytes.

Materials and methods: Chemical analysis of *Myrtus nivellei* essential oil isolated by hydrodistillation of aerial parts (leaves and flowers), was carried out using a combination of chromatographic (CC, GC with retention indices) and spectroscopic techniques (MS, ¹³C NMR, 2D NMR). The antifungal activity was evaluated by using broth macrodilution methods for yeasts and filamentous fungi. Cytotoxicity was tested in HaCaT keratinocytes through the MTT assay.

Results: Ten samples coming from two localities of harvest were investigated. The chemical composition was largely dominated by 1,8-cineole (33.6–50.4%) and limonene (17.5–25.0%). The structure of two new compounds bearing the isoamylcyclopentane skeleton has been elucidated. The oil was more active against *Cryptococcus neoformans* with MIC of 0.16 μL/mL followed by dermatophytes, with MICs of 0.64 and 1.25 μL/mL. Furthermore, evaluation of cell viability showed no cytotoxicity in HaCaT keratinocytes at concentrations up to 1.25 μL/mL.

Conclusions: The composition of *Myrtus nivellei* oil differed from that of *Myrtus communis*. The structure of two *di-nor*-sesquiterpenoids has been elucidated. It was possible to find appropriate doses of *Myrtus nivellei* oil with both antifungal activity and very low detrimental effect on keratinocytes. These findings add significant information to the pharmacological activity of *Myrtus nivellei* essential oils, specifically to its antifungal properties, thus justifying and reinforcing the use of this plant in traditional medicine.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In Algeria, the genus *Myrtus* L. (Myrtaceae) presently includes two species, *Myrtus communis* L. known as common myrtle and *Myrtus nivellei* Batt. & Trab. known as Sahara myrtle (Migliore et al., 2012). *Myrtus nivellei* is an endemic species of Sahara, widespread in the Center and scarce in the North (Quézel, 1965).

It has been considered two subspecies: subsp. *nivellei* in Algeria and subsp. *tibesticus* in Tchad (Tibesti) (Quézel, 1958).

Myrtus nivellei grows in scattered populations, in rocky and sandy wades where subterranean water points exist, and generally at an altitude above 1400 m (Hammiche and Maiza, 2006). It is a shrub up to 2 m, with rough bark, leaves lanceolate, thick and linear (4–5 cm), five white petals, indeterminate stamens and the fruits are black berries (Battandier and Trabut, 1911; Ozenda, 2004).

Myrtus nivellei, known under the names of “Tafeldest” or “Tafaltasset” in Tamahaq and “Raihana Essahara El Wousta” in Arabic,

* Corresponding author. Tel.: +33 495 5241 22; fax: +33 495 5241 42.
E-mail address: felix.tomi@univ-corse.fr (F. Tomi).

is appreciated by the Touaregs as medicinal plant, condiment and spice (flavoring of tea) (Maiza, 2008). According to the ethnobotanical research reported through interviews with nomad populations, leaves in infusion are employed by practitioners in internal use against intestinal diseases (diarrhea), fever and diabetes (Hammiche and Maiza, 2006; Maiza, 2008). In external use, the crushed leaves added to oil or butter ointment (poultice) are recommended in the treatment of dermatosis and for hair care (Hammiche and Maiza, 2006). In traditional medicine, the leaves in infusion or added to barley wafers, are also employed against the blennorrhoea (Sahki and Boutamine-Sahki, 2004).

Very little is known about the phytochemistry and biological activities of *Myrtus nivellei*. To our knowledge there is only one paper reporting the phenolic compounds and its antioxidant activity (Rached et al., 2010) and there is none about the composition of *Myrtus nivellei* essential oil.

Therefore, in continuation of our ongoing work on the characterization of aromatic and medicinal plants from Algeria (Bousmaha et al., 2006; Mecherara-Idjeri et al., 2008; Bekhechi et al., 2010; Bouzabata et al., 2013), and considering the widely use of *Myrtus nivellei* by the Touaregs in Algerian traditional

medicine, the aims of the present work were to investigate the chemical composition of its essential oils, as well as to evaluate the antifungal potential and its topical safety on keratinocyte cells.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and essential oil isolation

Aerial parts of *Myrtus nivellei* were collected in July 2010 during the flowering stage from Central Sahara. Samples TAS1-TAS5 and TAM1-TAM5 were isolated from plants harvested near Djanet city (Tassili of N'Ajers massif; altitude: 1710 m, latitude: 24°37', longitude: 9°35') and near Tamanrasset city (Hoggar massif; altitude: 1900 m, latitude: 22°50', longitude: 5°37'), respectively (Fig. 1). A voucher specimen was deposited at the herbarium of the Museum d'Histoire Naturelle, Aix-Marseille University; reference PH-2011-17-1. The myrtle was identified as *Myrtus nivellei* by Dr. G. De Belaire, University of Badji-Mokhtar, Annaba (Algeria). Each sample of aerial parts (leaves and flowers, 100 g) of *Myrtus nivellei* was submitted to



Fig. 1. Locations of harvest of *Myrtus nivellei* in Central Sahara (Algeria).

hydrodistillation using a Clevenger type apparatus during 3 h. Essential oils were stored in the dark, at 4 °C.

2.2. Fractionation of the essential oil

An aliquot of the sample TAM2 (1055 mg) was chromatographed on a silica gel column (63–200 μm , 20.5 g) affording four fractions which were analyzed by GC(RI), GC–MS and ^{13}C NMR. Fractions F1 (159 mg) and F2 (61 mg) eluted with pentane contained terpene hydrocarbons, whereas oxygenated compounds were present in two fractions, F3 (501 mg, pentane/diethyl ether (P/DE)=98/2) and F4 (334 mg; diethyl ether). The fraction F4 contained unidentified components A (26.8%), and B (6.5%). Part of F4 (250 mg) was fractionated once again (silica gel, 63–200 μm , 5 g) using a gradient of solvents, pentane/diethyl ether (96/4 to 0/100) as mobile phase, affording 28 fractions (F4.1–F4.28) which were analyzed by GC(RI) and ^{13}C NMR. Fraction F4.23 (5 mg, P/DE=90/10) contained unidentified compound B (77% purity by GC). Unidentified compound A was present in fractions F4.10–F4.12 (19–20 mg each, P/DE=95/5). The three fractions were mixed and the resulting mixture (60 mg) was chromatographed once again (silica gel, 35–70 μm , 5 g) affording 18 fractions. Fraction 16 (11 mg) eluted with P/DE=95/5 contained unidentified compound A (purity: 84% by GC). Compounds A and B were accompanied by minor components that did not hinder structural elucidation by 2D NMR.

Compound A: ^1H and ^{13}C NMR data, see Table 1; EIMS 70 eV, m/z (relative intensity): 165 (92), 123 (100), 95 (35), 85 (17), 79 (10), 67 (11), 57 (27), 43 (64), 41 (30), 39 (11).

Compound B: ^1H and ^{13}C NMR data, see Table 2; EIMS 70 eV, m/z (relative intensity): 163 (77), 123 (40), 112 (7), 95 (20), 83 (100), 79 (6), 67 (11), 55 (35), 43 (41), 41 (21), 39 (16).

2.3. GC and GC–MS analysis

GC analysis were carried out using a Perkin-Elmer Autosystem apparatus equipped with two flame ionization detectors (FID), and fused capillary columns (50 m \times 0.22 mm i.d., film thickness 0.25 μm), BP-1 (polydimethylsiloxane) and BP-20 (polyethylene-glycol). The oven temperature was programmed from 60 °C to 220 °C at 2 °C/min and then held isothermal (20 min); injector temperature: 250 °C (injection mode: split 1/60); detector temperature: 250 °C; carrier gas: helium (0.8 mL/min). The relative proportions of the essential oil constituents were expressed as percentage obtained by peak area normalization, without using

Table 1
NMR data of compound A.

C	δ (^{13}C)	Dept	δ (^1H)	Proton	Multiplicity (J)	Cosy ^1H – ^1H	HMBC (H→C)
C1	81.15	C					
C2	77.26	CH	5.62		m	4,6	1,3,4,9,12
C3	131.34	C					
C4	130.07	CH	5.36		m	2,6	2,5,6,7,11
C5	44.32	C					
C6	18.59	CH ₃	1.68		t (1.3)	2,4	2,3,4,8
C7	27.17	CH ₃	1.26		s		4,5,8,11
C8	26.72	CH ₃	1.24		s		1,4,5,7,11
C9	170.43	C					
C10	20.94	CH ₃	2.17		s		2, 9
C11	215.46	C					
C12	39.33	CH ₂	1.87	a	dd (14.7, 8.6)	13	1,2,11,13,14
			1.78	b	dd (14.7, 4.0)	13	1,2,11,13,14
C13	24.26	CH	1.5		m	12,14,15	
C14	24.03	CH ₃	0.97		d (6.7)	13	12,13
C15	24.45	CH ₃	0.83		d (6.7)	13	12,13

δ : ppm; J: Hz; d: doublet; t: triplet; m: multiplet; dd: doublet of doublet.

Table 2
NMR data of compound B.

C	δ (^{13}C)	Dept	δ (^1H)	Multiplicity (J)	Cosy ^1H – ^1H	HMBC (H→C)
C1	79.48	C				
C2	77.90	CH	5.55	m	4,6	1,3,4,9
C3	130.87	C				
C4	130.54	CH	5.33	m	2,6	2,5,6,11
C5	45.02	C				
C6	18.64	CH ₃	1.72	t (1.3)		
C7	27.92	CH ₃	1.21	s		4,5,8,11
C8	25.99	CH ₃	1.16	s		4,5,7,11
C9	170.73	C				
C10	20.99	CH ₃	2.17	s		9
C11	211.80	C				
C12	120.41	CH	5.55	m	14,15	1,11,14,15
C13	141.98	C				
C14	18.56	CH ₃	1.57	d (1.3)	12	11,12,13,15
C15	26.89	CH ₃	1.74	d (1.3)	12	11,12,13,14

δ : ppm; J: Hz; d: doublet; t: triplet; m: multiplet.

correcting factors. Retention indices (RI) were determined relative to the retention times of a series of *n*-alkanes with linear interpolation ("Target Compounds" software from Perkin Elmer).

GC–MS analysis: EOs were analyzed with a Perkin-Elmer TurboMass detector (quadrupole), directly coupled to a Perkin-Elmer Autosystem XL, equipped with a fused-silica capillary column (60 m \times 0.22 mm i.d., film thickness 0.25 μm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane). Carrier gas, helium at 1 mL/min; split, 1/80; injection volume, 0.2 μL ; injector temperature, 250 °C; oven temperature programmed from 60 °C to 230 °C at 2 °C/min and then held isothermal (45 min); ion source temperature, 150 °C; energy ionization, 70 eV; electron ionization mass spectra were acquired over the mass range 35–350 Da.

GC–TOF–MS analyses were performed on an Agilent 6890 gas chromatograph coupled to a time of flight (ToF) mass spectrometer GCT Premier from Waters equipped with a column (30 m \times 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 μm), DB-5 MS UI. Injection volume: 1 μL mode splitless; oven temperature programmed from 60 °C (1 min) to 320 °C (25 °C/min), 320 °C during 10 min. Transfer line temperature at 250 °C and source temperature at 200 °C. The mass spectrometer was operated in the electron impact mode (energy ionization, 70 eV). Multichannel plate voltage was set at 2600 V, acquisition rate at 10 spectra/s (*i.e.* 5 spectra/s with "Dynamic Range Enhancement" mode on) and pusher interval at 40 μs . Acquisition was performed in the full scan mode with a scan range of m/z 50–550. Calibration was done using the calibration wizard, with heptacosane as the reference. The mass resolution was around 5000 FMWH for m/z 218.9856. During acquisitions, an internal standard, pentafluorobromo benzene, was introduced continuously into the EI source, from a reference reservoir at 50 °C and through a reference inlet at 120 °C. The mass m/z 181.0077 was used as lock mass. Data were processed with MassLynx 4.1.

2.4. ^{13}C NMR analysis

All NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 Fourier Transform spectrometer, equipped with a 5 mm probe, in deuterated chloroform, with all shifts referred to internal tetramethylsilane (TMS). ^{13}C NMR spectra of mixtures (EO or fractions of chromatography) were recorded with the following parameters: pulse width=4 μs (flip angle 45°); acquisition time=2.7 s for 128 K data table with a spectral width of 25,000 Hz (250 ppm); CPD mode decoupling; digital resolution=0.183 Hz/pt. The number of accumulated scans was 3000 (around 40 mg of the sample in 0.5 mL of CDCl_3). Standard pulse sequences from Bruker library

were used for two dimensional spectra. Gradient enhanced sequences were used for the heteronuclear two-dimensional experiments.

2.5. Identification of components

Identification of the individual components was based (i) on comparison of their GC retention indices (RI) on apolar and polar columns, with those of authentic compounds (ii) on computer matching with commercial mass spectral libraries (National Institute of Standards and Technology, 1996; König et al., 2001; Adams, 2007), and (iii) on comparison of the signals in the ^{13}C NMR spectra of the mixtures with those of reference spectra compiled in the laboratory spectral library, with the help of a laboratory-made software (Rezzi et al., 2002; Tomi and Casanova, 2006; Bighelli and Casanova, 2009).

2.6. Antifungal activity evaluation

2.6.1. Fungal strains

The antifungal activity of the oil was evaluated against yeasts and filamentous fungi strains (dermatophytes):

- *Yeasts*: three American type culture collection (ATCC) type strains (*Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 90018, *Candida tropicalis* ATCC 13803); one Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) type strain (*Cryptococcus neoformans* CECT 1078); and two clinical strains isolated from recurrent cases of vulvovaginal candidiasis (*Candida guilliermondii* MAT23 and *Candida krusei* H9).
- *Dermatophytes*: three dermatophyte clinical strains isolated from nails and skin (*Epidermophyton floccosum* FF9, *Trichophyton mentagrophytes* FF7, *Microsporum canis* FF1); and four Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) type strains (*Trichophyton rubrum* CECT 2794, *Microsporum gypseum* CECT 2908, *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* CECT 2958, *Trichophyton verrucosum* CECT 2992).
- *Candida parapsilosis* ATCC 90018 was used as control.

The fungal isolates were identified by standard microbiology methods and stored on Sabouraud broth with glycerol at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Prior to antifungal susceptibility testing, each isolate was inoculated on Sabouraud agar to ensure optimal growth characteristics and purity.

2.6.2. Antifungal activity methods

Broth macrodilution methods based on the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) reference protocols M27-A3 (CLSI, 2008a) and M38-A2 (CLSI, 2008b) for yeasts and filamentous fungi, respectively, were used to determine MICs and MLCs of the essential oils.

The serial doubling dilution of the essential oil was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO), with concentrations ranging from 0.08 to $5\ \mu\text{L}/\text{mL}$. Final concentration of DMSO never exceeded 2%. Recent cultures of each strain were used to prepare the cell suspension adjusted to $1\text{--}2 \times 10^3$ cells/mL for yeasts, and $1\text{--}2 \times 10^4$ cells/mL for filamentous fungi. The concentration of cells was confirmed by viable count on Sabouraud agar. The test tubes were incubated aerobically at $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 h/72 h (*Candida* spp./*Cryptococcus neoformans*) and at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 7 days (dermatophytes) and MICs were determined. To evaluate MLCs, aliquots ($20\ \mu\text{L}$) of broth were taken from each negative tube after MIC reading, and cultured in Sabouraud dextrose agar plates. Plates were then incubated at $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 h (*Candida* spp.) and 72 h for *Cryptococcus neoformans*, and $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 7 days (dermatophytes). In addition,

two reference antifungal compounds, amphotericin B (Fluka) and fluconazole (Pfizer), were used to control the sensitivity of the tested microorganisms. All tests were performed in RPMI medium. For each strain tested, both growth conditions and sterility of the medium were checked in two control tubes. The innocuity of the DMSO was also checked at the highest tested concentration. All experiments were performed in duplicate and repeated three times, yielding essentially the same results (a range of values is presented when different results were obtained).

2.7. Evaluation of cytotoxicity

2.7.1. Cell culture and materials

The fetal calf serum was from Biochrom KG (Berlin, Germany) and trypsin from Gibco (Paisley, UK). The proteases inhibitor cocktail was from Roche (Carnaxide, Portugal). MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and all the other reagents were from Sigma Chemical Co. The human keratinocyte cell line HaCaT, obtained from DKFZ (Heidelberg), was kindly supplied by Dr. Eugénia Carvalho (Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal). Keratinocytes were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (high glucose) supplemented with 4 mM glutamine, 10% heat inactivated fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO_2 . Along the experiments, cells were monitored by microscope observation in order to detect any morphological change.

2.7.2. MTT assay for cell viability

Assessment of cell viability was made through a colorimetric assay, using MTT (Mosmann, 1983). In this method, the optical density of the solution containing the formazan produced by metabolically active cells is measured spectrophotometrically. The HaCaT cells (0.1×10^6 cells/well, cultured in 48-well microplates) were incubated in a final volume of 600 μL , allowed to stabilize for 12 h, and then incubated for 24 h with varying concentrations of the oil. After adding 60 μL of MTT solution (5 mg/mL in PBS) to each well, the cells were further incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min, in a humidified atmosphere of 95% air/5% CO_2 . Supernatants were then discarded and 300 μL of acidified isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol) were added to the cultures and mixed thoroughly to dissolve the dark blue crystals of formazan. Formazan quantification was performed using an automatic plate reader (SLT, Austria) at 570 nm, with a reference wavelength of 620 nm.

2.8. Data analysis

All the experiments were performed in duplicate. The MTT results are presented as mean \pm standard error of the mean (S.E. M.) of the indicated number of experiments, and the means were statistically compared using the one-way ANOVA test, with Dunnett's post-test. The differences between the means were considered significant for the values of $p < 0.05$.

3. Results and discussion

Leaves and flowers of *Myrtus nivellei* were collected on 10 individual shrubs in two localities of Algerian Central Sahara (Djanet, Tassili and Tamanrasset, Hoggar) (Fig. 1). Essential oil was isolated using a Clevenger-type apparatus. Yields ranged from 0.5% to 0.9% for Hoggar samples and from 1.4% to 2.0% for Tassili samples. All the samples were analyzed by GC(RI) and ^{13}C NMR without isolation of individual components, following a

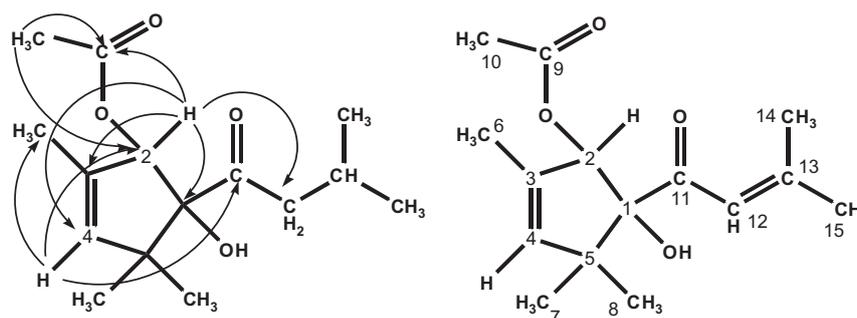


Fig. 2. Structures of compounds A and B and illustrative long-range proton–carbon connectivities observed in the HMBC spectrum of A.

computerized method developed in our laboratory (Rezzi et al., 2002; Tomi and Casanova, 2006; Bighelli and Casanova, 2009). One sample was also analyzed by GC–MS. It resulted from the analyses that two components remained unidentified. Therefore, the following items will be successively reported (i) structural elucidation of compounds A and B; (ii) detailed analysis of a selected sample; (iii) comparison of the 10 samples composition; (iv) antifungal activity of the essential oil and (v) skin cytotoxicity.

3.1. Structure elucidation of new compounds

A sample, chosen among those exhibiting the higher yields of essential oil as well as the higher contents of unidentified compounds A and B was repeatedly chromatographed over silica gel column in order to purify these compounds. Compounds A and B were found into two different fractions of CC and their structural elucidation was achieved using a full set of two dimensional NMR experiments.

3.1.1. Compound A

According to GC–TOF–MS, compound A had an exact mass of $m/z=268.1684$ corresponding to the formula $C_{15}H_{24}O_4$ (calc=268.1668), in agreement with 1H NMR, ^{13}C NMR and DEPT spectra (Table 1, Fig. 2). The molecule bears four insaturation centers, three of them being identified by the chemical shift values of selected carbons: a keto and an ester functions (215.46 ppm and 170.73 ppm, respectively), a trisubstituted double bond (131.34 ppm and 130.04 ppm), the fourth insaturation belonged to a ring. The deshielded values of aliphatic carbons (81.15 ppm and 77.26 ppm) confirmed the acetate function (methyl group at 20.94 ppm and 2.17 ppm) and suggested the occurrence of another oxygenated function (alcohol). The 3-methylbutoxy substructure $[-CO-CH_2-CH(CH_3)_2]$, frequently found in natural compounds, was evidenced by characteristic proton and carbon chemical shifts and confirmed by adequate correlation plots in the HMBC spectrum (Table 1). If we take care of three remaining methyl groups, the molecule contains a cyclopentene moiety in its structure. The various oxygenated functions (acetate, hydroxyle and keto fragment) as well as the three methyl groups were located on the cyclopentene moiety using long range proton–carbon connectivities on the HMBC spectrum. Therefore, compound A was identified as 1-hydroxy-1-(3-methylbutoxy)-2-acetoxy-3,5,5-trimethyl-3-cyclopentene. Unfortunately, neither the chemical shift values of protons and carbons, nor through space proton–proton correlation plots in the NOESY spectrum (none was observed) allowed the determination of the relative stereochemistry of the oxygenated groups present in the molecule.

3.1.2. Compound B

The exact mass of compound B was measured as $m/z=266.1552$ by GC–TOF–MS corresponding to the formula $C_{15}H_{22}O_4$

(calc=266.1512) in agreement with 1H NMR, ^{13}C NMR and DEPT spectra (Table 2, Fig. 2). The formula of compound B differs from that of compound A by the loss of two hydrogen atoms. Examination of 1H and ^{13}C NMR spectra demonstrated that B contains a supplementary double bond on the one hand and that the chemical shifts of most carbons are close to those of compound A, suggesting that both compounds exhibited the same framework. Moreover, the acetyl function was present and in contrast, the 3-methylbutoxy substructure was no more found. Indeed, the side chain contained the isopentenyl moiety evidenced by proton and carbon chemical shifts as well as by the shielding of the carbonyl carbon (211.80 ppm in B instead of 215.46 ppm in A). The isopentenyl moiety was confirmed by correlation plots in the HMBC spectrum between vinylic hydrogen H12 on the one hand and methyl hydrogens H13 and H14 with carbons C11–C15. The location of the side chain on the cyclopentene moiety was ascertained by the observation of connectivity between H12 and C1. As this has been done in compound A, various long range hydrogen–carbon correlation plots allowed the location of the three methyls, the acetyl function on the cyclopentene substructure. Therefore, compound A was identified as 1-hydroxy-1-(3-methyl-2-butenoxy)-2-acetoxy-3,5,5-trimethyl-3-cyclopentene. Here again, the relative stereochemistry of the oxygenated groups present in the molecule, could not be assigned (no through space proton–proton correlation plots was observed in the NOESY spectrum).

3.2. Chemical composition of *Myrtus nivellei* essential oil

The chemical composition of the *Myrtus nivellei* leaf oil sample is reported in Table 3 resulting from the GC(RI) and GC–MS analysis of the EO, as well as ^{13}C NMR analysis of the EO and fractions of chromatography and structure elucidation of new compounds A and B. 1,8-Cineole (37.5%) and limonene (25.0%) were by far the major components of that monoterpene-rich oil sample. Indeed, various oxygenated monoterpenes were present at appreciable contents: geranyl acetate, 5.1%; α -terpineol, 5.0%; linalyl acetate, 4.2%, α -terpinyl acetate, 3.8% and linalool, 1.7%. The two *di-nor*-sesquiterpene new compounds A and B accounted for 4.3% and 0.9%, respectively of the whole composition.

In order to check the homogeneity of the composition of *Myrtus nivellei* essential oil or to evidence an eventual chemical variability, 10 oil samples isolated from plants growing wild in Sahara have been investigated. The stations of harvest are located in Tassili des N'Ajers mountains (samples TAS-1–TAS-5) and in Hoggar mountains (near Tamanrasset, samples TAM-1–TAM-5). Both stations exhibit a meso-Mediterranean climate. The yields of EO isolated from *Myrtus nivellei* growing in the Tassili des N'Ajers station (TAS samples, 1.4–2.0%, w/w) were twice higher than those of EO isolated from plants growing in Hoggar station (TAM samples, 0.5–0.9%, w/w). Analysis of the essential oils by GC(FID) and ^{13}C NMR allowed the identification of 24 constituents representing from 77.3% to 92.6% of the whole composition (all the unidentified compounds were minor components) (Table 4).

Table 3
Components of the essential oil isolated from aerial parts of *Myrtus nivellei* Batt. & Trab.

	Components	RI ^a	RI ^P	%	Identification
1	α -Thujene	923	1013	tr	RI, MS, ¹³ C NMR
2	α -Pinene	930	996	3.2	RI, MS, ¹³ C NMRC NMR
3	β -Pinene	971	1114	0.2	RI, MS, ¹³ C NMR
4	Myrcene	981	1163	0.2	RI, MS
5	α -Phellandrene	997	1168	0.1	RI, MS, ¹³ C NMR
6	δ -3-Carene	1005	1151	0.1	RI, MS, ¹³ C NMR
7	α -Terpinene	1009	1183	0.1	RI, MS, ¹³ C -NMR
8	p-Cymene	1011	1273	0.6	RI, MS, ¹³ C NMR
9	1,8-Cineole*	1020	1213	37.5	RI, MS, ¹³ C -NMR
10	Limonene*	1020	1204	25.0	RI, MS, ¹³ C NMR
11	(Z)- β -Ocimene	1025	1235	0.1	RI, ¹³ C NMR
12	(E)- β -Ocimene	1036	1252	0.2	RI, MS, ¹³ C NMR
13	γ -Terpinene	1048	1248	0.6	RI, MS, ¹³ C NMR
14	Terpinolene	1079	1285	0.2	RI, MS, ¹³ C NMR
15	Linalool	1082	1544	1.7	RI, MS, ¹³ C NMR
16	Terpinen-4-ol	1161	1600	0.5	RI, MS, ¹³ C NMR
17	α -Terpineol	1172	1693	5.0	RI, MS, ¹³ C NMR
18	Geraniol	1233	1829	0.1	RI, ¹³ C NMR
19	Linalyl acetate	1239	1556	4.2	RI, MS, ¹³ C NMR
20	α -Terpinyl acetate	1332	1694	3.8	RI, MS, ¹³ C NMR
21	Neryl acetate	1341	1725	0.4	RI, MS, ¹³ C NMR
22	Geranyl acetate	1359	1755	5.1	RI, MS, ¹³ C NMR
23	(E)- β -Caryophyllene	1417	1596	0.2	RI, MS, ¹³ C NMR
24	α -Humulene	1451	1665	0.4	RI, ¹³ C NMR
25	Compound A	1582	2179	4.3	MS, NMR ^a
26	Compound B	1594	2270	0.9	MS, NMR ^a
Total				94.7	

Order of elution and percentages of individual components are given on apolar column (BP-1), those with an asterisk (*) excepted, percentages on polar column (BP-20). Limonene and 1,8-cineole co-eluted on the BP-1 column (GC) while they were separated on the Rtx-1 column (GC-MS). RI^a, RI^P: retention indices measured on apolar and polar columns, respectively. tr < 0.05%.

^a Identification by NMR: ¹H and ¹³C NMR, 2D-NMR.

Table 4
Composition of *Myrtus nivellei* essential oils from two stations in Central Algerian Sahara.

Components	TAS 1–5				TAM 1–5			
	Min	Max	M	SD.	Min	Max	M	SD
α -Pinene	2.9	3.3	3.1	0.2	3.6	5.8	5.2	1.0
p-Cymene	0.6	0.7	0.6	0.0	0.9	1.0	0.9	0.0
Limonene*	17.5	25.0	20.5	3.7	18.8	20.6	19.9	1.4
1,8-Cineole*	36.6	50.4	43.9	6.3	33.6	40.7	39.0	3.7
γ -Terpinene	0.0	0.6	0.4	0.0	0.0	0.2	0.1	0.0
Linalool	0.7	1.7	1.1	0.5	0.6	1.0	0.8	0.1
Terpinen-4-ol	0.5	0.6	0.5	0.1	0.3	0.3	0.3	0.0
α -Terpineol	3.5	5.2	4.4	0.8	4.7	5.5	5.0	0.3
Linalyl acetate	1.7	4.2	2.8	1.3	1.5	2.1	1.6	0.3
α -Terpinyl acetate	3.6	7.8	5.7	2.0	3.6	4.7	4.0	0.4
Geranyl acetate	5.0	5.3	5.1	0.1	3.2	4.1	3.6	0.4
(E)- β -caryophyllene	0.2	0.2	0.2	0.0	0.4	0.6	0.5	0.1
α -Humulene	0.3	0.4	0.4	0.0	0.8	1.3	1.0	0.2
Compound A	2.4	4.5	3.4	0.9	4.8	9.8	6.7	2.0
Compound B	0.4	0.9	0.6	0.3	1.0	2.1	1.5	0.4

Order of elution and percentages are given on apolar column (BP-1), except for compounds with an asterisk (*), percentage on BP-20, TAS 1–5: Tassili des N'Ajers samples, TAM 1–5: Tamanrasset samples.

The 10 oil samples exhibited similar chemical composition dominated by 1,8-cineole (up to 50.4%) and limonene (up to 25.0%). It could be noticed that the content of cineole is slightly higher in the samples from Tassili (TAS) than those from Hoggar (TAM). Conversely, the contents of the new compounds A and B are higher in Hoggar samples (means values = 6.7% and 1.5%) than in Tassili samples (mean values = 3.4% and 0.6%).

The composition of *Myrtus nivellei* essential oil differed from that of *Myrtus communis* growing wild in North Algeria, characterized by a high amount of α -pinene (Bouzabata et al., 2010, 2013). In fact, it differed from the various compositions of EOs isolated from

Myrtus communis growing wild all around the Mediterranean basin and in the islands (Bazzali et al., 2012). Compounds A and B have been found in all the investigated samples of *Myrtus nivellei* EO. In contrast, they were never identified in *Myrtus communis* EOs (Bazzali et al., 2012; Bouzabata et al., 2013). Both compounds may be considered as markers of *Myrtus nivellei*.

3.3. Antifungal activity

The antifungal activity of *Myrtus nivellei* essential oil presented in Table 5 showed a variability of inhibition among all the fungal

Table 5
Antifungal activity (MIC and MLC) of *Myrtus nivellei* essential oil.

Strains	<i>Myrtus nivellei</i> oil		Fluconazole	
	MIC ^a	MLC ^a	MIC ^b	MLC ^b
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1.25–2.5	1.25–2.5	1	> 128
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	2.5	2.5	4	> 128
<i>Candida krusei</i> H9	2.5	2.5	64	64–128
<i>Candida guilliermondii</i> MAT23	1.25–2.5	1.25–2.5	8	8
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	2.5	2.5	< 1	< 1
<i>Cryptococcus neoformans</i> CECT 1078	0.16	0.32	16	128
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> FF7	1.25	1.25	16–32	32–64
<i>Microsporum canis</i> FF1	0.64	0.64	128	128
<i>Trichophyton rubrum</i> CECT 2794	0.64	0.64	16	64
<i>Microsporum gypseum</i> CECT 2908	1.25	1.25	128	> 128
<i>Epidermophyton floccosum</i> FF9	0.64	0.64	16	16
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> CECT 2958	1.25	2.5	128	≥ 128
<i>Trichophyton verrucosum</i> CECT 2992	1.25	2.5	> 128	> 128

Results were obtained from 3 independent experiments performed in duplicate.

^a MIC and MLC were determined by a macrodilution method and expressed in $\mu\text{L}/\text{mL}$ (V/V).

^b MIC and MLC were determined by a macrodilution method and expressed in $\mu\text{g}/\text{mL}$ (W/V).

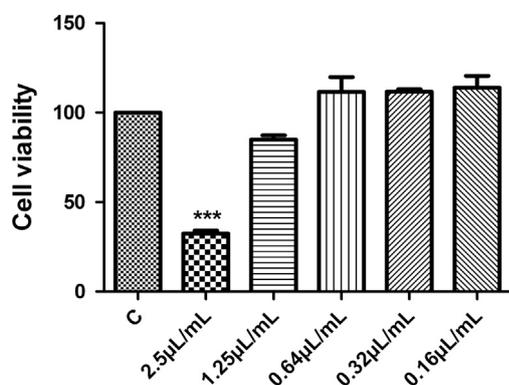


Fig. 3. Effect of *Myrtus nivellei* essential oil on keratinocytes viability (MTT assay). HaCaT cells were exposed to different concentrations of the essential oil (0.16–2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) for 24 h. Results are expressed as a percentage of MTT reduction by control cells maintained in culture medium. Each value represents the mean \pm SEM from three experiments, performed in duplicate (***) $p < 0.001$, compared with control).

strains tested. Our results showed that *Myrtus nivellei* essential oil had effective antifungal activity against *Cryptococcus neoformans* with MIC and MLC values of 0.16 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and 0.32 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectively. *Cryptococcus neoformans* is the major causative agent of fungal meningoencephalitis. It is the best known form of this mycosis in both immunocompromised and immunocompetent individuals. Also against dermatophytes, the oil demonstrated antifungal potential, particularly for *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum* and *Epidermophyton floccosum* with MIC and MLC of 0.64 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Table 5). For most of the fungi tested MIC and MLC are similar revealing fungicidal activity of the oil. These results support the use of this species in traditional medicine for the treatment of dermatophytosis.

3.4. Cytotoxicity evaluation

As shown in Fig. 3, only for 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of essential oil the value of cell viability in human keratinocyte is significantly different from the control (32.42 ± 1.62). Cell viability evaluation demonstrated that the oil in concentrations until 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ are safe for topical use supported by the absence of cytotoxicity in HaCaT keratinocytes.

4. Conclusions

This paper reported for the first time the chemical composition and the antifungal activity of the essential oil isolated from *Myrtus nivellei*, an endemic species to the Central Saharan mountains. 1,8-Cineole and limonene were the major components. Two new natural components, which possess a cyclopentene framework, were identified by structural analysis from 1D and 2D NMR. It could be assumed that these components were probably markers of this species.

Skin cytotoxicity evaluation for doses with antifungal activity revealed that *Myrtus nivellei* oil in concentrations up to 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ is safe for topical applications against *Cryptococcus neoformans* and all dermatophytes tested. These results demonstrate the efficacy and safety of *Myrtus nivellei* and support its use by the Touaregs in Saharan traditional medicine for the treatment of dermatophytosis.

Acknowledgments

A. Bouzabata wishes to thank the cooperation program between France and Algeria (PROFAS "B" program) for a research grant and PEst-OE/SAU/UI0177/2011 (Center for Pharmaceutical Studies, Portugal). We also thank Dr. G. De Belaïre (Badji-Mokhtar University, Annaba, Algeria) for identification of the plant, Dr. J. Migliore, (IMBE, Aix-Marseille University, France) who deposited the voucher specimen, and Dr. H. Casabianca (SCA-CNRS, Solaize, France) for exact mass measurement.

References

- Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, fourth ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA.
- Battandier, J.P., Trabut, L., 1911. Contribution à la flore du pays des Touaregs, Bulletin de la Société Botanique de France.
- Bazzali, O., Tomi, F., Casanova, J., Bighelli, A., 2012. Occurrence of C8-C10 esters in Mediterranean *Myrtus communis* L. leaf essential oil. Flavour Fragrance Journal 27, 337–340.
- Bekhechi, C., Boti, J.B., Atik Bekkara, F., Abdelouahid, D.E., Casanova, J., Tomi, F., 2010. Isothymol in ajowan essential oil. Natural Product Communications 5, 1107–1110.
- Bighelli, A., Casanova, J., 2009. Analytical Methods for Cymbopogon Oils in Essential Oil Bearing Grasses, the Genus Cymbopogon. In: Akhila, A. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 195–221.

- Bousmaha, L., Boti, J.B., Atik Bekkara, F., Castola, V., Casanova, J., 2006. Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Lavandula dendata* L. from Algeria. *Flavour Fragrance Journal* 21, 368–372.
- Bouzabata, A., Boussaha, F., Casanova, J., Tomi, F., 2010. Composition and chemical variability of leaf oil of *Myrtus communis* L. from North-Eastern Algeria. *Natural Product Communication* 10, 1659–1662.
- Bouzabata, A., Castola, V., Bighelli, A., Abed, L., Casanova, J., Tomi, F., 2013. Chemical variability of Algerian *Myrtus communis* L. *Chemistry and Biodiversity* 10, 129–137.
- CLSI—Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008a. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard, third ed., M27-A3, Wayne, PA.
- CLSI—Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008b. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. Approved Standard, third ed., M38-A2, Wayne, PA.
- Hammiche, V., Maiza, K., 2006. Traditional medicine in Central Sahara: pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *Journal of Ethnopharmacology* 105, 358–367.
- König, W.A., Hochmuth, D.H., Joulain, D., 2001. Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils, Library of MassFinder 2.1. University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry, Hamburg, Germany.
- Maiza, K., 2008. Pharmacopée traditionnelle saharienne: Sahara algérien (Ph.D.). Algiers University, p. 386.
- Mecherara-Idjeri, S., Hassani, A., Castola, V., Casanova, J., 2008. Composition of leaf, fruit and gall essential oils of Algerian *Pistacia atlantica* Desf. *Journal of Essential Oil Research* 20, 215–219.
- Migliore, J., Baumel, A., Juin, M., Médail, F., 2012. From Mediterranean shores to Central Saharan Mountains: key phylogeographical insights from the genus *Myrtus*. *Journal of Biogeography* 39, 942–956.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods* 65, 55–63.
- National Institute of Standards and Technology, 1996. PC version 1.7 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database. Perkin-Elmer Corp, Norwalk, CT, USA.
- Ozenda, P., 2004. Flore et végétation du Sahara, third ed. CNRS, Paris.
- Quézel, P., 1958. Mission botanique au Tibesti. Institut de recherches sahariennes, Alger.
- Quézel, P., 1965. La végétation du Sahara, du Tchad à la Mauritanie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Rached, W., Benamar, H., Bennaceur, M., Marouf, A., 2010. Screening of the antioxidant potential of some Algerian Indigenous plants. *Journal of Biological Sciences* 10, 316–324.
- Rezzi, S., Bighelli, A., Castola, V., Casanova, J., 2002. Direct identification and quantitative determination of acidic and neutral diterpenes using ^{13}C NMR. *Applied Spectroscopy* 56, 312–317.
- Sahki, A., Boutamine Sahki, R., 2004. Le Hoggar: Promenade botanique. Editions Esopé.
- Tomi, F., Casanova, J., 2006. ^{13}C NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from Labiatae—a review. *Acta Horticulturae* 723, 185–192.

Chemical composition of leaf and stem oils from Vietnamese *Cupressus tonkinensis* Silba

Tran Huy Thai^a, Ophélie Bazzali^b, Nguyen Thi Hien^a, Pham Van The^a, Phan Ke Loc^a, Tran Minh Hoi^a, Félix Tomi^b, Joseph Casanova^b and Ange Bighelli^{b*}

^aInstitute of Ecology and Biological Resources, Hanoi, Vietnam; ^bUniversité de Corse-CNRS, UMR 6134 SPE, Équipe Chimie et Biomasse, Ajaccio, France

(Received 15 March 2012; final form 15 October 2012)

Cupressus tonkinensis was treated for a long time as a synonym of *Cupressus torulosa* D. Don. and it was proposed as new species in 1994. The two species differed by morphological characters and they were distinct in their random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). Leaves and stems of *C. tonkinensis* produce monoterpene-rich oils whose composition is investigated here for the first time by combination of chromatographic and spectroscopic techniques. α -Pinene (23.1%), sabinene (21.0%) and terpinen-4-ol (14.4%) were the major components of the leaf oil that contained also β -elemol (4.2%). In contrast, α -pinene (42.5%) was by far the major component of the stem oil beside myrcene (10.2%) and cedrol (9.0%).

Keywords: *Cupressus tonkinensis*; Cupressaceae; essential oil composition; monoterpene-rich oil; α -pinene; sabinene; cedrol; ¹³C-NMR

1. Introduction

Cupressus tonkinensis Silba belongs to Cupressaceae family. It is an evergreen tree, 8–15 m in height and 40 cm in trunk diameter with drooping foliage. Its gray-brown stem bark is thick and its twigs are cylindrical. Leaves are small and acute on young twigs and scale-shaped, arranged in dense whorls on old twigs. Cones, unisexual and monoecious, appear in March–May. Female cones (1.5 cm in diameter) are sub-globular when mature, bearing brownish seeds (3 mm long, mature in May–November).

Although this new species was proposed in 1994 (1), the plant was generally ignored or treated as a synonym of *Cupressus torulosa* D. Don. (Himalayan cypress or Bhutan cypress). However, *C. tonkinensis* has dimorphic leaves and numerous resin glands on ultimate segments unlike to *C. torulosa*. Its ovulate cones are smaller than those of *C. torulosa* (2). Finally, Rushforth et al. found that *C. tonkinensis* and *C. torulosa* were distinct in their RAPDs (3).

Cupressus tonkinensis has a restricted distribution area. This species is found scarce on limestone cliffs at altitudes of 500–1000 m above sea level. In Vietnam, it can be found in the districts of Bac Son, Chi Lang (Lang Son province), Na Hang (Tuyen Quang province), Cao Bang, Kon Tum and Lam Dong provinces (4–6). Unfortunately, the felling of *Cupressus* for wood and incense has resulted in the decimation of wild

cypress populations (2). Nowadays, this species is in high risk of extinction and it needs protection in its natural distribution area (*in situ* conservation). It is considered a rare genetic resource and it is listed in the Vietnam Red Data Book (7) and the Governmental Decree 32/2006/NĐ/CP (List of Endangered Forest Plants and Animals). For its preservation, plantations have been established (*ex situ* conservation). Indeed, *C. tonkinensis* is actually cultivated (about 150 individuals) in Huu Lien Nature Reserve (Huu Lung district, Lang Son province) (8). A study on *C. tonkinensis* propagation from seeds and cuttings has been done by the Conifer Specialist Group in Vietnam.

Cupressus tonkinensis provides timber with straight grain and fine texture, resistant to termites and insects. Wood was commonly used to make furniture and fine-art articles of high quality. Wood, especially root, is aromatic. Essential oil isolated from the roots is used for cosmetics and against inflammatory wounds. Bark is employed in the form of decoction for stomach ache (4, 9).

Various *Cupressus* species produce essential oils whose chemical composition has been extensively investigated (10–12). However, little is known about the essential oil isolated from aerial parts of *C. torulosa* and *C. tonkinensis*. Leaf oil from *C. torulosa* cultivated in the Argentinean Patagonia contained mostly monoterpene hydrocarbons, α -pinene (25.8%) and sabinene

*Corresponding author. Email: ange.bighelli@univ-corse.fr

(22.3%) beside terpinen-4-ol (9.3%) (13). In contrast, the essential oil isolated from the foliage of *C. torulosa* var. *cashmeriana* trees cultivated in Yunnan Province, China, exhibited as major components, two monoterpene hydrocarbons, α -pinene (14.1%) and 3-carene (9.6%) beside various sesquiterpenes (14). Sesquiterpenes (more than 50% of the whole composition) are also important components of cone oil isolated from *C. torulosa* D. Don trees cultivated in a botanical garden in India, beside terpinen-4-ol (25.9%) (15).

In the course of our ongoing work on the characterization of Vietnamese medicinal and aromatic plants through the composition of their essential oils and extracts, we investigated a few years ago, commercial samples of essential oil and pyrolytic oil from *Cupressus funebris*. The composition of both samples was dominated by cedrane derivatives (16, 17). In contrast and to the best of our knowledge, there is no report on the volatiles of *C. tonkinensis*.

In this paper, are presented our results on the chemical composition of leaf and stem oils from *C. tonkinensis*. Identification of individual components has been carried out by combination of chromatographic and spectroscopic techniques. The two samples were analyzed by gas chromatography retention indices [GC (RI)], GC/mass spectrometry (GC/MS) and ^{13}C -nuclear magnetic resonance (^{13}C -NMR). Moreover, the leaf oil sample was also fractionated over silica gel column and all the fractions of chromatography analyzed by GC(RI) and ^{13}C -NMR.

2. Experimental

2.1. Plant material

Leaves and stems of *C. tonkinensis* were collected in March 2009 in Huu Lien Nature Reserve, Lang Son province, Vietnam. Voucher specimen was deposited in the Herbarium of the Institute of Ecology and Biological Resources (IEBR) under the number T-IT 120.

Dried leaves and stems were separately submitted to hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus for 2 hours (leaves) or 3 hours (stems). At the end of each hydrodistillation, the oils were collected, dried with anhydrous Na_2SO_4 , measured and transferred to glass flasks that were kept at a temperature of 5°C for further analysis.

2.2. Essential oil fractionation

The leaf oil sample of *C. tonkinensis* (1.500 g) was submitted to flash chromatography (silica gel, 250–500 μm , 25 g). Ten fractions (F1–F10) were eluted with a mixture of solvents of increasing polarity (pentane: diethyl oxide, 100:0–0:100): pentane; F1 (0.544 g), F2 (0.265 g) and F3 (0.007 g); pentane:Et₂O, 98:2; F4

(0.019 g), pentane:Et₂O, 95:5; F5 (0.015 g), F6 (0.055 g), F7 (0.073 g) and F8 (0.049 g), Et₂O, F9 (0.129 g) and F10 (0.085 g). The fractions of chromatography were analyzed by GC(RI) and ^{13}C -NMR.

2.3. Analysis of the essential oils

GC analyses were carried out with a Clarus 500 Perkin–Elmer Autosystem chromatograph equipped with two flame ionization detectors (FID), and fused capillary columns (50 m \times 0.22 mm i.d., film thickness 0.25 μm), BP-1 (polymethylsiloxane) and BP-20 (polyethylene glycol). Carrier gas was helium at a flow of 0.8 mL/minute. The oven temperature was programmed from 60° to 220°C at $2^\circ\text{C}/\text{minute}$ and then held isothermal (20 minutes). Injector temperature: 250°C (injection mode: split 1/60). Detector temperature: 250°C . The percentage composition of the essential oil (g/100 g) was computed by the normalization method from the GC peak areas, using nonane as internal standard and the response factors reported in the literature (18, 19).

GC/MS analyses were carried out using a Perkin–Elmer TurboMass detector (quadrupole), directly coupled to a Perkin–Elmer Autosystem XL, equipped with a fused-silica capillary column (60 m \times 0.22 mm i.d., film thickness 0.25 μm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane). Carrier gas, helium at 1 mL/minute; split, 1:80; injection volume, 0.2 μL . The injection port was set at 250°C ; the oven temperature was programmed from 60° to 230°C at $2^\circ\text{C}/\text{minute}$ and then held isothermal (45 minutes). Significant quadrupole MS operating parameters: Ion source temperature, 150°C ; electron impact ionization at 70 eV with scan mass range of 35–350 *m/z*.

^{13}C -NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 Fourier Transform spectrometer operating at 100.623 MHz for ^{13}C , equipped with a 5-mm probe, in deuterated chloroform (CDCl_3), with all shifts referred to internal tetramethylsilane (TMS). ^{13}C -NMR spectra were recorded with the following parameters: pulse width (PW), 5 μs (flip angle 45°); acquisition time, 2.7 seconds for 128 K data table with a spectral width (SW) of 25,000 Hz (250 ppm); digital resolution 0.183 Hz/pt. The number of accumulated scans was 3000 for each sample (about 50 mg of essential oil or 7–50 mg of fraction of chromatography, in 0.5 mL of CDCl_3).

Identification of the individual components was based: (i) on comparison of their GC retention indices (RI) on apolar and polar columns, determined relative to the retention times of C_6 – C_{30} *n*-alkane series with linear interpolation ('Target Compounds' software of Perkin–Elmer), with those of authentic compounds, or literature data and (ii) on computer search using digital libraries of mass spectral data (20–23) and (iii) by ^{13}C -NMR spectroscopy, following the methodology

Table 1. Components of *Cupressus tonkinensis* Silba leaf and stem oils.

No.	Components ^a	RI Lit	RIa ^b	RIp ^b	Leaf oil g/100 g ^c	Stem oil g/100 g ^c	Identification mode
1	Tricylene	927	921	1027	0.1	0.5	¹³ C-NMR ^d
2	α-Thujene	932	924	1027	2.9	0.3	¹³ C-NMR
3	α-Pinene	936	932	1027	23.1	42.5	¹³ C-NMR
4	α-Fenchene	941	943	1062	0.1	0.1	MS
5	Camphene	950	945	1071	0.2	1.6	¹³ C-NMR
6	Sabinene	973	967	1126	21.0	0.6	¹³ C-NMR
7	β-Pinene	978	972	1114	0.7	1.6	¹³ C-NMR
8	Myrcene	987	981	1163	4.4	10.2	¹³ C-NMR
9	α-Phellandrene	1002	998	1168	0.1	0.1	MS
10	δ-3-Carene	1010	1006	1151	tr	1.0	¹³ C-NMR
11	α-Terpinene	1013	1010	1183	2.7	0.2	¹³ C-NMR
12	p-Cymene	1015	1012	1273	0.3	0.1	¹³ C-NMR (F2)
13	β-Phellandrene	1023	1022	1212	0.3*	0.8*	¹³ C-NMR
14	Limonene	1025	1022	1203	1.5*	1.7*	¹³ C-NMR
15	(E)-β-Ocimene	1041	1037	1251	0.1	0.1	MS
16	γ-Terpinene	1051	1049	1248	4.4	0.3	¹³ C-NMR
17	trans-Sabinene hydrate	1053	1053	1460	0.4	tr	¹³ C-NMR (F10)
18	Terpinolene	1082	1079	1285	2.0	1.2	¹³ C-NMR
19	cis-Sabinene hydrate	1082	1083	1543	0.5	0.1	¹³ C-NMR (F10)
20	Camphre	1123	1121	1515	tr	0.3	¹³ C-NMR (F5)
21	Camphene hydrate (OH exo)	1143	1133	1592	0.2	1.1	¹³ C-NMR (F8)
22	Terpinen-4-ol	1164	1163	1599	14.4	0.8	¹³ C-NMR
23	α-Terpineol	1176	1172	1691	0.7	0.1	¹³ C-NMR
24	cis-Piperitol	1181	1180	1675	tr	0.2	¹³ C-NMR (F9)
25	trans-Piperitol	1193	1190	1740	tr	tr	¹³ C-NMR (F9)
26	Fenchyl acetate	1205	1207	1468	tr	0.1	¹³ C-NMR (F4)
27	Bornyl acetate	1270	1269	1578	0.1	0.1	¹³ C-NMR (F4)
28	α-Terpinyl acetate	1335	1332	1693	0.3	0.1	¹³ C-NMR (F4)
29	(E)-β-Caryophyllene	1421	1417	1596	0.8	0.4	¹³ C-NMR
30	Thujopsene	1434	1429	1620	tr	1.2	¹³ C-NMR
31	α-Humulene	1455	1450	1667	0.2	0.5	¹³ C-NMR (F2)
32	4-Methoxysafrole (sarisanol)	1466	1464	2174	tr*	tr	¹³ C-NMR (F4)
33	Germaacrene-D	1479	1476	1706	0.8	0.1	¹³ C-NMR
34	γ-Humulene	1483	1481	1716	tr	0.2	MS
35	Bornyl 2-methylbutyrate	1494†	1491	1719	0.2	0.2	MS
36	Bornyl isovalerate	1501†	1502	1752	tr	2.7	MS
37	δ-Cadinene	1520	1514	1755	0.2	0.3	MS
38	β-Elemol	1541	1534	2072	4.2	0.4	¹³ C-NMR
39	Caryophyllene oxide	1578	1569	1975	0.3	0.1	¹³ C-NMR (F5)
40	Cedrol	1603	1589	2111	0.1	9.0	¹³ C-NMR
41	γ-Eudesmol	1618	1617	2175	0.6	0.1	¹³ C-NMR
42	β-Eudesmol	1641	1634	2241	0.9	0.2	¹³ C-NMR

(Continued)

Table 1. (Continued)

No.	Components ^a	RI Lit	Ri ^a ^b	Rip ^b	Leaf oil g/100 g ^c	Stem oil g/100 g ^c	Identification mode
43	α -Eudesmol	1653	1640	2232	0.8	0.1	RI ¹³ C-NMR
44	Manoyl oxide	1989†	1983	2348	0.1	tr	RI ¹³ C-NMR (F4)
45	Abietatriene (dehydroabietane)	2046	2034	2487	0.2	0.2	RI ¹³ C-NMR (F3)
46	Abieta-7,13-diene	2084	2072	2451	0.6	0.4	RI ¹³ C-NMR
47	<i>iso</i> -Abienol	2106†	2085	2660	0.5	0.1	RI ¹³ C-NMR
48	<i>trans</i> -Totarol	2241	2263	nd	0.3	tr	RI ¹³ C-NMR (F5)
	Total identified				91.3	82.0	

Notes: ^aOrder of elution and percentages of individual components are given on apolar column (BP-1), except those with an asterisk (*), percentages on polar column (BP-20). ^bRi, Rip: retention indices measured on apolar and polar column, respectively; RI Lit: retention indices taken in the literature, ref. 22, unless otherwise stated; †ref. [29]. ^cThe percentage composition of the essential oils was computed by the normalization method from the GC peak areas, using nonane as internal standard and the response factors reported in the literature (18, 19). ^dIdentification by ¹³C-NMR: bold, components identified in the EO and fractions of chromatography; italic, components identified in the fractions of chromatography (fraction number indicated in parentheses). tr, trace level (<0.05%); nd, not determined.

developed and computerized in our laboratory, using home-made software, by comparison with spectral data of reference compounds compiled in a laboratory-built library (24–27). Each component, which accounted at least for 0.3–0.4% in the essential oils or fractions of chromatography, was identified by ¹³C-NMR.

3. Results and discussion

The essential oil yields of *C. tonkinensis* Silba leaves and stems were 0.16% and 0.05% (w/w), respectively. Table 1 shows the results of the qualitative and quantitative oil analyses listed in order of elution on the BP-1 column. In total, 48 compounds were identified, accounting for 91.3%, and 82.0% of the volatile constituents.

Monoterpene hydrocarbons were the main group of constituents in both oil samples (63.9–62.9%). Nevertheless, important differences in the amounts of major volatiles were found, mainly α -pinene (23.1% and 42.5%), sabinene (21.0% and 0.6%) and myrcene (4.4% and 10.2%); Beside α -pinene (23.1%) and sabinene (21.0%), terpinen-4-ol (14.4%) was the major oxygenated monoterpene of the leaf oil. In that sample, β -elemol was the unique sesquiterpene present at appreciable content (4.2%) whilst among the diterpenes abietatriene (0.6%) was the major one beside manoyl oxide, abietatriene, *iso*-abienol and *trans*-totarol (Figure 1).

In contrast, α -pinene (42.5%) was by far the major component of the stem oil sample. Myrcene was obtained with the highest amount (10.2%) in that sample while sabinene content was very low (0.6%). Cedrol was the main oxygenated sesquiterpene, reaching 9.0% (Figure 2).

The composition of the leaf oil from *C. tonkinensis* is close to that of the leaf oil from *C. torulosa* cultivated in the Argentinean Patagonia containing mostly monoterpene compounds, α -pinene (25.8%) and sabinene (22.3%) beside terpinen-4-ol (9.3%) (13). Stem oil differs by its high amount of α -pinene, myrcene and cedrol. Leaf and stem oils of *C. tonkinensis* differ also from the essential oil isolated from the foliage of *C. torulosa* var. *cashmeriana* trees cultivated in Yunnan Province, China, that exhibited two monoterpene hydrocarbons α -pinene (14.1%) and 3-carene (9.6%) as major components, beside various sesquiterpenes (14). The composition of both oils differed drastically from that of the sesquiterpene-rich cone oil isolated from plants of *C. torulosa* cultivated in a botanical garden in India (15). Indeed, in that oil sample, containing a fair amount of terpinen-4-ol (25.9%), the identified sesquiterpenes accounted for more than 50% of the whole composition: α -cubebene

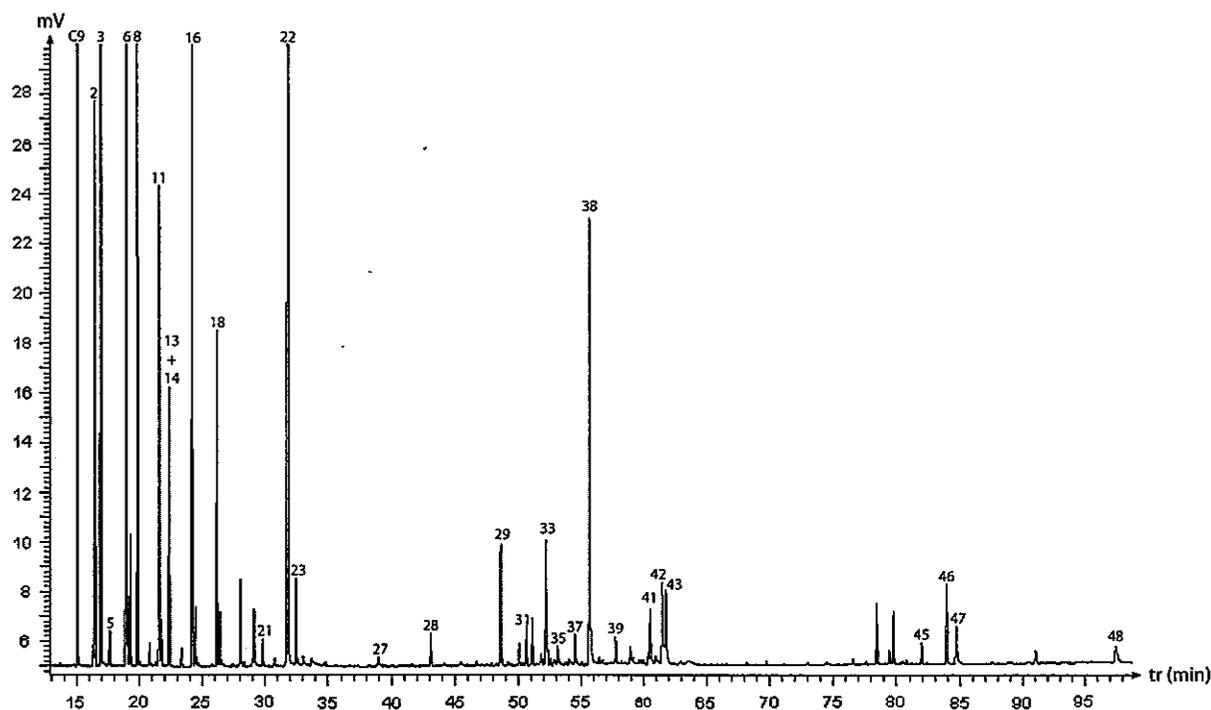


Figure 1. Gas chromatogram of the leaf essential oil of *Cupressus tonkinensis*. C9: nonane (internal standard).

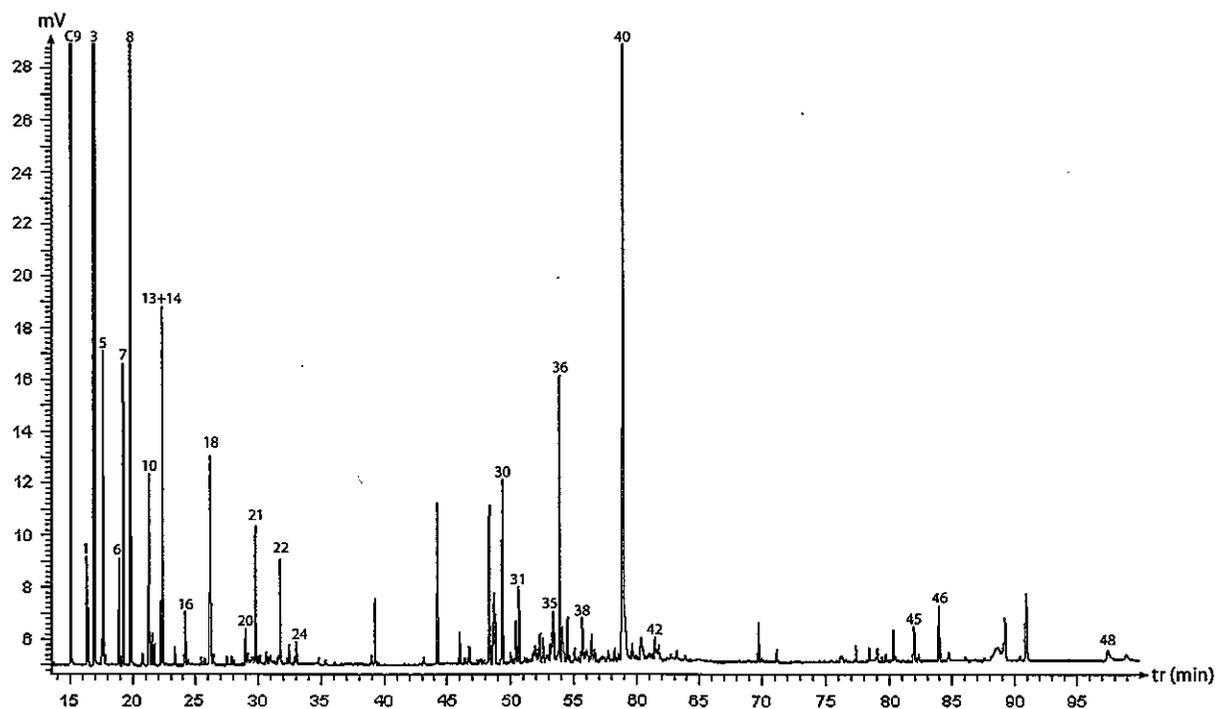


Figure 2. Gas chromatogram of the stem essential oil of *Cupressus tonkinensis*. C9: nonane (internal standard).

(10.5%),germacreneA (7.0%),caryophyllene(6.8%), β -cadinene(5.8%), calamenene (4.7%) and humulene (4.5%).

Acknowledgements

The authors thank the NAFOSTED for financial support (Project 10605.21.09) and Pr. J. Costa (CPN-Lab, University

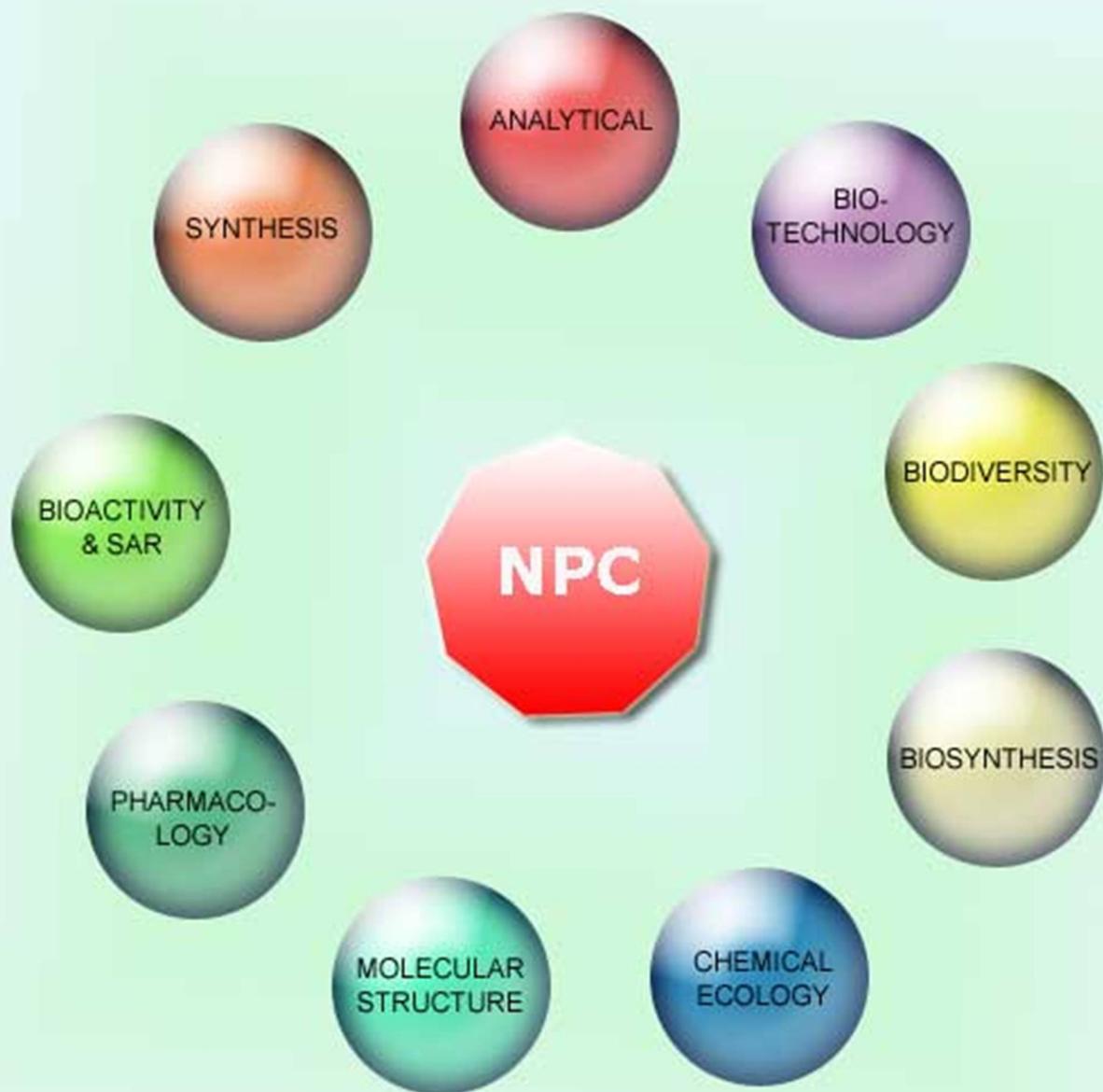
of Corsica) who placed the GC/MS equipment at our disposal.

References

1. J. Silba, *The trans-pacific relationship of Cupressus in India and North America*. J. Int. Conifer Preserv. Soc., **1**, 23 (1994).
2. D.P. Little, P. Thomas, H.T. Nguyen and L.K. Phan, *Before it had a name: Diagnostic characteristics, geographic distribution, and the conservation of Cupressus tonkinensis (Cupressaceae)*. Brittonia, **63**, 171–196 (2011).
3. K. Rushforth, R.P. Adams and M. Zhong, X.-qiang Ma and R.N. Pandey, *Variation among Cupressus species from the eastern hemisphere based on random amplified polymorphic DNAs (RAPDs)*. Biochem. Syst. Ecol., **31**, 17–24 (2003).
4. Nguyen Tien Ban. *Checklist of Plant species of Vietnam*. Agriculture Publishing House, Hanoi (2005).
5. Forest Inventory and Planning Institute. *Viet Nam Forest Trees*. Agriculture Publishing House, Hanoi (1996).
6. Nguyen Tien Hiep, Phan Ke Loc, Nguyen Duc To Luu, P.I. Thomas, A. Farjon, L. Averyanov and J. Regalado Jr., *Vietnam Conifers: Conservation Status Review 2004. Fauna & Flora International, Vietnam Program*. Lao Dong Xa Hoi Publishing House, Hanoi, (2005).
7. Ministry of Science and Technology – Vietnam Academy of Science and Technology, *Vietnam Red Data Book. Part II. Plants*. Science and Technology Publishing House, Hanoi (2007).
8. Pham Van The, Tran Huy Thai and Nguyen Tien Hiep, *Some additional data on the ecology and conservation of Cupressus tonkinensis Silba in Huu Lien Natural Reserve, Huu Lung District, Lang Son Province*. In *Proceedings of 3rd National Scientific Conference on Ecology and Biological Resources*, Hanoi, pp. 1660–1667 (2009).
9. Vo Van Chi, *The Dictionary of Medicinal Plants in Vietnam*. Health Publishing House, Hanoi (1997).
10. B.M. Lawrence, *Cypress oil*. Perfum. Flav., **20**, 34–35 (1995).
11. B.M. Lawrence, *Cypress oil*. Perfum. Flav., **26**, 65–66 (2001).
12. C. Pierre-Leandri, X. Fernandez, L. Lizzani-Cuvelier, A. M. Loiseau, R. Fellous, J. Garnero and C. Andreoli, *Chemical composition of cypress essential oils. Volatile constituents of leaf oils from seven cultivated Cupressus species*. J. Essent. Oil Res., **15**, 242–247 (2003).
13. R.A. Malizia, D.A. Cardell, J.S. Molly, S. Gonzaléz, P.E. Guerra and R.J. Grau, *Volatile constituents of leaf oils from the Cupressaceae family. Part I. Cupressus macrocarpa Hartw. C. arizonica Greene and C. torulosa Don species growing in Argentina*. J. Essent. Oil Res., **12**, 59–63 (2000).
14. L.G. Cool, Z.-L. Hu and E. Zavarin, *Foliage terpenoids of Chinese Cupressus species*. Biochem. Syst. Ecol., **26**, 899–913 (1998).
15. M. Sellappan, D. Palanisamy, N. Joghee and S. Bhojraj, *Chemical composition and antimicrobial activity of the volatile oil of the cones of Cupressus torulosa D. Don. from Nilgiris, India*. Asian J. Tradit. Med., **2**, 206–211 (2007).
16. Tran Minh Hoi, La Dinh Moi, A. Muselli, A. Bighelli and J. Casanova, *Analyse de l'huile essentielle de Cupressus funebris du Vietnam par RMN du carbone-13*. Rivista Italiana EPPOS, numéro spécial, pp. 632–637 (1997).
17. E. Duquesnoy, Nguyen Huu Dinh, V. Castola and J. Casanova, *Composition of a pyrolytic oil from Cupressus funebris Endl. of Vietnamese origin*. Flavour. Fragr. J., **21**, 453–457 (2006).
18. C. Bicchi, E. Liberto, M. Matteodo, B. Sgorbini and L. Mondello, B. d'Acampora Zellner, R. Costa and P. Rubiolo, *Quantitative analysis of essential oils: A complex task*. Flavour. Fragr. J., **23**, 382–391 (2008).
19. R. Costa, B. d'Acampora Zellner, M.L. Crupi, M.R. De Fina, M.R. Valentino, P. Dugo, G. Dugo and L. Mondello, *GC-MS, GC-O and enantio-GC investigation of the essential oil of Tarchonanthus camphoratus L.* Flavour. Fragr. J., **23**, 40–48 (2008).
20. F.W. Mc Lafferty and D.B. Stauffer, *Wiley Registry of Mass Spectral Data*, 6th edn. Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM Version 3.10d. Palisade, Newfield (1994).
21. National Institute of Standards and Technology, PC version 1.7 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database. Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT (1996).
22. W.A. König, D.H. Hochmuth and D. Joulain, *Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils, Library of MassFinder 2.1*. University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry, Hamburg (2001).
23. R.P. Adams, *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. 4th edn. Allured Publ. Corp, Carol Stream, IL (2007).
24. F. Tomi, P. Bradesi, A. Bighelli and J. Casanova, *Computer-aided identification of individual components of essential oil using carbon-13 NMR spectroscopy*. J. Magn. Reson. Anal., **1**, 25–34 (1995).
25. S. Rezzi, A. Bighelli, V. Castola and J. Casanova, *Direct identification and quantitative determination of acidic and neutral diterpenes using carbon-13 NMR spectroscopy. Application to the analysis of oleoresin of Pinus nigra*. Appl. Spectrosc., **56**, 312–317 (2002).
26. F. Tomi and J. Casanova, *¹³C-NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from Labiatae. A review*. In: *The Labiatae: Advances in Production, Biotechnology and Utilisation*. Edits., C. Cervelli, B. Ruffoni and C. Dalla Guda. Acta Hort., **723**, 185–192 (2006).
27. A. Bighelli and J. Casanova, *Analytical tools for analysing Cymbopogon oils*. In: *Essential Oil Bearing Grasses – Cymbopogons*. Edits., A. Akhila, pp. 195–221, Taylor and Francis, London (2009).
28. J. Paolini, J. Costa and A.F. Bernardini, *Analysis of the essential oil from aerial parts of Eupatorium cannabinum subsp. corsicum (L.) by gas chromatography with electron impact and chemical ionization mass spectrometry*. J. Chromatogr. A, **1076**, 170–178 (2005).
29. R.P. Adams and P.S. Beauchamp, *Vasu Dev and R.M. Bathala, The leaf essential oil of Juniperus communis L. varieties in North America and the NMR and MS data for isoabienol*. J. Essent. Oil Res., **22**, 23–28 (2010).

NATURAL PRODUCT COMMUNICATIONS

An International Journal for Communications and Reviews Covering all
Aspects of Natural Products Research



Volume 8. Issue 2. Pages 147-282. 2013
ISSN 1934-578X (printed); ISSN 1555-9475 (online)
www.naturalproduct.us

EDITOR-IN-CHIEF**DR. PAWAN K AGRAWAL**

Natural Product Inc.
7963, Anderson Park Lane,
Westerville, Ohio 43081, USA
agrawal@naturalproduct.us

EDITORS**PROFESSOR ALEJANDRO F. BARRERO**

Department of Organic Chemistry,
University of Granada,
Campus de Fuente Nueva, s/n, 18071, Granada, Spain
afbarre@ugr.es

PROFESSOR ALESSANDRA BRACA

Dipartimento di Chimica Bioorganica e Biofarmacia,
Università di Pisa,
via Bonanno 33, 56126 Pisa, Italy
braca@farm.unipi.it

PROFESSOR DEAN GUO

State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs,
School of Pharmaceutical Sciences,
Peking University,
Beijing 100083, China
gda5958@163.com

PROFESSOR YOSHIHIRO MIMAKI

School of Pharmacy,
Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences,
Horinouchi 1432-1, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan
mimakiy@ps.toyaku.ac.jp

PROFESSOR STEPHEN G. PYNE

Department of Chemistry
University of Wollongong
Wollongong, New South Wales, 2522, Australia
spyne@uow.edu.au

PROFESSOR MANFRED G. REINECKE

Department of Chemistry,
Texas Christian University,
Forts Worth, TX 76129, USA
m.reinecke@tcu.edu

PROFESSOR WILLIAM N. SETZER

Department of Chemistry
The University of Alabama in Huntsville
Huntsville, AL 35809, USA
wsetzer@chemistry.uah.edu

PROFESSOR YASUHIRO TEZUKA

Institute of Natural Medicine
Institute of Natural Medicine, University of Toyama,
2630-Sugitani, Toyama 930-0194, Japan
tezuka@inm.u-toyama.ac.jp

PROFESSOR DAVID E. THURSTON

Department of Pharmaceutical and Biological Chemistry,
The School of Pharmacy,
University of London, 29-39 Brunswick Square,
London WC1N 1AX, UK
david.thurston@pharmacy.ac.uk

HONORARY EDITOR**PROFESSOR GERALD BLUNDEN**

The School of Pharmacy & Biomedical Sciences,
University of Portsmouth,
Portsmouth, PO1 2DT U.K.
axuf64@dsl.pipex.com

ADVISORY BOARD

Prof. Berhanu M. Abegaz
Gaborone, Botswana

Prof. Viqar Uddin Ahmad
Karachi, Pakistan

Prof. Øyvind M. Andersen
Bergen, Norway

Prof. Giovanni Appendino
Novara, Italy

Prof. Yoshinori Asakawa
Tokushima, Japan

Prof. Lee Banting
Portsmouth, U.K.

Prof. Julie Banerji
Kolkata, India

Prof. Anna R. Bilia
Florence, Italy

Prof. Maurizio Bruno
Palermo, Italy

Prof. César A. N. Catalán
Tucumán, Argentina

Prof. Josep Coll
Barcelona, Spain

Prof. Geoffrey Cordell
Chicago, IL, USA

Prof. Ana Cristina Figueiredo
Lisbon, Portugal

Prof. Cristina Gracia-Viguera
Murcia, Spain

Prof. Duvvuru Gunasekar
Tirupati, India

Prof. Kurt Hostettmann
Lausanne, Switzerland

Prof. Martin A. Iglesias Arteaga
Mexico, D. F., Mexico

Prof. Leopold Jirovetz
Vienna, Austria

Prof. Vladimir I Kalinin
Vladivostok, Russia

Prof. Niel A. Koorbanally
Durban, South Africa

Prof. Karsten Krohn
Paderborn, Germany

Prof. Chiaki Kuroda
Tokyo, Japan

Prof. Hartmut Laatsch
Gottingen, Germany

Prof. Marie Lacaille-Dubois
Dijon, France

Prof. Shoei-Sheng Lee
Taipei, Taiwan

Prof. Francisco Macias
Cadiz, Spain

Prof. Imre Mathe
Szeged, Hungary

Prof. Ermino Murano
Trieste, Italy

Prof. M. Soledade C. Pedras
Saskatoon, Canada

Prof. Luc Pieters
Antwerp, Belgium

Prof. Peter Proksch
Düsseldorf, Germany

Prof. Phila Raharivelomanana
Tahiti, French Polynesia

Prof. Luca Rastrelli
Fisciano, Italy

Prof. Monique Simmonds
Richmond, UK

Dr. Bikram Singh
Palampur, India

Prof. John L. Sorensen
Manitoba, Canada

Prof. Valentin Stonik
Vladivostok, Russia

Prof. Winston F. Tinto
Barbados, West Indies

Prof. Sylvia Urban
Melbourne, Australia

Prof. Karen Valant-Vetschera
Vienna, Austria

INFORMATION FOR AUTHORS

Full details of how to submit a manuscript for publication in Natural Product Communications are given in Information for Authors on our Web site <http://www.naturalproduct.us>.

Authors may reproduce/republish portions of their published contribution without seeking permission from NPC, provided that any such republication is accompanied by an acknowledgment (original citation)-Reproduced by permission of Natural Product Communications. Any unauthorized reproduction, transmission or storage may result in either civil or criminal liability.

The publication of each of the articles contained herein is protected by copyright. Except as allowed under national "fair use" laws, copying is not permitted by any means or for any purpose, such as for distribution to any third party (whether by sale, loan, gift, or otherwise); as agent (express or implied) of any third party; for purposes of advertising or promotion; or to create collective or derivative works. Such permission requests, or other inquiries, should be addressed to the Natural Product Inc. (NPI). A photocopy license is available from the NPI for institutional subscribers that need to make multiple copies of single articles for internal study or research purposes.

To Subscribe: Natural Product Communications is a journal published monthly. 2013 subscription price: US\$2,395 (Print, ISSN# 1934-578X); US\$2,395 (Web edition, ISSN# 1555-9475); US\$2,795 (Print + single site online); US\$595 (Personal online). Orders should be addressed to Subscription Department, Natural Product Communications, Natural Product Inc., 7963 Anderson Park Lane, Westerville, Ohio 43081, USA. Subscriptions are renewed on an annual basis. Claims for nonreceipt of issues will be honored if made within three months of publication of the issue. All issues are dispatched by airmail throughout the world, excluding the USA and Canada.

Chemical Composition of the Essential Oils from Two Vietnamese *Asarum* Species: *A. glabrum* and *A. cordifolium*

Tran Huy Thai^a, Ophélie Bazzali^b, Tran Minh Hoi^a, Nguyen Anh Tuan^c, Félix Tomi^b, Joseph Casanova^b and Ange Bighelli^{b,*}

^aInstitute of Ecology and Biological Resources, Hanoi, Vietnam

^bUniversité de Corse-CNRS, UMR 6134 SPE, Équipe Chimie et Biomasse, Route des Sanguinaires, 20000 Ajaccio, France

^cVietnamese Journal of Biology, Hanoi, Vietnam

ange.bighelli@univ-corse.fr

Received: October 23rd, 2012; Accepted: December 4th, 2012

The essential oil isolated from *Asarum cordifolium* C. E. C. Fischer recently discovered in Vietnam, and *A. glabrum* Merr., an endangered species listed as vulnerable in the Red Data Book of Vietnam, have been analyzed by a combination of chromatographic and spectroscopic techniques including ¹³C NMR spectroscopy. The composition of *A. cordifolium* essential oil, investigated for the first time, was dominated by elemicin (82.5%). The essential oil isolated from *A. glabrum* contained safrole (41.9%) as its major component and was characterized by the diversity of phenylpropanoids contained in this oil (10 compounds).

Keywords: *Asarum cordifolium*, *A. glabrum*, Elemicin, Safrole, Chemical composition, ¹³C NMR, Vietnam.

The genus *Asarum* L. (Aristolochiaceae) comprises about 90 species, mainly distributed in Europe, East Asia and North America. Various species produce essential oil whose composition has been investigated. Most reported essential oils contained phenylpropanoids as major components and these compounds have been suggested as being responsible for the reported biological activity. For instance, the composition of the essential oil from *A. canadense* L., investigated as early as 1902, contained methyleugenol as its major component (36.9%), which was identified by chemical means [1]. A detailed analysis of this oil was recently provided by Bélanger *et al.* [2], who identified various elemicin and *iso*-elemicin derivatives. The rhizome oil contained 53.6% of methyleugenol and 2.2% of asaricin, while the root oil contained (*E*)-*iso*-elemicin (20.0%) and elemicin (4.9%) [2]. Methylisoeugenol (33.3%) and α -asarone (19.2%) were the main constituents of the leaf oil from *A. forbesii* Maxim, while α -asarone (58.8%) and methyleugenol (10.3%) were the major components of the root oil [3]. The composition of *A. heterotropoides* root oil was subject to seasonal variation; methyleugenol (21%-39%) and safrole (17%-33%) were the major components [4]. Methyleugenol (59.4%) was also the major component of *A. heterotropoides* var. *mandshuricum* oil, accompanied by elemicin (5.7%), and two monoterpenes, eucarvone (24.1%), and 3-carene (4.9%) [5]. (*E*)-Asarone (59.1%) was by far the major component of *A. europaeum* root oil, accompanied by bornyl acetate (7.5%) [6]. In contrast, various monoterpenes have been reported as the main volatile compounds of *A. insigne*: camphene (13.5%), α -pinene (12.4%), β -pinene (11.1%) and borneol (8.1%), while three phenylpropanoids were present in moderate amounts: elemicin (5.4%), safrole (3.1%), and myristicin (2.9%) [7]. Similarly, essential oils isolated from aerial parts (fresh/air dried) of *A. caulescens* were dominated by monoterpenes: β -pinene (7.6%/20.7%), 2-carene (8.9%/8.0%), α -phellandrene (7.8%/14.4%), 1,8-cineole (8.9%/13.3%) and germacrene (46.6%/6.6%) [8].

Various *Asarum* species are known as “wild gingers”, such as *A. asperum* (syn. *Heterotropa aspera*): Japanese wild ginger; *A. canadense*, Canadian wild ginger; *A. europaeum*, European Wild Ginger, *A. delavayi*, Chinese wild ginger; and *A. epigynum*, Taiwanese wild ginger. In Vietnam, seven *Asarum* species have been indexed, among them, *A. cordifolium* C. E. C. Fischer and *A. glabrum* Merr.

Asarum cordifolium grows wild in dense forest of moist valleys of India and China (altitude 1.500-1.600 m). Morphologically, the species shares some floral aspects with the section *Asarum*: connate styles, inferior ovary, and free sepals. However, unlike most species of section *Asarum*, the species has foliage leaves alternate to each other. Phylogenetic analyses indicate that *A. cordifolium* is closely related to *A. caudigerum* and *A. cardiophyllum* [9]. *A. cordifolium* has been discovered very recently in Vietnam (Sa Pa, Lao Cai province), and its botanical parameters have been reported [10]. In traditional medicine, a decoction of leaves and roots is used against dyspepsia and abdominal pain.

Asarum glabrum Merr., a perennial herb, 20-30 cm high, growing wild in wet soil, is distributed in high mountainous regions of Vietnam, at altitudes over 1.000 m (Hà Giang and Vinh Phuc provinces). This species is listed as vulnerable in the Red Data Book of Vietnam and in the Governmental Decree 32/2006/NĐ/CP. In Vietnamese traditional medicine, the decoction of leaves and roots is also used against dyspepsia and abdominal pain and is considered as a tonic.

In continuation of our on-going work on the characterization of aromatic plants from Vietnam, we became interested in these two *Asarum* species growing wild in Vietnam, and report here the composition of their essential oils.

The essential oil composition of *A. cordifolium* is reported for the first time. Water distillation of the air-dried plant (leaves, stems,

Table 1: Components of *Asarum glabrum* and *A. cordifolium* essential oils.

Components [#]	RI ^a	RI ^b	A.c. %	A.g. %	Identification		
1 α -Thujene	924	1028	Tr	1.2	GC(RI)	MS	NMR
2 α -Pinene	932	1026	0.7	0.4	GC(RI)	MS	NMR
3 Camphene	945	1071	0.3	0.2	GC(RI)	MS	NMR
4 Sabinene	966	1124	Tr	0.1	GC(RI)	MS	
5 β -Pinene	972	1114	0.4	1.0	GC(RI)	MS	NMR
6 Myrcene	981	1162	0.1	0.3	GC(RI)	MS	
7 α -Phellandrene	998	1168	0.4	Tr	GC(RI)	MS	NMR
8 δ -3-Carene	1008	1152	0.6	-	GC(RI)	MS	NMR
9 α -Terpinene	1010	1183	-	0.3	GC(RI)	MS	
10 <i>p</i> -Cymene	1013	1273	1.3	0.8	GC(RI)	MS	NMR
11 Limonene *	1022	1203	0.3*	0.3*	GC(RI)	MS	
12 1,8-Cineole *	1022	1211	-	0.3*	GC(RI)	MS	
13 β -Phellandrene*	1022	1212	0.3*	-	GC(RI)	MS	
14 (<i>Z</i>)- β -Ocimene	1026	1234	0.5	0.2	GC(RI)	MS	NMR
15 (<i>E</i>)- β -Ocimene	1037	1251	0.3	0.1	GC(RI)	MS	
16 γ -Terpinene	1049	1247	Tr	0.9	GC(RI)	MS	NMR
17 <i>trans</i> -Sabinene hydrate	1053	1460	-	0.4	GC(RI)	MS	NMR
18 Terpinolene	1079	1285	-	0.1	GC(RI)	MS	
19 Linalool	1083	1543	0.2	0.9	GC(RI)	MS	NMR
20 Borneol	1150	1696	-	0.4	GC(RI)	MS	NMR
21 Terpinen-4-ol	1162	1598	Tr	1.1	GC(RI)	MS	NMR
22 α -Terpineol	1172	1691	Tr	0.6	GC(RI)	MS	NMR
23 Safrole	1265	1873	-	41.9	GC(RI)	MS	NMR
24 Eugenol	1328	2175	-	0.2	GC(RI)	MS	
25 α -Terpinyl acetate	1332	1693	-	1.4	GC(RI)	MS	NMR
26 Methyleugenol	1370	2008	6.2	6.9	GC(RI)	MS	NMR
27 β -Elemene	1388	1593	0.3	0.1	GC(RI)	MS	
28 4-Methoxysafrole (sarisian)	1463	2211	-	3.2	GC(RI)		NMR
29 α -Curcumene	1470	1771	-	0.2	GC(RI)	MS	
30 γ -Curcumene	1472	1689	-	0.1	GC(RI)	MS	
31 β -Selinene	1483	1717	0.7	-	GC(RI)	MS	NMR
32 Myristicin	1487	2280	-	4.3	GC(RI)	MS	NMR
33 Sesquicineole	1503	1740	-	2.6	GC(RI)	MS	NMR
34 Elemicin	1516	2242	82.5	1.6	GC(RI)	MS	NMR
35 (<i>E</i>)- α -Bisabolene	1534	1772	0.5	-	GC(RI)	MS	NMR
36 γ -Asarone	1536	2277	-	4.7	GC(RI)	MS	NMR
37 Dill-apiol	1590	2360	-	3.0	GC(RI)	MS	NMR
38 (<i>E</i>)- <i>iso</i> -Elemicin	1612	2392	0.9	-	GC(RI)	MS	NMR
39 (<i>E</i>)-Asarone	1639	2452	-	5.3	GC(RI)		NMR
40 Apiol parsley	1645	2476	-	8.2	GC(RI)	MS	NMR
41 α -Bisabolol	1666	2229	-	0.4	GC(RI)	MS	NMR
Total			96.5	93.7			

[#] Order of elution and percentages of individual components are given based on the apolar BP-1 capillary column, except for those with an asterisk (% on polar BP-20 column). RI^a and RI^b = Retention indices measured on apolar and polar columns, respectively; A.c. = *Asarum cordifolium*; A.g. = *Asarum glabrum*; Tr = trace level (<0.05%). The order of elution of individual components on BP-1 and HP-MS 5% capillary columns was identical except for β -elemene and methyleugenol. Limonene and 1,8-cineole on the one hand, limonene and β -phellandrene on the other hand were separated on the HP-MS 5% capillary column.

flowers and roots) yielded a colorless (pale yellow) oil in 0.22% yield (w/w, based on dry material). The essential oil was analyzed by GC (FID), GC (RI), GC-MS and ¹³C NMR spectroscopy. The 23 identified components represented 96.5% of the whole composition (Table 1), which was dominated by phenylpropanoids that accounted for nearly 90% of the total. Elemicin was by far the major component (82.5%), followed by methyleugenol (6.2%). The isomer (*E*)-*iso*-elemicin was also detected in the oil, where it accounted only for 0.9%. Various monoterpene hydrocarbons (trace-1.3% each) were detected, as well as a few oxygenated monoterpenes (at trace level or very low content). Finally, three sesquiterpene hydrocarbons were identified by MS and the identification of two of them confirmed by ¹³C NMR spectroscopy.

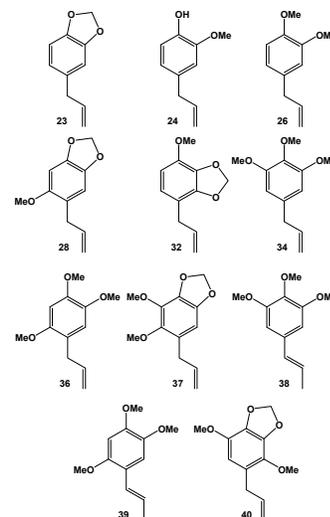


Figure 1: Structure of phenylpropanoids found in *Asarum cordifolium* and *A. glabrum* essential oils: 23 = safrole, 24 = eugenol, 26 = methyleugenol, 28 = 4-methoxysafrole = sarisian, 32 = myristicin, 34 = elemicin, 36 = γ -asarone, 37 = dill-apiol, 38 = (*E*)-*iso*-elemicin, 39 = α -asarone = (*E*)-asarone, 40 = apiol parsley.

The essential oil from *Asarum glabrum*, obtained by water-distillation of the whole plant (leaves, stems, flowers and roots), was obtained in a yield of 0.12% (w/w, based on dry material). The 36 identified constituents accounted for 93.7% of the whole composition (Table 1). Phenylpropanoids were the major components, with safrole (41.9%) being the major one. Our sample contained other phenylpropanoids in appreciable contents, as well as various sesquiterpenes. Beside safrole, the phenylpropanoids were represented by apiol parsley (8.2%), methyleugenol (6.9%), (*E*)-asarone (5.3%), γ -asarone (4.7%), myristicin (4.3%), 4-methoxysafrole (3.2%), dill-apiol (3.0%), elemicin (1.6%) and eugenol (0.2%). Various monoterpene hydrocarbons (trace-1.2%) and oxygenated monoterpenes (0.3-1.4%) were detected. Those with a percentage equal to or higher than 1% were: α -thujene, β -pinene, terpinen-4-ol and α -terpinyl acetate. Sesquiterpene hydrocarbons were present only at low level. In contrast, sesquicineole, a rare oxygenated sesquiterpene, suggested by MS and unambiguously identified by ¹³C NMR spectroscopy, accounted for 2.6% of the composition. Similarly, although the structure of α -bisabolol (0.4%) has been suggested by MS, the correct relative stereochemistry of the two asymmetric carbons could only be ascertained by NMR. Indeed, α -bisabolol and α -epi-bisabolol exhibit similar mass spectra, and their retention indices differ only by 2-3 points on both apolar and polar columns. In contrast, the ¹³C NMR spectra of both diastereoisomers are well differentiated. It could be pointed out that the oil sample under investigation presented a high diversity of phenylpropanoids (10 compounds identified). In comparison, the sample previously investigated by GC-MS in a preliminary work contained safrole (42.2%), apiol (27.1%, isomer not specified) and myristicin (6.1%) as major components [11].

Elemicin, the major component (82.5%) of *A. cordifolium* essential oil, has been reported as a component of the essential oil of other *Asarum* species, but in moderate content: *A. canadense* root oil (4.9%) and rhizome oil (1.6 %) [2]; *A. heterotropoides* var. *mandshuricum* oil (5.7%) [5]; *A. insigne* (5.4%) [7]. Safrole, the main component of *A. glabrum* essential oil, was also found in various *Asarum* species oils at appreciable and low contents: *A. heterotropoides* root oil (17%-33%) [4] and *A. insigne* (3.1%) [7].

Among the minor components, methyleugenol (6.2% in *A. cordifolium* oil and 6.9% in *A. glabrum* oil) has been reported as the major component (59.4%) of *A. heterotropoides* var. *mandshuricum* oil [5], and of the rhizome oil from *A. canadense* (53.8%) [2] and *A. heterotropoides* (21%-39%) [4].

(*E*)-Asarone (5.3% in *A. glabrum* oil) was by far the major component of *A. forbesii* and *A. europaeum* root oils (58.8% and 59.1%, respectively) and was present in appreciable amount (19.2%) in *A. forbesii* leaf oil [3,6]. (*E*)-*iso*-elemicin (0.9% in *A. cordifolium* oil) has been found in *A. canadense* rhizome oil (20%) [2]. In contrast, it seems that various phenylpropanoids contained in *A. glabrum* oil (apiol parsley, dill-apiol, γ -asarone, myristicin, 4-methoxysafrole, 3.0% - 8.3% each) have not been mentioned as components (at least in appreciable amounts) of other *Asarum* oils.

A. cordifolium essential oil may be considered as a source of elemicin (82.5%). This compound, not commercially available, was reported as the main component of various essential oils: *Artemisia dracuncululus* L. of Cuban origin (53.0%; beside methyleugenol, 17.6%) [12]; *Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steud) Wats., growing wild in northeast India (53.0%) [13]; *Thapsia garganica* L., collected in Italy (54–73%) [14]; *Anemopsis californica* (Nutt.) Hook. and Arn. (52.3%) [15], and *Tornabenea insularis* fruit oil from Cape Verde Islands (82-90%) [16]. Elemicin has been considered as responsible for the antibacterial and antifungal activities of some essential oils. Indeed, the essential oil from *Daucus carota* L. spp. *carota* containing elemicin (16.3%) was active against various *Campylobacter* strains (*C. jejuni*, *C. coli*, and *C. lari*) causing gastroenteritis. For instance, a sub-fraction containing almost pure elemicin (98%) inhibited the growth of *C. jejuni* (reference strain NCTC 11168, MIC = 250 μ g/mL). Therefore, elemicin appeared to be a potential treatment for *Campylobacter* infections [17]. The essential oil of *Daucus carota* subsp. *halophilus* (ripe umbels) that contained elemicin in appreciable amount (26.0%) exhibited fair antifungal activity (MIC values ranging from 0.16 to 0.32 μ L/mL). Dermatophyte strains showed more sensitivity to this oil than yeasts and other filamentous fungi. Moreover, the oil showed no cytotoxic effect at concentrations ranging from 0.16 to 0.64 μ L/mL for as long as 24 h [18]. However, the genotoxic potential of elemicin was uncertain [19].

In contrast, the essential oil from *A. glabrum* that contained 41.9% of safrole should be used with care. Indeed, safrole was once widely used as a food additive, but was banned by the Food and Drug Administration (FDA) after its carcinogenicity in rats was discovered. It is considered by the European Commission on Health and Consumer Protection to be genotoxic and carcinogenic. Today, safrole is also banned for use in soap and perfumes by the International Fragrance Association. Otherwise, this compound is in Category I precursors under regulation No 273/2004 of the European Community, as well as in the List I chemicals of the United States (precursor in the manufacture of the drug MDMA). However, safrole is also a precursor in the synthesis of the insecticide synergist piperonyl butoxide and of pesticides, as well as of other chemicals. The main natural sources for safrole are essential oils from *Sassafras albidum*, *Ocotea pretiosa* and *Cinnamomum parthenoxylon*. We also reported that the Vietnamese *Talauma gioi* Aug. Chev. (Magnoliaceae) produces a safrole-rich essential oil (84.5%) [20], as does the Brazilian *Piper xylosteoides* (Kunth) Steudel (84.1%) [21].

In conclusion, we report here, for the first time, the composition of the essential oil isolated from *A. cordifolium*, a plant very recently

discovered in Vietnam, that produced an elemicin-rich oil. A detailed analysis of *A. glabrum* essential oil is also given, demonstrating the diversity of phenylpropanoids contained in this oil (10 compounds).

Experimental

Plant material: *A. cordifolium* and *A. glabrum* were harvested in October 2011 in Sa Pa (Lao Cai province, Vietnam) and in June 2011 in Quan Ba (Ha Giang province, Vietnam), respectively. The whole plant (leaves, stems, flowers and roots) was used for hydrodistillation (3 h) using a Clevenger-type apparatus.

GC(FID) analysis: GC analyses were carried out with a Clarus 500 Perkin-Elmer Autosystem chromatograph equipped with 2 flame ionisation detectors (FID), and fused capillary columns (50 m x 0.22 mm i.d., film thickness 0.25 μ m), BP-1 (polymethylsiloxane) and BP-20 (polyethylene glycol). Carrier gas was helium at a flow of 0.8 mL/min. The oven temperature was programmed from 60°C to 220°C at 2°C/min and then held isothermal (20 min). Injector temperature: 250°C (injection mode: split 1/60); detector temperature: 250°C.

GC-MS analysis: GC/MS analyses were carried out using an Agilent Technology 7890A detector (quadrupole), directly coupled to a Agilent Technology 5975C, equipped with a fused-silica capillary column (30 m x 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 μ m), HP-MS 5% phenylmethylsiloxane. Carrier gas, helium at 1 mL/min; split, 1:80; injection volume, 0.2 μ L. The injection port was set at 250°C; the oven temperature was programmed from 60°C to 250°C at 4°C/min (52.5 min). Significant quadrupole MS operating parameters: Ion source temperature, 150°C; electron impact ionization at 70 eV with scan mass range of 33-350 *m/z*.

¹³C NMR analysis: ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 Fourier Transform spectrometer operating at 100.623 MHz for ¹³C, equipped with a 5 mm probe, in deuterated chloroform (CDCl₃), with all shifts referred to internal tetramethylsilane (TMS). ¹³C-NMR spectra were recorded with the following parameters: pulse width (PW), 5 μ s (flip angle 45°); acquisition time, 2.7 s for 128 K data table with a spectral width (SW) of 25000 Hz (250 ppm); digital resolution 0.183 Hz/pt. The number of accumulated scans was 3 000 for each sample (about 50 mg of essential oil in 0.5 mL of CDCl₃).

Component identification: Identification of the individual components was based: (i) on comparison of their GC retention indices (RI) on apolar and polar columns, determined relative to the retention times of a C₆-C₃₀ *n*-alkane series with linear interpolation [22a] ('Target Compounds' software of Perkin-Elmer), with those of authentic compounds compiled in our laboratory-built library, except (*E*)-*iso*-elemicin, RIs compared with literature data [22b] and (ii) by computer search using digital libraries of mass spectral data [22c,d] and comparison with published data [22e,f], and (iii) by ¹³C NMR spectroscopy, following the methodology developed and computerized in our laboratory, using home-made software, by comparison with spectral data of reference compounds compiled in a laboratory-built library [22g-i]. Each component which accounted for at least 0.3-0.4% in the EOs was identified by ¹³C NMR spectroscopy.

Acknowledgments - The authors are indebted to Dr P. Paquet (Corsica Essences) for his help in GC-MS analyses. Dr Tran Huy Thai thanks the NAFOSTED for financial support (Project 106.05.21.09).

References

- [1] Gower FB, Lees JH. (1902) The constituents of the essential oil of *Asarum canadense*. *Journal of the Chemical Society of London*, **81**, 59-73.
- [2] Bélanger A, Collin G, Garneau FX, Gagnon H, Pichette A. (2010) Aromas from Quebec. II. Composition of the essential oil of the rhizomes and roots of *Asarum canadense* L. *Journal of Essential Oil Research*, **22**, 164-169.
- [3] Zhang F, Xu Q, Fu S, Ma X, Xiao H, Liang X. (2005) Chemical constituents of the essential oil of *Asarum forbesii* Maxim (Aristolochiaceae). *Flavour and Fragrance Journal*, **20**, 318-320.
- [4] Wang D, Wang X, Xia X. (1997) Analysis of season variation of methyleugenol and safrole in *Asarum heterotropoides* by gas chromatography. *Chinese Journal of Chromatography*, **15**, 85-86.
- [5] Dan Y, Liu HY, Gao WW, Chen SL. (2010) Activities of essential oils from *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* against five phytopathogens. *Crop Protection*, **29**, 295-299.
- [6] Wilczewska AZ, Ulman M, Chilmończyk Z, Maj J, Koprowicz T, Tomczyk M, Tomczykowa M. (2008) Comparison of volatile constituents of *Acorus calamus* and *Asarum europaeum* obtained by different techniques. *Journal of Essential Oil Research*, **20**, 390-395.
- [7] Qu WY, Tan ZW, Yu AN, Quan JP. (2010) Analysis of the chemical constituents of volatile oil from *Asarum insigne* by GC-MS. *Zhong Yao Cai*, **33**, 1095-1098.
- [8] Zhu S, Yang Y, Yu H, Ying Y, Long D, Zou G. (2006) Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Asarum caulescense*. *Wuhan University Journal of Natural Sciences*, **11**, 699-703.
- [9] Sugawara T, Fujii N, Senni K, Murata J. (2005) Morphological and karyological characteristics and phylogenetic relationship of *Asarum cordifolium* C. E. C. Fisch. (Aristolochiaceae) occurring in Myanmar. *Acta Phytotaxonomica Geobotanica*, **56**, 247-255.
- [10] Nguyen Anh Tuan, Tran Huy Thai, Jenn-Che Wang, Chang-Tse Lu. (2012) A new record of species *Asarum cordifolium* C. E. C. Fischer (Aristolochiaceae) for the flora of Vietnam. *Vietnam Journal of Biology*, **34**, 197-200.
- [11] Tran Huy Thai, Nguyen Thi Hien, Do Thi Minh, Nguyen Anh Tuan. (2010) Chemical composition of the essential oil of *Asarum glabrum* Merr. in Ha Giang province, Vietnam. *Vietnam Journal of Biology*, **32**, 94-96.
- [12] Pino JA, Rosado A, Correa MT, Fuentes V. (1996) Chemical composition of the essential oil of *Artemisia dracuncululus* L. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*, **8**, 563-564.
- [13] Sarma KK, Nath SC, Leclercq PA. (1999) The essential oil of a variant of *Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steud) Wats. from northeast India. *Journal of Essential Oil Research*, **11**, 381-385.
- [14] Avato P, Rosito I. (2002) Essential oils from the roots of *Thapsia garganica* L. *Journal of Essential Oil Research*, **14**, 20-22.
- [15] Medina-Holguin AL, Holguin FO, Micheletto S, Goehle S, Simon J, O'Connell MA. (2008) Chemotypic variation of essential oils in the medicinal plant, *Anemopsis californica*. *Phytochemistry*, **69**, 919-927.
- [16] Grosser C, Teixeira G, Gomes I, Martins ES, Barroso JG, Pedro LG, Figueiredo AC. (2009). Assessment of the essential oil composition of *Tornabenea annua*, *Tornabenea insularis* and *Tornabenea tenuissima* fruits from Cape Verde Islands. *Biochemical Systematics and Ecology*, **37**, 474-478.
- [17] Rossi PG, Bao L, Luciani A, Panighi J, Desjobert JM, Costa J, Casanova J, Bolla JM, Berti L. (2007) (*E*)-Methylisoeugenol and elemicin: antibacterial components of *Daucus carota* L. essential oil against *Campylobacter jejuni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 7332-7336.
- [18] Tavares AC, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Cruz MT, Lopes MC, Canhoto J, Ribeiro Salgueiro L. (2008) Essential oil of *Daucus carota* subsp. *halophilus*: composition, antifungal activity and cytotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology*, **119**, 129-134.
- [19] De Vincenzi M, De Vincenzi A, Silano M. (2004) Constituents of aromatic plants: elemicin. *Fitoterapia*, **75**, 615-618.
- [20] Tran Minh Hoi, Ninh Khac Ban, Luu Dùm Cu, La Dinh Moi, Nguyen Thi Phuong Thao, Tran Huy Thai, Muselli A, Bighelli A, Casanova J. (2007) Aromatic plants from Vietnam, sources of natural products for industry. *Vietnam Journal of Biology*, **29**, 52-60.
- [21] Dognini J, Meneghetti EK, Teske MN, Beghini IM, Rebelo RA, Dalmarco EM, Verdi M, de Gaspar AL. (2012) Antibacterial activity of high safrole containing essential oils from *Piper xylosteoides* (Kunth) Steudel. *Journal of Essential Oil Research*, **24**, 241-244.
- [22] (a) Van Den Dool H, Kratz PD. (1963) A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, **11**, 463-471; (b) Nazaruk J, Kalembe D. (2009) Chemical composition of the essential oils from the roots of *Erigeron acris* L. and *Erigeron annuus* (L.) Pers. *Molecules*, **14**, 2458-2465; (c) US National Institute of Standards and Technology PC Version 1.7 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library, Norwalk, CT (1999); (d) König WA, Hochmuth DH, Joulain D. (2001) Terpenoids and related constituents of essential oils, library of Massfinder 2.1. University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry, Hamburg; (e) Joulain D, König WA. (1998) *The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons*. E B-Verlag, Hamburg; (f) Adams RP. (2007) *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA; (g) Rezzi S, Bighelli A, Castola V, Casanova J. (2002) Direct identification and quantitative determination of acidic and neutral diterpenes using ¹³C NMR spectroscopy. Application to the analysis of oleoresin of *Pinus nigra*. *Applied Spectroscopy*, **56**, 312-317; (h) Tomi F, Casanova J. (2006) ¹³C-NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from *Labiatae*. A review. In *The Labiatae: Advances in Production, Biotechnology and Utilisation*, *Acta Horticulturae* Vol. **723**, Cervelli C, Ruffoni B, Dalla Guda C. (Eds). 185-192; (i) Bighelli A, Casanova J. (2010) *Analytical methods for Cymbopogon oils in essential oil-bearing grasses. The genus Cymbopogon*. Akhila A. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Essential Oil of Flowers of <i>Anaphalis contorta</i>, an Aromatic and Medicinal Plant from India Rajesh K. Joshi	225
Composition of Essential Oils from Seeds of <i>Abies koreana</i> Anna Wajs-Bonikowska, Karol Olejnik, Radosław Bonikowski and Piotr Banaszczak	227
Chemical Composition of <i>Hypericum richeri</i> subsp. <i>grisebachii</i> Essential Oil from Croatia Igor Jerković, Maja Marasović, Zvonimir Marijanović, Kroata Hazler Pilepić, Željko Maleš and Mladen Miloš	231
Chemical Composition of the Essential Oils from Two Vietnamese <i>Asarum</i> Species: <i>A. glabrum</i> and <i>A. cordifolium</i> Tran Huy Thai, Ophélie Bazzali, Tran Minh Hoi, Nguyen Anh Tuan, Félix Tomi, Joseph Casanova and Ange Bighelli	235
Essential Oils from Five Species of Annonaceae from Vietnam Tran D. Thang, Do N. Dai, Tran M. Hoi and Isiaka A. Ogunwande	239
Essential Oils from the Leaves of Six Medicinal Plants of Nigeria Isiaka A. Ogunwande, Nudewhenu O. Avoseh, Guido Flamini, Alimot-Sadiat O. Hassan, AbdulRazaq O. Ogunmoye, Akindele O. Ogunsanwo, Kamorudeen O. Yusuf, <i>Auonwu</i> O. Kelechi, Zainab A. Tihamiyu and Godgift O. Tabowei	243
Comparative Study on <i>In Vitro</i> Activities of Citral, Limonene and Essential Oils from <i>Lippia citriodora</i> and <i>L. alba</i> on Yellow Fever Virus Luz Angela Gómez, Elena Stashenko and Raquel Elvira Ocazonez	249
TLC-Bioautographic Evaluation of <i>In Vitro</i> Anti-tyrosinase and Anti-cholinesterase Potentials of Sandalwood Oil Biswapriya B. Misra and Satyahari Dey	253
Composition, Mosquito Larvicidal, Biting Deterrent and Antifungal Activity of Essential Oils of Different Plant Parts of <i>Cupressus arizonica</i> var. <i>glabra</i> ('Carolina Sapphire') Abbas Ali, Nurhayat Tabanca, Betül Demirci, K. Husnu Can Baser, Jane Ellis, Sandra Gray, Brett R. Lackey, Christine Murphy, Ikhlas A. Khan and David E. Wedge	257
Composition of <i>Cassia fistula</i> Oil and its Antifungal Activity by Disrupting Ergosterol Biosynthesis Md. Irshad, Aijaz Ahmad, Md. Zafaryab, Farah Ahmad, Nikhat Manzoor, Man Singh and M. Moshahid A. Rizvi	261
Chemical Composition and Biological Activity of the Essential Oil of <i>Amomum biflorum</i> Chakkrapat Singtothong, Michel J. Gagnon and Jean Legault	265
Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from <i>Myrcia alagoensis</i> (Myrtaceae) Aline do N. Silva, Ana Paula T. Uetanabaro and Angélica M. Lucchese	269
Composition, <i>in-vitro</i> Anticancer, and Antimicrobial Activities of the Leaf Essential Oil of <i>Machilus mushaensis</i> from Taiwan Yu-Chang Su, and Chen-Lung Ho	273
Chemical Constituents and Cytotoxic Evaluation of Essential Oils from Leaves of <i>Porcelia macrocarpa</i> (Annonaceae) Erica Biolcati P. da Silva, Alisson L. Matsuo, Carlos R. Figueiredo, Mariana H. Chaves, Patricia Sartorelli and João Henrique G. Lago	277
<u>Book Review</u>	
Medicinal Plants of China, Korea, and Japan: Bioresources for Tomorrow's Drugs and Cosmetics by Christophe Wiart, PharmD, PhD Stephen Pyne	281

Natural Product Communications

2013

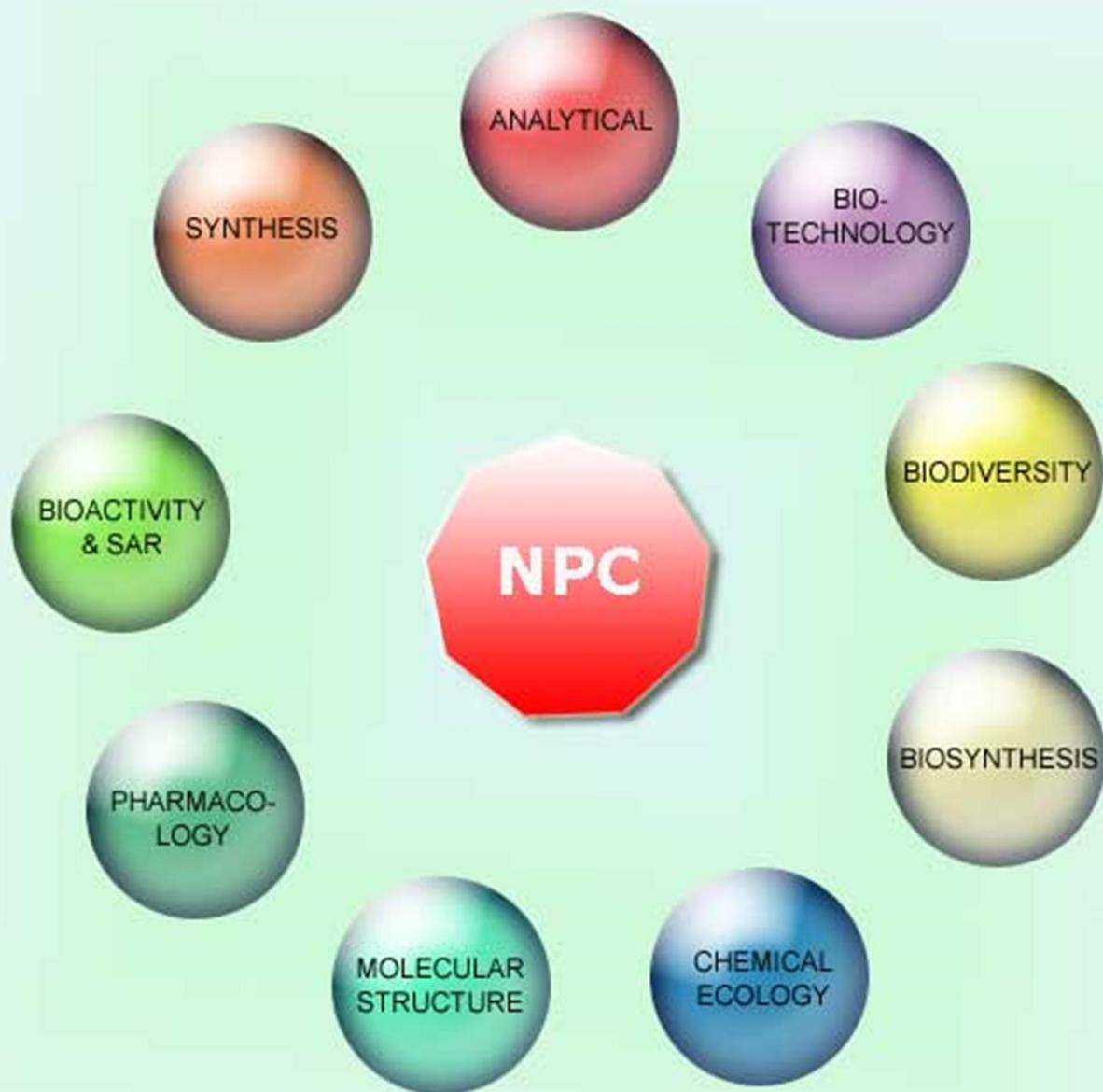
Volume 8, Number 2

Contents

<u>Original Paper</u>	<u>Page</u>
Drimendiol, A Drimane Sesquiterpene with Quorum Sensing Inhibition Activity Cristian Paz, Gerardo Cárcamo, Mario Silva, José Becerra, Homero Urrutia and Katherine Sossa	147
Microbial Transformation of Curcuminol by <i>Aspergillus niger</i> Chen Li-Xia, Zhang Hui, Zhao Qian, Yin Shi-Yu, Zhang Zhong, Li Tian-Xian and Qiu Feng	149
Chemopreventive Effect of Sarcophine-diol on NOR-1-Induced TPA-Promoted Skin Carcinogenesis in Female HOS:HR-1 Mice Pawel T. Szymanski, Safwat A. Ahmed, Sherief Khalifa, Harukuni Tokuda, Eiichiro Ichiishi, Akira Iida, Nobutaka Suzuki and Hesham Fahmy	153
Carmichaeline A: A New C₂₀-diterpenoid Alkaloid from <i>Aconitum carmichaeli</i> Shu-hua Li, Jun-ruXiong, Yuan-qin Zhang, Qing-xiang Xiang and Feng-zheng Chen	155
Steroidal Saponins from <i>Dracaena marginata</i> Abdelmalek Rezgui, Anne-Claire Mitaine-Offer, David Pertuit, Tomofumi Miyamoto, Chiaki Tanaka, Stéphanie Delemasure, Patrick Dutartre and Marie-Aleth Lacaille-Dubois	157
Zephyrabetaine: A New Betaine-type Amaryllidaceae Alkaloid from <i>Zephyranthes grandiflora</i> Deepali Katoch, Dharmesh Kumar, Upendra Sharma, Neeraj Kumar, Yogendra S. Padwad, Brij Lal and Bikram Singh	161
Antioxidant and Anti-inflammatory Compounds in the Popular Landscape Plant <i>Berberis thunbergii</i> var. <i>atropurpurea</i> Chuan-Rui Zhang, Robert E. Schutzki and Muraleedharan G. Nair	165
Two New Amides from <i>Streptomyces michiganensis</i> Jinghua Xue, Liangxiong Xu, Zi-Hua Jiang and Xiaoyi Wei	169
Determination of Bioactive Compounds in the Juice of Pummelo (<i>Citrus grandis</i> Osbeck) Marina Russo, Ivana Bonaccorsi, Germana Torre, Antonella Cotroneo, Paola Dugo and Luigi Mondello	171
Antiplasmodial Activity of Compounds from the Surface Exudates of <i>Senecio roseiflorus</i> Leonidah Omosa Kerubo, Jacob Ogweni Midiwo, Solomon Derese, Moses K. Langat, Hosea M. Akala, Norman C. Waters, Martin Peter and Matthias Heydenreich	175
Anti-inflammatory, Antioxidant and Cytotoxicity Activities of Methanolic Extract and Prenylated Flavanones Isolated from Leaves of <i>Eysehardia platycarpa</i> Valeri Domínguez-Villegas, Vanessa Domínguez-Villegas, María Luisa García, Ana Calpena, Beatriz Clares-Naveros and María Luisa Garduño-Ramírez	177
Phenolic Glycosides from <i>Lindera obtusiloba</i> and their Anti-allergic Inflammatory Activities Hyun Gyu Choi, Hwa Dong Lee, Sang Hyun Kim, MinKyun Na, Jeong Ah Kim and Seung Ho Lee	181
Antiproliferative Effects of an Analog of Curcumin in Hep-2 cells: A Comparative Study with Curcumin Mohankumar Kumaravel, Pajaniradje Sankar, Periyasamy Latha, Chellakan S Benson and Rajagopalan Rukkumani	183
Antiproliferative Activity of epi-Cercosporin in Human Solid Tumor Cell Lines Ángel Trigos, César Espinoza, Maricela Martínez, Olivia Márquez, Leticia G. León, José M. Padrón, Manuel Norte and José J. Fernández	187
New Anthraquinone Derivatives from <i>Geosmithia lavendula</i> Lourin G. Malak, Daoud W. Bishay, Afaf M. Abdel-Baky, Ahmed M. Moharram, Stephen J. Cutler and Samir A. Ross	191
Pancreatic Lipase Inhibitory Activity of Cassiamin A, a Bianthraquinone from <i>Cassia siamea</i> Dilip Kumar, Aniket Karmase, Sneha Jagtap, Ruchi Shekhar and Kamlesh K. Bhutani	195
Antifeedant Activity of Spin-Labeled Derivatives of Deoxypodophyllotoxin against <i>Brontispa longissima</i> Larvae Gang Feng, Jing Zhang, Liu Yang, Ying-Qian Liu, Zhi-Wei Zhang, Xuan Tian, Qi-An Jin and Zheng-Qiang Peng	199
Determination of Organic Acids in <i>Salicornia herbacea</i> by Solid-phase Extraction Combined with Liquid Chromatography Dandan Han, Minglei Tian, Dong Wha Park and Kyung Ho Row	203
Hypoglycemic Effect of <i>Bumelia sartorum</i> Polyphenolic Rich Extracts Halliny S. Ruela, Katia C. C. Sabino, Ivana C. R. Leal, Ana M. Landeira-Fernandez, Michelle R. A. de Almeida, Talita S. M. Rocha and Ricardo M. Kuster	207
Protoanemonin Content Variation between <i>Clematis</i> spp.: Leaf, Stem and Root Fangming Jin, Christian Narkowicz and Glenn A Jacobson	211
Methanolic Extract of <i>Nigella sativa</i> Seed Inhibits SiHa Human Cervical Cancer Cell Proliferation Through Apoptosis Tarique N. Hasan, Gowhar Shafi, Naveed A Syed, Muhammad A Alfawaz, Mohammed A. Alsaif, Anjana Munshi, Kai Y. Lei and Ali A. Alshatwi	213
Glucosinolate Biosynthesis in Hairy Root Cultures of Broccoli (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>) Sun-Ju Kim, Woo Tae Park, Md. Romij Uddin, Yeon Bok Kim, Sang-Yong Nam, Kwang Hyun Jho and Sang Un Park	217
Characterization of Volatile Components of <i>Zingiber roseum</i> Essential Oil Using Capillary GC on Modified Cyclodextrins VPPalayam S Pragadheesh, Anju Yadav, Manju Singh and Chandan S Chanotiya	221

NATURAL PRODUCT COMMUNICATIONS

An International Journal for Communications and Reviews Covering all
Aspects of Natural Products Research



Volume 9. Issue 10. Pages 1399-1538. 2014
ISSN 1934-578X (printed); ISSN 1555-9475 (online)
www.naturalproduct.us

EDITOR-IN-CHIEF**DR. PAWAN K AGRAWAL**

Natural Product Inc.
7963, Anderson Park Lane,
Westerville, Ohio 43081, USA
agrawal@naturalproduct.us

EDITORS**PROFESSOR ALEJANDRO F. BARRERO**

Department of Organic Chemistry,
University of Granada,
Campus de Fuente Nueva, s/n, 18071, Granada, Spain
afbarre@ugr.es

PROFESSOR ALESSANDRA BRACA

Dipartimento di Chimica Bioorganica e Biofarmacia,
Università di Pisa,
via Bonanno 33, 56126 Pisa, Italy
braca@farm.unipi.it

PROFESSOR DEAN GUO

State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs,
School of Pharmaceutical Sciences,
Peking University,
Beijing 100083, China
gda5958@163.com

PROFESSOR YOSHIHIRO MIMAKI

School of Pharmacy,
Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences,
Horinouchi 1432-1, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan
mimakiy@ps.toyaku.ac.jp

PROFESSOR STEPHEN G. PYNE

Department of Chemistry
University of Wollongong
Wollongong, New South Wales, 2522, Australia
spyne@uow.edu.au

PROFESSOR MANFRED G. REINECKE

Department of Chemistry,
Texas Christian University,
Forts Worth, TX 76129, USA
m.reinecke@tcu.edu

PROFESSOR WILLIAM N. SETZER

Department of Chemistry
The University of Alabama in Huntsville
Huntsville, AL 35809, USA
wsetzer@chemistry.uah.edu

PROFESSOR YASUHIRO TEZUKA

Faculty of Pharmaceutical Sciences
Hokuriku University
Ho-3 Kanagawa-machi, Kanazawa 920-1181, Japan
y-tezuka@hokuriku-u.ac.jp

PROFESSOR DAVID E. THURSTON

Department of Pharmaceutical and Biological Chemistry,
The School of Pharmacy,
University of London, 29-39 Brunswick Square,
London WC1N 1AX, UK
david.thurston@pharmacy.ac.uk

HONORARY EDITOR**PROFESSOR GERALD BLUNDEN**

The School of Pharmacy & Biomedical Sciences,
University of Portsmouth,
Portsmouth, PO1 2DT U.K.
axuf64@dsl.pipex.com

ADVISORY BOARD

Prof. Viqar Uddin Ahmad
Karachi, Pakistan

Prof. Giovanni Appendino
Novara, Italy

Prof. Yoshinori Asakawa
Tokushima, Japan

Prof. Roberto G. S. Berlinck
São Carlos, Brazil

Prof. Anna R. Bilia
Florence, Italy

Prof. Maurizio Bruno
Palermo, Italy

Prof. César A. N. Catalán
Tucumán, Argentina

Prof. Josep Coll
Barcelona, Spain

Prof. Geoffrey Cordell
Chicago, IL, USA

Prof. Fatih Demirci
Eskişehir, Turkey

Prof. Dominique Guillaume
Reims, France

Prof. Ana Cristina Figueiredo
Lisbon, Portugal

Prof. Cristina Gracia-Viguera
Murcia, Spain

Prof. Duvvuru Gunasekar
Tirupati, India

Prof. Hisahiro Hagiwara
Niigata, Japan

Prof. Kurt Hostettmann
Lausanne, Switzerland

Prof. Martin A. Iglesias Arteaga
Mexico, D. F., Mexico

Prof. Leopold Jirovetz
Vienna, Austria

Prof. Vladimir I Kalinin
Vladivostok, Russia

Prof. Niel A. Koorbanally
Durban, South Africa

Prof. Chiaki Kuroda
Tokyo, Japan

Prof. Hartmut Laatsch
Göttingen, Germany

Prof. Marie Laccaille-Dubois
Dijon, France

Prof. Shoen-Sheng Lee
Taipei, Taiwan

Prof. Imre Mathe
Szeged, Hungary

Prof. Ermino Murano
Trieste, Italy

Prof. M. Soledade C. Pedras
Saskatoon, Canada

Prof. Luc Pieters
Antwerp, Belgium

Prof. Peter Proksch
Düsseldorf, Germany

Prof. Phila Raharivelomanana
Tahiti, French Polynesia

Prof. Luca Rastrelli
Fisciano, Italy

Prof. Stefano Serra
Milano, Italy

Prof. Monique Simmonds
Richmond, UK

Dr. Bikram Singh
Palampur, India

Prof. John L. Sorensen
Manitoba, Canada

Prof. Johannes van Staden
Scottsville, South Africa

Prof. Valentin Stonik
Vladivostok, Russia

Prof. Winston F. Tinto
Barbados, West Indies

Prof. Sylvia Urban
Melbourne, Australia

Prof. Karen Valant-Vetschera
Vienna, Austria

INFORMATION FOR AUTHORS

Full details of how to submit a manuscript for publication in Natural Product Communications are given in Information for Authors on our Web site <http://www.naturalproduct.us>.

Authors may reproduce/republish portions of their published contribution without seeking permission from NPC, provided that any such republication is accompanied by an acknowledgment (original citation)-Reproduced by permission of Natural Product Communications. Any unauthorized reproduction, transmission or storage may result in either civil or criminal liability.

The publication of each of the articles contained herein is protected by copyright. Except as allowed under national "fair use" laws, copying is not permitted by any means or for any purpose, such as for distribution to any third party (whether by sale, loan, gift, or otherwise); as agent (express or implied) of any third party; for purposes of advertising or promotion; or to create collective or derivative works. Such permission requests, or other inquiries, should be addressed to the Natural Product Inc. (NPI). A photocopy license is available from the NPI for institutional subscribers that need to make multiple copies of single articles for internal study or research purposes.

To Subscribe: Natural Product Communications is a journal published monthly. 2014 subscription price: US\$2,395 (Print, ISSN# 1934-578X); US\$2,395 (Web edition, ISSN# 1555-9475); US\$2,795 (Print + single site online); US\$595 (Personal online). Orders should be addressed to Subscription Department, Natural Product Communications, Natural Product Inc., 7963 Anderson Park Lane, Westerville, Ohio 43081, USA. Subscriptions are renewed on an annual basis. Claims for nonreceipt of issues will be honored if made within three months of publication of the issue. All issues are dispatched by airmail throughout the world, excluding the USA and Canada.

Chemical Composition of the Essential Oils from Vietnamese *Clausena indica* and *C. anisum-olens*

Tran Huy Thai^a, Ophélie Bazzali^b, Tran Minh Hoi^a, Nguyen Thi Hien^a, Nguyen Viet Hung^c, Félix Tomi^b, Joseph Casanova^b and Ange Bighelli^{b*}

^aInstitute of Ecology and Biological Resources, VAST, Hanoi, Vietnam

^bUniversité de Corse-CNRS, UMR 6134 SPE, Équipe Chimie et Biomasse, Route des Sanguinaires, 20000 Ajaccio, France

^cVinh University, 182, Le Duan Street, Vinh City, Vietnam

ange.bighelli@univ-corse.fr

Received: June 27th, 2014; Accepted: August 11th, 2014

The chemical composition of Vietnamese oil samples of the aerial parts of *Clausena indica* (Dalz.) Oliver and *C. anisum-olens* (Blanco) Merryll have been investigated using a combination of chromatographic and spectroscopic techniques. *C. indica* essential oil contained mainly terpinolene (53.9 and 56.1%), and myristicin (17.9 and 7.3%), whereas the major components of *C. anisum-olens* essential were citronellal (22.8%), geranial (21.4%) and neral (16.8%). The compositions of the investigated samples have been compared with those of essential oils from various origins.

Keywords: *Clausena indica*, *C. anisum-olens*, Rutaceae, Essential oil composition, Terpinolene, Citral, Vietnam.

The genus *Clausena* (Rutaceae) contains 15 species and six recognized varieties [1]. It is widespread in India and tropical Asia, but a few species are also found in Africa (*C. anisata*) and Australia (*C. brevistyla*, *C. smyrelliana*) [2,3]. Various species produce edible fruits locally consumed such as *C. dentata* var. *dulcis* (India), *C. dentata* var. *henryi* (China) and *C. indica* (India, Sri Lanka). However only *C. lansium* (known as wampi) is commercially cultivated [3]. Most species of *Clausena* are used in folk medicine, particularly in China and Vietnam [2,4].

Secondary metabolites contained in solvent extracts of *Clausena* species have been isolated and their structures elucidated: alkaloids, coumarins and limonoids in *C. anisata*, *C. dentata*, *C. excavata*, *C. harmandiana*, *C. lansium* and *C. suffruticosa* [2,5]. The compositions of essential oils (EO) isolated from leaves and fruits of *Clausena* species have been investigated. Three groups may be distinguished: i) EOs whose composition is dominated by mono and sesquiterpenes: *C. excavata*, *C. dentata* and *C. dunniana*; ii) EOs containing mostly phenylpropanoids: *C. heptaphylla* and *C. lunata*; iii) EOs from *C. anisata* that exhibited a chemical variability with either a phenylpropanoid or a terpene as major component [6,7].

C. indica (Dalz.) Oliver is naturally distributed in India, China, Laos, Cambodia, Philippines, Thailand and Vietnam (Quang Ninh, Cao Bang and Lang Son provinces). *C. anisum-olens* (Blanco) Merryll (synonym, *C. sanki* Molino) is also naturally distributed in China, Taiwan, Philippines and Vietnam (Quang Ninh, Ha Giang and Kontum provinces). Both species are used as food condiments and in traditional medicine (China, Philippines). *C. indica* leaf oil showed significant antibacterial activity [6,8], and the volatile oil of *C. anisum-olens* also had a strong inhibitory effect against *Staphylococcus*, *Escherichia* and *Bacillus* strains [9a,b].

Various compounds have been isolated from solvent extracts of both *C. indica* and *C. anisum-olens*: coumarins [2,10a-c,15a-d], alkaloids [11], amides [12], flavonoids [13a-c], cyclopeptides [16a-b] and sesquiterpenes [14].

The leaf essential oil of *C. indica* from India contained mostly sabinene (53.1%) and terpinen-4-ol (13.1%) [8]. Monoterpenes, β -myrcene (51.5%) and terpinolene (12.8%), have also been found as major components of fruit peel oil of Chinese origin, beside a phenylpropanoid, myristicin (24.8%) [17]. Two compositions were reported from China. The volatile oil from the leaf of *C. indica* was first steam distilled and then extracted with diethyl ether (EE) and ethyl acetate (EA). Curiously, the compositions of the fractions obtained were dominated by different compounds: terpinolene (53.9%), myristicin (15.3%) and 3-carene (9.7%) for the EE fraction and 4-carene (45.7%) and 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol (40.8%) for the EA fraction [18]. In contrast, myristicin was the main volatile (61.0% and 47.5%) found during headspace solid phase microextraction (HS-SPME) of the fresh fruit peel and the fresh leaves. The phenylpropanoid was accompanied by either β -myrcene (23.5%, fruit peel) or terpinolene (23.8%, leaves) [19].

The first study related to *C. anisum-olens* essential oil dates back to 1911 and demonstrated that estragole (methyl chavicol) was the main component. Its content has been estimated at 90-95% of the whole composition, using a combination of physical and chemical techniques [20]. More recently, Molino [21] analyzed a large number of samples from the Philippines. Volatiles were extracted with either ethanol or dichloromethane. Methyl chavicol was the unique component for 30% of the samples, and anethole for 14%; the largest group of samples (64%) contained anethole, accompanied by around 10% of methylchavicol. Recently, Chinese *C. anisum-olens* oils isolated from various parts of the plant (stems, roots, leaves, nutlets, fruits and flowers) were reported to contain myristicin as the major component, (29.0-100%), beside other phenylpropanoids such as elemicin and 2,6-dimethoxy-4-(2-propenyl)-phenol. Various terpenes, such as 4-carene and germacrene B, as well as fatty acids and alkanes have been identified in the EOs [9a-b,22a-b].

Table 1: Components of *Clausena indica* and *C. anisum-olens* essential oils.

	Compounds	RI ^a	RI ^b	Ci1 %	Ci2 %	Cao %	Identification
1	α -Thujene	923	1016	tr	tr	2.0	RI, MS, ¹³ C NMR
2	α -Pinene	931	1014	1.1	1.3	4.3	RI, MS, ¹³ C NMR
3	Camphene	945	1066	-	0.1	-	RI, MS
4	6-Methylhept-5-en-2-one	960	1334	-	-	0.9	RI, MS, ¹³ C NMR
5	Sabinene	966	1125	tr	0.1	13.5	RI, MS, ¹³ C NMR
6	β -Pinene	971	1114	tr	tr	0.4	RI, MS, ¹³ C NMR
7	Myrcene	981	1162	3.7	4.1	0.9	RI, MS, ¹³ C NMR
8	δ -2-Carene	997	1133	0.2	0.3	-	RI, MS
9	α -Phellandrene	998	1168	1.2	1.1	-	RI, MS, ¹³ C NMR
10	δ -3-Carene	1007	1151	8.2	10.0	-	RI, MS, ¹³ C NMR
11	α -Terpinene	1009	1183	3.1	2.9	0.4	RI, MS, ¹³ C NMR
12	<i>p</i> -Cymene	1012	1272	0.7	1.2	0.3	RI, MS, ¹³ C NMR
13	Limonene*	1021	1203	1.7	2.2	2.3	RI, MS, ¹³ C NMR
14	β -Phellandrene*	1021	1211	1.1	1.5	0.2	RI, MS, ¹³ C NMR
15	1,8-Cineole*	1021	1212	-	-	0.2	RI, MS
16	(<i>Z</i>)- β -Ocimene	1026	1234	0.2	0.2	-	RI, MS
17	(<i>E</i>)- β -Ocimene	1036	1251	0.7	0.8	tr	RI, MS, ¹³ C NMR
18	γ -Terpinene	1049	1247	0.5	0.5	2.0	RI, MS, ¹³ C NMR
19	<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1053	1459	-	-	0.5	RI, MS, ¹³ C NMR
20	Terpinolene	1079	1284	53.9	56.1	0.3	RI, MS
21	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1083	1542	-	-	0.6	RI, MS, ¹³ C NMR
22	Linalool	1083	1542	0.3	0.3	-	RI, MS
23	<i>cis</i> - <i>p</i> -Menth-2-en-1-ol	1121	nd	-	-	0.2	RI, MS
24	Citronellal*	1132	1480	-	-	22.8	RI, MS, ¹³ C NMR
25	<i>iso</i> -Pulegol*	1132	1571	-	-	0.3	RI, MS
26	<i>iso</i> -Neral	1140	nd	-	-	0.7	RI, MS, ¹³ C NMR
27	<i>iso</i> -Geraniol	1157	nd	-	-	1.0	RI, MS, ¹³ C NMR
28	<i>p</i> -Cymen-8-ol	1160	1843	0.7	2.0	-	RI, MS, ¹³ C NMR
29	Terpinen-4-ol	1162	1598	-	-	2.6	RI, MS, ¹³ C NMR
30	α -Terpineol	1172	1690	0.5	0.1	0.2	RI, MS
31	Citronellol	1209	1760	-	-	0.5	RI, MS, ¹³ C NMR
32	Neral	1216	1679	-	-	16.8	RI, MS, ¹³ C NMR
33	Geraniol	1234	1841	-	-	0.2	RI, MS
34	Geraniol	1244	1729	-	-	21.4	RI, MS, ¹³ C NMR
35	<i>iso</i> -Bornyl acetate	1269	1583	-	-	0.1	RI, MS
36	2-Methoxy-4-vinylphenol	1320	nd	-	-	0.1	RI, MS
37	Citronellyl acetate	1333	1659	-	-	0.1	RI, MS
38	Neryl acetate	1341	1722	-	-	0.1	RI, MS
39	Geranyl acetate	1359	1753	-	-	1.7	RI, MS, ¹³ C NMR
40	(<i>E</i>)- β -Caryophyllene	1417	1595	-	-	0.2	RI, MS
41	<i>trans</i> - α -Bergamotene	1432	1578	-	-	tr	RI, MS
42	Myristicin	1488	2257	17.9	7.3	-	RI, MS, ¹³ C NMR
43	Elemicin	1516	2219	0.1	0.1	tr	RI, MS
44	Spathulenol	1569	2113	tr	0.1	0.1	RI, MS
	Monoterpene hydrocarbons			76.3	82.4	26.6	
	Oxygenated monoterpenes			1.5	2.4	70.0	
	Sesquiterpene hydrocarbons			-	-	0.2	
	Oxygenated sesquiterpenes			tr	0.1	0.1	
	Phenylpropanoids			18.0	7.4	tr	
	Others			-	-	1.0	
	Total			95.8	92.3	97.9	

Order of elution and percentages are given on an apolar column (BP1), except for compounds with an asterisk*, percentage on polar column (BP20). RI^a, RI^b: retention indices measured on apolar and polar columns, respectively. Ci 1 = *C. indica*, Lan son; Ci 2 = *C. indica*, Ha giang; Cao = *C. anisum-olens*; Kon tum: Components 13-15 on the one hand and 24-25 on the other were separated on a HP-MS 5 capillary column used to perform GC-MS analysis. nd = not determined. tr = trace.

Concerning Vietnamese *C. indica* oils, two papers reported drastically different compositions. Myristicin (35.3%) was the major component beside terpinolene (16.7%) and δ -3-carene (11.6%) of an oil sample isolated from leaves and branches collected in Melin, Vinh Phuc province [6]. In contrast, a very unusual composition, dominated by menthone (70.6%) and β -phellandrene (13.0%) has been reported for another oil sample isolated from plants collected in Nghê An province [23]. There is no report concerned the composition of Vietnamese *C. anisum-olens* oil.

In order to gain more insight into the chemical composition of Vietnamese *C. indica* and *C. anisum-olens* oils, analysis of two samples of the first species and one of the second was undertaken using a combination of chromatographic and spectroscopic techniques, including ¹³C NMR spectroscopy, following a computerized method developed by our group [24a-c].

Both *C. indica* oil samples investigated in the present study contained high amounts of terpinolene (53.9 and 56.1%), accompanied by myristicin (17.9 and 7.3%) (Table 1). Other monoterpene hydrocarbons present in appreciable content were

δ -3-carene (8.2 and 10.0%), myrcene (3.7 and 4.1%), α -terpinene (3.1 and 2.9%), and limonene (1.7 and 2.2%). Our oil samples differed substantially from an oil sample from Vietnam characterized by the preeminence of myristicin (35.3%), although terpinolene and δ -3-carene were present in appreciable amounts [6]. They differed drastically from another oil sample of Vietnamese origin that contained menthone as its major component [23]. The composition of our samples differed also from those of other monoterpene-rich *C. indica* essential oils from India and China, dominated by sabinene (53.1%) and β -myrcene (51.5%), respectively [8,17]. In contrast, our samples resembled the Chinese "oil" isolated by a two-step process (hydrodistillation followed by diethyl ether extraction) [18]. It could be pointed out that terpinolene-rich essential oils have fair economic value. Indeed, terpinolene has a broad spectrum of biological activities such as anticancer [25], antioxidant [26], and antifungal [27]. It was found to be the most effective pure compound of *Hyptis suaveolens* leaf oil evaluated for larvicidal and repellent activity against the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*) [28].

The composition of Vietnamese *C. anisum-olens* essential oil was largely dominated by the monoterpene aldehydes, citronellal

(22.8%), geranial (21.4%) and neral (16.8%). Iso-geranial and iso-neral were also observed to a lesser extent. Sabinene (13.5%) was the main monoterpene hydrocarbon, accompanied by α -pinene (4.3%), limonene (2.3%), α -thujene and γ -terpinene (2.0% each). Terpinen-4-ol (2.6%) was the major oxygenated monoterpene. Sesquiterpenes were present at very low or trace level, as well as phenylpropanoids.

Our oil sample differed drastically from other *C. anisum-olens* oils, whose chemical composition was largely dominated by the phenylpropanoids, estragole or anethole (Philippines) [19,21], and myristicin (China) [22a-b]. This difference in the composition of the essential oils may be due to the occurrence of varieties. Indeed, according to Molino [29], *C. anisum-olens* is subdivided into three botanical varieties: i) var. *anisum-olens*, distributed as the species, except Borneo; ii) var. *calciphila* (B.C. Stone) Molino, occurring in Borneo; iii) var. *mollis* (Merrill) Molino, occurring in the Philippines. All information about uses and essential oil content refer to var. *anisum-olens* only. Various Citrus oils whose composition is dominated by citronellal and/or citral (geranial-neral) have been reported in the literature. For instance, citronellal was the major compound (66.8-72.4%) of kaffir lime (*Citrus hystrix*) leaf oil [30a-b]. Geranial and neral were among the main components of various *Citrus* leaf oils: *C. medica* L. var. *sarcodactylis* (25.9%/16.4%) [31], *C. reticulata* (19.0%/14.5%) [32] and *C. aurantifolia* (19.4%/11.4%) [30]. The simultaneous occurrence of the three aldehydes has been mentioned in the leaf oils of various limes (citronellal, up to 17.7%, neral, up to 20.5%, and geranial, up to 26.9%) [33].

Experimental

Plant material: *C. indica* was harvested in May 2012, in Lang Son province (sample Ci1), and in September 2012, in Ha Giang province (sample Ci2). *C. anisum-olens* was harvested in October 2013, in Kon Tum province. Aerial parts (leaves and small fruits) were used for hydrodistillation (2.5 h) using a Clevenger-type apparatus. Both species were authenticated by Dr Nguyen Thi Ha, Hanoi National University of Education. Voucher specimens have been deposited at the herbarium of IERB under the accession Thai N° 11 (HN), N° 15 (HN), and N° 19 (HN), respectively.

GC(FID) analysis: GC analyses were carried out with a Clarus 500 Perkin-Elmer Autosystem chromatograph equipped with 2 flame ionisation detectors (FID), and fused capillary columns (50 m x 0.22 mm i.d., film thickness 0.25 μ m), BP-1 (polymethylsiloxane) and

BP-20 (polyethylene glycol). Carrier gas: He; flow 0.8 mL/min. The oven temperature was programmed from 60°C to 220°C at 2°C/min and then held isothermal (20 min). Injector temperature: 250°C (injection mode: split 1/60). Detector temperature: 250°C.

GC-MS analysis: GC/MS analyses were carried out using an Agilent Technologie 7890A detector (quadrupole), directly coupled to a Agilent Technologie 5975C, equipped with a fused-silica capillary column (30 m x 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 μ m), HP-MS 5% phenylmethylsiloxane. Carrier gas, He at 1 mL/min; split, 1:80; injection volume, 0.2 μ L. Injection port: 250°C; oven temperature programmed from 60°C to 250°C at 4°C/min. MS operating parameters: Ion source temperature, 150°C; electron impact ionization at 70 eV with scan mass range of 33-350 m/z.

¹³C NMR analysis: ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 Fourier Transform spectrometer operating at 100.623 MHz, equipped with a 5 mm probe, in CDCl₃. Spectra were recorded with the following parameters: pulse width (PW), 5 μ s (flip angle 45°); acquisition time, 2.7 s for 128 K data table with a spectral width (SW) of 25000 Hz (250 ppm); digital resolution 0.183 Hz/pt. Number of accumulated scans: 3 000 (50 mg of EO in 0.5 mL of CDCl₃).

Component identification: Identification of the individual components was based: (i) on comparison of their GC retention indices (RI) on apolar and polar columns, determined relative to the retention times of a C₆-C₂₈ n-alkane series with linear interpolation ('Target Compounds' software of Perkin-Elmer), with those of authentic compounds compiled in our laboratory-built library, except iso-neral and iso-geranial, RIs compared with literature data [34a] and (ii) on computer search using digital libraries of mass spectral data [34a,b] and comparison with published data [34c,d] and (iii) by ¹³C NMR spectroscopy, following the methodology developed and computerized in our laboratory, using home-made software, by comparison with spectral data of reference compounds compiled in a laboratory-built library [24a-c]. Each component which accounted at least for 0.3-0.4% in the EOs was identified by ¹³C NMR spectroscopy.

Acknowledgments - The authors thanks the NAFOSTED for financial support (Project 106-NN.03-2013.42). They are indebted to Dr P. Paquet (Corsica Essences) for his help in GC-MS analyses and to Dr Nguyen Thi Ha, HNUE, for authentication of the plant.

References

- [1] Shi X-J, Ye G, Tang W-J, Zhao W-M. (2010) A new coumarin and carbazole alkaloid from *Clausena vestita* D. D. Tao. *Helvetica Chimica Acta*, **93**, 985-990.
- [2] Arbab IA, Abdul AB, Aspollah M, Abdullah R, Abdelwahab SI, Ibrahim MY, Ali LZ. (2012) A review of traditional uses, phytochemical and pharmacological aspects of selected members of *Clausena* genus (Rutaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, **6**, 5107-5118.
- [3] Krueger RR, Navarro L. (2007) Citrus germplasm resources. In *Citrus. Genetics, Breeding and Biotechnology*. Khan I. (Ed). CAB International, Oxfordshire UK. 45-140.
- [4] Malarvannan S, Senthil Kumar S, Prabavathy VR, Nair S. (2008) Individual and synergistic effects of leaf powder of few medicinal plants against American bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Noctuidae: Lepidoptera). *Asian Journal of Experimental Science*, **22**, 79-88.
- [5] Begum R, Rahman MS, A. Chowdhury MS, Rahman MM, Rashid MA. (2008) O-Methylheptaphylline from *Clausena suffruticosa*, *Natural Product Communications*, **3**, 815-818.
- [6] Diep PTM, Pawlowska AM, Cioni PL, Minh CV, Huong LM, Braca A. (2009) Chemical composition and antimicrobial activity of *Clausena indica* (Dalz) Oliv. (Rutaceae) essential oil from Vietnam. *Natural Product Communications*, **4**, 869-872.
- [7] Yaouba A, Tatsadjieu LN, Jazet Dongmo PM, Etoa FX, Fontum Mbofung CM, Amvam Zollo PH, Menut C. (2011) Evaluation of *Clausena anisata* essential oil from Cameroon for controlling food spoilage fungi and its potential use as an antiradical agent. *Natural Product Communications*, **6**, 1367-1371.
- [8] Anil John J, Kurup SRR, Pradeep NS, Sabulal B. (2011) Chemical composition and antibacterial activity of the leaf oil of *Clausena indica* from South India. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **14**, 776-781.
- [9] (a) Su XF. (2008) Analysis on chemical components of the essential oil from the leaves of *Clausena anisum-alens* (Blanco) Merr. by GC-MS. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 10956-10957; (b) Su X-F, Huang L-J, Feng P-Z. (2011) Chemical composition analysis and antimicrobial activity of volatile oil from the nutlets of *Clausena anisum-olens*. *Food Science*, 30-32.

- [10] (a) Joshi BS, Gawad DH. (1971) Rutaceae - Isolation of some furanocoumarins from *Clausena indica* and identity of chalepentin with xylotenin. *Phytochemistry*, **10**, 480-481; (b) Joshi BS, Kamat VN, Gawad DH. (1974) Structure of clausindine, a new coumarin from *Clausena indica* Oliv. *Experientia*, **30**, 223; (c) Prakash D, Raj K, Kapil RS, Popli SP. (1978) Coumarins from *Clausena indica*. *Phytochemistry*, **17**, 1194-1195.
- [11] Joshi BS, Gawad DH, Kamat VN. (1972) 6-Methoxyheptaphylline, a new carbazole alkaloid from *Clausena indica* Oliv. *Indian Journal of Chemistry*, **10**, 1123-1124.
- [12] Riemer B, Hofer O, Greger H. (1997) Tryptamine derived amides from *Clausena indica*. *Phytochemistry*, **45**, 337-341.
- [13] (a) Liang YZ, Peng JY, Yi L, Liang HH. (2010) Study on microwave-assisted extraction technology of flavonoids from the leaves of *Clausena indica*. *Guangdong Agricultural Sciences*, 153-155; (b) Liang YZ, Peng JY, Li Z, Liang HH. (2010) Microwave-assisted extraction of flavonoids from the fruit of *Clausena indica* (Dalz) Oliv. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 269-272; (c) Wei FL, Liang YZ, Huang QZ. (2011) Study on antimicrobial effect of the flavonoids in *Clausena indica* (Dalz) Oliv. fruits. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 15932-15933.
- [14] Joshi BS, Gawad DH, Williams DJ. (1975) The structure of clausantalene, a new sesquiterpene from *Clausena indica*. *Experientia*, **31**, 138-139.
- [15] (a) Wang YS, Huang R, Li L, Zhang HB, Yang JH. (2008) *O*-terpenoidal coumarins from *Clausena anisum-olens*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **36**, 801-803; (b) Wang YS, He HP, Yang JH, Di YT, Hao XJ. (2008) New monoterpene coumarins from *Clausena anisum-olens*. *Molecules*, **13**, 931-937; (c) Wang YS, Xu HY, Wang DX, Yang JH. (2009) A new *O*-terpenoidal coumarin from *Clausena anisum-olens* Merr. *Molecules*, **14**, 771-776; (d) Wang YS, Huang R, Li NZ, Yang JH. (2010) Coumarins from *Clausena anisum-olens* Merr. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **74**, 1483-1484.
- [16] (a) Wang YS, He HP, Yang JH, Shen YM, Zhou J, Hao XJ. (2005) A new cyclopeptide from *Clausena anisum-olens*. *Helvetica Chimica Acta*, **88**, 2345-2348; (b) Wang YS, He HP, Yang JH, Di YT, Tan NH, Hao XJ. (2009) Clausenain B, a phenylalanine-rich cyclic octapeptide from *Clausena anisum-olens*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **20**, 478-481.
- [17] Zhou H, Huang KJ, Pan ZW, Huang G, Su T, Lin CW. (2008) Analysis of essential oil from the fruit peel of *Clausena indica* (Datz.) Oliv. by gas chromatography-mass spectrometry. *Fine Chemicals*, **25**, 65-67.
- [18] Yu T, Li YZ, Hua SJ, Gang L. (2009) Two steps extraction and analysis of volatile oil from the leaf of *Clausena indica* (Datz.) Oliv. by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Guangxi Agriculture*, **4**, 123-134.
- [19] Zhou H, Huang KJ, Pan ZW, Lin CW, Huang G, Su T. (2008) Headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry for analysis of volatile components from the fresh leaves and the fresh fruit peel of *Clausena indica* (Datz.) Oliv. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, **47**, 71-74.
- [20] Brooks BT. (1911) New Philippine essential oils. *Philippine Journal of Science*, **6A**, 333-354.
- [21] Molino JF. (2000) The inheritance of leaf oil composition in *Clausena anisum-olens* (Blanco) Merr. *Journal of Essential Oil Research*, **12**, 135-139.
- [22] (a) Su XF, Huang LJ, Feng PZ. (2011) Chemical composition analysis and antimicrobial activity of volatile oil from the nutlets of *Clausena anisum-olens*. *Food Science*, **32**, 30-32; (b) Su XF, Liang ZY. (2011) Chemical constituents of essential oil of different organs from *Clausena anisum-olens*. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, **12**, 87-89.
- [23] Trung HD, Thang TD, Ban PH, Hoi TM, Dai do N, Ogunwande IA. (2014) Terpene constituents of the leaves of five Vietnamese species of *Clausena* (Rutaceae). *Natural Product Research*, **28**, 622-630.
- [24] (a) Bighelli A, Castola V, Casanova J. (2002) Direct identification and quantitative determination of acidic and neutral diterpenes using ¹³C NMR spectroscopy. Application to the analysis of oleoresin of *Pinus nigra*. *Applied Spectroscopy*, **56**, 312-317; (b) Tomi F, Casanova J. (2006) ¹³C-NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from Labiatae. A review. In *The Labiatae: Advances in Production, Biotechnology and Utilisation*. *Acta Horticulturae*, Vol 723, Cervelli C, Ruffoni B, Dalla Guda C. (Eds). 185-192; (c) Bighelli A, Casanova J. (2010) Analytical methods for Cymbopogon oils. In *Essential oil-bearing grasses. The genus Cymbopogon*. Akhila A. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, USA, 195-221.
- [25] Harada T, Harada E, Sakamoto R, Ashitani T, Fujita K, Kuroda K. (2012) Regio- and substrate-specific oxidative metabolism of terpinolene by cytochrome P450 monooxygenases in *Cupressus lusitanica* cultured cells. *American Journal of Plant Sciences*, **3**, 268-275.
- [26] Dorman HJD, Figueiredo AC, Barroso JG, Deans SG. (2000) *In vitro* evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*, **15**, 12-16.
- [27] Hammer KA, Carson CF, Riley TV. (2004) Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **53**, 1081-1085.
- [28] Conti B, Benelli G, Flamini G, Cioni PL, Profeti R, Ceccarini L, Macchia M, Canale A. (2012) Larvicidal and repellent activity of *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) essential oil against the mosquito *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, **110**, 2013-2021.
- [29] Molino JF. (1999) *Clausena anisum-olens* (Blanco) Merrill. In *Plant resources of South-East Asia No.19. Essential-oil plants*. Oyen LPA, Nguyen Xuan Dung (Eds). Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands, 86-89.
- [30] (a) Fan SL, Muhamad Awang R, Dzolkhifli O, Mawardi R. (2011) Insecticidal properties of *Citrus hystrix* DC leaves essential oil against *Spodoptera litura* Fabricius. *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**, 3739-3744; (b) Jantan I, Ahmad AS, Ahmad AR, Nor Azah Mohd Ali, Ayop N. (1996) Chemical composition of some Citrus oils from Malaysia. *Journal of Essential Oil Research*, **8**, 627-632.
- [31] Theanphong O, Songsak T, Mingvanish W. (2008) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* (Sieber) Swingle leaf. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*, **35**, 57-61.
- [32] Chutia M, Deka Bhuyan P, Pathak MG, Sarma TC, Boruah P. (2009) Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *Food Science and Technology*, **42**, 777-780.
- [33] Lota ML, De Rocca Serra D, Tomi F, Jacquemond C, Casanova J. (2002) Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **50**, 796-805.
- [34] (a) König WA, Hochmuth DH, Joulain D. (2001) Terpenoids and related constituents of essential oils, library of Massfinder 2.1. University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry, Hamburg; (b) US National Institute of Standards and Technology PC Version 1.7 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library, Norwalk, CT (1999); (c) Joulain D, König WA. (1998) *The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons*. E B-Verlag, Hamburg; (d) Adams RP. (2007) *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA.

Two New Pyrone Derivatives from the Plant Endophytic Fungus <i>Exserohilum</i> sp. Ruxin Li, Shubin Niu, Liangdong Guo and Yang Zhang	1497
A New Aggreceride Analogue and a Peltogynoid Isolated from the Stem Bark of <i>Entada abyssinica</i> (Fabaceae) Raduis Melong, Deccaux G. F. W. Kapche, Michel T. Feussi and Hartmut Laatsch	1499
Protective Effect of <i>Agave salmiana</i> Fructans in Azoxymethane-Induced Colon Cancer in Wistar Rats Antonio Dávila-Céspedes, Bertha I. Juárez-Flores, Juan M. Pinos-Rodríguez, Juan R. Aguirre-Rivera, A. Cuahutemoc Oros-Ovalle, E.D. Loyola-Martínez and Hera Andrade-Zaldívar	1503
Compositional Variability and Antifungal Potentials of <i>Ocimum basilicum</i>, <i>O. tenuiflorum</i>, <i>O. gratissimum</i> and <i>O. kilimandscharicum</i> Essential Oils against <i>Rhizoctonia solani</i> and <i>Choanephora cucurbitarum</i> Rajendra C. Padalia, Ram S. Verma, Amit Chauhan, Prakash Goswami, Chandan S. Chanotiya, Arvind Saroj, Abdul Samad and Abdul Khaliq	1507
Chemical Composition of the Essential Oil of <i>Ligularia hodgsonii</i> and Free Radical Scavenging Activity of the Oil and Crude Extracts Zihao Zhou, Jun Tang and Xueping Song	1511
Repellent Constituents of Essential Oil from <i>Citrus wilsonii</i> Stem Barks against <i>Tribolium castaneum</i> Yan Wu, Hai-Ping Chen, Jian-Yu Wei, Kai Yang, Zhao-Fu Tian, Xiao-Lan Li, Ping-Juan Wang, Cheng-Fang Wang, Shu-Shan Du and Qian Cai	1515
Essential Oil from the Heartwood of Taiwan fir Ameliorates LPS-induced Inflammatory Response by Inhibiting the Activation of Mitogen-activated Protein Kinase May-Lan Liu, Kuo-Feng Hua, Tzu-Jung Yang, Huan-Wen Chiu and Chen-Lung Ho	1519
Melissopalynological and Volatile Analysis of Honeys from Corsican <i>Arbutus unedo</i> Habitat Yin Yang, Marie-José Battesti, Jean Costa and Julien Paolini	1523
Chemical Composition and Insecticidal Properties of Essential Oils of <i>Piper septuplinervium</i> and <i>P. submentosum</i> (Piperaceae) Mónica Constanza Ávila Murillo, Luis Enrique Cuca Suarez and Jairo Alonso Cerón Salamanca	1527
Chemical Composition of the Essential Oils from Vietnamese <i>Clausena indica</i> and <i>C. anisum-olens</i> Tran Huy Thai, Ophélie Bazzali, Tran Minh Hoi, Nguyen Thi Hien, Nguyen Viet Hung, Félix Tomi, Joseph Casanova and Ange Bighelli	1531
Chemical Constituents from <i>Sinningia canescens</i> and <i>S. warmingii</i> Maria Helena Verdan, Carlos Augusto Ehrenfried, Dilamara Riva Scharf, Armando Carlos Cervi, Marcos José Salvador, Andersson Barison and Maria Elida A. Stefanello	1535

Natural Product Communications

2014

Volume 9, Number 10

Contents

<u>Original Paper</u>	<u>Page</u>
Anti-obesity Effect of (8-E)-Nüzhenide, a Secoiridoid from <i>Ligustrum lucidum</i>, in High-fat Diet-induced Obese Mice Qing Liu, Sang Hyun Kim, Seon Beom Kim, Yang Hee Jo, Eun Sil Kim, Bang Yeon Hwang, Kyunghee Oh and Mi Kyeong Lee	1399
Antiproliferative and Antimalarial Sesquiterpene Lactones from <i>Piptocoma antillana</i> from Puerto Rico Yixi Liu, L. Harinantenaina Rakotondraibe, Peggy J. Brodie, Jessica D. Wiley, Maria B. Cassera, Michael Goetz and David G. I. Kingston	1403
Diterpene Foliar Exudates of <i>Blakiella bartsiiifolia</i> and Phytotoxicity of Clerodanes Diego Rodriguez-Hernandez, Alberto Oliveros-Bastidas, Miguel E. Alonso-Amelot and Maria Pia Calcagno-Pissarelli	1407
Variations of Carnosic acid and Carnosol Concentrations in Ethanol Extracts of Wild <i>Lepechinia salviae</i> in Spring (2008-2011) Cecilia Labbé, Francesca Faini, Daniela Calderón, Juanita Molina and Susana Arredondo	1413
One-pot Synthesis of Hollongdione from Dipterocarpol Irina E. Smirnova, Oxana B. Kazakova, Do Thi Thu Huong, El'za M. Minnibaeva, Alexandr N. Lobov and Kiryll Yu. Suponitsky	1417
Triterpene Glycosides from the Sea Cucumber <i>Cladolabes schmeltzii</i>. II. Structure and Biological Action of Cladolosides A₁-A₆ Alexandra S. Silchenko, Anatoly I. Kalinovsky, Sergey A. Avilov, Pelageya V. Andryjaschenko, Pavel S. Dmitrenok, Ekaterina A. Yurchenko, Igor Yu. Dolmatov, Alexander M. Savchenko and Vladimir I. Kalinin	1421
History of Gymnemic acid, a Molecule that does not Exist Armando Zarrelli, Valeria Romanucci, Raffaele Gravante, Cinzia Di Marino and Giovanni Di Fabio	1429
A New 1,6-Benzoxazocine-5-one Alkaloid isolated from the Aerial Parts of <i>Peristrophe lanceolaria</i> Wasana Prapalart, Dammrong Santiarworm, Saisunee Liawruangrath, Boonsom Liawruangrath and Stephen G. Pyne	1433
Comparative Analysis of Therapeutically Important Indole Compounds in <i>in vitro</i> Cultures of <i>Hypericum perforatum</i> Cultivars by HPLC and TLC Analysis Coupled with Densitometric Detection Bożena Muszyńska, Halina Ekiert, Inga Kwiecień, Anna Maślanka, Rawad Zodi and Ludger Beerhues	1437
Monoterpene Indole Alkaloids from the Twigs of <i>Kopsia arborea</i> Sarot Cheenpracha, Achara Raksat, Thunwadee Ritthiwigrom and Surat Laphookhieo	1441
Two New Alkaloids from <i>Melodinus suaveolens</i> Fan Lu, Pan Liu, Shan-Shan Yin, Jun Zhang and Jing Wang	1445
Streptomycin Hydrazone Derivatives: Synthesis and Molecular Recognition in Aqueous Solution Juan P. Fuentes-Martinez, Diana Gutiérrez-Rodríguez, Edgar Rogel García, Karla I. Rivera-Márquez, Felipe Medrano, Oscar Torres-Ángeles, Evelin Castillo-Vargas, Blanca E. Duque Montaña and Carolina Godoy-Alcántar	1449
Flavone Induces Cell Death in Human Hepatoma HepG2 Cells Glaucio Valdameri, Juliana C. N. Kenski, Vivian R. Moure, Marina Trombetta-Lima, Glauca R. Martinez, Mari C. Sogayar, Sheila M. B. Winnischofer and Maria E. M. Rocha	1457
Isolation, Identification and Usefulness of Antifungal Compounds from <i>Zuccagnia punctata</i> for Control of Toxicogenic Ear Rot Pathogens Cristina M. Jimenez, Diego A. Sampietro, Melina A. Sgariglia, José R. Soberón and Marta A. Vattuone	1461
Cell Cycle Control by Natural Phenols in Cisplatin-Resistant Cell Lines Daniela Catanzaro, Caterina Vianello, Eugenio Ragazzi, Laura Caparrotta and Monica Montopoli	1465
Identification and Evaluation of Flavone-glucosides Isolated from Barley Sprouts and their Inhibitory Activity against Bacterial Neuraminidase Mi Jin Park, Ji-Eun Ra, Kyung Hye Seo, Ki-Chang Jang, Sang-Ik Han, Jin-Hwan Lee, Young-Hwa Kang, Min-Hee Nam and Woo Duck Seo	1469
Polyphenol Composition and Antioxidant Capacity of Three <i>Lysimachia</i> Species Anita Toth, Gergo Toth and Agnes Kery	1473
Phenolic Content, Antioxidant and Astroprotective Response to Oxidative Stress of Ethanolic Extracts of <i>Mentha longifolia</i> from Sinai Tarek F. Eissa, Elena González-Burgos, M. Emilia Carretero and M. Pilar Gómez-Serranillos	1479
Chemical Constituents from <i>Pterocarpus soyauxii</i> Zushang Su, Ping Wang, Wei Yuan and Shiyong Li	1483
Antibacterial Compounds from the Roots of <i>Cratogeomys formosum</i> spp. <i>pruniflorum</i> Achara Raksat, Surat Laphookhieo, Sarot Cheenpracha, Thunwadee Ritthiwigrom and Wisanu Maneerat	1487
Stimulation of Phosphorylation of ERK and CREB by Phellopterin and Auraptene Isolated from <i>Citrus junos</i> Mitsuhiro Nakamura, Tomoko Suzuki, Mai Takagi, Hirotohi Tamura and Toshiya Masuda	1491
Isolation of (-)-Avenaciolide as the Antifungal and Antimycobacterial Constituent of a <i>Seimatosporium</i> sp. Endophyte from the Medicinal Plant <i>Hypericum perforatum</i> Trevor N. Clark, Amanda I. Bishop, Mark McLaughlin, Larry A. Calhoun, John A. Johnson and Christopher A. Gray	1495

Continued inside backcover



AkiNik

American Journal of Essential Oils and Natural Products

Available online at www.essencejournal.com

A
J
E
O
N
P
American
Journal of
Essential
Oils and
Natural
Products

ISSN: 2321 9114
AJEONP 2015; 2 (3): 01-05
© 2015 AkiNik Publications
Received: 01-10-2015
Accepted: 14-04-2015

Tran Huy Thai
Institute of Ecology and Biological
Resources, VAST, Hanoi, Vietnam

Ophélie Bazzali
Université de Corse-CNRS, UMR
6134 SPE, Equipe Chimie et
Biomasse, Route des Sanguinaires,
20000 Ajaccio, France.

Tran Minh Hoi
Institute of Ecology and Biological
Resources, VAST, Hanoi, Vietnam

Do Thi Minh
Institute of Ecology and Biological
Resources, VAST, Hanoi, Vietnam

Phan Ke Loc
Vietnam National University, Hanoi,
Vietnam

Nguyen Thi Thanh Nga
Vinh University, Hanoi, Vietnam

Félix Tomi
Université de Corse-CNRS, UMR
6134 SPE, Equipe Chimie et
Biomasse, Route des Sanguinaires,
20000 Ajaccio, France.

Joseph Casanova
Université de Corse-CNRS, UMR
6134 SPE, Equipe Chimie et
Biomasse, Route des Sanguinaires,
20000 Ajaccio, France.

Ange Bighelli
Université de Corse-CNRS, UMR
6134 SPE, Equipe Chimie et
Biomasse, Route des Sanguinaires,
20000 Ajaccio, France.

Correspondence:
Ange Bighelli
Université de Corse-CNRS, UMR
6134 SPE, Equipe Chimie et
Biomasse, Route des Sanguinaires,
20000 Ajaccio, France.

Chemical composition of the essential oil from *Cunninghamia konishii* Hayata growing wild in Vietnam.

Tran Huy Thai, Ophélie Bazzali, Tran Minh Hoi, Do Thi Minh, Phan Ke Loc, Nguyen Thi Thanh Nga, Félix Tomi, Joseph Casanova, Ange Bighelli

Abstract

The chemical composition of one oil sample of *Cunninghamia konishii* Hayata isolated from wood harvested in Hà Giang province (Vietnam), was investigated by chromatographic (GC with retention indices) and spectroscopic techniques (MS, ^{13}C NMR). Forty six compounds accounting for 88.4% of the oil have been identified. *C. konishii* wood produced sesquiterpene-rich essential oil, whose composition was dominated by α -cedrene (18.4%), cedrol (11.2%) and γ -eudesmol (8.8%). α -Terpineol (9.6%) was the major monoterpene. ^{13}C NMR appeared really useful for the identification of β -funebrene which co-eluted with α -cedrene and sesquithuriferol which co-eluted with cedrol.

Keywords: *Cunninghamia konishii*, wood oil, chemical composition, ^{13}C NMR, Vietnam.

1. Introduction

Cunninghamia genus (Cupressaceae family) comprises two species native from East Asia (Taiwan and China): *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) and *Cunninghamia konishii* Hayata [syn. *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook. var. *konishii* (Hay.) Fujita; *Cunninghamia kawakamii* Hayata].

Cunninghamia konishii is an endemic species to Taiwan, growing at altitudes from 1200 m to 2700 m. [1] recently, this species was discovered in the North of Laos. In Vietnam, specimens have been observed in Hà Giang, Thanh Hóa, Sơn La and Nghệ An provinces, in dense subtropical forest, mixed with *Fokienia hodginsii*, *Dacrydium pierrei*, and *Quercus bambusaefolia* [2]. In Vietnam, its vernacular name is Sa mộc dẫu.

C. konishii is a big tree, reaching 50 m height and 1.25 m in diameter with conical, dark green crown. Brown-red bark splits into thin scales. Leaves, 2-3 cm long and 0.5 cm wide, are densely concentrated at branch-tips. Male cones numerous, terminal, are enclosed by many green scales at the base. Female cones, 2-2.5 cm by 1.3 cm, globose or ovate, terminal, first green, later brown-reddish, consist of many scale-shaped carpels. Each carpel bears three winged seeds. This species differs from *C. lanceolata* by shorter leaves (2-3 cm), obtuse apex and smaller female cone (less than 3 cm in diameter).

C. konishii is considered as one of the five "precious" conifers in Taiwan. Its wood is used in the construction of houses. It is resistant to rot and termites. This species is considered as endangered due to over-exploitation and possible hybridization with *C. lanceolata*, introduced in plantations.

Phytochemicals belonging to various families of compounds have been isolated from solvent extracts of wood of *C. konishii*, including new compounds whose structures have been elucidated: various sesquiterpenes [3-5] such as konishiol, cadalenol, 3-cedranol, T-cadinol, cedrol, T-muurolol, and *epi*-cedrol among which cedrol, T-cadinol and T-muurolol may be considered as new natural antifungal agents [6]; numerous diterpenes bearing mostly the abietane or labdane skeleton [5-11]; sterols such as β -sitosterol and stigmasterol [3, 4], and various lignans [1, 5].

In comparison, only a few studies concerned the composition of essential oils. According to Cheng *et al.* [12], a pioneering work has been done as early as 1929 by Ikeda and Fujita who identified various monoterpenes and cedrol in wood oil of *C. konishii*. Recently, these

authors [12, 13] reported a composition dominated by cedrol (53.0%) and α -pinene (25.6%); α -cedrene (6.6%) and α -terpineol (4.4%) being present at substantial amounts. Wood oil of *C. konishii* and cedrol are effective as antifungal agents. Other results revealed that the same wood oil sample from *C. konishii* and its effective constituents served as a potential larvicide against the dengue mosquitoes. [13] A more or less similar composition has been reported for EO isolated from heart wood: cedrol (58.3%), α -cedrene (11.8%), α -terpineol (4.2%) and β -cedrene (3.5%) [14]. Antimicrobial activity and cytotoxic activity on human cancer cells have been evidenced. The active compound was determined to be cedrol. In contrast, monoterpenes were the main components of leaf oils. Indeed, α -pinene (36.4%) and α -thujene (11.4%) dominated the composition of Taiwanese leaf oil, accompanied by sesquiterpenes, α -eudesmol (8.1%), β -elemol (5.8%), β -elemene (3.5%), γ -eudesmol (2.8%) and γ -himachalene (2.7%). [15] In a second sample of Taiwanese origin, α -pinene (34.9%), *p*-cymene (16.7%) and γ -muurolene (11.4%) were the main components. [12] This leaf oil sample exhibited antifungal activities.

Finally, two studies concerned Vietnamese *C. konishii* wood oil. The composition of two oil samples isolated from plants harvested in Son La and Nghê An provinces, respectively, was dominated by cedrol (30.0% and 37.0%) while α -cedrene accounted for 4.5% and 5.3%, respectively. The two samples contained also a major component named β -penchyl alcohol (synonym, β -fenchyl alcohol, 16.1% and 27.5%, respectively) [16]. The third oil sample isolated from wood of *C. konishii* collected in Tay Con Linh Nature Reserve, Hà Giang province, differed drastically from the two former samples by the occurrence of α -terpineol (36.6%) and α -cedrol (29.8%) as major components and it was reported as a new chemotype. In contrast, β -fenchyl alcohol was not detected [17].

In continuation of our on-going work on the characterization of essential oil bearing plants from Vietnam, we report in the present study on the chemical composition of wood oil of *C. konishii*. Indeed, since previous works demonstrated that wood oil from Son La and Nghê An provinces exhibited similar composition which differed drastically from that of wood oil from Hà Giang province, we investigated the composition of wood oil from Thanh Hóa province, the fourth location where *C. konishii* grows wild in Vietnam. In order to avoid any misidentification of individual components which exhibit insufficiently resolved mass spectra (diastereoisomers for instance) or very close retention indices, qualitative and quantitative analysis of the oil sample has been carried out by combination of chromatographic (GC with retention indices) and spectroscopic techniques (MS, ^{13}C NMR).

2. Materials and methods

2.1 Plant Material and Essential Oil Production

Wood of *Cunninghamia konishii* was collected in April 2012 in Xuan Lien Nature Reserve, Thanh Hóa province (Vietnam). Wood (550g) was submitted to hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus (4 h) and yielded 2.65 mL of EO. Plant material has been authenticated by one of the authors, Dr Nguyen Thi Ha, Vietnam National University. Voucher specimen has been deposited at the herbarium of IERB under the accession Thai N° 06 (HN).

2.2 Analytical GC

GC analysis was carried out using a Clarus 500 Perkin Elmer apparatus equipped with FID and two fused-silica capillary columns (50 m x 0.22 mm, film thickness 0.25 μm), BP-1 (polymethylsiloxane) and BP-20 (polyethylene glycol). The oven temperature was programmed from 60 °C to 220 °C at 2 °C/min and then held isothermal at 220 °C for 20 min; injector temperature: 250 °C; detector temperature: 250 °C; carrier gas: helium (0.8 mL/min); split: 1/60. The relative proportions of the oil constituents were expressed as percentage obtained by peak area normalization, without using correction factors. Retention indices (RI) were determined relative to the retention times of a series of *n*-alkanes with linear interpolation («Target Compounds» software from Perkin Elmer).

2.3 GC-MS Analysis

GC-MS analyses were carried out using a Agilent Technologie 7890A detector (quadrupole), directly coupled to a Agilent Technologie 5975C, equipped with a fused-silica capillary column (30 m x 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 μm), HP-MS 5% phenylmethylsiloxane. Carrier gas, helium at 1 mL/min; split, 1:80; injection volume, 0.2 μL . The injection port was set at 250 °C; the oven temperature was programmed from 60 °C to 250 °C at 4 °C/min (52.5 min). Significant quadrupole MS operating parameters: Ion source temperature, 150 °C; electron impact ionization at 70 eV with scan mass range of 33-350 *m/z*.

2.4 ^{13}C NMR Analysis

NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 Fourier Transform spectrometer operating at 100.63 MHz for ^{13}C NMR, equipped with a 5 mm probe, in CDCl_3 , with all shifts referred to internal TMS. ^{13}C NMR spectra of the oil samples were recorded with the following parameters: pulse width = 4 μs (flip angle 45°); acquisition time = 2.7 s for 128K data table with a spectral width of 25 000 Hz (250 ppm); CPD mode decoupling; digital resolution = 0.183 Hz/pt. The number of accumulated scans was 3000 (50 mg of oil in 0.5 mL of CDCl_3).

2.5 Identification of Components

Identification of the individual components was based: (i) by comparison of their GC retention indices (RIs) on polar and apolar columns, determined relative to the retention times of a series of *n*-alkanes with linear interpolation with those of reference compounds (ii) on computer search using digital libraries of mass spectral data and comparison with literature [18-23], (iii) on comparison of the signals in the ^{13}C NMR spectra of essential oils with those of reference spectra compiled in the laboratory spectral library, with the help of a laboratory-made software. In the investigated samples individual components were identified by NMR at content as low as 0.3-0.4% [24-27].

3. Results & Discussion

Subjected to hydrodistillation, wood of *Cunninghamia konishii* furnished a pale yellow oil with a yield of 0.48% (v/w). The wood oil sample was analyzed by combination of chromatographic (GC/retention indices) and spectroscopic techniques, GC-MS and ^{13}C NMR following a computerized

method developed in our laboratory [24-27]. Forty six compounds, accounting for 88.4% of the whole composition have been identified (Table 1). All the main components have been identified by the three techniques. Most minor components have been identified by GC(RI) and GC-MS. A few minor components that co-eluted on the capillary column used to perform GC-MS analysis, have been identified by their RIs and by ^{13}C NMR.

The investigated sample of *C. konishii* wood oil may be considered quantitatively as a sesquiterpene-rich essential oil. Indeed, the identified monoterpene hydrocarbons accounted for only 3.3% of the whole composition. Oxygenated monoterpenes were present at higher content, 21.3%, with α -terpineol (9.6%) and borneol (4.4%) as main monoterpenes. Sixteen sesquiterpene hydrocarbons have been identified, identification of most of them being ensured by ^{13}C NMR. α -Cedrene (18.4%) was the major component of the oil sample, and it was accompanied by β -cedrene (5.2%) and their diastereoisomers α -funebrene (also known as 1,7-*di-epi*- α -cedrene, 1.4%) and β -funebrene (2.0%). Identification of cedrenes and funebrenes simultaneously present in an oil sample highlight perfectly the interest of using complementary analytical techniques (namely, SM and ^{13}C NMR) to perform the identification of individual components of sesquiterpene-rich essential oils. Indeed, cedrene and funebrene isomers differ only by the stereochemistry of the ring junction in the polycyclic tricyclo[5.3.1.0^{1,5}]undecane framework. They have super imposable mass spectra and their retention indices differ by a few units only [24]. For instance, α -funebrene was suggested by MS as α -cedrene. In parallel, β -funebrene was co-eluted with α -cedrene on the apolar capillary column used to perform GC-MS analysis. Therefore, its identification by MS was hazardous. Only six oxygenated sesquiterpenes have been identified. However, they accounted for 26.2% of the whole composition. Cedrol (11.2%) and γ -eudesmol (8.8%) were the main sesquiterpenols. Once again, it could be pointed

out that sesquithuriferol that co-eluted with cedrol on the capillary column used to carry out GC-MS experiment, was identified by ^{13}C NMR. Finally, ^{13}C NMR confirmed that β -elemene is a secondary metabolite present in the EO and not an artifact coming from the thermal rearrangement of germacrene A [28]. *C. konishii* wood oil contained also a phenylpropanoid, namely saffrole (0.7%) whose identification was ensured by the observation of characteristic signals (particularly those of the protonated carbons of the aromatic ring) in the ^{13}C NMR spectrum.

Comparison of the chemical composition of the investigated sample in the present work with those reported in the literature suggested some comments:

- Cedrol is much more abundant in the Taiwanese oil samples (53.0 and 58.3%) than in the Vietnamese ones (29.8-37.0% in published samples and 11.2% in the present work). In contrast, the content of α -cedrene is higher in our sample (18.4%) than in Taiwanese samples (6.6 and 11.8%) and in other Vietnamese ones (3.4-5.3%).
- Camphor and borneol were present at appreciable contents in all the samples;
- α -Terpineol was the main component of a Vietnamese oil sample (36.6%, Hà Giang province);
- α -Pinene was abundant (25.6%) only in one Taiwanese wood oil sample although it was the major component of leaf oil samples;
- Fenchol was one of the major components of two Vietnamese oil samples (16.1 and 27.5%) while its content was very low in all other investigated samples (0.1-1.8%);
- The three eudesmol isomers accounted for 2.8-8.8% in the present oil sample. They were much more abundant than in all the other samples (0.0-1.9%);
- Saffrole, β -funebrene, α -muurolene, β -bisabolene, β -elemol and sesquithuriferol were reported for the first time as components of *C. konishii* wood oil.

Table 1: Components of Vietnamese *Cunninghamia konishii* wood oil

N°	Components ^a	RI lit ^b	RIa ^c	RIp ^c	%	Identification
1	α -Thujene	932	924	1028	0.5	RI, MS
2	α -Pinene	936	932	1026	0.8	RI, MS, ^{13}C NMR
3	α -Fenchene	941	943	1062	0.1	RI, MS
4	Camphene	950	945	1072	0.3	RI, MS
5	Sabinene	973	966	1125	0.5	RI, MS, ^{13}C NMR
6	β -Pinene	978	972	1114	0.1	RI, MS
7	Myrcene	987	982	1163	0.1	RI, MS
8	1,4-Cineole	1012 ^d	1005	1180	0.1	RI, MS
9	<i>p</i> -Cymene	1015	1013	1273	0.6	RI, MS, ^{13}C NMR
10	Limonene *	1024	1022	1203	1.0	RI, MS, ^{13}C NMR
11	1,8-Cineole *	1025	1022	1211	0.4	RI, MS
12	β -Phellandrene *	1023	1022	1211		RI, MS
13	Fenchone	1069	1069	1398	1.0	RI, MS, ^{13}C NMR
14	Fenchol	1099	1100	1580	1.4	RI, MS, ^{13}C NMR
15	Terpin-3-en-1-ol	-	1118	nd	0.2	RI, MS
16	Camphor	1123	1122	1515	2.7	RI, MS, ^{13}C NMR
17	iso-Borneol	1142	1142	1665	1.0	RI, MS, ^{13}C NMR
18	Borneol	1150	1150	1697	4.4	RI, MS, ^{13}C NMR
19	Terpinen-4-ol	1164	1160	1603	tr	RI, MS
20	<i>p</i> -Cymen-8-ol	1169	1162	1843	0.2	RI, MS
21	α -Terpineol	1176	1174	1692	9.6	RI, MS, ^{13}C NMR
22	γ -Terpineol	1188	1180	1697	0.5	RI, MS, ^{13}C NMR
23	Piperitone	1226	1231	1734	tr	RI, MS

24	Safrole	1265	1263	1872	0.7	RI, MS, ¹³ C NMR
25	α -Copaene	1379	1381	1492	0.1	RI, MS
26	α -Funebrene	1385	1383	1506	1.4	RI, ¹³ C NMR
27	α -Duprezianene	1388	1386	1524	0.8	RI, MS, ¹³ C NMR
28	β -Elemene	1389	1388	1590	2.0	RI, MS, ¹³ C NMR
29	α -Cedrene*	1418	1415	1570	18.4	RI, MS, ¹³ C NMR
30	β -Funebrene*	1418	1415	1572	2.0	RI, ¹³ C NMR
31	β -Cedrene	1424	1420	1597	5.2	RI, MS, ¹³ C NMR
32	Thujopsene	1434	1430	1621	0.7	RI, MS, ¹³ C NMR
33	γ -Muurolene	1474	1470	1687	1.4	RI, MS, ¹³ C NMR
34	Selina-4,11-diene	1475	1474	1674	0.2	RI, MS
35	β -Selinene	1486	1482	1717	0.5	RI, MS, ¹³ C NMR
36	α -Muurolene	1496	1494	1722	0.5	RI, MS, ¹³ C NMR
37	Cuparene	1498	1500	1757	0.2	RI, MS
38	β -Bisabolene	1503	1507	1725	0.7	RI, MS, ¹³ C NMR
39	γ -Cadinene	1507	1514	1829	0.2	RI, MS
40	α -Calacorene	1527	1528	1912	0.2	RI, MS
41	β -Elemol	1541	1534	2073	1.5	RI, MS, ¹³ C NMR
43	Sesquithuriferol *	1592 ^e	1591	2107	0.4	RI, ¹³ C NMR
42	Cedrol*	1603	1591	2113	11.2	RI, MS, ¹³ C NMR
44	γ -Eudesmol	1618	1619	2177	8.8	RI, MS, ¹³ C NMR
45	β -Eudesmol	1641	1636	2242	3.0	RI, MS, ¹³ C NMR
46	α -Eudesmol	1653	1641	2233	2.8	RI, MS, ¹³ C NMR
	Total identified				88.4%	

^aOrder of elution and percentages of individual components are given on apolar (BP-1) capillary column except for compounds indicated by an asterisk, percentage on polar (BP-20) column. RIa, RIp: Retention indices measured on apolar and polar columns, respectively. RI lit: retention indices from reference [28] otherwise stated; ^d: reference [23]; ^e: reference [29]. Compounds 10, 11 and 12 were separated on the DB5 capillary column used to perform GC-MS analysis. nd = not determined.

4. Conclusions

In conclusion, according to our results and published data, it appears that *Cunninghamia konishii* essential oil isolated from wood harvested in four Vietnamese provinces exhibited various chemical compositions dominated either by monoterpenes (α -terpineol, β -fenchyl alcohol) or by sesquiterpenes (cedrol, α -cedrene). Therefore, it should be informative to investigate the chemical variability of Vietnamese *C. konishii* wood oil (chemical variability of genetic or pedo-climatic origin). This study could be carried out after normalization of the harvest procedure, essential oil isolation and analysis of oil samples by complementary analytical techniques.

5. Acknowledgments

The authors thank Nafosted for partial financial support (Project 106-NN. 03-2013.42). They are indebted to Dr. P. Paquet (Corsica Essences) for his help in GC-MS analysis.

6. References

- Chang CI, Li YC, Kuo CC, Chao CY, Chang HS, Wu JH *et al.* Two New Lignans from the Wood of *Cunninghamia konishii*. *Nat Prod Commun* 2013; 8:805-806.
- Le Sau. Vietnam Forest Trees. Agricultural publishing house, Hanoi, 1996, 21.
- Cheng YS, Tsai MD. Terpenes and sterols of *Cunninghamia konishii*. *Phytochemistry* 1972; 11:2108-2109.
- Cheng YS, Lin CS. Study of the extractive constituents from the wood of *Cunninghamia konishii* Hayata. *J Chin Chem Soc* 1979; 26:169-172.
- He K, Shi G, Zeng L, Ye Q, McLaughlin JL. Konishiol, a new sesquiterpene, and bioactive components from *Cunninghamia konishii*. *Planta Med* 1997; 63:158-160.
- Cheng SS, Chung MJ, Lin CY, Wang YN, Chang ST. Phytochemicals from *Cunninghamia konishii* Hayata Act as Antifungal Agents. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 2012; 60:124-128.
- Li YC, Kuo YH. Five New Diterpenoids from the Wood of *Cunninghamia konishii*. *J Nat Prod* 1998; 61:997-1000.
- Li YC, Kuo YH. Labdane-type diterpenoids from the wood of *Cunninghamia konishii*. *Chem Pharm Bull* 2002; 50:498-500.
- Chen YC, Li YC, Chiu HL, Cheng WY, Hong YH, Sung PJ *et al.* Diterpenoids from the Wood of *Cunninghamia konishii*. *Helvetica Chimica Acta* 2013; 96:2282-2287.
- Chen YC, Li YC, You BJ, Chang WT, Chao LK, Lo LC *et al.* Diterpenoids with Anti-Inflammatory Activity from the Wood of *Cunninghamia konishii*. *Molecules* 2013; 18:682-689.
- Chang CI, Li YC, Hong YH, Cheng WY, Chao CY, Tsuzuki M *et al.* Two new labdane-type diterpenes from the wood of *Cunninghamia konishii*. *Phytochemistry Letters* 2014; 7:107-110.
- Cheng SS, Lin CY, Gu HJ, Chang ST. Antifungal Activities and Chemical Composition of Wood and Leaf Essential Oils from *Cunninghamia konishii*. *Journal of Wood and Chemical Technology* 2011; 31:204-217.
- Cheng SS, Lin CY, Chung MJ, Liu YH, Huang CG, Chang ST. Larvicidal activities of wood and leaf essential oils and ethanolic extracts from *Cunninghamia konishii* Hayata against the dengue mosquitoes. *Industrial Crops Products* 2013; 47:310-315.
- Su YC, Hsu KP, Wang EI, Ho CL. Composition, anticancer, and antimicrobial activities *in vitro* of the heartwood essential oil of *Cunninghamia lanceolata* var.

- konishii* from Taiwan. Natural Product Communication 2012; 7:1245-1247.
15. Su YC, Ho CL, Wang EIC. Analysis of leaf essential oils from the indigenous five conifers of Taiwan. Flavour Frag Journal 2006; 21:447-452.
 16. Trần Huy Thái, Phùng Tuyết Hồng, NguyễnThị Minh. Chemical composition of the essential oils of *Cunninghamia konishii* Hayata from Vietnam. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 2007, 375-377.
 17. Dai DN, Hung NQ. Chemical composition of the essential oil from woods of *Cunninghamia konishii* Hayata from Hà Giang. J Biology (in Vietnamese) 2012; 34:469-472.
 18. McLafferty FW, Stauffer DB. Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM, version 3.10d. Wiley Registry of Mass Spectral Data, Edn 6. Palisade, Newfield, 1994.
 19. Joulain D, König WA. The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons. E. B.-Verlag, Hamburg, 1998.
 20. NIST/EPA/NIH. National Institute of Standards and Technology. PC Version 17 of the Mass Spectral Library. Perkin-Elmer Corporation, Saint Quentin, France, 1999.
 21. König WA, Hochmuth DH, Joulain D. Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils. Library of MassFinder 2.1. Institute of Organic Chemistry, Hamburg, 2001.
 22. MassFinder (version 3.0). In Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils, Hochmuth D (ed). Scientific Consulting, Hamburg, Germany, 2006.
 23. Adams RP. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. 4th edition. Allured, Carol Stream, 2007.
 24. Tomi F, Bradesi A, Bighelli A, Casanova J. Computer-aided identification of individual components of essential oils using Carbon-13 NMR spectroscopy. Journal Magnetic Resonance Analysis 1995; 1:25-34.
 25. Tomi F, Casanova J. ¹³C-NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from Labiatae. A review. Acta Horticulturae 2006; 723:185-192.
 26. Duquesnoy E, Castola V, Casanova J. Identification and quantitative determination of triterpenes in the hexane extract of *Olea europaea* L. leaves using ¹³C NMR spectroscopy. Phytochemical Analysis 2007; 18:347-353.
 27. Bighelli A, Casanova J. Analytical tools for analysing *Cymbopogon* oils. In “Essential Oil Bearing Grasses - Cymbopogons”, Akhila A (Ed.), CRC Press, London, 2009, 195-221.
 28. Ouattara ZA, Boti JB, Ahibo AC, Casanova J, Tomi F, Bighelli A. Analysis of *Cleistopholis patens* Leaf and Trunk Bark Oils Using Combined GC- Flame Ionisation Detection, GC-Retention Index, GC-MS and ¹³C-NMR. Phytochemical Analysis 2013; 24:574-580.
 29. Gonny M, Cavaleiro C, Salgueiro L, Casanova J. Analysis of *Juniperus communis* subsp. *alpina* needle, berry, wood and root oils by combination of GC, GC/MS and ¹³C-NMR. Flavour Fragrance Journal 2006; 21:99-106.

SUMMARY

In recent years products derived from plant biomass have become increasingly popular in many industries (aromatherapy, cosmetics, food, etc.). The aim of our study was twofold. First, it was to study the chemical composition of essential oils isolated from different species from Vietnam, adapting the analytical strategy to the complexity of the mixture. Secondly, we want to contribute to a better understanding of the volatiles by two species of the type *Myrtus*: *M. nivellei*, endemic in the Sahara, the chemical composition of the essential oil had never been previously described and *M. communis*, through the analysis of essential oils from different sources around the Mediterranean and their aroma.

The first part concerns the essential oils of 7 species from Vietnam. Among these, the essential oils of *Clausena indica*, *C. anisum-olens*, *Cunninghamia konishii*, *Asarum glabrum*, *A. cordifolium* et *Cupressus tonkinensis* (EO stems) were analysed by GC(RI), GC-MS and ¹³C NMR, without prior splitting. In contrast, the essential oils of *C. tonkinensis* (EO leaves) and *Xanthocyparis vietnamensis*, more complex than the preceding, required one or more fractionation steps by short open column chromatography of silica prior to analysis by GC(RI), GC-MS and ¹³C NMR and sometimes 2D NMR. This work has contributed to a better understanding of the chemical compositions of these essential oils and has enriched our NMR spectra library « Terpènes » of 8 compounds, two of which had never been identified or described in the literature: the 10-*epi*-nor- γ -eudesmen-11-one and the 12-hydroxy-isodihydroagarofuran.

The second and final part deals with essential oils of *M. nivellei* and of *M. communis*. The essential oil of leaves of *M. nivellei* was studied by combination of different techniques (CC, GC(RI), GC-MS and ¹³C NMR et 2D NMR). We identified 26 compounds representing 94.7% of the overall chemical composition, including the two major compounds are 1,8-cineole (37,5%) and limonene (25,0 %). We managed to determine the structure of two new compounds: The 1-hydroxy-1-(3-methylbutoxy)-2-acetoxy-3,5,5-trimethyl-3-cyclopentene (4,3%) et le 1-hydroxy-1-(3-methyl-2-butenoxy)-2-acetoxy-3,5,5-trimethyl-3-cyclopentene (0,9%). Finally, the essential oils of *M. communis* (65 samples) from Corsica and other areas of the Mediterranean (Algeria, Portugal, Morocco, Tunisia and Sardinia) were analyzed by GC(RI), GC-MS and ¹³C NMR, giving special importance to minority oxygenates. Four short chain esters, very rarely reported in the literature, have been systematically identified, regardless of the chemical group to which the essential oil belongs: the isobutyl isobutyrate, the isobutyl 2-methylbutyrate, the 2-methylbutyl isobutyrate and the 2-methylbutyle 2-methylbutyrate. Their individual contents vary from 0,1 to 2,2%. A sensory analysis has noted the contribution of these esters, with varying intensity, with a fruity top note from the essential oils of myrtle.

Key words : Essential oils, ¹³C NMR, Vietnam, *Myrtus nivellei*, *Myrtus communis*.

RIASSUNTU

I prudutti esciuti da a biomassa vegetale cunnoscenu dapoi qualch'anni un successu criscitivu in industrie svarie (aromaterapia, cosmetichi, agroalimentarie,...). L'oggettivu di u nostru studiu era doppiu. D'una parte, cunsistia in u studiu di a cumposizione chimiche d'olie essenziale scantate à parte da spezie svarie uriginarie di u Vietnam adattandu a strategia analitica à a cumplexità di l'imbuleghju. D'altra parte, vuliamu cuntribui à una meglior cunniscenza di i vulatili prudutti da duie spezie di generu *Myrtus*: *M. nivellei*, spezie endémica di u Sahara chì a cumposizione chimica di l'oliu ùn era micca stata discrita fin'à tandu è *M. communis*, attraversu à l'analisi d'oliu essenziale d'origine svarie di u cuntornu di u mediterraniu è u so aspettu ulfattivu.

A prima parte concerna l'oliu essenziale di 7 spezie uriginarie di u Vietnam. Trà queste, l'oliu essenziale di *Clausena indica*, *C. anisum-olens*, *Cunninghamia konishii*, *Asarum glabrum*, *A. cordifolium* è *Cupressus tonkinensis* (OE code) sò state analizzate da CPG(Ir), CPG-SM è RMN ¹³C, senza frazzionamentu capunanzu. Invece, l'olie essenziale di *C. tonkinensis* (OE fronde) è *Xanthocyparis vietnamensis*, più cumplesse che e prcidente, anu necessitatu una o dipiù tappe di frazzionamentu per chromatugraffia sopra culonna aperta di silicia nanzu à analisi da CPG(Ir), CPG-SM è RMN ¹³C è qualchi volte RMN 2D. Issu travagliu hà cusì cuntribuitu à una meglior cunniscenza di e cumposizione chimiche d'isse olie essenziale svarie è hà permessu d'arrichi a nostra biblioteca di spettri di RMN «Terpènes» di 8 cumposti da duve dui ùn eranu mai stati identificati, ni discritti in a literatura: a 10-épi-nor-y-eudesmén-11-one è u 12-hydroxy-isodihydroagarofurane.

A seconda è ultima parte hè cunsacrata à l'olie essenziale di *M. nivellei* è di *M. communis*. L'oliu essenziale di fronde di *M. nivellei* hè stata studiata assuciendu tecniche svarie (CC, CPG-SM, CPG(Ir), RMN ¹³C è RMN 2D). Avemu cusì identificatu 26 cumposti ripresentendu 94,7 % di a cumposizione chimica glubale, tra quelli i dui cumposti maghjuraritii sò u 1,8-cinéole (37,5 %) è u limonène (25,0 %). Simu parvenuti à stabili a struttura di dui cumposti novi: u 1-hydroxy-1-(3-méthylbutoxy)-2-acétoxy-3,5,5-triméthyl-3-cyclopentène (4,3 %) è u 1-hydroxy-1-(3-méthyl-2-butènoxy)-2-acétoxy-3,5-5-triméthyl-3-cyclopentène (0,9 %). In fine, l'olie essenziale di *M. communis* (65 campione) venuti di Corsica è d'altri lochi di u mediterraniu (Algeria, Portugalu, Marocu, Tunisia è Sardegna) sò stati analizzati da CPG-SM, CPG(Ir) è RMN ¹³C, purtandu un'impurtanza particolare à i cumposti ussiginati minuritarii. Quatri esters à catena corta, pocu o micca ripurtati in a literatura sò cusì stati identificati di modu sistematicu qualchi sia u gruppu chimicu à quale appartene l'oliu essenziale: l'isobutyrate d'isobutyle, u 2-méthylbutyrate d'isobutyle, l'isobutyrate de 2-méthylbutyle è u 2-méthylbutyrate de 2-méthylbutyle. E so prpurzione individuale svarianu da 0,1 à 2,2 %. Un'analisi sinsuriale hà permessu di nutà a cuntribuzione d'issi esters, c'una intensità svariabile, à a nota di capu chì sente a caspa di l'oliu essenziale di morta.

Parulle chjave : Olie essenziale, RMN ¹³C, Vietnam, *Myrtus communis*, *Myrtus nivellei*.

RESUME

Les produits issus de la biomasse végétale connaissent depuis quelques années un succès grandissant dans de nombreuses industries (aromathérapie, cosmétique, agroalimentaire, etc.). L'objectif de notre étude était double. D'une part, il s'agissait d'étudier la composition chimique d'huiles essentielles isolées à partir de différentes espèces originaires du Vietnam, en adaptant la stratégie analytique à la complexité du mélange. D'autre part, nous voulions contribuer à une meilleure connaissance des volatils produits par deux espèces du genre *Myrtus* : *M. nivellei*, espèce endémique au Sahara dont la composition chimique de l'huile essentielle n'avait jamais été décrite jusqu'alors et *M. communis*, à travers l'analyse d'huiles essentielles de différentes provenances du pourtour méditerranéen et leur aspect olfactif.

La première partie concerne les huiles essentielles de 7 espèces originaires du Vietnam. Parmi celles-ci, les huiles essentielles de *Clausena indica*, *C. anisum-olens*, *Cunninghamia konishii*, *Asarum glabrum*, *A. cordifolium* et *Cupressus tonkinensis* (HE tiges) ont été analysées par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ¹³C, sans fractionnement préalable. En revanche, les huiles essentielles de *C. tonkinensis* (HE feuilles) et *Xanthocyparis vietnamensis*, plus complexes que les précédentes, ont nécessité une ou plusieurs étapes de fractionnement par chromatographie sur colonne ouverte de silice avant analyse par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ¹³C et parfois RMN 2D. Ce travail a ainsi contribué à une meilleure connaissance des compositions chimiques de ces différentes huiles essentielles et a permis d'enrichir notre bibliothèque de spectres de RMN « Terpènes » de 8 composés, dont deux n'avaient jamais été identifiés, ni décrits, dans la littérature : la 10-épi-nor-γ-eudesmén-11-one et le 12-hydroxy-isodihydroagarofurane.

La deuxième et dernière partie est consacrée aux huiles essentielles de *M. nivellei* et de *M. communis*. L'huile essentielle de feuilles de *M. nivellei* a été étudiée par combinaison de différentes techniques (CC, CPG-SM, CPG(Ir), RMN ¹³C et RMN 2D). Nous avons ainsi identifié 26 composés représentant 94,7 % de la composition chimique globale, parmi lesquels les deux composés majoritaires sont le 1,8-cinéole (37,5 %) et le limonène (25,0 %). Nous sommes parvenus à déterminer la structure de deux nouveaux composés : le 1-hydroxy-1-(3-méthylbutoxy)-2-acétoxy-3,5,5-triméthyl-3-cyclopentène (4,3 %) et le 1-hydroxy-1-(3-méthyl-2-buténoxy)-2-acétoxy-3,5,5-triméthyl-3-cyclopentène (0,9 %). Enfin, les huiles essentielles de *M. communis* (65 échantillons) provenant de Corse et d'autres localités du bassin méditerranéen (Algérie, Portugal, Maroc, Tunisie et Sardaigne) ont été analysées par CPG-SM, CPG(Ir) et RMN ¹³C, en accordant une importance particulière aux composés oxygénés minoritaires. Quatre esters à chaîne courte, très rarement reportés dans la littérature, ont ainsi été systématiquement identifiés, quel que soit le groupe chimique auquel l'huile essentielle appartient : l'isobutyrate d'isobutyle, le 2-méthylbutyrate d'isobutyle, l'isobutyrate de 2-méthylbutyle et le 2-méthylbutyrate de 2-méthylbutyle. Leurs teneurs individuelles varient de 0,1 à 2,2 %. Une analyse sensorielle a permis de noter la contribution de ces esters, avec une intensité variable, à la note de tête fruitée des huiles essentielles de myrte.

Mots clés : Huiles essentielles, RMN ¹³C, Vietnam, *Myrtus nivellei*, *Myrtus communis*.