



HAL
open science

CONTRIBUTION DE LA RMN 13C A L'ANALYSE D'HUILES ESSENTIELLES ET D'OLEORESINES : CARACTERISATION DE GENEVRIERS ET DU PIN MARITIME DE CORSE

Joséphine Ottavioli

► **To cite this version:**

Joséphine Ottavioli. CONTRIBUTION DE LA RMN 13C A L'ANALYSE D'HUILES ESSENTIELLES ET D'OLEORESINES : CARACTERISATION DE GENEVRIERS ET DU PIN MARITIME DE CORSE. Chimie. Université Pascal Paoli, 2009. Français. NNT: . tel-00604382

HAL Id: tel-00604382

<https://theses.hal.science/tel-00604382>

Submitted on 28 Jun 2011

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

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

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

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE CORSE

Discipline : Chimie Organique et Analytique

présentée et soutenue publiquement

par

Joséphine OTTAVIOLI

le xx-xx-2009

**CONTRIBUTION DE LA RMN ¹³C A L'ANALYSE
D'HUILES ESSENTIELLES ET D'OLEORESINES :
CARACTERISATION DE GENEVRIERS
ET DU PIN MARITIME DE CORSE**

Directeur de thèse : Pr. Ange BIGHELLI

JURY

Mme C. Menut
M. C. Cavaleiro
Mme A. Judzentiene
M. A. Bighelli
M. J. Costa
M. F. Tomi

Professeur, Université de Montpellier (Rapporteur)
Professeur, Université de Coïmbra (Rapporteur)
Chercheur, Institut de Chimie, Vilnius
Professeur, Université de Corse
Professeur, Université de Corse
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 au sein de l'UMR 6134 « Sciences pour l'Environnement »), dirigée par le Professeur Joseph CASANOVA, sous la direction du Professeur Ange BIGHELLI.

Je tiens à leur exprimer ma profonde reconnaissance. Leur grande expérience et leurs précieux conseils ont permis la réalisation de cette thèse. J'ai été très sensible à leur grande disponibilité et à la confiance qu'ils ont bien voulu m'accorder. Qu'ils veuillent bien trouver ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

Je suis sensible à l'honneur que me font Madame le Professeur Chantal MENUT (Université de Montpellier II) et Monsieur le Professeur Carlos CAVALEIRO (Université de Coïmbra, Portugal) 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 Monsieur le Professeur Jean COSTA (Université de Corse) et Madame Asta JUDZENTIENE qui ont accepté de participer à cette Commission d'Examen trouve ici l'expression de mes sincères remerciements pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ce travail.

Je remercie l'Agence de Développement Economique de la Corse de la Collectivité Territoriale de Corse pour m'avoir attribuée une bourse qui m'a permis de réaliser cette thèse. J'adresse de chaleureux remerciements à Madame OTTAVY pour sa grande gentillesse et son soutien constant.

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à Mesdames Pascale BRADESI, et Dominique de ROCCA SERRA (Maîtres de Conférences à l'Université de Corse), pour leur gentillesse, leur soutien, leurs encouragements et leur amitié.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur Félix TOMI (Université de Corse) ainsi qu'à Monsieur Vincent CASTOLA (Maître de Conférences à l'Université de Corse) pour leur disponibilité, leurs nombreux conseils et leur sympathie.

Je tiens à remercier aussi les membres de l'équipe « Chimie des produits naturels », en particulier Messieurs Jean-Marie DESJOBERT et Julien PAOLINI, pour leur aide dans l'analyse des spectres de masse.

Que Monsieur Madame Laetitia HUGOT (Responsable du conservatoire botanique de Corse) et Christophe PANAIOTIS (Office de l'Environnement de Corse)

trouve ici l'expression de ma gratitude pour avoir participé à la récolte et à l'identification des genévriers de Corse.

Je tiens également à remercier Gilles NOTTON, Philippe POGGI et Marc MUSELLI de l'équipe « Système à Sources Renouvelables d'Énergie », Monsieur Jean-Claude ROMANO (Directeur de recherche au CNRS) pour leur sympathie, leur gentillesse et leur bonne humeur.

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

Un grand merci à Messieurs Mathieu PAOLI, Kai LIU et Sylvain SUTOUR, Doctorants à l'Université de Corse, pour leur gentillesse, leur soutien moral, les fous rires partagés et l'intérêt qu'ils ont toujours porté à ce travail. Qu'ils trouvent ici l'assurance de mon amitié sincère.

Merci également à mes camarades de l'équipe « Chimie et Biomasse », Muriel, Dominique, Emilie, Jean-Brice, Don-Antoine ainsi que mes camarades de physique Rachel, Fabrice, Ludmil et Owen pour leur sympathie et leur soutien amical.

Enfin, je ne saurais terminer sans remercier l'ensemble de ma famille ainsi que mes amis, en particulier Pierre, Paola, Isabelle, Marion, Angélique, Fanny, Emilie et Alexandra pour leur patience, leurs encouragements, et leur soutien de tous les instants. Je profite de l'occasion qui m'est ainsi donnée pour leur faire part de mon profond attachement et les assurer de toute mon affection.

SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>CHAPITRE I : LES METHODES D'IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS DANS UN MELANGE NATUREL</u>	6
I. ANALYSE PAR DES COUPLAGES EN « LIGNE » : VOIE A.....	9
I. 1. La CPG et les couplages de la CPG avec les techniques spectroscopiques.	9
I.1.1. La CPG.....	9
I.1.2. Les couplages CPG-SM, CPG-SM(ICP), CPG-SM(ICN) et CPG-SM- SM.....	10
I.1.3. La CPG bidimensionnelle.....	13
I.1.4. Les couplages CPG-IRTF et CPG-IRTF-SM.....	14
I. 2. Les couplages de la CLHP avec les techniques spectroscopiques.....	14
I.2.1. Les couplages CLHP-SM et CLHP-SM-SM.....	14
I.2.2. Le couplage CLHP-CPG-SM.....	15
I.2.3. Le couplage CLHP-RMN ¹ H.....	15
II. IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS APRES PURIFICATION : VOIE B.....	17
III. ANALYSE PAR RMN ¹³ C SANS SEPARATION PREALABLE.....	19
III. 1. Historique.....	19
III. 2. Intérêt de la RMN ¹³ C pour l'analyse des mélanges complexes.....	19
III. 3. Identification des constituants en mélange.....	20
III.3.1. Observation des signaux.....	21
III.3.2. Individualisation des signaux.....	22
III.3.3. Attribution des signaux dans le spectre d'un mélange complexe.....	23
III.4. Quantification par RMN.....	27

IV. LA METHODE DEVELOPPEE AU LABORATOIRE.....	30
IV. 1. Principe.....	30
IV. 2. Domaines d'application.....	35
IV.2.1. Huiles essentielles	36
IV.2.2. Extraits végétaux et résines	37
IV.2.3. Biocombustibles.....	39
IV.2.4. Huiles végétales.....	39
IV.2.5. Molécules qui co-éluent.....	40
IV.2.6. Identification de stéréoisomères.....	42
IV.2.7. Identification et quantification de molécules thermosensibles.....	42
IV.2.8. Combinaison de la chromatographie sur colonne et de la RMN ¹³ C..	43
IV.2.9. Combinaison de l'hémisynthèse et de la RMN ¹³ C.....	43
IV.2.10. Application à la variabilité chimique.....	44
IV.2.11. Enantiométrie.....	44
V. PROBLEMATIQUE.....	45

**CHAPITRE II : QUELQUES EXEMPLES D'APPLICATION DE LA
 RMN ¹³C A L'ANALYSE DES MELANGES :
 HUILES ESSENTIELLES, EXTRAITS DE PARFUM..... 47**

I. ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES DE TROIS ESPECES DE <i>CYMBOPOGON</i> DU VIET-NAM.....	48
I. 1. <i>Cymbopogon winterianus</i>	49
I.1.1. Huile essentielle de <i>C. winterianus</i> , échantillon n°1 : illustration de l'analyse par RMN ¹³ C et CPG(Ir).....	50
I.1.2. Huile essentielle de <i>C. winterianus</i> , échantillon n°2 : complémentarité entre la RMN ¹³ C et la spectrométrie de mass.....	53
I. 2. <i>Cymbopogon flexuosus</i>	55
I.2.1. Analyse de l'échantillon <i>Cf1</i>	56
I.2.2. Etude de l'échantillon <i>Cf2</i> : fractionnement par chromatographie sur colonne de silice et analyse par RMN ¹³ C, CPG(Ir) et CPG-SM.....	57
I. 3. Huile essentielle de <i>C. tortilis</i> : analyse par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ¹³ C.....	63

II. VARIABILITE CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES D'HYBRIDES CLEMENTINIER COMMUN X MANDARINIER WILLOW LEAF.....	65
II. 1. Généralités sur les agrumes.....	65
II.1.1. Les agrumes.....	65
II.1.2. Reproduction sexuée et hybridation somatique.....	67
II.1.3 Objectif de l'étude.....	69
II. 2. Composition chimique des huiles essentielles de zestes d'hybrides clémentinier commun x mandarinier Willow Leaf.....	70
III. QUANTIFICATION DU DIPROPYLENE GLYCOL PAR RMN ¹³ C.....	74
III. 1. Caractérisation par RMN ¹³ C des trois isomères du DPG.....	76
III. 2. Analyse quantitative.....	78
III.2.1. Détermination des paramètres d'enregistrement des spectres.....	79
III.2.2. Validation de la méthode de quantification.....	80
III.2.3. Quantification du DPG dans deux huiles essentielles dopées.....	83
III.2.4. Application à l'analyse du dipropylène glycol dans deux échantillons commerciaux d'extraits de parfum.....	84

CHAPITRE III : LES HUILES ESSENTIELLES DE *JUNIPERUS* DE CORSE.....

I. <i>JUNIPERUS THURIFERA</i> L.....	87
I. 1. Etude bibliographique et objectif du travail.....	89
I. 2. Analyse des trois échantillons d'huile essentielle de feuilles.....	90
I. 3. Variabilité de l'huile essentielle de feuilles de <i>Juniperus thurifera</i>	92
II. <i>JUNIPERUS OXYCEDRUS</i> SSP. <i>MACROCARPA</i>	97
II. 1. Etude bibliographique.....	98
II. 2. Caractérisation des échantillons d'huile essentielle d'aiguilles.....	100

II. 3. Composition chimique des huiles essentielles de baies.....	105
III. <i>JUNIPERUS COMMUNIS</i> VAR. <i>COMMUNIS</i>	107
III. 1. Etude bibliographique.....	108
III. 2. Composition chimique des huiles essentielles d'aiguilles.....	110
III. 3. Les huiles essentielles de baies.....	113
IV. <i>JUNIPERUS COMMUNIS</i> SSP. <i>ALPINA</i>	116
IV. 1. Etude bibliographique.....	117
IV. 2. Comparaison de la composition chimique de l'huile essentielle obtenue par Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-Ondes (ESSAM) et par Hydrodistillation.....	119
IV. 3. Variabilité chimique de l'huile essentielle d'aiguilles.....	124

**CHAPITRE IV : CARACTERISATION CHIMIQUE DE L'HUILE
ESSENTIELLE ET DE L'OLEORESINE DE
PINUS PINASTER DE CORSE.....**

.....	130
I. <i>PINUS PINASTER</i> AITON.....	131
I. 1. Localisation et description.....	131
I. 2. Propriétés naturelles et emplois.....	132
II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	133
II. 1. Les huiles essentielles de <i>Pinus pinaster</i> Ait.....	133
II. 2. Les résines de <i>Pinus pinaster</i> Ait.	135
III. LES HUILES ESSENTIELLES DE <i>PINUS PINASTER</i>	139
III. 1. Analyse d'un échantillon d'huile essentielle d'aiguilles par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ¹³ C.....	139

III. 2. Analyse détaillée suite à un fractionnement.....	141
III.2.1. Etude de la fraction hydrocarbonnée.....	141
III.2.2. Etudes des fractions oxygénées.....	142
III.2.3. Fractionnement d'une huile essentielle au cours de l'hydrodistillation.....	144
III.2.4. Identification des constituants oxygénés de l'huile essentielle de <i>P.</i> <i>pinaster</i> à partir des données de la littérature.....	149
III. 3. Bilan de l'analyse détaillée de l'huile essentielle d'aiguilles de pin maritime de Corse.....	152
III. 4. Variabilité chimique.....	154
IV. LES RESINES DE PIN MARITIME.....	159
IV. 1. Identification et quantification des acides résiniques des oléoresines du pin maritime.....	159
IV. 2. Identification et quantification du pinorésinol.....	164
IV. 3. Variabilité chimique des fractions acides d'oléorésine de pin maritime de Corse.....	168
<u>CONCLUSION</u>	172
<u>PARTIE EXPERIMENTALE</u>	178
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	184
 <u>ANNEXES</u>	
ANNEXE A : Compositions chimiques des échantillons appartenant au groupe 1	
ANNEXE B : Compositions chimiques des échantillons appartenant au groupe 2	
ANNEXE C : Classification des hybrides par rapport à leurs parents (clémentine = 1 ou mandarine = 2) d'après la composition chimique de leurs huiles essentielles	
ANNEXE D : Carte d'échantillonnage des <i>Juniperus</i> de Corse	
ANNEXE E : Composition chimique des 109 échantillons d'huile essentielle de <i>J.</i> <i>communis</i> ssp. <i>alpina</i>	
ANNEXE F : Composition chimique des 46 échantillons d'huile essentielle de <i>Pinus</i> <i>pinaster</i> de Corse	

INTRODUCTION

La biomasse végétale peut être utilisée à la fois comme vecteur énergétique (biocombustibles et biocarburants) et comme source de produits industriels à forte valeur ajoutée (extraits végétaux, résines et huiles essentielles). Ce travail de thèse, financé par l'Agence pour le Développement Economique de la Corse (ADEC) de la Collectivité Territoriale de Corse, est réalisé dans le cadre des recherches auxquelles se consacre, depuis une vingtaine d'années, l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse. Ces travaux s'inscrivent dans le thème « Ressources Naturelles » de l'UMR Université de Corse-CNRS 6134 « Sciences Pour l'Environnement » (SPE). L'objectif général est de contribuer à augmenter la rentabilité économique de la biomasse en caractérisant les produits qui en sont issus en vue de leur valorisation. Dans la plupart des cas, les produits obtenus sont des mélanges complexes pouvant renfermer une centaine (et parfois plus) de constituants. Or, la valorisation de ces produits nécessite une connaissance précise de leur composition chimique, permettant de les caractériser, d'en contrôler la qualité et de mettre en évidence une éventuelle spécificité. Ces deux derniers points sont tout particulièrement importants dans le cas de produits originaires d'une région insulaire comme la Corse. En effet, étant donné l'étroitesse du marché, l'accent doit être mis beaucoup plus sur la qualité du produit que sur la quantité et dans ce contexte, l'existence d'un particularisme peut constituer un atout lors de la commercialisation.

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

- La première voie est basée sur le couplage en ligne d'une ou plusieurs techniques chromatographiques, permettant d'individualiser les constituants, avec une ou plusieurs techniques spectroscopiques qui conduit à leur identification par comparaison de leurs données spectrales avec celles de produits de référence contenues dans une bibliothèque de spectres. Ainsi la CPG-SM, associée à l'utilisation des indices de rétention, est sans conteste la technique la plus couramment employée pour l'analyse de routine des huiles essentielles. Cependant, lorsque les constituants à identifier ont des structures très proches (stéréoisomères), des indices de rétention très

voisins ou des spectres de masse insuffisamment différenciés, il faut alors multiplier les analyses afin de garantir un résultat fiable.

- Une autre stratégie d'analyse consiste à purifier chacun des constituants (en général par chromatographies successives, Chromatographie sur colonne (CC), Chromatographie sur couche mince (CCM), Chromatographie liquide haute performance (CLHP), Chromatographie phase gazeuse préparative (CPGP)) avant d'effectuer une étude structurale par diverses techniques spectroscopiques : UV, IRTF, SM et RMN ^1H et ^{13}C , RMN bidimensionnelle. Cette démarche, qui s'apparente à celle mise en œuvre pour la caractérisation de nouvelles molécules, est reconnue pour sa fiabilité, en partie grâce à la RMN ^{13}C qui apporte des informations extrêmement précieuses sur le squelette carboné de la molécule. Toutefois, elle requiert un investissement en temps important du fait des multiples étapes de séparation nécessaires pour atteindre un degré de pureté suffisant des constituants.

Parallèlement, l'utilisation de la RMN ^{13}C comme outil analytique a connu ces dernières années un essor important dans plusieurs domaines. Ainsi, à la suite des travaux de Formáček et Kubeczka qui utilisaient la RMN ^{13}C pour confirmer la présence d'un composé préalablement identifié (ou suggéré) par SM ou par les indices de rétention, l'équipe « Chimie et Biomasse » a mis au point et développé une méthode d'analyse basée sur la RMN ^{13}C , permettant l'identification des constituants des mélanges complexes sans purification préalable. Le principe de cette méthode repose sur la comparaison, à l'aide d'un logiciel d'aide à l'identification, des raies de résonance du spectre du mélange avec celles de composés purs contenus dans une bibliothèque de spectres de référence.

Dans un premier chapitre, nous avons réalisé une synthèse bibliographique des principales techniques d'analyse des mélanges naturels. Nous décrivons les techniques d'analyse conventionnelles utilisées dans le domaine des huiles essentielles et nous mettons en évidence, à travers divers exemples, leurs avantages et leurs limites. Nous avons insisté plus particulièrement sur la RMN du ^{13}C , utilisée non pas comme outil d'élucidation structurale mais comme outil d'analyse des mélanges. Nous nous sommes attachés à démontrer la spécificité de cette technique ainsi que sa

complémentarité avec les autres techniques d'analyse, ces deux aspects étant illustrés par des exemples provenant des travaux réalisés au laboratoire.

Le deuxième chapitre comporte trois parties, chacune d'elles présente un aspect différent de l'utilisation de la RMN pour l'analyse des mélanges naturels.

- Ainsi, l'analyse par RMN ^{13}C , combinée lorsque cela était nécessaire à la CPG-SM et à la chromatographie sur colonne, a permis la caractérisation de différentes huiles essentielles du genre *Cymbopogon* mettant ainsi en évidence l'intérêt de la complémentarité des méthodes d'analyse.

- La seconde partie concerne des travaux réalisés en collaboration avec l'INRA de San Ghjulianu et s'inscrit dans la continuité de l'étude des huiles essentielles de feuilles des hybrides, entre la clémentine commune et la mandarine Willow Leaf déjà menée au laboratoire. Il s'agit plus précisément d'examiner la composition chimique des huiles essentielles de zestes de ces mêmes hybrides, produits quelques années plus tard et de les comparer à celles des huiles essentielles de feuilles correspondantes analysées précédemment. L'idée développée étant de savoir s'il existe une relation entre ces deux compositions et donc de déterminer si on peut utiliser les feuilles de jeunes plants pour prévoir la qualité aromatique des fruits à venir.

- Enfin, dans une troisième partie, nous avons détaillé la mise au point d'une méthode de quantification, par RMN ^{13}C , du dipropylène glycol, produit industriel très employé dans l'industrie cosmétique. Nous avons appliqué ensuite cette méthode à sa quantification dans deux « extraits de parfums ».

Le travail présenté dans le troisième chapitre s'inscrit dans le cadre de la caractérisation des genévriers de Corse à travers la composition chimique de leurs huiles essentielles. Dans ce but, nous nous sommes intéressés aux trois espèces qui n'avaient pas encore fait l'objet d'études. Ainsi, nous avons préparé et analysé les huiles essentielles de *Juniperus thurifera* et de *Juniperus communis* ssp. *communis*, qui sont des espèces très localisées en Corse, de même que celles de *Juniperus oxycedrus* ssp. *macrocarpa* qui est une espèce protégée. Parallèlement, il nous a paru intéressant de compléter l'étude de la variabilité chimique des huiles essentielles de

Juniperus communis ssp. *alpina*, précédemment initiée au laboratoire, par un échantillonnage plus important. En effet, cette huile essentielle fait l'objet d'une production et d'une commercialisation.

Le dernier chapitre est consacré au pin maritime (*Pinus pinaster* Aiton) qui est largement répandu en Corse et qui est exploité pour la qualité du bois. Nous décrivons l'analyse détaillée par RMN ^{13}C et CPG-SM d'un échantillon d'huile essentielle d'aiguilles. Ensuite, nous examinons la variabilité chimique intraspécifique de cette huile essentielle à travers l'analyse de 46 échantillons récoltés dans les principaux massifs forestiers de l'île. Enfin, nous reportons l'étude de la fraction acide de 23 échantillons d'oléorésines de ce pin, réalisée par RMN ^{13}C .

Chapitre I

**LES METHODES D'IDENTIFICATION
DES CONSTITUANTS
DANS UN MELANGE NATUREL**

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels obtenus par entraînement à la vapeur ou par expression à froid de certaines espèces végétales. La composition de ces mélanges est généralement dominée par des substances mono- ou sesquiterpéniques, plus rarement diterpéniques, et parfois par des phénylpropanoïdes. Les huiles essentielles trouvent des emplois dans des secteurs assez divers, principalement en parfumerie, en cosmétique et font aussi l'objet d'une consommation importante de la part des industries agroalimentaires ou elles sont appréciées pour leurs propriétés organoleptiques. D'autres produits naturels, ont des utilisations spécifiques. Ainsi, les oléorésines de pins fournissent par distillation à la vapeur d'eau l'essence de térébenthine, utilisée comme solvant ou comme matière première pour la synthèse d'arômes, et la colophane (résidu de distillation) qui entre dans la composition d'adhésifs, de peintures, et de vernis.

La valorisation et/ou la commercialisation de ces produits naturels quelle que soit leur application, est en général précédée d'une étape de caractérisation qui inclut l'étude de leur composition chimique. Ce travail délicat nécessite de disposer d'outils analytiques rapides et fiables, chacun d'eux possédant sa spécificité et son domaine d'application. Cependant, l'identification et la quantification des constituants d'un mélange naturel demeurent toujours des opérations délicates qui nécessitent souvent l'utilisation conjointe de plusieurs techniques analytiques complémentaires (Coleman et Lawrence 1997 ; Joulain, 1994).

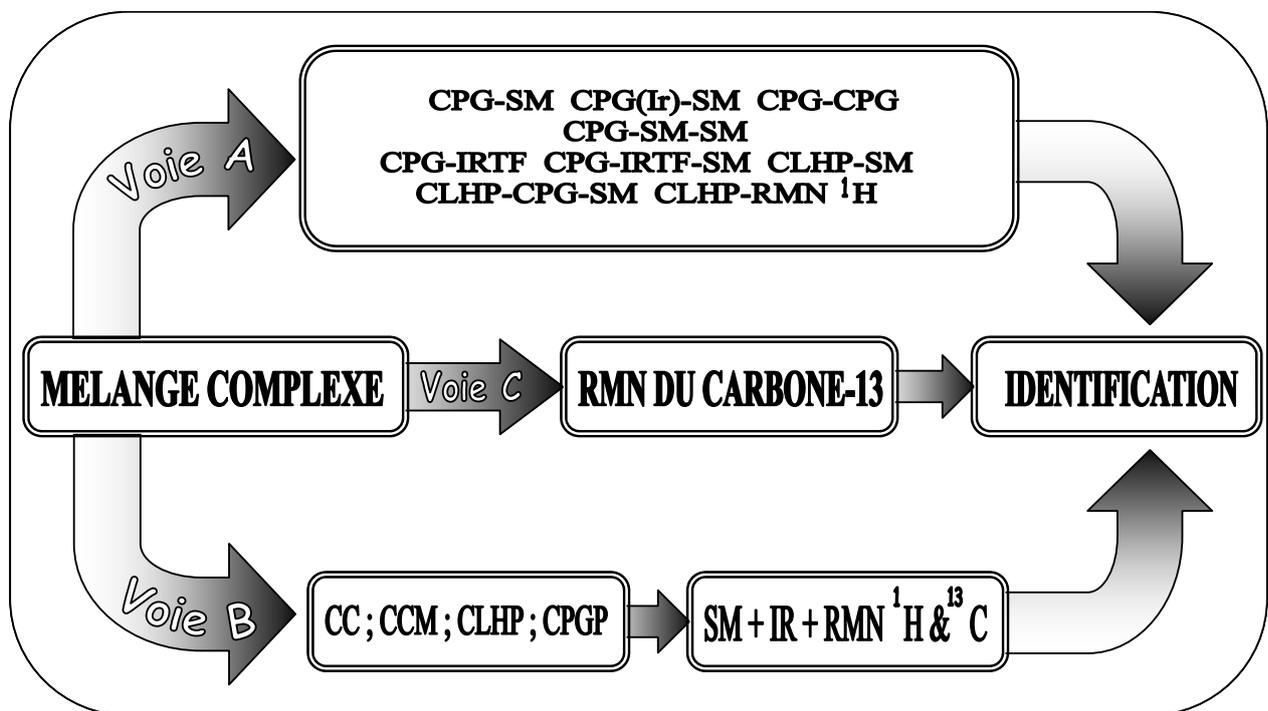
De manière conventionnelle, l'étude de la composition chimique d'un mélange naturel complexe peut être réalisée selon différentes voies (Figure 1):

- La voie A est particulièrement bien adaptée aux analyses de routine (par exemple, contrôle de la qualité) d'échantillons d'huiles essentielles ou d'extraits végétaux dont les constituants ont déjà été décrits dans la littérature. Elle fait intervenir le couplage « en ligne » d'une technique chromatographique (CPG, CLHP), qui permet l'individualisation et la quantification des constituants, avec une technique spectroscopique (SM, IRTF, ...), qui permet leur identification par combinaison de leurs données spectrales avec celles de produits connus.

▪ La voie B, en deux étapes, s'impose lorsque les constituants d'un mélange présentent des difficultés d'identification (structures complexes et/ou très proches). Ainsi, le travail d'analyse comporte une étape préalable de purification de tous les composés par différentes techniques chromatographiques suivie d'une étude spectroscopique, incluant la RMN du proton et du carbone-13, en vue de leur identification.

▪ Enfin, l'analyse peut également être menée selon la voie C (Figure I. 1), plus récente, 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 également être employée pour la quantification des constituants lorsque celle-ci ne peut être réalisée par les méthodes usuelles.

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



I. ANALYSE PAR DES COUPLAGES « EN LIGNE » : VOIE A

I. 1. La CPG et les couplages de la CPG avec les techniques spectroscopiques

I. 1. 1. La CPG

La CPG, dont les premières applications datent des années 40, est une technique analytique très sensible et très répandue dans l'analyse des mélanges complexes de constituants volatils. C'est une méthode de séparation des composés qui est utilisée dans le cas des molécules naturellement volatiles, mais aussi des molécules qui, par des réactions de dérivatisation (acétylation, silylation), sont rendues volatiles à des températures ne provoquant pas leur décomposition (Bielicka-Daszkiewicz *et al.*, 2004 ; Rojas-Escudero *et al.*, 2004). Cette technique de séparation fait partie des plus utilisées, notamment dans le domaine des huiles essentielles car elle permet l'individualisation des constituants avec des échantillons en quantité inférieure au milligramme. De plus, elle permet une grande adaptabilité par un grand choix de phases stationnaires, de températures (isotherme ou programmée) et de débit de phase mobile celle-ci pouvant être l'hélium, l'argon, l'azote, le dioxyde de carbone ou l'hydrogène.

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

Les indices de rétention, plus fiables que les temps de rétention, sont privilégiés pour l'analyse d'huiles essentielles. Ils sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcane linéaires à température constante (Indice de Kováts, IK)

(Kováts, 1965) ou en programmation de température (Indices de Rétention, Ir). Les indices de rétention expérimentaux sont comparés avec ceux de composés de référence, mesurés sur deux colonnes capillaires de polarité différente. Cependant, pour un même composé, il est fréquent de constater des écarts, parfois importants, entre les indices obtenus au laboratoire et les indices publiés dans la littérature. C'est pourquoi, un composé ne peut être identifié uniquement par l'examen de ses indices de rétention sur deux colonnes, à l'exception de quelques monoterpènes usuels. Il est a fortiori beaucoup plus délicat d'identifier des sesquiterpènes. Ainsi, Joulain (1994) fait observer que 230 sesquiterpènes de même masse moléculaire se répartissaient sur une plage de seulement 300 unités d'indices. Enfin, si on tient compte des cas de co-élution qui sont presque systématiquement observés avec certains composés (par exemple le limonène qui co-élue avec le β -phellandrène sur colonne apolaire, ou le longifolène qui est superposé à l' α -gurjunène sur la colonne apolaire (BP-1) et avec l'isocaryophyllène sur la colonne polaire (BP-20)), on admet aisément que les indices de rétention ne constituent pas une base suffisante pour l'identification des constituants d'une huile essentielle.

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

I. 1. 2. Les couplages CPG-SM, CPG-SM(ICP), CPG-SM(ICN) et CPG-SM-SM

D'un point de vue analytique, d'important progrès ont été réalisés en couplant la CPG avec des appareils tels que le spectromètre de masse (SM). En effet, le couplage CPG-SM en mode impact électronique (IE), dite CPG-SM(IE), est la technique utilisée en routine dans le domaine des huiles essentielles. Le principe de la spectrométrie de masse consiste à bombarder à l'aide d'électrons une molécule qui sera fragmentée ; les différents fragments obtenus, chargés positivement constituent le spectre de masse de la molécule. Ce procédé permet d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux contenus dans des bibliothèques de spectres

informatisées construites au Laboratoire ou commerciales (NIST, 1999 ; Mc Lafferty et Stauffer, 1994 ; Joulain et König, 1998 ; König *et al.* 2001 ; Adams, 1989, 2001).

Cependant, il faut utiliser les bibliothèques commerciales avec précaution, car bien que très utiles, elles ne sont pas les plus performantes. En effet, compte tenu de la diversité et du nombre très important de composés qu'elles contiennent, il est très rare qu'une interrogation n'obtienne pas de réponse, même si cette proposition d'identification est attachée à une note de concordance très moyenne. C'est pourquoi, les bibliothèques de spectres élaborées au Laboratoire, avec des spectres de masse enregistrés dans des conditions expérimentales rigoureusement identiques, demeurent les plus performantes et permettent des identifications plus fiables. Ceci est particulièrement vrai pour l'analyse des huiles essentielles comprenant un grand nombre de sesquiterpènes, qui, construits à partir d'un même synthon isoprénique, présentent des spectres de masse souvent identiques ou insuffisamment différenciés. En fait, dans la pratique, l'utilisation conjointe de la spectrométrie de masse et des indices de rétention calculés sur deux colonnes de polarité différente en CPG, permet, en général l'identification d'un grand nombre de constituants dans les mélanges complexes tels que les huiles essentielles (Liang *et al.*, 2004 ; Maia *et al.*, 2004 ; Chericoni *et al.*, 2004 ; Bilia *et al.*, 2002 ; Senatore *et al.*, 2004 ; Adio *et al.*, 2004). Ainsi, Vernin *et al.* d'une part (1986, 1990), Cavaleiro d'autre part (2001a) ont développé un logiciel leur permettant de combiner les résultats de la spectrométrie de masse avec les valeurs des indices de rétention sur colonne apolaire et polaire.

Dans le cas des huiles essentielles riches en sesquiterpènes et diterpènes, des problèmes d'identification peuvent subsister même si on utilise la SM-IE associée aux indices de rétention mesurés sur deux colonnes de polarité différente. Des informations complémentaires peuvent être obtenues avec des techniques « d'ionisation douce » telles que l'ionisation chimique positive (ICP) ou l'ionisation chimique négative (ICN) (Schultze *et al.*, 1992 ; Lange et Schultze 1988a). L'ICP et ICN produisent des ions quasi moléculaires correspondant à des ions qui ne sont pas visibles en mode impact électronique. Ainsi, la SM-ICP a permis de différencier les quatre stéréoisomères de

l'isopulégol grâce à leur spectre de masse obtenu en utilisant l'isobutane comme gaz réactif (Lange et Schultze 1988a). La SM-IC permet également de différencier les alcools et leurs esters par l'observation de leurs pics moléculaires. Plus précisément, il s'agit des ions quasi moléculaires $[M+H^+]$ et $[M+H^-]$. L'observation de ces pics permet d'obtenir la masse molaire de ces composés et donc de savoir s'il s'agit de l'alcool ou d'un ester. C'est le cas, par exemple, du (E)-nérolidol et de l'acétate de nérolidyle lorsque l'ammoniac est utilisé comme gaz réactif (Schultze *et al.*, 1992). Plus récemment, la connaissance de ces ions $[M+H^+]$, $[M+H^-]$ et des adduits $[M+CH_4]^+$, $[M+NH_4]^-$, a permis l'identification des esters de thymyle, de néryle, de bornyle et de lavandulyle dans l'huile essentielle d'*Eupatorium cannabinum*, l'ammoniac ou le méthane étant employés comme gaz réactifs (Paolini *et al.*, 2005). Toutefois cette technique a montré ses limites pour l'identification de molécules ayant des structures voisines. Ainsi, le géraniol et le nérol qui ne diffèrent que par la stéréochimie d'une des doubles liaisons, possèdent des spectres de masse ICN identiques (Bruins, 1979). De plus, la difficulté d'obtenir des spectres en SM(ICN) ou la SM(ICP), reproductibles d'un laboratoire à l'autre ont fait que cette technique doit surtout être considérée comme une technique complémentaire de la SM(IE) pour l'identification des constituants des huiles essentielles (Zupanc *et al.*, 1992).

Diverses difficultés rencontrées lors de l'analyse de mélanges complexes, que ce soit dans le domaine médical (drogues, poisons), dans la recherche de polluants dans l'environnement ou dans l'étude de coupes pétrolières, ont conduit à la mise en œuvre de la spectrométrie de masse multidimensionnelle à double analyseur (SM-SM) (Cambon, 1989) ou à triple analyseur (Yost et Enke, 1979). En effet, cette technique consiste à sélectionner les ions correspondants à un rapport m/z choisi au moyen d'un premier analyseur qui joue ainsi le rôle d'un filtre et à les envoyer sur un deuxième analyseur. Les fragments de l'ion secondaire constituent un deuxième spectre de masse qui diffère en fonction de l'origine de l'ion primaire (Rouessac, 2004). Cette méthode peut présenter une utilité dans le domaine des huiles essentielles. Ainsi, Decouzon *et al.* (1990) ont pu différencier les quatre stéréoisomères du dihydrocarvéol à partir des fragments caractéristiques obtenus, qui diffèrent en fonction de la stéréochimie axiale

ou équatoriale des groupements hydroxyle et méthyle. Par ailleurs, le couplage CPG-SM-SM a été utilisé dans l'analyse de l'huile essentielle de Vétiver de Chine. Les auteurs ont identifié 118 composés dans cette huile essentielle et surtout ils ont confirmé la présence de l' α -cédrene, de l'acordiène et du khusimène dont l'identification n'était pas évidente par l'utilisation de la CPG-SM (Sellier *et al.*, 1991).

I. 1. 3. La CPG bidimensionnelle

La CPG bidimensionnelle (GC x GC) a été récemment mise en œuvre pour individualiser des composés qui co-éluent en CPG monodimensionnelle. Elle est utilisée dans le cas où la résolution des pics obtenus en CPG est insuffisante pour parvenir à une caractérisation complète de mélanges très complexes (Philipps et Beens, 1999 ; Dallüge *et al.*, 2003). Cette méthode est basée sur l'utilisation en ligne de deux colonnes capillaires, placées dans deux fours. La première colonne est de dimension moyenne (25-30 mètres) et apolaire, la deuxième est plus courte (0,5-0,8 mètre) et polaire. Le dispositif permet de recueillir une fraction non résolue à la sortie de la première colonne pour la réinjecter ensuite dans la seconde colonne. L'installation comporte deux détecteurs et une vanne d'introduction entre les deux colonnes. Cette méthode permet la séparation, l'identification et la quantification de composés minoritaires pouvant co-éluer avec des composés plus importants. Ainsi elle a été utilisée pour la caractérisation des effluents pétrochimiques (Vendeuvre *et al.*, 2004), dans l'analyse des médicaments (Songa *et al.*, 2004) ou dans le domaine alimentaire (Tranchida *et al.*, 2004). La CPG-2D a aussi été utilisée dans l'analyse fine des huiles essentielles complexes, qui contiennent par exemple de nombreux sesquiterpènes ou diterpènes, ou des sesquiterpènes oléfiniques qui co-éluent avec des monoterpènes oxygénés. Ainsi, Marriott *et al.* (2000) l'ont appliquée à l'analyse de l'huile essentielle de Vétiver de Java, et Mondello *et al.* (2005) ont élué séparément, dans l'huile essentielle de *Citrus*, le β -bisabolène, l'acétate de néryle et le bicyclogermacrène qui co-éluent en CPG conventionnelle.

I. 1. 4. Les couplages CPG-IRTF et CPG-IRTF-SM

La spectroscopie infrarouge renseigne en général sur les fonctions chimiques présentes dans les molécules et permet également de différencier les isomères, par l'examen de la partie du spectre dite « des empreintes digitales ». L'avènement de la spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IRFT) autorisant une grande vitesse d'acquisition a permis de réaliser le couplage CPG-IRFT. Les limites de détection de l'IRTF ont considérablement été améliorées grâce au développement d'interfaces performantes (Sasaki et Wilkins, 1999). Le spectre obtenu peut être comparé à ceux contenus dans une bibliothèque informatisée de spectres Infra-Rouge. Le couplage CPG-IRTF peut s'appliquer à l'analyse de diverses familles de composés : les produits pétroliers et leurs additifs, les arômes, les essences naturelles, les produits de synthèse (Iob *et al.*, 1998 ; Thomaidis et Georgiou, 1999). Son efficacité a été montrée notamment pour l'étude de molécules présentant des spectres de masse superposables tels que les stéréoisomères du farnésol et du menthol (Coleman *et al.*, 1989). Par ailleurs, Joulain et Laurent (1989) ont pu différencier, sur la base de leurs spectres IR et leurs indices de rétention sur colonne polaire et apolaire, le 1-endo-bourbonanol et le 1,6-germacradièn-5-ol, deux alcools sesquiterpéniques qui présentent des spectres de masse identiques. L'appareil de chromatographie peut être couplé en parallèle à la fois au détecteur IR et au spectromètre de masse. Ce couplage a permis à Hedges et Wilkins (1991) d'identifier un grand nombre de composés en faible quantité à côté du 1,8-cinéole ultra majoritaire, dans l'huile essentielle d'*Eucalyptus australiana*.

I. 2. Les couplages de la CLHP avec les techniques spectroscopiques

I. 2. 1. Les couplages CLHP-SM et CLHP-SM-SM

La Chromatographie Liquide Haute Performance s'adresse à des substances peu ou pas volatiles et parfois thermolabiles ou polaires. Le couplage CLHP-SM a été utilisé pour l'identification d'esters sesquiterpéniques dans des extraits méthanoliques de champignons du genre *Armillaria* (Cremin *et al.*, 1995) ainsi que 13 alcaloïdes dans un extrait méthanolique de *Onosma Stellulalum* (Mroczek *et al.*, 2004). Ce couplage a

également permis l'identification de coumarines, psoralènes et flavones dans des huiles essentielles de *Citrus* (Dugo *et al.*, 2000), des xanthones, des sécoiridoïdes et des flavones dans les extraits méthanoliques de différentes espèces de *Gentianacées* (Wolfender et Hostettmann, 1996). D'autres travaux ont mis en œuvre ce couplage pour l'analyse de terpènes (diterpènes acides ou glycosylés, triptènes) dans des extraits au dichlorométhane de plusieurs espèces de *Potamogeton* (Waridel *et al.*, 2004), ou bien encore de composés phénoliques dans des vins rouges de Sardaigne (La Torre *et al.*, 2006).

La spectrométrie de masse en tandem (SM-SM) couplée avec la CLHP est utilisée, par exemple, pour la détermination de la streptomycine et de ses dérivés dans le lait et le miel (Van Bruijnsvoort *et al.*, 2004). De même l'analyse de procyanidines dans le chocolat a été réalisée par CLHP-SM(IE) et CLHP-SM-SM (Wollgast *et al.*, 2001).

I. 2. 2. Le couplage CLHP-CPG-SM

Lorsque l'étape d'individualisation des constituants s'avère être difficile en raison de leur nombre et de leur nature, il est parfois possible de combiner plusieurs techniques chromatographiques. Dans le couplage, CLHP-CPG-SM, la CLHP réalise une séparation préalable des constituants du mélange en fonction de la famille à laquelle ils appartiennent. Ce dispositif permet de supprimer ou de limiter le nombre de co-élutions et, de ce fait, une plus grande fiabilité dans l'identification de constituants présents à l'état de traces dans des huiles essentielles d'agrumes (Mondello *et al.*, 1995 ; Munari *et al.*, 1990).

I. 2. 3. Le couplage CLHP-RMN ¹H

La RMN du proton apporte des informations extrêmement précieuses sur la structure des molécules, mais présente l'inconvénient d'être beaucoup moins sensible que les techniques spectroscopiques décrites précédemment (IR et surtout SM). Néanmoins, la mise en œuvre de couplage CLHP-RMN ¹H a été rendue possible grâce au développement d'aimants supraconducteurs de plus en plus puissants (jusqu'à 21,1

Tesla), permettant ainsi d'abaisser le seuil de détection pour les composés à des valeurs de l'ordre du nanogramme. Ce couplage a aussi été rendu possible grâce au développement de colonnes capillaires dont la faible consommation en éluant permet d'employer des solvants deutériés, évitant ainsi d'avoir recours à des techniques d'irradiations sélectives (Albert *et al.*, 1996, 1999).

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

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

Ainsi, nous avons vu dans les paragraphes précédents que le couplage en ligne d'une technique chromatographique d'individualisation des composés avec une technique spectroscopique d'identification se révèle performant dans divers types d'analyses, que ce soit des analyses de routine et de contrôle de qualité ou des analyses fines. L'utilisation conjointe d'au moins deux techniques d'identification est indispensable, la combinaison de la CPG-SM avec les Ir sur deux colonnes de polarité différentes étant privilégiée pour l'analyse des huiles essentielles. Cependant, toutes ces méthodes ont leurs propres limites. Bien que la méthode d'analyse traditionnelle par CPG(Ir) et CPG-SM donne souvent de bons résultats, certains auteurs ont noté des erreurs -ou des abus- d'interprétation, provenant d'une utilisation abusive des banques informatisées (Joulain, 1994). Ainsi la prise en compte des indices de rétention associée à l'utilisation d'au moins deux techniques d'identification complémentaires est vivement recommandée dans l'analyse des huiles essentielles. De plus, l'analyse

d'huiles essentielles particulièrement complexes (ciste, vétiver par exemple) a nécessité une méthode d'analyse en deux étapes, basée sur la purification des constituants avant leur identification, illustrée par la voie B décrite ci-dessous.

II. IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS APRES PURIFICATION :

VOIE B

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

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

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

Nous pouvons également citer les travaux de Braun *et al.* (2001) sur l'huile essentielle de feuilles de *Laurus nobilis* L. L'analyse par CPG-SM de chaque fraction obtenue après la distillation fractionnée de l'huile essentielle et chromatographies répétitives a permis l'identification de 155 composés, 76 monoterpènes, 46 sesquiterpènes, 10 phénylpropanoïdes et 23 composés divers dont une majorité de composés linéaires.

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

III. ANALYSE PAR RMN ^{13}C SANS SEPARATION PREALABLE

III. 1. Historique

A notre connaissance, les premiers travaux relatifs à l'utilisation de la RMN ^{13}C , en tant qu'outil d'analyse des mélanges naturels ont concerné l'identification des principaux constituants des huiles essentielles d'abord, ponctuellement par Bugar *et al.* (1979) puis, de manière plus systématique, par Formàcek et Kubeczka (1982a, b 2002). Divers travaux ont concerné d'autres domaines d'investigation : produits alimentaires (huiles végétales, graisses animales, vins, miels, ...), extraits végétaux, coupes pétrolières. Dans la plupart des cas, la RMN ^{13}C a été utilisée pour confirmer l'identification des constituants préalablement identifiés (ou dont la présence était suspectée) par une autre technique, généralement la CPG-SM. C'est dans ce contexte que l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse s'est proposée de mettre au point et de développer une véritable méthode d'identification des constituants des mélanges naturels, basée sur l'analyse informatisée du spectre de RMN ^{13}C du mélange.

III. 2. Intérêt de la RMN du carbone-13 (RMN ^{13}C) pour l'analyse des mélanges complexes

En dépit de sa faible abondance isotopique naturelle de l'ordre de 1,1% et d'un rapport gyromagnétique 5700 fois moins sensible que celui du proton, le carbone-13 présente divers avantages qui font que ce noyau est préféré aux autres pour le domaine de l'analyse des mélanges complexes (Günther, 1994) :

- Le carbone constitue le squelette de toutes les molécules organiques. Dans le cas des molécules naturelles, les différents atomes présents sont, à quelques exceptions près, magnétiquement non-équivalents. Le spectre de RMN du carbone-13 présente donc, dans la très grande majorité des cas, autant de raies de résonance qu'il y a de carbones dans la molécule. De plus, la fréquence de résonance des carbones étant très sensible aux variations électroniques et stériques, la moindre modification structurale se traduit par une variation plus ou moins importante mais toujours mesurable de tous

(ou presque tous) les carbones de la molécule. Ainsi, il est possible d'identifier par RMN du carbone-13 la plupart des molécules organiques, même dans le cas où les molécules ont des structures très proches.

- Les spectres de RMN du carbone-13 peuvent être simplifiés par irradiation totale des hydrogènes, ce qui permet de n'observer qu'une raie de résonance par carbone et parallèlement de bénéficier de l'effet NOE (Nuclear Overhauser Enhancement) qui améliore le rapport signal sur bruit (S/B) en augmentant l'intensité des signaux.

- Le temps de relaxation transverse spin/spin (T_2) est beaucoup plus important pour le carbone que pour le proton, la largeur du signal à mi-hauteur étant inversement proportionnelle à T_2 , il en résulte un gain dans la finesse du pic donc un gain en 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 de 240 ppm alors que celui du proton ne s'étend que sur 12 ppm environ. Ceci améliore notablement la dispersion spectrale. Un grand nombre de raies de résonances peuvent être observées dans le spectre du mélange en évitant un nombre rédhibitoire de superpositions.

- Les spectres sont réalisés à température ambiante, ce qui évite la dégradation ou la transformation éventuelle des molécules thermosensibles, observée pendant l'étape d'individualisation dans les colonnes de CPG ou sous l'effet de l'impact électronique dans le spectromètre de masse.

- L'étude des produits « lourds » et très polaires (acides) s'effectue sans difficulté supplémentaire.

- Enfin, la RMN du carbone-13 étant une méthode non destructive, l'échantillon peut être récupéré et éventuellement soumis à d'autres analyses.

III. 3. Identification des constituants en mélange

L'identification des constituants d'un mélange par RMN ^{13}C est basée sur la comparaison des déplacements chimiques dans le spectre du mélange avec ceux de composés de référence contenus dans diverses bibliothèques de spectres. Avec cette méthode, les composés ne sont pas préalablement purifiés. Il est donc nécessaire que l'enregistrement du spectre du mélange et des spectres des composés de référence soit

réalisé avec des conditions expérimentales optimisées et standardisées afin de permettre une bonne reproductibilité des résultats obtenus.

III. 3. 1. Observation des signaux

L'identification d'un composé dans un mélange par RMN nécessite la prise en compte de deux paramètres : l'observation des signaux dans le spectre et leur individualisation.

L'observation des raies de résonance des carbones d'une molécule dépend de plusieurs paramètres :

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

Ainsi grâce au développement des aimants supraconducteurs, la RMN voit sa sensibilité augmenter avec l'intensité du champ magnétique des aimants (21,1 Tesla pour les plus performants). Il est donc possible d'utiliser des quantités de plus en plus faibles de produit, ce qui peut être utile dans des cas particuliers. Cependant, dans la majorité des cas, les produits naturels sont disponibles en quantité appréciable ce qui permet de réaliser des spectres de RMN de mélange naturel avec des appareils de routine : 1,9 Tesla lors des premières expériences, 4,7 Tesla pendant longtemps et 9,4 Tesla de nos jours. Par ailleurs, le rapport S/B peut également être amélioré en modifiant les paramètres d'enregistrement des spectres. Ainsi, l'irradiation des protons liée aux noyaux de carbone (découplage), se traduit non seulement par une simplification des spectres (chaque signal se présentant comme un singulet) mais aussi par une augmentation d'intensité pouvant s'élever à 200%, due à l'effet nucléaire Overhauser (effet NOE) (Günther, 1994 ; Williamson et Neuhaus, 1989 ; Hesse *et al.*, 1997).

L'augmentation du nombre d'accumulations permet de palier un manque de sensibilité de l'appareil, surtout pour les spectromètres de routine à champ moyen, ou une quantité faible de produit mais cela entraîne un temps d'utilisation plus important.

En effet, le rapport S/B étant proportionnel à la racine carrée du nombre d'acquisitions, le temps d'analyse devient rapidement prohibitif.

De plus, pour réduire le temps d'utilisation de l'appareil il est possible d'utiliser des sondes de 10 mm spécialement dessinées pour l'enregistrement des spectres de RMN ^{13}C (au lieu des sondes de 5 mm proton-carbone utilisées habituellement), ceci permet de tripler la quantité de produit disponible pour l'enregistrement du spectre et donc la quantité de signal.

III. 3. 2. Individualisation des signaux

L'individualisation des signaux dépend de la résolution de l'appareil de RMN elle-même fonction de la puissance de l'aimant et des caractéristiques du système informatique permettant l'acquisition du signal. La résolution représente la capacité d'un appareil à individualiser les différents signaux d'un spectre. On peut définir la limite de résolution comme la plus petite différence de fréquence entre deux signaux de résonance pouvant encore être enregistrés séparément (Williamson et Neuhaus 1989). L'individualisation des signaux d'un composé pur pose rarement des problèmes, les superpositions fortuites des signaux de deux carbones étant assez exceptionnelles. On peut citer toutefois les deux méthylènes C3 et C4 du β -pinène qui sont superposés lorsque le spectre est enregistré à 50 MHz et qui sont individualisés à 100 MHz. En revanche, dans le cas du spectre d'un mélange complexe, le nombre de constituants et le nombre de carbones qui composent chaque molécule, sont autant de facteurs qui augmentent la probabilité de superposition des raies de résonance. La résolution est donc un facteur important pour l'identification des constituants d'un mélange complexe.

Divers facteurs influent sur la résolution :

- le champ magnétique : plus il est élevé, plus la séparation des signaux de résonance des différents noyaux est importante. Il en résulte une interprétation plus facile des spectres, ce qui est primordial dans le cas des études réalisées sur les composés ayant une masse moléculaire élevée (oligomères et protéines par exemple, polymère en RMN du solide), dont les spectres sont très complexes.

- diverses techniques d'acquisition des données et/ou de traitement du signal permettent aussi d'améliorer la résolution. On peut par exemple signaler que l'utilisation de convertisseurs numériques performants améliore le traitement des données tout comme l'utilisation de multiplications exponentielles effectuées directement sur le signal de la FID avant la transformée de Fourier (Günther, 1994, Williamson et Neuhaus, 1989 ; Hesse *et al.*, 1997 ; Claridge, 1999).
- la méthode du «Zéro Filling» permet d'augmenter le nombre de points de digitalisation sur le FID. Les pics sont alors définis par un nombre de points plus important, ce qui augmente la résolution du spectre (Günther 1994, Williamson et Neuhaus 1989 ; Hesse *et al.*, 1997 ; Claridge 1999 ; Brekke et Kvalheim, 1996).
- l'utilisation de fenêtres réduites qui permet d'enregistrer le spectre sur la largeur voulue ou en plusieurs portions. A titre d'exemple, Alemany (1989) a pu observer, en utilisant cette technique pour enregistrer le spectre d'un mélange de diastéréoisomères du farnésane (2,6,10-triméthyl dodécane) avec un appareil opérant à 5,8T, 29 signaux sur les 30 attendus, certains d'entre eux n'étant séparés que de 0,003 ppm.

III. 3. 3. Attribution des signaux dans le spectre d'un mélange complexe

L'intérêt de la spectroscopie de RMN réside dans sa faculté à reconnaître un noyau déterminé par rapport à son environnement dans la molécule. La fréquence de résonance des carbones est très sensible à l'environnement électronique et stérique. La moindre modification structurale se traduit par des variations plus ou moins importantes de pratiquement tous les carbones de la molécule. Contrairement à la majorité des autres techniques spectroscopiques, il est très peu probable que deux composés, même ayant des structures très proches (diastéréoisomères par exemple) présentent des spectres de RMN ^{13}C superposables ou indifféremment différenciés. Il en résulte que le déplacement chimique est la donnée spectroscopique la plus utilisée pour identifier un composé connu dans un mélange.

Ainsi, chaque molécule sera définie par une série de déplacements chimiques qui constituera son spectre, ou en quelque sorte son empreinte digitale, à partir duquel elle pourra être identifiée. Pour cela, il est donc très important d'avoir une excellente

reproductibilité des valeurs des déplacements chimiques, dans le spectre du mélange par rapport aux spectres des composés de référence. Divers paramètres doivent être pris en compte :

- la valeur du déplacement chimique (donnée en ppm par rapport à une référence interne) est indépendante du champ magnétique B_0 de l'appareil utilisé, des séquences impulsionnelles, des paramètres d'acquisition et de traitement du signal ;
- cependant, en fonction de la fonctionnalisation des molécules, les valeurs de déplacements chimiques peuvent être influencées par la nature du solvant, la concentration et la présence d'autres molécules. C'est le cas par exemple pour les composés phénoliques dont les déplacements chimiques des carbones peuvent varier en fonction de la fonctionnalisation (alcool, composé carbonylé, oxyde) des autres composés oxygénés présents dans le mélange, à cause des liaisons hydrogènes susceptibles de se former (Castola *et al.*, 1997).

Pour identifier un composé dans un mélange et afin d'obtenir une meilleure reproductibilité, il est préférable, de se référer aux déplacements chimiques de ses carbones tels qu'ils sont reportés dans une (des) bibliothèque(s) de spectres construite(s) au laboratoire, avec des paramètres expérimentaux parfaitement définis. Cette règle est d'ailleurs valable pour toutes les méthodes comparatives. Si le composé est absent de nos bibliothèques, on peut utiliser les valeurs des déplacements chimiques décrits dans la littérature récente. En effet, la sensibilité des appareils de RMN permet d'enregistrer les spectres avec une faible quantité de produit et par conséquent, avec une faible concentration, ce qui a pour effet de supprimer les liaisons hydrogène potentielles.

La RMN ^{13}C a été appliquée avec succès à l'identification des constituants présents dans divers types de mélanges dont voici quelques exemples.

- Dans le domaine pétrochimique, dès 1986, Allerhand et Mapple (1987), ont montré qu'il était possible d'obtenir une excellente résolution avec un aimant de 4,7 Tesla (fréquence de résonance, 50 MHz pour le carbone) en enregistrant plusieurs spectres (fenêtres réduites) et en effectuant des modifications simples de l'appareillage de RMN (suppression des gradients de température dans la sonde, augmentation du

débit de refroidissement d'air, diminution de la puissance de découplage des protons et utilisation d'une sonde spécifique). Ainsi, les auteurs ont pu individualiser 1800 pics dans un échantillon d'essence sans plomb avec une résolution pouvant atteindre 0,0016 ppm. Trente-deux composés ont été identifiés, mais cette identification n'a été possible qu'en enregistrant divers spectres de cet échantillon enrichi à chaque fois d'un nouveau produit de référence.

- En se référant, aux valeurs moyennes des déplacements chimiques des carbones de composés purs et en mélange, Brekke *et al.* (1988) ont identifié six et huit hydrocarbures, possédant un nombre de carbone inférieur ou égal à dix, dans des coupes pétrolières à bas point d'ébullition.

- Matlengiewicz *et al.* identifient, en prenant en compte les déplacements chimiques et les intensités relatives des signaux, divers alcanes, cycloalcanes et des composés aromatiques dans une essence de synthèse (Matlengiewicz *et al.*, 1994) ainsi que des alkadiènes dans une essence légère (Matlengiewicz *et al.*, 1992).

Dans le domaine de l'industrie agro-alimentaire, les huiles végétales, les graisses animales, les vins, les miels ont fait l'objet de diverses études.

- Ainsi, il est possible, à partir de l'observation des signaux relatifs à certains carbones, de connaître la classe lipidique (Gunstone, 1991), la distribution des acides gras sur le glycérol (Bonnet *et al.*, 1990 ; Wollengerg, 1990 ; Sacchi *et al.*, 1992), la position et la stéréochimie des doubles liaisons (Gunstone *et al.*, 1977).

- Markowitz et Rapp (1990) ont travaillé sur le miel et les jus de fruits. Ils ont pu identifier, à côté du glucose et du fructose majoritaires, quelques di- et trisaccharides minoritaires dans le miel, ainsi que l'acide ascorbique et divers acides aminés dans les jus de fruits.

- La RMN ^{13}C a permis à Chon *et al.* (1996) d'identifier divers constituants du vin. Kosir et Kidric (2001) ont identifié 17 acides aminés présentés comme des constituants minoritaires du vin grâce à l'utilisation de séquences 1D et 2D. 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.

Dans le domaine des huiles essentielles, c'est à Formàcek et Kubeczka que l'ont doit les travaux précurseurs d'utilisation de la RMN ^{13}C comme outil d'analyse (1982a, 1982b). L'identification des constituants est basée sur la comparaison des spectres de l'huile essentielle avec ceux de composés de référence enregistrés avec les mêmes conditions expérimentales. Cependant, l'enregistrement des spectres avec très peu de solvant pour pallier le manque de sensibilité des appareils de l'époque, avait pour effet de provoquer sur de nombreux carbones des variations de déplacement chimique non négligeables. L'utilisation conjointe de cette méthode avec la CPG-SM a permis l'analyse d'une cinquantaine d'huiles essentielles, la RMN ^{13}C étant utilisée plus comme un moyen de confirmation de composés que comme une technique d'identification propre. D'autres huiles essentielles ont été récemment analysées par les mêmes auteurs avec la même méthode (Formàcek et Kubeczka, 2002).

D'autres travaux sur l'analyse des huiles essentielles par RMN ^{13}C ont été décrits. Encore aujourd'hui la plupart des auteurs utilisent la RMN ^{13}C pour confirmer la présence des composés précédemment identifiés par CPG-SM :

- le caryophyllène et l'oxyde de caryophyllène ainsi qu'une dizaine d'autres sesquiterpènes d'une fraction chromatographique de l'huile essentielle de bois de *Guarea guidonia* (Núñez et Roque, 1999),
- divers monoterpènes et sesquiterpènes, (*trans*- α - et β -ionone, hexahydrofarnésyl acetone ; *trans,trans*-farnésyl acetone, *trans*-phytol), dans l'huile essentielle de *Equisetum arvense* L. (Radulovic *et al.*, 2006),
- divers diesters de néryle dans l'huile essentielle d'*Eupatorium cannabinum* ssp *corsicum* (Paolini *et al.* 2007),
- le limonène, le β -phellandrène, le β -eudesmol, la valencène, et le junipercamphor, composés majoritaires de l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng (Khadri *et al.*, 2008),
- l'estragole et le linalol qui différencient les huiles essentielles d'*Ocimum forskolei* Benth et d'*Ocimum basilicum* L. (Fatope *et al.*, 2008).

Récemment, Ferreira *et al.* (2001) ont mis au point une méthode d'identification des constituants d'une huile essentielle, basée sur l'étude du spectre de RMN ^{13}C du

mélange et sa comparaison avec des spectres de mono- et sesquiterpènes décrits dans la littérature. Un logiciel informatique prend en compte simultanément la valeur des différents déplacements chimiques observés dans le mélange et la multiplicité de chacun des carbones, préalablement déterminée par des séquences DEPT. Après consultation de la banque de spectres décrits dans la littérature, le logiciel propose une identification. Cette méthode a été appliquée à l'étude des déplacements chimiques de *Piper cernum* et *P. regnellii* (10 et 5 composés identifiés, respectivement).

III. 4. Quantification par RMN

En RMN, les conditions expérimentales sont quantitatives lorsqu'elles permettent d'obtenir une réponse homogène pour l'ensemble des noyaux de carbone-13. Il est alors possible de quantifier chacun des constituants identifiés dans un mélange puisque l'aire de chaque pic est directement proportionnelle au nombre de noyaux qui résonnent. La quantification des composés d'un mélange se fait, de manière générale, par ajout d'une quantité connue de référence interne dans l'échantillon. La comparaison des intégrations des signaux des composés et de la référence interne permet de calculer la masse de chacun des produits du mélange selon la formule :

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

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

Par RMN du carbone 13, deux facteurs sont responsables de la réponse non uniforme des noyaux :

- les temps de relaxation longitudinaux (T₁) des carbones qui varient notamment en fonction de la taille et de la géométrie des molécules. Généralement les échanges d'énergie entre le milieu et les atomes sont moindres lorsque les molécules sont petites, ce qui aboutit à des T₁ plus importants,

- les variations du facteur de renforcement nucléaire d'Overhauser (NOE). Cet effet provoque une amélioration du rapport S/B d'environ 200% pour les signaux des carbones protonés par rapport à ceux des carbones quaternaires.

Compte tenu de ces contraintes, diverses techniques ont été développées pour quantifier les constituants d'un mélange par RMN ^{13}C :

- un angle d'impulsion de 90° combiné à un délai d'attente entre deux impulsions successives de cinq fois T_1 du T_1 le plus long, permet d'obtenir un rapport S/B maximum et la relaxation totale de tous les carbones (Allerhand et Maple 1987). L'application simultanée de ces paramètres et du découplage en créneaux inverses, qui provoque la suppression de l'effet NOE, est reconnue comme étant la séquence standard de quantification par RMN ^{13}C (Mooney, 1989). Quoique très fiable, cette séquence présente un inconvénient majeur qui est le temps d'analyse extrêmement long ;

- l'addition d'un réactif de relaxation paramagnétique tels que le $\text{Cr}(\text{acac})_3$ ou le $\text{Fe}(\text{acac})_3$ provoque, au moyen d'un mécanisme de relaxation électronique, une diminution des valeurs de T_1 et l'élimination de l'effet NOE. Néanmoins, cette séquence quantitative nécessite tout de même des délais de relaxation relativement longs et un nombre d'accumulations suffisamment important afin de compenser la perte de l'effet NOE, ce qui se traduit par un temps d'analyse assez long. Par ailleurs, l'utilisation de réactif de relaxation paramagnétique induit, à partir de certaines concentrations, un élargissement des raies de résonance qui est préjudiciable pour l'analyse des constituants de mélanges complexes (Mooney, 1989). Par ailleurs, MgCl_2 a été utilisé pour la quantification d'acides aminés et d'acides carboxyliques (Jinping *et al.*, 2002).

En opposition aux techniques précédentes, la quantification par RMN ^{13}C peut également être réalisée en utilisant une séquence mettant en œuvre une série rapide d'impulsions courtes (Kalinowski *et al.*, 1991 ; Ng, 1985), dans la mesure où la diminution de l'angle d'impulsion amoindrit les différences d'aimantation entre des noyaux de T_1 différents. L'utilisation de petits angles d'impulsion présente l'avantage de pouvoir diminuer le délai entre deux impulsions successives. Cependant, la

diminution de l'angle d'impulsion s'accompagne systématiquement d'une baisse du rapport S/B qui ne peut pas toujours être compensée par l'augmentation du nombre d'impulsions.

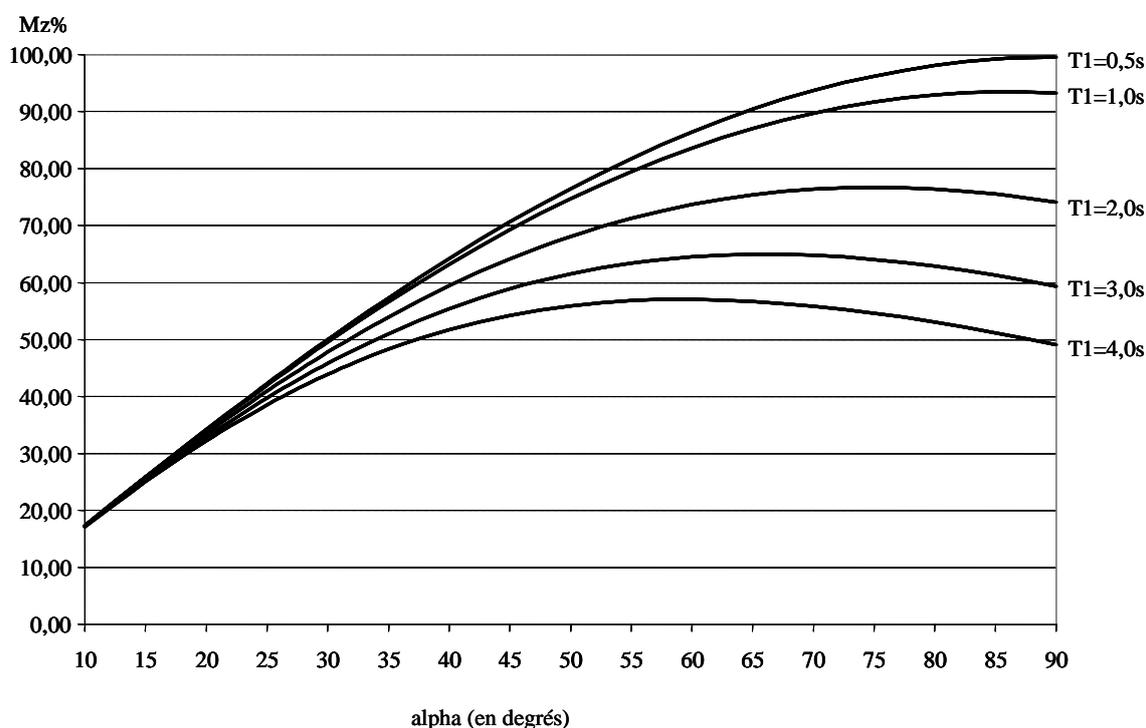
Enfin, l'utilisation d'une méthode intermédiaire entre les deux précédentes, constitue une bonne approche de l'analyse quantitative d'un mélange complexe contenant des noyaux de T_1 différents. Dans ce cas, les conditions optimales de séquence seront celles qui permettront de réduire au minimum les différences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

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

S/B : rapport signal sur bruit ; *M₀* : aimantation initiale ; *D* : délai de relaxation en secondes ; *T₁* : temps de relaxation longitudinal exprimé en secondes ; *α* : angle d'impulsion exprimé en degrés

A titre d'exemple, l'application de la formule [2] pour différentes valeurs de T_1 comprises entre 0,5s et 4s, qui sont les valeurs des T_1 des carbones contenus dans les molécules de taille moyenne (terpènes et sucres) et pour un délai de répétition de 2,8s (temps d'acquisition AQ = 2,7s + D1 = 0,1s, taille mémoire TD = 128K) permet de tracer les courbes de variation de l'aimantation « Z » restaurée (S/B) en fonction de α (Figure I. 2). Dans le cas présent, l'utilisation d'un angle d'impulsion de 90° induit une différence de l'ordre de 60% du rapport S/B pour les deux valeurs extrêmes de T_1 . En revanche la réduction de l'angle d'impulsion s'accompagne d'une diminution des différences d'aimantation mais également du rapport S/B. Néanmoins, ce rapport S/B doit être suffisant pour permettre l'observation des signaux des constituants minoritaires du mélange, ce qui nécessite un nombre d'accumulations élevé.

Figure I. 2. Courbes de restitution de la magnétisation (Mz) d'un noyau en fonction de l'angle d'impulsion (alpha), pour un délai de relaxation de 2,7 s et des valeurs de T_1 comprises entre 0,5 s et 4 s.



IV. LA METHODE DEVELOPPEE AU LABORATOIRE

IV. 1. Principe

Depuis une vingtaine d'années, l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse, utilise la RMN ^{13}C comme outil d'analyse des mélanges naturels complexes. L'objectif de cette méthode est l'identification et éventuellement la quantification des constituants d'un mélange, à partir de son spectre de RMN ^{13}C , sans séparation préalable ou du moins en limitant les étapes de séparation.

Cette méthode est basée sur la comparaison des déplacements chimiques du spectre du mélange avec ceux de composés de référence contenus dans des bibliothèques de spectres (Figure I. 3). L'enregistrement des spectres de référence et des mélanges est réalisé dans les mêmes conditions expérimentales (nature du solvant, concentration, paramètres d'enregistrement des spectres). Son originalité réside dans l'informatisation du traitement des données spectroscopiques, grâce à un logiciel

d'aide à l'identification spécialement élaboré au laboratoire. Ce logiciel d'aide à l'identification permet l'édition des informations nécessaires à la caractérisation des constituants d'un mélange, à savoir :

- le nombre de pics observés par rapport au nombre de pics attendus pour chaque molécule ;
- le nombre de superpositions de pics qui peuvent se produire quand deux carbones de deux molécules différentes ont fortuitement le même déplacement chimique, ou quand les composés présents ont une partie de leur squelette et de leur fonctionnalisation très proche ;
- les variations de déplacements chimiques des carbones dans le spectre du mélange par rapport aux valeurs de référence.

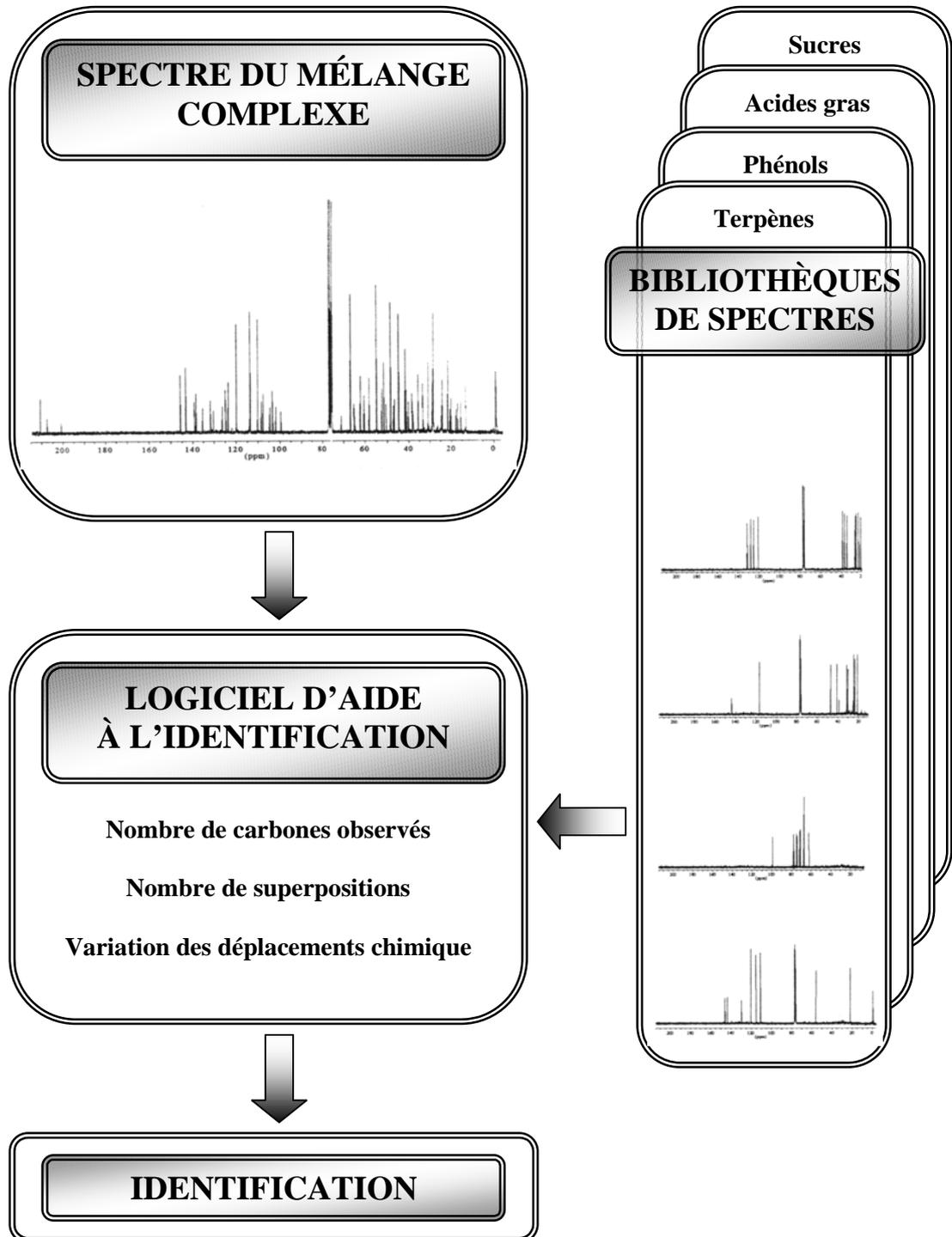
De plus, l'intensité des pics permet éventuellement de contrôler l'appartenance du signal d'un carbone à tel ou tel composé.

Cette méthode, qui allie fiabilité et rapidité, est complémentaire des techniques conventionnelles exposées précédemment dans les voies A et B. Elle a été appliquée à différentes familles de molécules (terpènes, lipides, sucres, phénols) selon un protocole expérimental spécifiquement adapté (nature du solvant, dilution, paramètres d'enregistrement des spectres) (Bradesi *et al.*, 1996 ; Tomi *et al.*, 1995 ; Tomi et Casanova 2000, 2006 ; Bighelli *et al.*, 2009). Ainsi, différentes bibliothèques de spectres ont été construites au laboratoire, au départ à partir de produits commerciaux. Elles sont régulièrement enrichies avec les spectres de composés isolés à partir de mélanges naturels ou préparés par héli-synthèse. La bibliothèque la plus importante est celle des terpènes qui contient les données de près d'un millier de molécules (mono- sesqui- et diterpènes ainsi que des phénylpropanoïdes que l'on trouve dans les huiles essentielles). D'autres bibliothèques de spectres ont également été créées, elles sont plus ou moins importantes en fonction de l'abondance des molécules appartenant à une même famille, de l'antériorité de leur création et de l'accessibilité des molécules de référence : composés linéaires, triterpènes, sucres, sucres anhydres, phénols, coumarines, flavonoïdes. 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 très grand nombre de spectres de référence. 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 sa totalité, contrairement à la description des autres spectres SM ou IR (seuls les principaux fragments ou les raies d'absorption les plus importantes sont décrits) ou encore RMN ^1H (divers signaux apparaissant sous forme de multiplets). De plus, les spectres étant actuellement enregistrés à partir d'une quantité minimale (quelques milligrammes en général) de produit purifié, la concentration est faible et la reproductibilité des déplacements chimiques est très bonne.

L'identification des constituants des mélanges a été appliquée avec succès au laboratoire à différentes familles de produits naturels, huiles essentielles, extraits végétaux, résines, biocombustibles. Après l'enregistrement et le traitement de plusieurs milliers de spectres, nous pouvons faire le bilan suivant :

- la teneur minimale des composés identifiables avec notre spectromètre (9,4 T) est de l'ordre de 0,3% ;
- en général, tous les carbones des molécules identifiées sont observés, à l'exception de certains carbones quaternaires appartenant aux composés minoritaires ;
- le nombre de superpositions est limité et n'empêche pas l'identification d'un composé ;
- les variations des déplacements chimiques ($\Delta\delta$) sont généralement inférieures à 0,05 ppm pour la très grande majorité des cas. Cependant, il existe quelques exceptions, en particulier avec les composés phénoliques (thymol, carvacrol) ou les composés carbonylés α,β -insaturés, dont certains carbones présentent des variations de déplacement chimique plus importantes selon la polarité, la fonctionnalisation et l'abondance des autres constituants.

Figure I. 3 : Identification des constituants d'un mélange complexe par RMN¹³C

A titre d'exemple permettant d'évaluer les possibilités de RMN ^{13}C , nous pouvons décrire l'analyse de l'huile essentielle de *Piper bavinum* du Viêt-Nam, dans laquelle il a été possible d'identifier, avec un spectromètre équipé d'un aimant de 9,4 Tesla, 38 composés mono et sesquiterpéniques, présents à des teneurs comprises entre 0,4 et 10% et possédant des squelettes très divers, cycliques, bicycliques, bicycliques pontés et une fonctionnalisation variée, oléfines, alcools, acétates, dérivés carbonylés (Lesueur *et al.*, 2009).

Il nous faut signaler que, dans le domaine des huiles essentielles par exemple, les composés volatils identifiés à partir du spectre de RMN ^{13}C , sont ensuite repérés sur le chromatogramme du mélange par comparaison de leurs indices de rétention sur colonne apolaire et polaire avec ceux de produits de référence, confirmant ainsi et en tant que de besoin leur identification et permettant également leur quantification. Dans le cas de molécules non volatiles (diterpènes acides, triterpènes, triglycérides, sucres) la quantification peut être réalisée par CPG après une étape de dérivatisation (acétylation des acides, silyllation des alcools), ou par HPLC (directement ou après dérivatisation). La quantification peut également être réalisée en utilisant la RMN ^{13}C comme nous l'avons vu au début de ce chapitre (paragraphe III. 4.). La quantification par RMN s'avère utile quand il s'agit de molécules thermosensibles ou de molécules qui co-éluent sur les colonnes de chromatographie usuelles. C'est la technique qui a été choisie au laboratoire.

Nous avons vu que la séquence standard de quantification par RMN consiste à utiliser un découplage des hydrogènes en créneaux inverses et un temps d'attente entre deux impulsions égal à 5 fois T_1 du T_1 le plus long. Cette méthode a été appliquée au laboratoire à la quantification des acides sesquiterpéniques de type eudesmane de *Dittrichia viscosa* subsp. *viscosa* (Blanc *et al.*, 2005), ainsi que de deux lactones, la costunolide et la déhydrocostuslactone, directement dans l'huile végétale de *Laurus azorica* (Ferrari *et al.*, 2005a).

S'il est nécessaire d'analyser un nombre important d'échantillons et donc de réaliser des analyses avec un temps raisonnable d'occupation de l'appareil, le travail

de quantification par RMN ^{13}C nécessite la mise au point d'un protocole expérimental bien adapté à chaque famille de composés. La procédure suivie au laboratoire pour réaliser l'analyse quantitative est identique quelle que soit la famille de composés étudiée et elle est résumée ci-dessous :

- choix du solvant en fonction de la solubilité des composés et de la facilité d'utilisation,
- mesure des temps de relaxation T_1 des carbones de la molécule à étudier ou d'une molécule représentative d'une famille de molécules (méthode d'inversion récupération),
- choix de la référence interne (diglyme, dioxane, hexanediol, ...) en fonction de la valeur des T_1 de ses carbones et de l'absence de superposition de ses signaux avec ceux des molécules à analyser,
- choix de la séquence impulsionnelle (magnétisation restaurée observée sur les courbes de Becker-Gambhir, en fonction de l'angle d'impulsion d'une part et du délai de répétition d'autre part). Cette séquence doit garantir i) l'obtention d'un rapport signal sur bruit (S/B) suffisant pour permettre l'observation des signaux des composés minoritaires, ii) la différence d'aimantation « Z » restaurée minimale entre les noyaux de T_1 différents, iii) enfin, un temps d'enregistrement qui soit compatible avec l'analyse d'un grand nombre d'échantillons.
- validation (justesse, précision, linéarité) de la procédure à partir de tests réalisés avec des produits purs et de mélanges artificiels ;
- application à la quantification des constituants de divers mélanges naturels.

Nous présenterons dans le paragraphe suivant les divers protocoles expérimentaux développés au laboratoire, en fonction de la famille de composés à quantifier et de l'appareillage dont nous disposons (appareil de RMN 4,7 Tesla puis 9,4 Tesla).

IV. 2. Domaines d'application

L'intérêt de la RMN ^{13}C dans l'analyse des mélanges naturels est manifeste quand ceux-ci contiennent majoritairement des composés terpéniques (huiles

essentielles, résines et certains extraits). Cependant, au laboratoire, cette méthode a aussi été appliquée à d'autres familles de produits naturels.

IV. 2. 1. Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substrats de choix pour mettre en évidence l'efficacité et la spécificité d'une technique analytique ainsi que pour démontrer la complémentarité des différentes techniques. En effet, nous avons vu que ni la complexité de la structure ni la fonctionnalisation ne constitue un handicap pour l'identification des constituants d'un mélange naturel par RMN ^{13}C . En effet, la RMN permet d'identifier les nombreux sesquiterpènes ayant des structures voisines, présents dans les huiles essentielles. Nous pouvons citer par exemple l'identification dans l'huile essentielle de *Fokienia hodginski* de nombreux composés sesquiterpéniques possédant le squelette bicyclo[4.4.0]décanique : cadinanes, muurolanes, eudesmanes, selinanes. Ces sesquiterpènes se différencient par la position des substituants méthyle et isopropyle, par la stéréochimie relative de ces substituants ainsi que par la stéréochimie *cis* ou *trans* de la jonction de cycles (Lesueur *et al.*, 2006).

Cette méthode a également permis l'identification de diterpènes dans certaines huiles essentielles, nous pouvons citer par exemple l' α -kaurène dans les échantillons d'*Illicium griffithi*, le sandaracopimaradiène, l'isopimaradiène, l'isoabiéanol et le *trans*-totarol dans ceux de *Juniperus cedrus*, l'oxyde manoylé dans ceux de *Pinus nigra ssp. laricio*. Parallèlement, il a été constaté, lors de l'analyse d'un extrait au CO_2 supercritique d'*Abies alba*, que le *cis*-abiéanol était difficilement élué dans les conditions habituelles en CPG. Il présentait un pic mal résolu qui conduisait à une sous-évaluation de ce composé dans l'extrait. Une quantification plus précise a été obtenue par RMN ^{13}C en utilisant la séquence classique (Temps de répétition = $5 \times T_1$, découplage en créneaux inverses).

La RMN ^{13}C a aussi permis d'identifier des composés aux structures inhabituelles dans les huiles essentielles. C'est ainsi qu'elle a permis d'identifier la 5-[(E)-hexylidene]-5H-furan-2-one et son isomère Z dans l'huile essentielle de feuilles d'*Isolona cooperi* de Côte d'Ivoire ainsi que les 5- et 7-isopentenylindoles dans l'huile

essentielle de racines de cette même plante (Boti *et al.*, 2005). Le squelette de ces molécules avait été suggéré par la SM sans toutefois que soit précisée la position du groupement isopropyle.

IV. 2. 2. Extraits végétaux et résines

En ce qui concerne l'identification et la quantification simultanée des dérivés terpéniques, les premiers travaux ont concerné l'analyse des triterpènes dans des extraits dichlorométhaniques du liège (Castola *et al.*, 1999). Le diglyme (oxyde de di-2-méthoxyéthyle, ($T_1 = 3,8s$) était utilisé comme référence interne. Les valeurs de T_1 des carbones protonés de trois des six composés identifiés sont comprises entre 0,5 et 2,5s. Après plusieurs essais avec des composés purs puis des mélanges artificiels, les paramètres suivants ont été choisis : une séquence de découplage en créneaux inverses qui permet de bénéficier de l'effet NOE pour accroître le rapport S/B, un angle d'impulsion standard de 45° et un délai de relaxation D_1 de 2s associé à un temps d'acquisition AQ de 1,3s. La justesse, la précision et la linéarité de la réponse de cette méthode ont été validées à partir de plusieurs expériences menées sur des composés purs puis des mélanges artificiels avant l'application à d'authentiques extraits de liège. Des résultats corrects (erreur inférieure à 8,5%) ont été obtenus en calculant les valeurs moyennes mesurées à partir des intensités de 5-9 signaux non protonés de chaque molécule. Cette méthode d'analyse a été appliquée à la caractérisation des extraits de liège de Corse et de Sardaigne et trois compositions ont été mises en évidence (Castola *et al.*, 2002). Le même protocole expérimental a permis l'identification et la quantification de trois triterpènes (l'acide oléanolique, l'ulvaol et l'érythrodiol.) dans un extrait hexanique de feuilles d'olivier (Duquesnoy *et al.*, 2007a).

Le fait d'avoir pu identifier et quantifier l'acide bétulinique dans les extraits de liège a incité au développement d'une méthode d'analyse par RMN des résines de *Pinus nigra ssp laricio var. corsicana* (pin laricio) qui sont connus pour contenir des composés neutres et acides, dont l'analyse se fait en deux étapes après une partition acido-basique (Rezzi *et al.*, 2002). De nouveau, les T_1 des différents carbones protonés de 4 diterpènes commerciaux, représentatifs des différentes classes de diterpènes

identifiés dans deux échantillons de résines ont été mesurés (0,3-2,9s). Le diglyme a également été utilisé comme référence interne et un angle d'impulsion de 30°, meilleur compromis entre la génération d'un S/B suffisant et l'écart d'aimantation « Mz » restaurée, a été choisi. La période entre deux acquisitions successives a été abaissée à 1,4 s (temps d'acquisition de 1,3s pour une taille mémoire de 32K, Zero filling à 64K, délai de relaxation 0,1s) ce qui a permis l'enregistrement d'un spectre de 5000 accumulations en moins de deux heures (spectromètre 4,7 Tesla, 50 MHz pour le carbone). La justesse, la précision et la linéarité de la réponse de cette méthode ont été de nouveau validées à partir de plusieurs expériences menées sur des composés purs puis sur des mélanges artificiels, avant l'application à d'authentiques résines de *P. nigra ssp laricio*. Des erreurs inférieures à 5% ont été obtenues à partir des aires des signaux des carbones protonés, suffisamment résolus, sélectionnés pour chaque molécule. Dix huit diterpènes acides et neutres ont été identifiés et quantifiés dans les résines et une analyse statistique a réparti les compositions en deux groupes (Rezzi *et al.*, 2002).

La méthode développée au laboratoire a aussi été adaptée à l'analyse de diterpènes portant des chaînes latérales, comme par exemple les taxanes qui peuvent posséder jusqu'à 40 carbones. Ces composés sont non volatils et thermosensibles et leur analyse est généralement réalisée par des couplages CLHP-SM. Cependant, diverses difficultés analytiques liées surtout aux similitudes structurales de ces composés demeurent. L'utilisation de bibliothèques de données issues de la littérature a permis de mettre en évidence la présence de 16 taxanes appartenant aux familles taxine, taxinine, taxicine et taxuspine dans diverses fractions obtenues par chromatographie sur colonne d'un extrait de *Taxus baccata* (Duquesnoy *et al.*, 2009).

La RMN ¹³C a aussi permis l'identification de coumarines dans un extrait dichlorométhanique de *Peudeudanum paniculatum* de Corse. En effet, l'utilisation du logiciel d'aide à l'identification et d'une bibliothèque de spectres de référence a mis en évidence les principaux constituants de l'extrait, soit directement à partir du spectre du mélange sans séparation préalable (triglycérides et 1 coumarine), soit à partir des spectres des fractions de chromatographie (Vellutini *et al.*, 2005).

Récemment, un protocole expérimental différent a été choisi pour l'identification et la quantification des sucres (glucose, fructose, pinitol, arabinitol, mannitol) dans un extrait éthanolique de bois et d'aiguilles de pin laricio et de feuilles de sapin. Le mélange DMSO-d₆/H₂O a été utilisé comme solvant et l'hexan-1,6-diol comme référence interne ($T_1 = 1s$). Une taille mémoire de 128 K a été utilisée pour avoir une meilleure résolution, ce qui a induit un temps de répétition de 2,8s (temps d'acquisition 2,7s, délai de relaxation 0,1s) et qui a permis d'utiliser un angle d'impulsion de 90°, fournissant une quantité de signal maximale. Les erreurs relatives étaient comprises entre 2 et 8% (Duquesnoy *et al.*, 2008).

IV. 2. 3. Biocombustibles

La RMN ¹³C a été utilisée pour l'analyse des liquides de pyrolyse de la biomasse qui sont des mélanges extrêmement complexes. Après fractionnement, l'analyse des fractions par RMN a permis d'identifier les dérivés phénoliques les plus importants (guaiacol, 2,6-dimethoxyphénol, éthylphénol) sans mettre en œuvre un protocole de séparation trop lourd. Des sucres anhydres (levoglucosane, levogalactosane, levomannosane) ont également été identifiés et quantifiés dans une autre fraction contenant également des oligomères (Solvant : CDCl₃/DMSO-d₆) (Castola *et al.*, 2000a). Enfin, l'hydroxyacétaldéhyde, produit de dégradation de la cellulose, se présentant en solution principalement sous deux formes monomères et quatre formes dimères a été identifié et quantifié dans la fraction non soluble dans l'éther (angle d'impulsion, 30°; délai de répétition, 2,7s ; taille mémoire, 128K, solvant DMSO-d₆; référence interne, diglyme ; temps de relaxation des carbones compris entre 0,5 et 8,7s) (Lesueur *et al.*, 2007).

IV. 2. 4. Huiles végétales

Nous avons vu (paragraphe IV. 1.) que la RMN ¹³C permet d'accéder à des informations relatives à la constitution des glycérides présents dans les huiles végétales (Mazzoni, 1998 ; Ferrari, 2003). La RMN ¹³C permet ainsi d'accéder à :

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

l'huile d'olive, dans l'huile de baies de lentisque, dans un extrait au solvant de la farine de châtaignes,

- l'identification et la quantification des différentes chaînes grasses mono et poly insaturées (huile d'olive, d'argan, matière grasse animale,) ;
- la distribution des chaînes grasses sur l'entité glycérique (huile d'olive, huile d'argan, dans la matière grasse du lait et du fromage, ...) ;
- l'évaluation des proportions des chaînes grasses isomères de position oléique (C18:1 Δ 9) et vaccénique (C18:1 Δ 11), souvent superposées en CPG ainsi que la stéréochimie Z ou E de la double liaison (matière grasse du lait, du fromage, huile de colza,) ;
- et enfin, l'identification et la quantification de composés non lipidiques minoritaires dans certaines huiles végétales : le squalène dans l'huile d'olive, la costunolide et la dehydrocostuslactone dans l'huile de *Laurus azorica* de Madère.

Ces quelques exemples montrent le fort potentiel d'adaptation de la RMN ^{13}C pour l'analyse des mélanges naturels, qui sont généralement constitués de nombreuses molécules, volatiles ou non, de familles chimiques différentes. Dans les paragraphes suivants, nous allons développer quelques cas particuliers qui démontrent l'intérêt de la RMN et sa complémentarité avec les autres techniques.

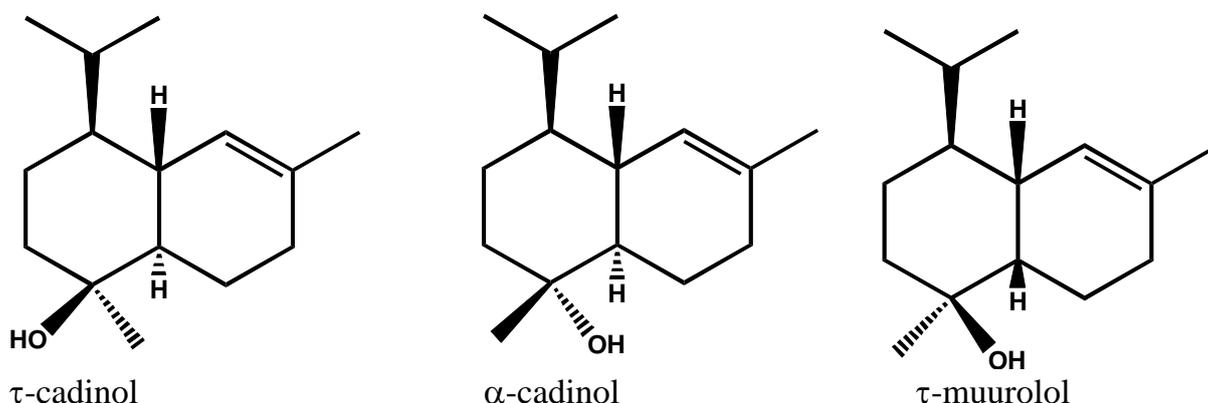
IV. 2. 5. Molécules qui coéluent

L'efficacité de la RMN du ^{13}C est bien illustrée dans le cas (cependant assez rare) où des composés co-éluent sur deux colonnes de polarité différente. C'est le cas, bien connu du cinéole et du β -phellandrène qui sont co-élués sur colonne polaire et qui sont individualisés ou non en fonction de la colonne apolaire utilisée ou encore de l' α -sélinène et de l' α -muurolène. On peut également citer le cas des 2,4- et 2,5-diméthylphénols d'une part, des 2,3- et 3,5-diméthylphénols d'autre part, présents dans les biocombustibles, qui ont le même temps de rétention sur la plupart des colonnes. Dans les résines, le levopimaral et le palustral sont souvent co-élués. L'identification de certains sesquiterpènes peut se révéler délicate dans certaines huiles essentielles.

Ainsi, le β -himachalene co-élue avec le β -bisabolene et le β -curcumene sur colonne apolaire et avec le valencene sur colonne polaire.

L'exemple de l'analyse de l'huile essentielle de *Piper betle* du Viêt-nam contenant plusieurs sesquiterpènes possédant le squelette bicyclo[4.4.0]décannique démontre bien la complémentarité des techniques analytiques. Le profil chromatographique (colonne apolaire) de cette huile essentielle montre la présence de trois composés majoritaires (A, B et C ; 25, 20 et 10 % environ) qui sont identifiés par SM comme l' α -cadinol, le δ -cadinol et le δ -cadinène. L'analyse du spectre RMN ^{13}C permet d'identifier, à côté de composés minoritaires, les composés A et C (α -cadinol et δ -cadinène). Par contre, au lieu d'observer la présence d'une série de raies de résonance appartenant à un sesquiterpène présent à une teneur d'environ 20%, on observe deux séries de raies de résonance correspondant à deux produits avec des teneurs approximativement similaires. En fait, les composés A (α -cadinol) et C (δ -cadinène) étaient correctement identifiés par CPG-SM et par RMN ^{13}C . Par contre, le composé dénommé B sur le chromatogramme correspondait en fait à 2 composés B1 et B2 qui co-éluent dans les conditions utilisées et qui sont identifiés par RMN ^{13}C comme étant le τ -cadinol et le τ -muurolol (Figure I. 4).

Figure I. 4: Structure du τ -cadinol, de l' α -cadinol et du τ -muurolol identifiés dans un échantillon d'huile essentielle de *Piper betle*.



IV. 2. 6. Identification de stéréoisomères

La RMN ^{13}C est un bon moyen d'identifier certains stéréoisomères dont l'analyse par les techniques conventionnelles est délicate. A titre d'exemple, nous pouvons citer l'identification des isomères du dihydrocarvéol et de leurs acétates (Bradesi *et al.*, 1994). Par ailleurs, les couples α -cédrene/ α -funébrène et β -cédrene/ β -funébrène, qui ne diffèrent que par la stéréochimie des jonctions de cycles sont difficilement différenciables deux à deux car leur indices de rétention sont très proches et leurs spectres de masse quasiment superposables. Par contre, les spectres de RMN ^{13}C de ces quatre composés sont suffisamment différents pour pouvoir les identifier sans difficulté dans des échantillons d'huile essentielle de bois de cèdre (Tomi *et al.*, 1995) et de *Cupressus funebris* (Hoi *et al.*, 1997). De même, les *trans*- et *cis*-calamenenes ne sont pas différenciés, quelle que soit la colonne de chromatographie utilisée (Gonny *et al.*, 2006). La RMN ^{13}C a également permis l'identification, toutefois après un fractionnement partiel, des quatre diastéréoisomères du bisépoxyfarnésatriène et des quatre diastéréoisomères de l'époxyfarnésatriénol dans l'huile essentielle de *Dittrichia viscosa* de Corse (Blanc *et al.*, 2004).

IV. 2. 7. Identification et quantification de molécules thermosensibles

La RMN- ^{13}C a également pu être utilisée comme outil dans l'analyse et la quantification des molécules thermosensibles telles que le furanodiène et le furanoélémente dans l'huile essentielle de rhizomes et fleurs de *Smyrniolum olustrum* (Baldovini *et al.*, 2001a). Le furanodiène se transforme en furanoélémente thermiquement (réaction sigmatropique [3.3] ou transposition de Cope) dès 140°C en partie dans l'injecteur et en partie dans la colonne de chromatographie, se traduisant par un gonflement de la ligne de base, ce qui fait que les deux composés ont les mêmes indices de rétention et ne sont donc pas différenciables en CPG(Ir) et en CPG-SM. Une appréciation correcte de la teneur des différents constituants de l'huile essentielle a été obtenue en combinant les analyses et RMN ^{13}C . De même, cette technique analytique a également permis d'identifier et de quantifier l'ascaridole et son isomère (isoascaridole) dans l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* de Madagascar

(Cavalli *et al.*, 2004). En effet une partie de l'ascaridole s'isomérisise thermiquement en isoascaridole au cours de l'analyse en CPG, ce qui fausse sa quantification.

IV. 2. 8. Combinaison de la chromatographie sur colonne et de la RMN ^{13}C

Dans le cas d'huiles essentielles très complexes, il est nécessaire de combiner un (ou plusieurs) fractionnement(s) sur colonne ouverte de silice (ou alumine, ou sephadex) avec des analyses par CPG(Ir) et RMN ^{13}C , afin d'obtenir une composition détaillée et fiable. En effet, l'analyse des fractions permet d'identifier par RMN des molécules qui sont en trop faible quantité dans l'huile essentielle sans toutefois avoir à les isoler. Pour illustrer cette méthode, nous pouvons citer l'analyse des huiles essentielles de la carotte sauvage (*Daucus carota*) et d'inule visqueuse (*Dittrichia viscosa* sp. *viscosa*) isolées à partir des parties aériennes de la plante (Gonny *et al.*, 2004 ; Blanc *et al.*, 2005).

IV. 2. 9. Combinaison de l'hémisynthèse et la RMN ^{13}C

Il peut se produire que la combinaison de diverses techniques (CC, CPG(Ir), CPG-SM, RMN ^{13}C) soit insuffisante pour mener à bien l'analyse d'une huile essentielle extrêmement complexe, soit parce que les molécules sont structurellement trop proches et difficiles à séparer ou tout simplement parce qu'il n'y a plus suffisamment de produit pour continuer le fractionnement. Dans ce cas, l'hémisynthèse de certains constituants peut apporter la solution.

Ainsi, à titre d'exemple, les huiles essentielles (feuilles et racines) de *Peuceданum paniculatum* L., plante endémique à la Corse, contenaient des composés, présents à des teneurs appréciables, absents des bibliothèques de spectres (SM et RMN ^{13}C). Ces huiles essentielles ont fait l'objet d'un important travail de fractionnement sur colonne de silice (et de sephadex) qui a permis l'identification de divers composés à l'aide de la bibliothèque de spectres du laboratoire ou des données de la littérature. D'autres composés, constituants majoritaires dans certaines fractions de chromatographie, étaient d'après leurs données RMN, des esters de β -cyclolavandulyle et de β -isocyclolavandulyle. Ces esters, ne pouvant être purifiés ont

été préparés à partir du β -cyclolavandulol (lui-même préparé à partir du lavandulol) et du β -isocyclolavandulol (obtenu par réduction de l'acétate). Tous ces esters ont ensuite été identifiés dans les fractions de chromatographie puis dans les huiles essentielles (Vellutini *et al.*, 2005).

IV. 2. 10. Application à la variabilité chimique

La RMN ^{13}C , en permettant l'identification des composés jusqu'à une teneur de 0,3-0,5%, est aussi particulièrement bien adaptée à la mise en évidence de la variabilité chimique (des huiles essentielles ou des résines) qui nécessite l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Un traitement statistique des données, par exemple l'Analyse en Composante Principale (ACP), est associé à cette démarche. Elle a été appliquée avec succès aux huiles essentielles de diverses plantes parmi lesquelles, *Abies alba* (Corse, Duquesnoy *et al.*, 2007b), *Artemisia vulgaris* (Vietnam, Nguyen Thi Phuong Thao *et al.*, 2004), *Calamintha nepeta* (Corse, Baldovini *et al.*, 2000), *Cedrelopsis grevei* (Madagascar, Cavalli *et al.*, 2003), *Ferula communis* (Corse, Ferrari *et al.*, 2005b), *Isolona campanulata* (Côte d'Ivoire, Boti *et al.*, 2006a), *Juniperus phoenicea* (Corse, Rezzi *et al.*, 2001a ; Portugal, Cavaleiro *et al.*, 2001b), *Juniperus oxycedrus* (Corse, Boti *et al.*, 2006b), *Lavandula stoechas* (Corse, Ristorcelli *et al.*, 1998), *Lavandula dentata* (Algérie, Bousmaha *et al.*, 2006), *Lippia multiflora* (Côte d'Ivoire, Kanco *et al.*, 1999), *Pinus nigra* ssp. *laricio* (Corse, Rezzi *et al.*, 2001b), *Pistacia lentiscus* (Corse, Castola *et al.*, 2000b ; Algérie, Mecherara *et al.*, 2008), *Thymus herba barona* (Corse, Corticchiato *et al.*, 1998 ; Sardaigne, Usai *et al.*, 2003), *T. carnosus*, *T. caespitius*, *T. camphoratus* (Portugal, Salgueiro *et al.*, 1995, 1997a,b), extrait de liège (*Quercus suber* L) (Corsica, Sardaigne, Castola *et al.*, 2002), oléorésines de *Pinus nigra* ssp. *laricio* (Corse, Rezzi *et al.*, 2005).

IV. 2. 11. Enantiométrie

La différenciation énantiomérique des mono et sesquiterpènes est en général réalisée par CPG en utilisant une colonne chirale. Elle peut être également réalisée par RMN, la RMN ^{13}C étant préférée quand il est utile de travailler sur des mélanges. Diverses méthodes peuvent être utilisées : dérivatisation avec un réactif chiral,

utilisation d'un solvant chiral, complexation avec des cyclodextrines, et surtout formation d'un complexe avec un réactif de déplacement chimique chiral (RDCC). En RMN ^{13}C le RDCC le plus utilisé est $\text{Yb}(\text{hfc})_3^{3+}$. En utilisant cette méthode, il a été possible de déterminer le rapport énantiomérique du camphre et de la fenchone dans l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* (Ristorcelli *et al.*, 1997, 1998) et de l'acétate de bornyle dans l'huile essentielle d'*Inula graveolens* (Baldovini *et al.*, 2003). La différenciation énantiomérique des terpènes oléfiniques par RMN ^{13}C est possible en utilisant le complexe binucléaire $\text{Ag}(\text{fod})\text{-Yb}(\text{hfc})_3$ (Baldovini *et al.*, 2001b).

V. PROBLEMATIQUE

Ce travail s'inscrit dans le cadre général des travaux de l'équipe « Chimie et Biomasse » (UMR « Sciences Pour l'Environnement », thème « Ressources Naturelles ») sur la valorisation des produits issus de la biomasse végétale (huiles essentielles, résines, extraits végétaux, etc...). Ces différents produits peuvent être valorisés dans divers secteurs industriels (pharmacie, aromathérapie, parfumerie, cosmétique ou agro-alimentaire). Pour cela, il est nécessaire d'acquérir au préalable une bonne connaissance de leur composition chimique. Nous avons vu tout au long de ce premier chapitre que l'analyse des mélanges complexes est une opération délicate qui nécessite généralement la mise en œuvre de techniques analytiques complémentaires. Dans ce contexte, nous avons montré l'étendue des domaines d'application, les avantages et la complémentarité de la méthode d'analyse des mélanges naturels par RMN ^{13}C développée par l'équipe « Chimie et Biomasse ». L'objectif de ce travail était de caractériser diverses plantes poussant à l'état spontané en Corse à travers la composition de leurs huiles essentielles et résines, en mettant en œuvre la méthode d'analyse propre au laboratoire, associée dans certains cas à la CPG-SM. Lorsque le nombre d'échantillons était suffisamment important, nous avons soumis les résultats à une analyse statistique afin de mettre en évidence une homogénéité des échantillons ou une éventuelle variabilité chimique intraspécifique. Les travaux ont concerné principalement des plantes de Corse, divers genévriers, le pin

maritime, mais des études plus ponctuelles ont été réalisées sur la composition chimique d'huiles essentielles du Viêt-Nam ainsi que sur la quantification d'un additif.

Dans le chapitre suivant, nous expliciterons le mode de fonctionnement de la méthode d'analyse par RMN ^{13}C et nous montrerons ses différentes possibilités en l'appliquant :

- à la détermination de la composition chimique des huiles essentielles de trois espèces de *Cymbopogon* du Viêt-Nam : *C. winterianus*, *C. flexuosus* et *C. tortilis*.
- à l'analyse d'un grand nombre d'échantillons d'huiles essentielles d'hybrides d'agrumes dans le but de contribuer à l'étude de l'héritabilité des caractères qualitatifs et quantitatifs que sont les composés volatils.
- à la quantification du dipropylène glycol dans deux « extraits de parfum » commerciaux.

Dans le troisième chapitre, nous étudierons les huiles essentielles de trois genévriers de Corse qui n'ont pas encore fait l'objet d'étude détaillée. Il s'agit des huiles essentielles de *Juniperus thurifera* et de *J. communis* ssp. *communis*, qui sont des espèces très localisées en Corse, ainsi que celles de *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa* qui est une espèce protégée. Parallèlement, il nous a paru intéressant de compléter l'étude de la variabilité chimique des huiles essentielles de *Juniperus communis* ssp. *alpina*, initiée au laboratoire par un plus large échantillonnage. En effet, cette huile essentielle est produite en Corse et commercialisée.

Enfin, le dernier chapitre concerne la caractérisation du pin maritime de Corse à travers l'étude de la composition chimique et de la variabilité de l'huile essentielle d'aiguilles et de l'oléorésine. Ainsi, nous analyserons divers échantillons préparés à partir de matériel végétal récolté dans la plupart des peuplements de l'île, en nombre suffisamment important pour que puisse être réalisée une analyse statistique. Les analyses des huiles essentielles seront réalisées par combinaison de la CPG(Ir), de la RMN ^{13}C et de la CPG-SM. En ce qui concerne des oléorésines, nous mettrons en œuvre la RMN ^{13}C pour identifier et quantifier les constituants.

Chapitre II

**QUELQUES EXEMPLES D'APPLICATION
DE LA RMN ¹³C
A L'ANALYSE DES MELANGES:
HUILES ESSENTIELLES,
EXTRAITS DE PARFUMS**

Ce deuxième chapitre a pour but de montrer l'étendue des domaines d'application de la RMN ^{13}C .

- Dans une première partie, nous décrirons l'analyse par RMN ^{13}C et CPG(Ir) et CPG-SM d'huiles essentielles de l'espèce *Cymbopogon* afin d'expliciter notre méthode d'analyse et de mettre en évidence l'intérêt de la complémentarité des techniques dans l'analyse des mélanges complexes.

- Dans une deuxième partie, nous montrerons comment la RMN peut être utilisée comme outil d'analyse de la variabilité chimique, dans le cadre d'une étude sur les huiles essentielles de zestes de 68 hybrides mandarine Willow Leaf x clémentine commune. Cette étude a été réalisée dans la continuité de travaux menés au laboratoire, en collaboration avec le centre INRA de Corse (Dr François Luro), travaux qui concernent la caractérisation d'huiles essentielles de feuilles des mêmes hybrides et ayant pour objectif de déterminer si on peut utiliser les huiles essentielles de feuilles de jeunes plantules comme marqueurs précoces du profil aromatique des fruits.

- Enfin, dans une troisième partie, nous décrirons la mise au point d'une méthode de quantification du dipropylène glycol par RMN ^{13}C . Ce composé, qui se présente sous la forme de plusieurs isomères, entre dans la formulation de nombreux produits industriels et cosmétiques.

I. ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES DE TROIS ESPECES DE CYMBOPOGON DU VIET-NAM

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un programme de coopération décentralisée entre la Région Corse et les Provinces du Nord Viêt-Nam. Les échantillons d'huiles essentielles nous ont été fournis par l'un de nos partenaires, l'Institut de la Matière Médicale de Hanoi (Dr Bui Thi Bang).

Le but de ce travail est tout autant d'appréhender les potentialités et les limites de la RMN ^{13}C pour l'analyse d'un mélange naturel, que de caractériser trois espèces de *Cymbopogon* poussant à l'état spontané ou cultivées au Viêt-Nam par l'étude

détaillée de la composition chimique de leurs huiles essentielles. En effet, l'utilisation de la RMN ^{13}C permet, à partir d'un spectre unique, l'identification des composés terpéniques à une teneur proche de 0,3% et nécessite moins de temps que la voie « purification-identification » (Voie B).

Le genre *Cymbopogon* qui appartient à la famille des Poaceae (Graminées) compte 120 espèces dans le monde, principalement dans les régions tropicales. Dix de ces espèces sont communément cultivées en Inde, au Sri Lanka, en Indonésie et à Madagascar pour leurs huiles essentielles et leur utilisation comme épices. En général, les espèces de *Cymbopogon* sont héliotropes et tolérantes à la sécheresse. Les feuilles et les rhizomes de ces plantes sont utilisés pour produire des huiles essentielles. Les feuilles dégagent souvent une odeur caractéristique lorsqu'on les écrase. Au Viêt-Nam, 15 espèces de *Cymbopogon* sont répertoriées, 11 d'entre elles produisent une huile essentielle et six espèces sont cultivées. Ces plantes sont utilisées en médecine traditionnelle contre les douleurs abdominales et la toux (National Institute of Materia Medica, 1999).

Dans cette première partie, nous allons décrire la composition chimique de cinq échantillons d'huile essentielle provenant de trois espèces de *Cymbopogon* : *C. winterianus* (Java citronella oil), *C. flexuosus* et *C. tortilis* en utilisant différentes combinaisons des techniques analytiques :

- CPG(Ir) et RMN ^{13}C , ce qui nous permettra d'explicitier notre méthode d'analyse ;
- CPG(Ir), RMN ^{13}C et SM
- Chromatographie sur colonne, CPG(Ir), RMN ^{13}C et SM.

I. 1. *Cymbopogon winterianus*

Cymbopogon winterianus est une herbe vivace cultivée pour son huile essentielle qui est utilisée dans la fabrication de savons, de déodorants et de répulsifs à moustiques. La composition chimique de l'huile essentielle de *C. winterianus*, riche en monoterpènes oxygénés, a fait l'objet de plusieurs études répertoriées par Lawrence (1977a, 1982, 1985, 1993, 1996a). Le citronellal (5,2-50,3%) et/ou le géraniol (11,0-

25,7%) sont toujours les composés majoritaires, parfois accompagnés du citronellol et/ou de l'acétate de géranyle à des teneurs assez importantes. (Lawrence 1977a). Nous avons étudié la composition chimique de deux échantillons d'huile essentielle de cette espèce (Cw1 et Cw2).

I. 1. 1. Huile essentielle de *C. winterianus*, échantillon n°1 : illustration de l'analyse par RMN ¹³C et CPG(Ir)

L'échantillon Cw1 a été analysé par RMN ¹³C, selon la méthode développée au laboratoire et par CPG(Ir). Il se caractérise par une forte proportion de monoterpènes oxygénés (89,4%) parmi lesquels le géraniol, largement majoritaire avec une teneur de 43,3% et le citronellal, 15,0% (Tableau II. 1).

Tableau II. 1. Composés identifiés à partir du spectre RMN ¹³C de l'huile essentielle de *Cymbopogon winterianus* Cw1.

Composés	RMN	Sup	Ir ^a	Ir ^p	% ^a
p-cymène	10/10	0	1010	1272	1,6
linalol	10/10	3	1082	1545	0,9
citronellal	10/10	3	1129	1479	15,0
décanal	10/10	1	1182	1498	0,6
citronellol	10/10	4	1208	1765	9,2
néral	10/10	3	1214	1684	5,3
géraniol	10/10	3	1237	1851	43,3
géraniol	10/10	3	1243	1735	8,9
acétate de citronellyle	12/12	3	1337	1660	1,5
acétate de géranyle	12/12	6	1358	1757	2,7
élémol	14/14	3	1538	2085	2,0
acétate de (E,E)-farnésyle	12/17	3	1825	2278	0,6
Total:					91,6

RMN : nombre de carbones observés par rapport au nombre de pics attendus ; *Sup* : nombre de superpositions, *Ir^a* et *Ir^p* : Indices de rétention mesurés respectivement sur colonnes apolaire (BP-1) et polaire (BP-20); %^a : pourcentage sur colonne apolaire.

D'autres monoterpènes oxygénés sont présents à des teneurs non négligeables comme le citronellol (9,2%), le géraniol (8,9%) et le néral (5,3%). Les autres

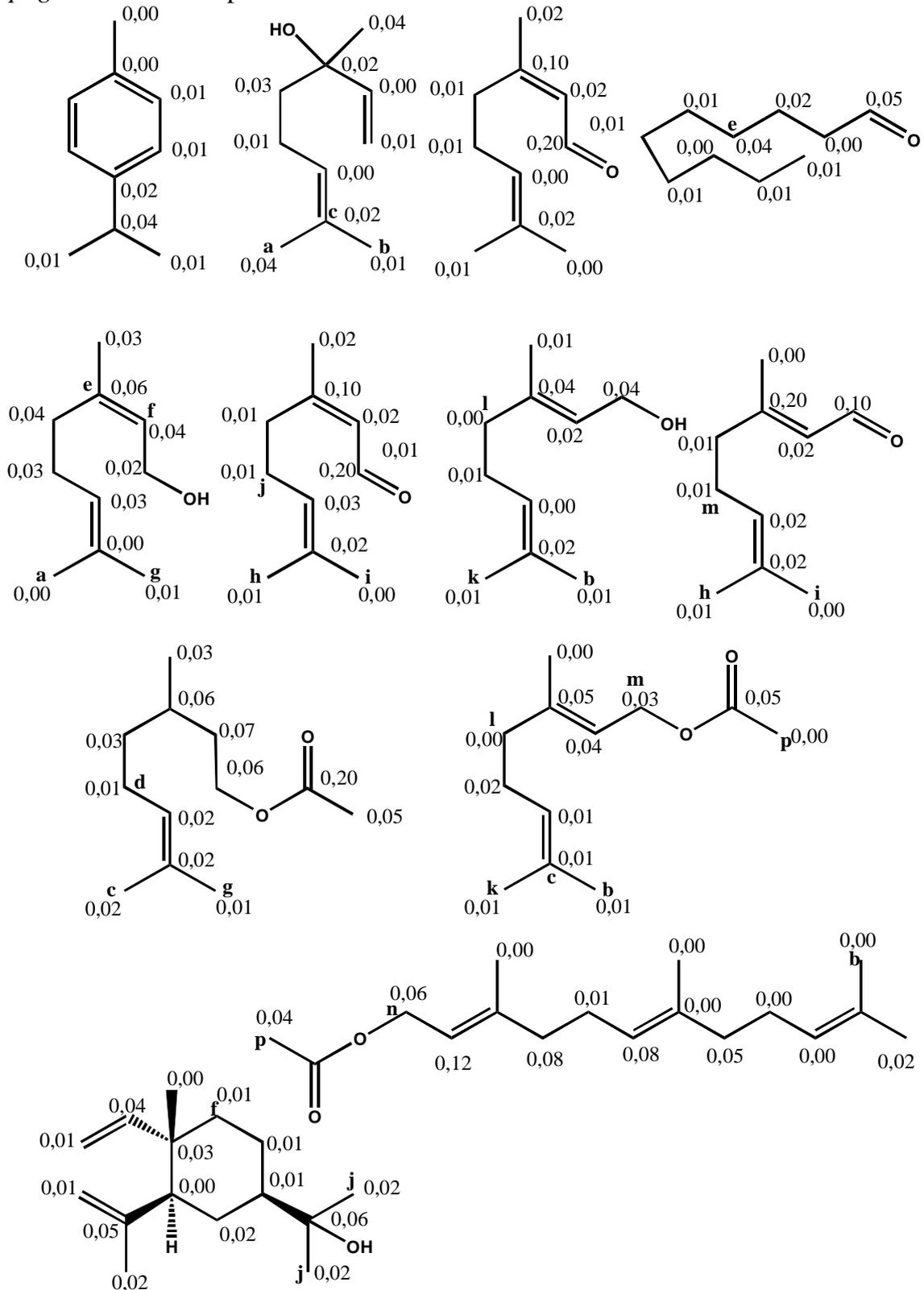
monoterpènes n'excèdent pas pour leur part un taux de 3%. Il s'agit par ordre décroissant d'abondance de l'acétate de géranyle (2,7%), du p-cymène (1,6%), de l'acétate de citronellyle (1,5%) et du linalol (0,9%). Enfin la fraction sesquiterpénique, qui représente 2,6% de la composition globale identifiée, est constituée de l'élémol (2,0%) et de l'acétate de (E,E) farnésyle (0,6%).

Les douze composés identifiés étaient présents dans notre bibliothèque « Terpènes » de spectre RMN ^{13}C constituée au laboratoire (Figure II. 1). Pour chacun d'entre eux :

- tous les signaux des carbones ont été repérés, à l'exception des carbones quaternaires de l'acétate de farnésyle composés dont la teneur est égale 0,6%, mais cela ne gêne en rien son identification ;
- le nombre de superpositions de signaux, compris entre 0 et 6, n'empêche pas l'identification des composés, chacun d'entre eux étant identifié au minimum à partir de 50% des carbones lui appartenant en propre ;
- les variations des déplacements chimiques ($\Delta\delta$ ppm) observées entre les valeurs du mélange et celles des spectres de référence sont inférieures ou égales à 0,05 ppm pour environ 80% des carbones observés, comprises entre 0,06 et 0,07 ppm pour pratiquement tous les autres signaux et sensiblement plus importantes (0,10 et 0,20 ppm) pour les carbonyles du néral, du géraniol et de l'acétate de citronellyle.

En ce qui concerne les composés non identifiés, ils ont tous des teneurs inférieures à 1%. L'analyse d'un échantillon d'huile essentielle de *Cymbopogon winterianus*, par CPG(Ir) et RMN ^{13}C sans séparation préalable, a permis l'identification de 12 composés, majoritairement des monoterpènes oxygénés représentant près de 92% de la composition globale. Cette analyse est tout à fait suffisante pour caractériser cet échantillon.

Figure II. 1. Identification des constituants de l'huile essentielle de *Cymbopogon winterianus* par RMN ^{13}C .



Les molécules sont données dans l'ordre d'élu­tion du tableau II. 1. Les variations de déplacements chimiques par rapport aux valeurs de référence sont reportées à côté des carbones auxquels elles correspondent. Les superpositions des raies de résonance sont signalées par des lettres à proximité des carbones.

I. 1. 2. Huile essentielle de *Cymbopogon winterianus*, échantillon de n°2 :
Complémentarité entre la RMN ¹³C et la spectrométrie de masse

L'échantillon Cw2 a été analysé par RMN ¹³C associée à la CPG(Ir), mais également par CPG-SM afin d'identifier les composés minoritaires (Tableau II. 2). La combinaison de ces techniques d'analyse a conduit à l'identification de 46 composés, représentant 91,9% de la composition globale. Tous les composés dont la teneur est supérieure à 0,5% ont été identifiés par RMN ¹³C. Au total, on distingue 32 monoterpènes, 10 sesquiterpènes, 1 normoterpène et 3 composés linéaires non terpéniques. Le géraniol est de nouveau le composé majoritaire (50,2%), le second composé en importance étant cette fois-ci le géraniol (8,3%), le néral étant présent à une teneur de 4,8%. On observe la présence des oxydes de géraniol et de néral (dont on peut se demander s'ils ne sont pas des artéfacts). Enfin, des monoterpènes bicycliques pontés sont présents à des teneurs appréciables dans cet échantillon : camphène, 4,0% et acétate de bornyle, 3,4%. Par contre, l'élémol est absent alors qu'il était présent dans l'échantillon Cw1.

Tableau II. 2. Composition chimique des huiles essentielles de *C. winterianus* Cw2

Composés	Ir ^a	Ir ^p	% ^a	Identification
tricyclène	922	1020	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
α-pinène	931	1022	0,9	Ir, SM, RMN ¹³ C
camphène	943	1066	4,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
6-méthylhépt-5-èn-2-one	963	1338	0,3	Ir, SM
β-pinène	970	1110	tr	Ir, SM
myrcène	979	1161	0,2	Ir, SM
p-cymène	1010	1272	0,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
limonène	1020	1203	2,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
(Z)-β-ocimène	1024	1233	0,2	Ir, SM
(E)-β-ocimène	1034	1250	0,1	Ir, SM
cis oxyde de linalol THF	1056	1442	0,2	Ir, SM
linalol	1082	1545	2,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
trans oxyde de linalol THF	1085	1467	0,1	Ir, SM
citronellal	1129	1479	0,1	Ir, SM
bornéol	1148	1697	0,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
oxyde de β-pinène	1152	1485	0,1	Ir, SM

nonanol	1155	#	0,2	Ir, SM
isogéranial	1158	#	0,2	Ir, SM
terpinèn-4-ol	1160	1599	0,2	Ir, SM
α -terpinéol	1171	1697	0,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
déc-4-ènal	1177	1539	0,2	Ir, SM
décanal	1182	1498	0,2	Ir, SM
2,3-époxynéral	1195	#	0,2	Ir, SM
2,3-époxygéranial	1205	#	0,3	Ir, SM
citronellol	1208	1765	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
néral	1214	1684	4,8	Ir, SM, RMN ¹³ C
pipéritone	1237*	1731	0,4	Ir, SM
géraniol	1237*	1851	50,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
géranial	1243	1735	8,3	Ir, SM, RMN ¹³ C
acétate de bornyle	1269	1579	3,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
formate de néryle	1283	1707	2,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
6,7-époxynéral	1303	1952	0,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
acétate d' α -terpinyle	1331	1702	0,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
acétate de citronellyle	1337	1660	0,2	Ir, SM
acide géranique	1353	2325	0,1	Ir, SM
acétate de géranyle	1358	1757	3,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
β -élémente	1387	1594	0,2	Ir, SM
(E)- β -caryophyllène	1418	1594	0,2	Ir, SM
α -humulène	1432	1586	0,1	Ir, SM
cuparène	1494	1825	0,2	Ir, SM
oxyde de caryophyllène	1571	1988	1,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
époxyde d'humulène II	1595	2044	0,2	Ir, SM
10-épi- γ -eudesmol	1618	2083	0,1	Ir, SM
β -eudesmol	1636	2230	0,1	Ir, SM
α -eudesmol	1642	2127	0,1	Ir, SM
acétate de (E,E)-farnésyle	1825	2278	0,1	Ir, SM
Total:			91,9	

L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, Ir^a et Ir^p : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP-1) et polaire (BP-20). # : indices de rétention non déterminés, tr : composés à l'état de trace <0,05%.

Les huiles essentielles de *C. winterianus* que nous avons étudiées, sont caractérisées par une prédominance des monoterpènes oxygénés acycliques, alcools, aldéhydes et acétates qui représentent en effet plus de 70% de la composition chimique globale. Le géraniol est le composé majoritaire des deux échantillons (43,3% et 50,2%). Le géranial et le néral sont les seuls autres produits présents à une teneur

assez importante dans les deux échantillons (respectivement 8,9% et 5,3% dans *Cw1* et 8,3% et 4,8% dans *Cw2*). Les deux échantillons se distinguent néanmoins par la présence dans *Cw1* du citronellal à une teneur relativement importante (15,0%), alors que ce composé est très minoritaire (0,1%) dans *Cw2* et inversement des monoterpènes bicycliques pontés sont présents, à des teneurs appréciables, dans *Cw2*.

La composition chimique des deux échantillons du Viêt-Nam étudiés, riche en géraniol, peut être considérée comme originale car ce composé est rarement majoritaire dans les huiles essentielles de *C. winterianus* décrites dans la littérature et dans tous les cas, il n'est jamais présent à une teneur aussi importante (26,5% au maximum) (Lawrence 1977a, 1982).

I. 2. *Cymbopogon flexuosus* :

C. flexuosus est une herbe vivace, à feuilles très retombantes. La panicule est grisâtre, composée, à rameaux allongés, grêles, flexueux et souvent penchés. L'huile essentielle produite à partir de cette plante, qui possède un parfum de violette et de citron, est utilisée en parfumerie. Au Viêt-Nam, cette huile essentielle est utilisée contre le choléra et les rhumatismes (Petelot, 1952).

Plusieurs études relatives à la composition chimique des huiles essentielles de feuilles de *C. flexuosus* sont décrites dans la littérature. Elles mettent en évidence la présence de plusieurs compositions chimiques. La plus couramment rencontrée est celle à géraniol/néral (42-62/14-36%) (Lawrence 1977b, 1978, 1984, 1992; Nath *et al.*, 2002). Le géraniol, l'acétate de géranyle et le myrcène sont parfois présents à des teneurs assez importantes (jusqu'à 16%). D'autres compositions chimiques plus ponctuelles sont également décrites :

- géraniol majoritaire (48-75%) (Lawrence 1998),
- géraniol/camphène (32/13%) (Lawrence 1998),
- citronello/géraniol/géraniol/acétate de géranyle (30/18/15/15%) (Nath *et al.*, 2002),
- méthyl eugénol / méthyl (E)-isoeugénol (34/20%) (Nath *et al.*, 2002),
- enfin, élémicine ultra-majoritaire (plus de 70%) (Nath *et al.*, 2002).

Nous avons étudié deux échantillons d'huiles essentielles de feuilles de *C. flexuosus*, Cf 1 et Cf2, par RMN ^{13}C et par CPG(Ir).

I. 2.1. Analyse de l'échantillon Cf 1

L'analyse de l'huile essentielle de feuilles Cf 1 par CPG(Ir) et RMN ^{13}C a permis d'identifier 19 composés, correspondant à 91% de la composition chimique totale. Cette huile essentielle est riche en monoterpènes oxygénés (Tableau II. 3), la composition chimique est en effet dominée par le géraniol (32,3%), le citronellal (15,0%) et le citronellol (11,3%).

Tableau II. 3. Composition chimique de l'échantillon Cf 1

Composés	Ir ^a	Ir ^p	% ^a	Identification
p-cymène	1013	1276	1,0	Ir, RMN ^{13}C
linalol	1082	1544	1,0	Ir, RMN ^{13}C
citronellal	1134	1486	15,0	Ir, RMN ^{13}C
décanal	1186	1503	0,8	Ir, RMN ^{13}C
citronellol	1213	1772	11,3	Ir, RMN ^{13}C
néral	1218	1689	5,1	Ir, RMN ^{13}C
géraniol	1240	1850	32,3	Ir, RMN ^{13}C
géranial	1247	1740	8,3	Ir, RMN ^{13}C
acétate de citronellyle	1335	1661	1,2	Ir, RMN ^{13}C
acétate de géranyle	1361	1757	1,4	Ir, RMN ^{13}C
β -élémyène	1392	1593	1,7	Ir, RMN ^{13}C
α -cédrène	1422	1575	0,4	Ir, RMN ^{13}C
trans- α -bergamotène	1436	1587	1,1	Ir, RMN ^{13}C
élémol	1539	2088	6,2	Ir, RMN ^{13}C
γ -eudesmol	1624	2176	1,3	Ir, RMN ^{13}C
β -eudesmol	1642	2230	1,0	Ir, RMN ^{13}C
α -eudesmol	1649	2224	1,0	Ir, RMN ^{13}C
(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-farnesol	1704	2361	0,4	Ir, RMN ^{13}C
(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-farnésal	1719	2266	0,5	Ir, RMN ^{13}C
Total:			91,0	

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

D'autres monoterpènes sont présents en quantité appréciable, notamment le géraniol (8,3%) et le néral (5,1%). Cet échantillon contient également quelques sesquiterpènes parmi lesquels l'élémol (6,2%) et trois eudesmols (α , β , γ environ 1% chacun) sont les plus abondants.

I. 2. 2. Etude de l'échantillon Cf2 : fractionnement par chromatographie sur colonne de silice et analyse par RMN ^{13}C , CPG(Ir) et CPG-SM

L'échantillon Cf 2 a été analysé par CPG (Ir), par RMN ^{13}C et par CPG-SM. Ensuite cet échantillon a été fractionné sur colonne de silice et les fractions ont été analysées par CPG (Ir), par RMN ^{13}C . L'analyse de l'échantillon Cf 2 par RMN ^{13}C et de CPG(Ir) nous a permis d'identifier directement 6 constituants représentant 68% de la composition globale. Le géraniol (39,2%) et le néral (24,1%) sont les deux composés majoritaires. Viennent ensuite l'oxyde de caryophyllène (1,6%), l'acide gérannique (1,3%), le γ -cadinène (1,2%) et la 6-méthylhept-5-èn-2-one (0,9%). Cependant, l'examen du chromatogramme révèle la présence de nombreux composés non identifiés, parmi lesquels deux composés sont présents en quantité appréciable (environ 4,5% chacun), que nous nommerons A et B. D'ailleurs, le spectre RMN ^{13}C présente également plusieurs signaux non attribués, dont certains correspondent manifestement aux composés A et B, qui sont donc absents de nos bibliothèques de spectres construites au laboratoire, bibliothèque «Terpènes» construite avec des spectres enregistrés au laboratoire et bibliothèque «Littérature» construite avec les données de la littérature. Toutefois, la complexité du spectre ne permet pas de repérer avec certitude l'ensemble des signaux des composés A et B. Il faut préciser que l'analyse de cet échantillon par CPG-SM a confirmé l'identification des six composés préalablement identifiés par RMN, de plusieurs composés minoritaires mais qu'aucune réponse satisfaisante n'a été obtenue pour les composés A et B, laissant suspecter que ces molécules sont absentes des bibliothèques de spectres commerciales (NIST, 1999 ; Mc Lafferty et Stauffer 1994 ; Joulain et König 1998 ; König *et al.*, 2001 ; Adams, 1989, 2001) et celle du Laboratoire des Produits Naturels de l'Université de Corse. C'est pourquoi nous avons fractionné cette huile essentielle par chromatographie sur colonne de silice, afin de concentrer ces deux composés dans une des fractions. Ce fractionnement devrait également nous permettre d'identifier

plusieurs composés minoritaires, présents en trop faible quantité dans l'huile essentielle pour être détectés par RMN ^{13}C .

Afin d'identifier ces deux composés, nous avons soumis l'huile essentielle à un fractionnement par chromatographie sur gel de silice de type « flash ». Nous avons obtenu six fractions éluées respectivement au pentane (F1), avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle (Et_2O) 97/3 (F2, F3, F4), puis 90/10 (F5) et enfin avec Et_2O (F6). Chacune de ces fractions a ensuite été analysée par RMN ^{13}C et CPG(Ir) (tableau II. 4).

- Dans de la fraction hydrocarbonée F1, nous identifions 5 composés supplémentaires, tous des sesquiterpènes. Le composé majoritaire est le γ -cadinène (74,0%) viennent ensuite le *trans*- α -bergamotène (5,4%), le β -élémane (2,4%), le cuparène (1,9%), le δ -cadinène (1,8%) et le 1,5-diépi-aristolochène (0,6%).

- Dans le spectre de la fraction F2, en plus de la 6-méthylhept-5-èn-2-one, du néral, du géranial et de l'oxyde de caryophyllène majoritaires, on identifie 3 composés, le décanal (0,7%), le géraniate de méthyle (1,0%) et l'acétate de géranyle (0,8%).

- L'eugénol (0,6%) est le seul composé nouveau identifié dans la fraction F3, dominée par le couple géranial/néral (56,1%/38,0%).

- Dans la fraction F4, 3 constituants non identifiés dans l'huile essentielle brute, ont pu être mis en évidence : le linalol (3,5%), la pipéritone (1,6%) et l'octanal (0,6%).

- L'analyse de la fraction F5 permet de détecter 6 composés supplémentaires, tous des alcools : le géranol (2,3%), le (2E,6E)-farnésol (2,2%), l'élémol (1,3%), le nérol (1,2%), le bornéol (1,1%) et le linalol (0,6%).

- Enfin, dans la fraction F6 élue à l'oxyde de diéthyle, seuls deux alcools minoritaires sont identifiés directement : le *trans*-oxyde de linalol THF (0,7%) et le géranol (1,1%).

Tableau II. 4. Constituants de l'échantillon Cf 2

Fraction	HE	F1	F2	F3	F4	F5	F6		
Elution (Pentane/Ether)	(100/0)(97/3)(97/3)(97/3)(90/10)(0/100)								
Masse de la fraction (mg)	1000	21	88	295	70	62	380		
Composés	Ir^a	Ir^p							
6-méthylhept-5-èn-2-one	961	1338	0,9	3,6					
octanal	980	1294	0,1			0,6			
trans oxyde de linalol THF	1075	1467	0,1			0,7			
linalol	1081	1545	0,1			3,5	0,6		
bornéol	1142	1697	0,2			1,1			
α -terpinéol	1166	1697	0,5			1,2			
décanal	1186	1498	0,2	0,7					
nérol	1213	1792	0,1			1,0			
néral	1220	1684	24,1	39,0	38,0	11,1			
pipéritone	1229	1731	0,2			1,6			
géraniol	1231	1851	0,3			2,3	1,1		
géraniel	1249	1735	39,2	20,4	56,1	70,8	2,5		
A	1252	1940	4,5			21,5			
B	1257	1957	4,4			21,3			
géraniate de méthyle	1305	1680	0,7	1,0					
eugénol	1341	2178	0,5			0,6			
acide gérannique	1343	2325	1,3			41,7			
acétate de géranyle	1363	1757	0,3	0,8					
β -élémente	1391	1597	0,1	2,4					
trans- α -bergamotène	1430	1587	0,3	5,4					
1,5-diépiaristolochène	1470	1672	tr	0,6					
γ -cadinène	1496	1752	1,2	74,0					
δ -cadinène	1507*	1752	0,2	1,8					
cuparène	1507*	1825	0,1	1,9					
élémol	1538	2088	0,1			1,3			
oxyde de caryophyllène	1576	1988	1,6	9,8	0,9				
(2E,6E)-farnésol	1704	2361	0,1			2,2			
Total:			81,3	86,1	75,3	95,6	87,6	53,9	44,6

*L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, Ir^a: indices de rétention mesurés sur colonne apolaire (BP-1). * composés superposés sur colonne apolaire les % sont ceux de la colonne polaire.*

De plus, on observe dans le spectre RMN ^{13}C de la fraction F6, 16 signaux d'intensité assez importante et 4 signaux deux fois moins intenses, tous non attribués, qui correspondent vraisemblablement aux composés recherchés A et B, à des teneurs quasiment identiques (21,5% et 21,3%) d'après le chromatogramme. Il s'agit en fait de deux séries de 10 valeurs de déplacements chimiques très proches deux à deux, qui laissent supposer la présence de deux monoterpènes isomères. D'ailleurs ces deux composés possèdent des indices de rétention qui ne diffèrent que par 5 points sur colonne apolaire et 17 points d'indice sur colonne polaire. Nous avons également enregistré les spectres en RMN ^{13}C avec les séquences DEPT qui ont permis de distinguer, pour chaque molécule, les groupements suivants :

- 2 carbones quaternaires dont l'un correspondant à un alcool tertiaire (70,90/71,15 ppm) et l'autre plutôt à un groupement C-O (80,17/81,28 ppm),
- 2 méthynes (CH) dont un aldéhydique (202,29/202,49 ppm) et un groupement CH-O (85,71/86,15 ppm),
- -3 CH_2 aliphatiques (54,08/54,18ppm ; 38,05/38,15ppm ; 26,08/26,22 ppm),
- -3 méthyles (CH_3) (27,27/27,38ppm ; 27,57/26,84ppm; 24,16/24,45 ppm).

Pour résumer, l'analyse des déplacements chimiques dans le spectre de RMN ^{13}C et des spectres DEPT nous amène à penser que nous sommes en présence de deux isomères de formule $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_3$. Ces composés possèdent une fonction alcool, une fonction aldéhyde et une fonction oxyde. Par ailleurs, la présence d'un CH_2 à environ 54 ppm suggère l'existence d'un groupement $\text{CH}_2\text{-CHO}$. Tenant compte de ce point, des 3 méthyles, du carbone portant l'alcool tertiaire, et du nombre d'insaturations égal à 2 (à savoir la fonction aldéhyde et forcément un cycle), nous proposons une structure tétrahydrofurannique (THF). La structure 7-hydroxy-3,7-diméthyl-(3,6)-oxyoctanal répond à toutes les caractéristiques du spectre RMN, avec la possibilité d'avoir deux isomères *cis* et *trans*. (Tableaux II. 5 et 6).

L'interrogation de la banque de données « Beilstein » nous indique que ces composés sont décrits dans une publication récente (Yarovaya *et al.*, 2002). Les auteurs ont en fait préparé ces deux composés par hémisynthèse à partir du citral. Les valeurs d'attribution des déplacements chimiques de leurs carbones correspondent bien avec celles que nous reportons, confirmant ainsi l'identification de ces deux

isomères dans cette huile essentielle. Ces deux composés étant présents à des teneurs trop proches, aussi bien dans la fraction F6 (21,5 et 21,3%) que dans l'huile essentielle brute (4,4 et 4,5%), il n'est pas possible d'affecter à chacun des isomères (*cis* et *trans*) les indices de rétention en CPG. En revanche, nous avons également identifié ces deux composés par RMN ^{13}C dans l'huile essentielle de *C. tortilis* (voir paragraphe suivant) dans laquelle ils sont présents à des teneurs assez différentes (2,5 et 1,4%). Dans ces conditions, l'examen de l'intensité de leurs signaux de RMN nous a permis de déterminer que le composé A (Ira=1252 ; Irp=1940) est le *trans*-7-hydroxy-3,7-diméthyl-(3,6)-oxyoctanal et le composé B (Ira=1257 ; Irp=1957) est le *cis*-7-hydroxy-3,7-diméthyl-(3,6)-oxyoctanal.

Tableau II. 5. Structure et déplacements chimiques (ppm) du *trans*-7-hydroxy-3,7-diméthyl-(3,6)-oxyoctanal

<i>trans</i> -7-hydroxy-3,7-diméthyl-(3,6)-oxyoctanal			
C	$\delta(\underline{\text{A}})$ (ppm)	δ (ref)(ppm)	
1	202,29	200,59	
2	54,08	54,00	
3	81,17	80,99	
4	38,05	37,93	
5	26,08	26,03	
6	86,15	86,09	
7	70,90	70,31	
8	24,15	24,31	
9	27,57	27,56	
10	27,27	27,39	

$\delta(\underline{\text{A}})$: déplacements chimiques observés dans la fraction F6, $\delta(\text{ref})$ déplacements chimiques observés dans la littérature.

Tableau II. 6. Structure et déplacements chimiques (ppm) du *cis*-7-hydroxy-3,7-diméthyl-(3,6)-oxyoctanal

<i>Cis</i> -7-hydroxy-3,7-diméthyl-(3,6)-oxyoctanal			
C	$\delta(\mathbf{B})$ (ppm)	δ (ref)(ppm)	
1	202,49	200,90	
2	54,18	54,09	
3	81,28	81,05	
4	38,16	38,15	
5	26,22	25,89	
6	85,71	85,63	
7	71,15	70,58	
8	24,45	24,63	
9	26,84	26,89	
10	27,38	27,48	

$\delta(\mathbf{B})$: déplacements chimiques observés dans la fraction F6, δ (ref): déplacements chimiques observés dans la littérature

A l'issue de l'étude de l'échantillon Cf2, nous pouvons faire le bilan suivant : L'analyse de l'huile essentielle par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ^{13}C associée à un fractionnement de l'huile essentielle par chromatographie sur colonne et à l'analyse des fractions par RMN ^{13}C a permis d'identifier au total 27 composés qui représentent plus de 80% de la composition globale (Tableau II. 4). Parmi ces constituants, nous avons identifié par RMN ^{13}C , les *cis*- et *trans*-7-hydroxy-3,7-diméthyl-(3,6)-oxyoctanal.

La composition chimique de l'échantillon Cf 1 se rapproche donc de celle à géraniol majoritaire reportée ponctuellement dans la littérature pour la même espèce (Lawrence 1998), bien que notre échantillon se distingue par une teneur plus faible en géraniol et par la présence de citronellol et d'élémol à des teneurs appréciables (respectivement 11,3 et 6,2%). L'échantillon Cf 2 possède lui une composition chimique plus classique de type géraniol/néral largement décrite (Nath *et al.*, 2002 ; Lawrence 1977b, 1978, 1984, 1992). Toutefois, on note certaines différences au niveau des produits minoritaires notamment la présence des 7-hydroxy-3,7-diméthyl-

(3,6)-époxyoctanal (plus de 4% chacun) reportés pour la première fois dans un produit naturel.

I. 3. Huile essentielle de *Cymbopogon tortilis*. Analyse par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ¹³C.

Comme les autres espèces de *Cymbopogon*, *C. tortilis* est une herbe vivace. A notre connaissance, une seule étude relative à la composition chimique de *C. tortilis* est décrite dans la littérature. L'échantillon analysé provenant de Chine est composé majoritairement de méthyleugenol (Liu *et al.*, 1981). Nous avons analysé un échantillon d'huile essentielle de *C. tortilis* provenant du Viêt-Nam, par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ¹³C (Tableau II. 7). La combinaison des techniques nous a permis d'identifier 34 composés correspondant à environ 80% de la composition chimique globale. Parmi eux, on dénombre 23 monoterpènes, 7 sesquiterpènes, 4 composés linéaires. Il s'agit d'une huile essentielle assez complexe qui renferme de nombreux composés minoritaires absents de nos différentes bibliothèques de spectres de RMN et de masse.

Tableau II. 7. Composition chimique d'un échantillon d'huile essentielle de *C. tortilis*

Composés	Ir ^a	Ir ^p	% ^a	Identification
heptanal	883	1168	0,1	Ir, SM
6-méthylhept-5-èn-2-one	961	1343	1,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
octanal	980	1294	0,1	Ir, SM
p-cymène	1013	1276	0,7	Ir, SM, RMN ¹³ C
limonène	1020	1199	0,2	Ir, SM
<i>cis</i> -oxyde de linalol THF	1058	1446	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
<i>trans</i> -oxyde de linalol THF	1073	1475	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
linalol	1082	1544	2,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
citronellal	1134	1486	0,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
pinocamphéol	1166	1712	0,3	Ir, SM
2,3-époxyneral	1198	#	0,3	Ir, SM
2,3-époxygéraniol	1208	#	0,4	Ir, SM
neral	1220	1691	19,1	Ir, SM, RMN ¹³ C

pipéritone	1229	1722	0,2	Ir, SM
géraniol	1240	1850	2,1	Ir, SM, RMN ¹³ C
géraniol	1249	1743	32,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
<i>trans</i> -7-hydroxy-3,7-diméthyl-3,6-oxyoctanal	1252	1940	2,5	RMN ¹³ C
<i>cis</i> -7-hydroxy-3,7-diméthyl-3,6-oxyoctanal	1257	1957	1,4	RMN ¹³ C
formate de néryle	1263	1666	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
acétate de lavandulyle	1275	1586	0,3	Ir, SM, RMN ¹³ C
isoascaridole	1283	1853	0,7	Ir, SM, RMN ¹³ C
6,7-époxyneral	1302	1956	1,9	Ir, SM, RMN ¹³ C
6,7-époxygéraniol	1337	2041	5,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
acétate de néryle	1341	1734	1,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
acide géranique	1343	2356	1,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
acétate de géranyle	1363	1761	0,2	Ir, SM,
β-élémente	1391	1587	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
α- <i>trans</i> -bergamotène	1430	1587	0,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
tridécan-2-one	1478	1592	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
(Z,E)-α-farnésène	1483	1723	0,9	Ir, SM, RMN ¹³ C
β-élémol	1538	2077	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
oxyde de caryophyllène	1576	1980	3,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
époxyde d'humulène	1600	2049	0,4	Ir, SM
α-cadinol	1644	2229	0,3	Ir, SM

Total:**82,4**

L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, Ir^a et Ir^p : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP-1) et polaire (BP-20). # : indice de rétention non déterminés, tr : composés à l'état de trace <0,05%.

Comme dans le cas de l'échantillon Cf 2, le couple géraniol/néral (32,0/19,1%) domine la composition chimique de cette huile essentielle. Tous les autres composés sont présents à une faible teneur, inférieure ou égale à 5,0%, il s'agit essentiellement de monoterpènes oxygénés. Parmi ces composés, nous notons de nouveau la présence des *cis* et *trans*-7-hydroxy-3,7-diméthyl-(3,6)-oxyoctanal (respectivement 2,5 et 1,4%), qui n'ont pas pu être identifiés par CPG-SM car ils étaient absents des différentes bibliothèques. La composition chimique de cette l'huile essentielle de *C. tortilis* diffère donc de celle de Chine riche en méthyl-eugénol composé absent de notre échantillon. En revanche, elle s'assimile à celles précédemment reportées pour *C. flexuosus* (Nath *et al.*, 2002), et *C. citratus* (Carlson *et al.*, 2001), également

caractérisées par le couple géraniol/nérol. Cette étude montre la nécessité de réaliser un plus large échantillonnage concernant *C. tortilis* afin de mettre en évidence une éventuelle variabilité chimique au sein de cette espèce.

A notre avis, ces quelques exemples illustrent parfaitement l'intérêt de disposer de différentes techniques analytiques pour caractériser les huiles essentielles, ainsi que de les combiner pour réaliser une analyse détaillée ou pour identifier certains composés inhabituels, absents des bibliothèques de spectres. Ainsi :

- l'analyse par RMN ¹³C et CPG(Ir) est suffisante pour identifier les constituants d'une huile essentielle jusqu'à une teneur minimale de 0,6% et donc caractériser l'échantillon *cw1*;
- l'association de la CPG-SM aux techniques précédentes permet d'obtenir des informations sur les composés minoritaires, ainsi nous avons pu obtenir une étude détaillée des échantillons *cw2* ; *cf2* et de l'huile essentielle de *C. tortilis*;
- le fractionnement sur colonne de silice, associé à l'analyse de l'huile essentielle par CPG(Ir), par CPG-SM ainsi qu'à l'analyse des fractions par RMN ¹³C permet en outre d'identifier des molécules absentes de nos bibliothèques de spectres (SM et RMN ¹³C), comme cela a été le cas lors de l'analyse de l'échantillon *cf1* dans lequel nous avons identifié le *trans*-7-hydroxy-3,7-diméthyl-(3,6)-oxyoctanal et l'isomère *cis*.

II. VARIABILITE CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES D'HYBRIDES CLEMENTINIER COMMUN X MANDARINIER WILLOW LEAF

II. 1. Généralités sur les agrumes :

II. 1.1. Les agrumes

Les agrumes sont originaires du Sud-Est asiatique où ils sont connus depuis 4200 ans et cultivés depuis 3000 ans. En Europe, la première espèce à avoir été introduite est le cédratier (*Citrus medica* L.) 300 ans avant JC. Le bigaradier (*C. aurantium* L.), le citronnier (*C. limon* (L.) Burm.) et l'oranger (*C. sinensis* (L.) osb.)

n'ont été introduits dans le bassin méditerranéen que vers la moitié du XII^e siècle et le mandarinier (*C. reticulata*) au XIX^e siècle.

Deux grandes classifications sont généralement utilisées : celle de Tanaka (1961) qui comporte 156 espèces, et celle de Swingle et Reece (1967) qui n'en distingue que 16. Les agrumes appartiennent à la famille des *Rutaceae*, sous famille des *Aurantioideae*, tribu des *Citreae* et sous tribu des *Citrineae*. Dans cette dernière, on distingue trois groupes dont les agrumes vrais et parmi ceux-ci, les trois genres botaniques les plus connus : *Citrus*, *Poncirus* et *Fortunella* (Swingle et Reece, 1967). Le genre *Fortunella* désigne les kumquats, il comprend deux ou quatre espèces, selon les auteurs ; elles servent essentiellement à la fabrication de confitures. Le genre *Poncirus* renferme une seule espèce *P. trifoliata* (L.) Raf. Elle produit des fruits non comestibles, mais joue un rôle important en agrumiculture comme porte-greffe. Le genre *Citrus* comprend la plupart des agrumes cultivés pour leurs fruits ou leurs huiles essentielles.

Les agrumes occupent la première place des productions fruitières dans le Monde avec plus de 115 millions de tonnes produites. Leur culture s'étend sur plus de 3 millions d'hectares, des zones tempérées chaudes aux zones tropicales, entre 40° de latitude nord et 40° de latitude sud. Historiquement, la production a été d'abord développée aux Etats-Unis et en Méditerranée. Elle a ensuite connu un grand essor au Brésil et en Asie. En 2002, le plus gros producteur d'agrumes était le Brésil avec presque 20 millions de tonnes produites. Viennent ensuite la région méditerranéenne avec 19 millions de tonnes, les Etats-Unis avec 14 millions de tonnes et la Chine avec 12 millions de tonnes. Les oranges représentent les deux tiers de cette production, les clémentines 17%, les citrons et les limes 11% et les pomelos 6%. Ces agrumes offrent une grande étendue d'utilisation, allant de la consommation en fruit frais, à la transformation en jus, confits ou liqueurs. Le volume de fruits transformé est évalué à 35% de la production totale et est en constante évolution.

La valorisation des agrumes passe également par la production et la commercialisation des huiles essentielles qui en sont extraites soit par expression à froid des zestes soit par entraînement à la vapeur des rameaux (petit grain). Les huiles

essentielles d'agrumes, particulièrement odorantes, sont très utilisées dans l'industrie pharmaceutique, en parfumerie, ou encore dans l'industrie agro-alimentaire. Les huiles essentielles de zestes d'orange et de citron représentent plus du tiers de la production mondiale d'huiles essentielles. Celles obtenues à partir de fleurs de bigaradier appelées communément « Neroli » sont très prisées par les parfumeurs. Les huiles essentielles d'agrumes sont principalement composées de monoterpènes oléfiniques (de 60 à 98% de l'huile totale), le limonène étant dans la plupart des cas le composé majoritaire. Les composés oxygénés sont, en grande partie, responsables de l'arôme si particulier des huiles essentielles d'agrumes.

Le centre INRA de Corse à San Ghjulianu développe depuis de nombreuses années un programme qui a pour objectif d'appréhender le contrôle génétique des critères de qualité des agrumes parmi lesquels, le goût et l'attractivité pour le consommateur. A côté de l'étude de l'acidité et du contenu en sucres et en caroténoïdes, l'INRA s'intéresse aussi aux composés volatils, principalement aux terpènes, qui sont les principaux composés responsables de l'odeur et de l'arôme, si particuliers, des agrumes. En effet, c'est au cours de l'épluchage que le consommateur perçoit les premiers arômes du fruit, lorsque des vésicules de la peau sont détruites et que les composés volatils se dégagent. C'est pourquoi, les compositions chimiques des huiles essentielles de zestes et de feuilles d'agrumes ont fait l'objet d'un grand nombre d'études (Lota *et al.*, 2000, 2001 ; Merle *et al.*, 2004).

II. 1.2. Reproduction sexuée et hybridation somatique

Chez les agrumes, le nombre de chromosomes de base est $n=9$. La grande majorité des agrumes est diploïde, il existe toutefois quelques polyploïdes naturels, tels *Fortunella hindsii* (4X) ou la lime de Tahiti (3X). La plupart des agrumes ont une graine polyembryonnée : un embryon est issu de la fusion du pollen et d'un ovule (embryon zygotique), les autres dérivent du tissu nucellaire (embryons nucellaires). La compétition entre les embryons d'un pépin engendre souvent la non germination ou la létalité de l'embryon zygotique présentant souvent des capacités amoindries par rapport aux embryons nucellaires. Il en résulte que la polyembryonie est un obstacle à l'obtention d'hybrides sexués. On peut aussi rencontrer chez les agrumes une

stérilité gamétique, en plus de phénomènes d'auto- et d'inter-incompatibilité. Le brassage génétique est donc considérablement limité.

La mise en place de l'hybridation somatique permet d'outrepasser ces facteurs limitants. Développée dans les années 80 avec la création du premier hybride inter générique entre *Poncirus trifoliata* et *Citrus sinensis* (Gancel, 2004), cette technique permet ainsi d'élargir le domaine des ressources génétiques utilisables et d'améliorer la qualité des agrumes. On entend par qualité une plus grande résistance aux maladies, à la sécheresse et au froid, mais aussi des fruits sans pépin, de bonne qualité organoleptique, plus faciles à éplucher, et une production plus importante qui s'étend sur une période plus longue (variété précoce ou tardive). Un hybride somatique clémentine x citron (Gazea *et al.*, 1998) a été étudié dans ce but. On a pu également constater que sa composition chimique était héritée des deux parents avec une influence légèrement plus importante de la part de la clémentine. Cette héritabilité des caractères dans d'autres cas d'hybridations somatiques a aussi été constatée pour un croisement clémentine x orange (Ruberto *et al.*, 1997). Toutefois, la plupart de ces études sont menées sur des zestes ou des jus de fruits frais où la teneur en limonène domine (90-95%). L'étude de l'héritabilité se limite donc à 5 ou à 10% de la composition chimique globale (Shaw *et al.*, 2001). Une étude portant sur les feuilles d'hybrides d'agrumes a été réalisée par Gancel (2004). Les composés volatils de feuilles de neuf agrumes (lime, deux citrons, cédrat, orange douce, pomelo, mandarine, kumquat, *Poncirus*) et d'hybrides résultant de combinaisons multiples de ces géniteurs (diallèles, test cross) ont été analysés par CPG-SM. Les composés volatils détectés sont essentiellement des mono- et sesquiterpènes (oléfines, alcools et aldéhydes) et le N-méthyl-anthranilate de méthyle, composé spécifique de la mandarine. Pour l'ensemble des hybrides étudiés, lorsque la mandarine est l'un des deux parents, les caractéristiques chimiques du mandarinier sont dominantes. Enfin, une étude de la composition chimique des huiles essentielles de feuilles d'hybrides, issus d'un croisement entre le clémentinier commun et le mandarinier de Willow Leaf a été réalisée par le laboratoire en collaboration avec l'INRA (Tomi *et al.*, 2008). Les échantillons étaient repartis en deux groupes dont un divisé en deux sous-groupes. Ainsi, plus de la moitié des échantillons étudiés présente un type chimique à N-

méthyle anthranilate de méthyle proche de celui du parent mandarine (groupe 1). Un tiers des échantillons est caractérisé par l'association sabinène/linalol qui est le type chimique du parent clémentine (groupe 2A). Le reste des échantillons est caractérisé par l'association linalol/ γ -terpinène et présente une composition chimique originale par rapport à celles des deux parents (groupe 2B).

II.1.3. Objectif de l'étude

L'objectif de ce travail est de contribuer à l'étude, chez les agrumes, de l'héritabilité des caractères qualitatifs et quantitatifs que sont les constituants des huiles essentielles. Il s'inscrit dans la continuité de l'étude des huiles essentielles de feuilles des hybrides entre la clémentine commune et la mandarine Willow Leaf. Il s'agit plus précisément d'examiner les compositions chimiques des huiles essentielles de zestes de fruits de ces mêmes hybrides, produits quelques années plus tard (lorsque les arbres sont âgés de 9 ans) et de les comparer à celles des huiles essentielles de feuilles correspondantes analysées précédemment. L'idée développée étant de savoir s'il existe une relation entre ces compositions et donc de déterminer si on peut utiliser les feuilles de jeunes plants pour prévoir la qualité aromatique des fruits à venir. Ce travail constitue une étape indispensable pour la localisation sur une carte génétique des loci impliqués dans la synthèse des composés aromatiques.

Notre étude, réalisée en collaboration avec le centre INRA de Corse (Dr François Luro), comporte plusieurs étapes :

- déterminer la composition chimique des huiles essentielles de zestes et ainsi fournir des informations importantes sur l'héritabilité de certains caractères chimiques des hybrides par rapport à ceux de leurs parents,
- réaliser la partition des différents échantillons en fonction de la composition chimique (hybrides et parents) par une analyse statistique des données,
- déterminer s'il existe une relation entre la composition chimique des huiles essentielles de zestes d'hybrides et celles de feuilles lorsque les arbres sont plus jeunes.

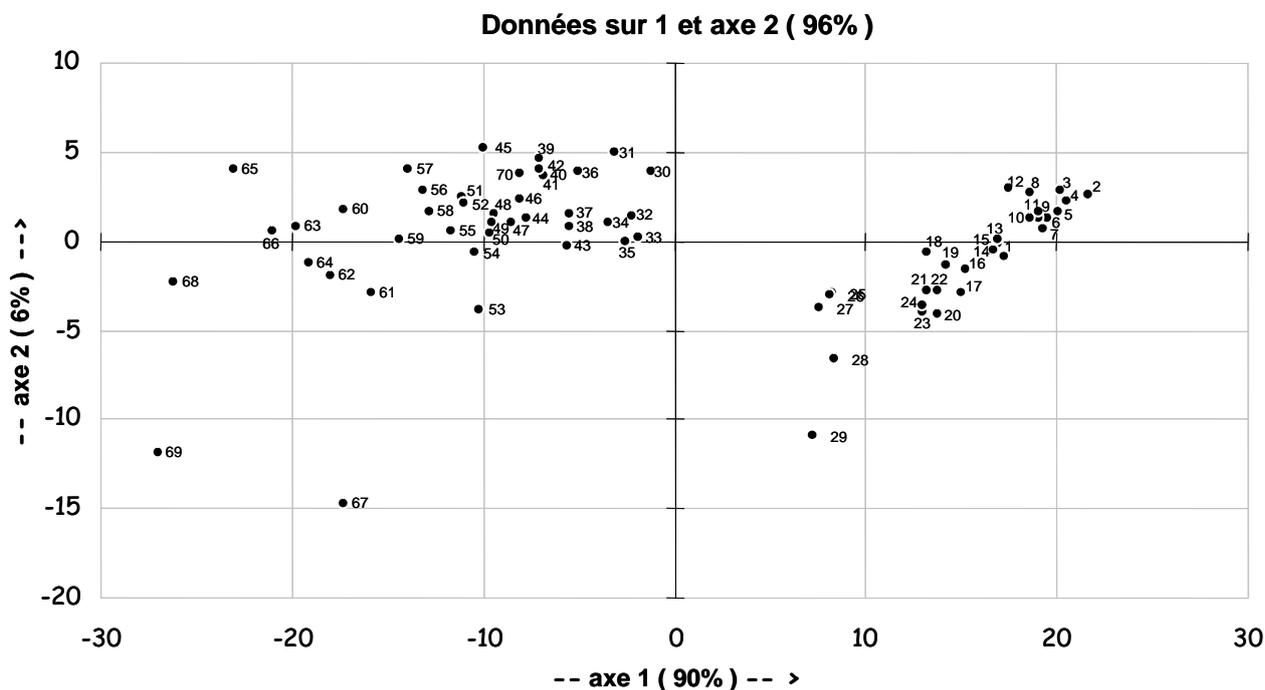
II. 2. Composition chimique des huiles essentielles de zeste d'hybrides clémentinier commun x mandarinier Willow Leaf

Les huiles essentielles de zestes ont été obtenues à partir de 68 hybrides entre *Citrus clementina* (Commun) et *Citrus deliciosa* (Willow Leaf) et de leurs parents. Les rendements en huile essentielle sont exprimés en pourcentage et calculés par rapport à la masse de matière fraîche (Annexes A et B). Nous constatons une grande variation de ces rendements (0,03 à 0,47%). Cinquante hybrides contiennent moins d'huile essentielle que chacun des parents (0,03-0,17%). Parmi ceux-ci, 15 hybrides contiennent 0,09-0,11% d'huile essentielle tandis que 11 autres hybrides en contiennent 0,14-0,15%. Par ailleurs, cinq hybrides ont le même rendement en huile essentielle que les parents (0,18-0,21%). Enfin, 13 hybrides produisent plus d'huile essentielle que les parents, 0,22-0,29 (9 hybrides), 0,32%, 0,35%, 0,42% et 0,47% (un hybride chaque fois) (Annexe A et B).

Tous les échantillons d'huile essentielle ont été analysés par CPG(Ir) et sur la base de leur profil chromatographique, 8 échantillons ont été analysés par RMN ¹³C et 7 par CPG-SM. Ainsi, nous avons identifié de 12 à 27 composés qui représentent de 96,0% à 99,6% de la composition globale de l'huile essentielle (Annexe A et B). Les teneurs des produits non identifiés sont toujours inférieures à 0,1%. Nous remarquons une variabilité chimique quantitative particulièrement pour les composés suivants : le limonène (46,8-95,1%), le γ -terpinène (0-24,9%), le linalol (0-13,3%) et le N-methylantranilate de methyle (0-8,8%).

Les compositions des 70 échantillons d'huile essentielle provenant de 68 hybrides et des deux parents (*C. Clementina* : 1 = clem et *C. deliciosa*, 70 = mand) ont été soumis à deux tests statistiques : une analyse en composantes principales (Figure II. 2) et une partition utilisant la méthode du K-means. Bien que les compositions de ces échantillons soient largement dominées par le limonène (46,8-95,1%), deux groupes d'huiles essentielles de zestes peuvent être ainsi définis : le premier rassemble les échantillons 1 à 29 et le second les échantillons 30 à 70. Les composés qui conduisent à cette partition sont le limonène (qui représente 90% de la variabilité sur l'axe 1) et le γ -terpinène (qui représente 6% de la variabilité sur l'axe 2).

Figure II. 2. Analyse en composante principale des compositions chimiques des huiles essentielles de zestes d'hybrides (axe1 : limonène ; axe 2 : γ -terpinène)

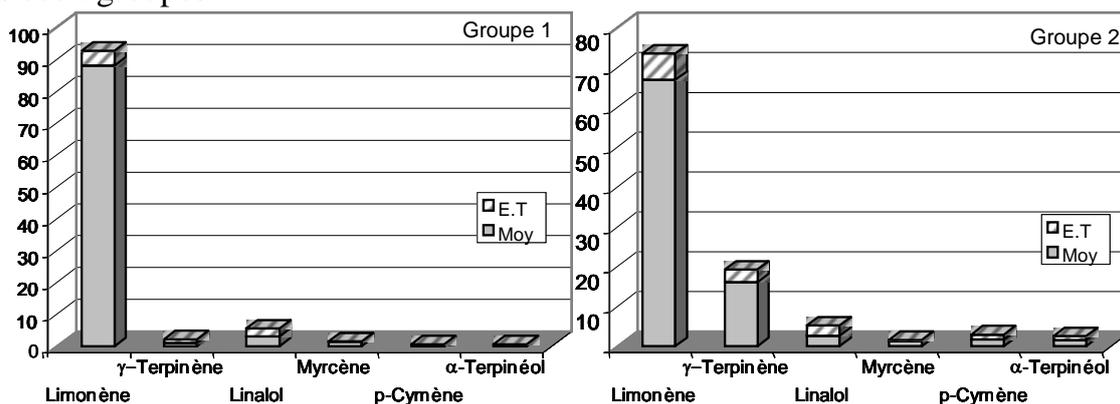


Groupe 1 : Ce groupe, très homogène, qui contient 28 hybrides et le parent clémentine, se caractérise par une teneur en limonène ultra majoritaire (moyenne $M=88,1\%$ et écart type $ET=4,7$). Le linalol ($M=3,2\%$; jusqu'à 13% dans un échantillon), le myrcène ($M=1,4\%$), l' α -terpinéol ($M=0,4\%$), et l' α -pinène ($M=0,3\%$) sont présents dans l'ensemble des échantillons. En revanche, le γ -terpinène et le N-méthylantranilate de méthyle ne sont pas identifiés dans tous les échantillons, mais présentent ponctuellement des teneurs non négligeables (N-méthylantranilate de méthyle : 8,7% ; 7,4% ; et 7,1% dans les échantillons 22, 26, et 28 respectivement) et (γ -terpinène : 3,5% dans les échantillons 25 et 27). Enfin, nous remarquons que la teneur en sesquiterpènes n'excède jamais 1% (Figure II. 3).

Groupe 2 : Le parent mandarine et les 40 échantillons de ce groupe (30 à 69) présentent une composition dominée par le limonène ($M=66,9\%$ et $ET=6,6$) et le γ -terpinène ($M=16,1\%$ et $ET=3,2$). Le myrcène ($M=1,3\%$), l' α et le β -pinène ($M=1,2\%$ chacun), le terpinolène ($M=0,8\%$), le terpineol-4 ($M=0,8\%$) et dans une moindre mesure le thujène ($M=0,5\%$), l' α -terpinène ($M=0,4\%$) et le sabinène ($M=0,3\%$) sont présents dans tous les échantillons à des teneurs n'excédant jamais 5%. Le p-cymène,

l' α -terpinéol, le thymol et le linalol sont ponctuellement rencontrés à des teneurs non négligeables. On peut noter la présence de deux échantillons atypiques (n° 67 et 69) qui se distinguent aisément sur l'ACP par une teneur inhabituellement élevée en linalol (13,3%) pour l'échantillon n° 67 et en N-méthylanthranilate de méthyle (8,8%) pour l'échantillon n°69 (Figure II. 3).

Figure II. 3. : Moyenne (Moy) et Ecart type (E.T) des principaux constituants des deux groupes



On trouve parmi les 68 huiles essentielles d'hybrides, deux types d'échantillons, soit à limonène ultra majoritaire, soit à limonène/ γ -terpinène. Les deux compositions chimiques d'huile essentielle de zeste d'hybrides (limonène et limonène/ γ -terpinène) sont caractéristiques des huiles essentielles de clémentines et de mandarines. En effet, le type chimique à limonène ultra majoritaire est caractéristique du parent clémentine alors que celui à limonène/ γ -terpinène a déjà été mis en évidence dans plusieurs variétés de mandarines de l'espèce *Citrus reticulata* Blanco, de *C. deliciosa* et de *C. sunki* (Lota, 1999). De manière générale, nous remarquons que la composition chimique des huiles essentielles des hybrides étudiés se rapproche beaucoup de celles des parents. Ainsi, les échantillons du groupe 2 présentent un type chimique à limonène/ γ -terpinène identique à celui du parent mandarine (Figure II. 3. et Annexe A et B) tandis que les échantillons du groupe 1 sont constitués en grande majorité de limonène ce qui correspond au type chimique du parent clémentine (90% de limonène).

La prépondérance du nombre d'hybrides appartenant au groupe se rapprochant du parent mandarine (groupe 2), peut être expliquée par l'origine « phylogénétique »

supposée de la clémentine. En effet, la clémentine est issue d'un croisement récent entre une mandarine et une orange douce (Ollitrault *et al.*, 2003). L'orange douce est un hybride ancien connu depuis des millénaires (Webber *et al.*, 1967), issus d'un croisement potentiel entre le pomelo et la mandarine (Nicolosi *et al.*, 2000 ; Barkley *et al.*, 2006). Ces croisements successifs peuvent être considérés comme des croisements « backcross » avec surexpression des gènes de la mandarine. Par conséquent, le profil génétique de la mandarine est prédominant dans notre descendance. Une distribution similaire des échantillons avait été observée lors de l'analyse des huiles essentielles de feuilles de la même population d'hybrides (Tomi *et al.*, 2008). En effet, le groupe d'échantillons ayant une composition proches du parent mandarine était 1,5 fois plus important que celui qui comprenait les échantillons proche du parent clémentine. Néanmoins, la distribution des hydrides entre les huiles essentielles de zeste et celles de feuilles est différente. En ce qui concerne les huiles essentielles de feuilles, les échantillons étaient répartis en deux groupes, dont les profils étaient proches de ceux des deux parents. Cependant, le groupe comprenant les échantillons se rapprochant du type chimique de la clémentine était divisé en deux sous-groupes : l'un caractérisé par une teneur importante en γ -terpinène (27,3-63,4%) et en linalol, et l'autre ayant le type chimique clémentine (riche en sabinène et en linalol). Dans les huiles essentielles de zestes, seuls deux groupes ont été repérés. Leurs compositions chimiques se rapprochent de celle des parents. Cette faible divergence de profil par rapport aux parents, observée dans la descendance, peut s'expliquer par la situation de backcross où les variations (combinaisons) alléliques sont réduites, à cause de l'augmentation du nombre d'allèles issus de la mandarine et de la diminution des allèles du pomelo. Notons aussi que nous n'avons pas trouvé de composé dans les huiles essentielles d'hybrides qui était absent de la composition chimique des parents, ce qui suggère que les voies métaboliques contrôlées par le patrimoine génétique parental n'ont pas été perturbées. En ce qui concerne les deux échantillons n°67 et 69, ayant une composition chimique atypique, leurs différences sont quantitatives et non qualitatives.

Cinquante-cinq composés ont été identifiés dans les huiles essentielles de feuilles alors que seulement 30 composés l'ont été dans les huiles essentielles de

zestes. Parmi eux, cinq sont spécifiques des fruits (octanol, carvone, pipéritone, périllaldehyde et alcool périllique). Nous avons testé au niveau des 25 composés communs la corrélation pouvant exister entre la composition chimique des huiles essentielles de zestes et celles de feuilles, dans le but d'évaluer la possibilité d'utiliser l'huile essentielle de feuilles comme marqueur précoce de la qualité aromatique des fruits.

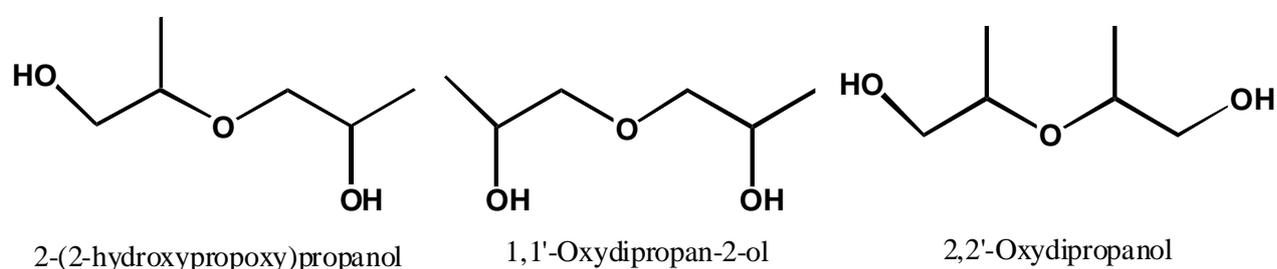
Nous avons examiné la répartition des échantillons en fonction de l'organe (feuille ou zeste), nous constatons que seuls 31 hybrides sur 68 présentent une composition de même type que l'un des deux parents pour les deux organes (Annexe C). Les 36 autres hybrides changent de profil entre les huiles essentielles de feuilles et de zestes. Cette constatation suggère que la composition chimique de l'huile essentielle de feuilles ne présente pas de corrélation avec celle de zeste. Nous pouvons supposer que la régulation de l'expression des gènes est associée à un chemin métabolique spécifique pour chaque organe. Par conséquent, nous ne pouvons pas utiliser les huiles essentielles de feuilles de jeunes plantules comme marqueurs précoces du profil aromatique des fruits.

III. QUANTIFICATION DU DIPROPYLENE GLYCOL PAR RMN¹³C

Le dipropylène glycol (DPG) est un produit incolore, visqueux et quasiment inodore, destiné à être utilisé dans des applications sensibles aux propriétés olfactives, telles que les parfums et les produits cosmétiques. C'est aussi un excellent cosolvant de l'eau, des huiles et des hydrocarbures qui se caractérise par un faible potentiel d'irritation cutanée et une toxicité réduite, ce qui en fait une matière première essentielle pour ces industries. Dans les parfums, il peut représenter jusqu'à 50% de la formulation totale mais ce pourcentage est généralement inférieur à 10% en masse dans les autres applications. Le DPG est aussi utilisé comme agent de couplage et humectant dans diverses applications cosmétiques. Parmi les applications spécifiques figurent les produits de nettoyage de la peau, les déodorants, les produits de soin du visage, du corps et des mains, les crèmes hydratantes pour la peau et les rouges à lèvres (Cosmetic ingredient review, 1985 ; Opdyke, 1978 ; Talzi, 2006).

Le dipropylène glycol est obtenu industriellement par réaction entre le propylène glycol et l'oxyde de propylène. Il se présente sous la forme de trois isomères structuraux, le 2-(2-hydroxypropoxy)propanol (DPG₁), le 1,1'-oxydipropan-2-ol (DPG₂) et le 2,2'-oxydipropanol (DPG₃), chaque isomère étant constitué en fait d'un mélange équimolaire des deux diastéréisomères : RS (ou SR) et RR (ou SS) (Campbell *et al.*, 1989). Le ratio entre ces trois isomères dépend des conditions expérimentales de formation de ce composé, toutefois les isomères DPG₁ et DPG₂ sont toujours majoritaires (Campbell *et al.*, 1989).

Figure II. 4. Structure et nom des trois formes de dipropylène glycol



La quantification du dipropylène glycol est généralement réalisée par chromatographie en phase gazeuse dans divers produits commerciaux (Cosmetic ingredient review, 1985) ou par HS-SPME et GC (Headspace Solid-Phase microextraction and Gaz chromatography) dans certains produits spécifiques comme la lessive et la cire de bougies (Bothe *et al.*, 2003).

Notre étude a pour but de quantifier le DPG dans deux produits commercialisés sous l'appellation « extraits de parfum » : cyprès et cèdre rouge. Ces deux produits sont constitués d'huiles essentielles de cyprès ou de cèdre rouge additionnées de DPG. Dans ce type de mélange, la quantification du DPG par chromatographie en phase gazeuse est rendue très délicate. En effet, dans les conditions expérimentales que nous utilisons au laboratoire et qui sont celles généralement utilisées pour l'analyse des huiles essentielles, le DPG se présente sur les chromatogrammes sous forme de plusieurs signaux larges et mal définis : quatre pour la colonne apolaire, compris entre les valeurs d'Ir 999 et 1044 et cinq pour la colonne polaire, compris entre les valeurs d'Ir 1830 et 1958. En conséquence, les

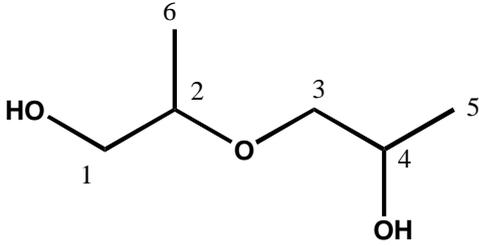
risques de co-élution avec les composés terpéniques des huiles essentielles sont nombreux. Nous nous sommes donc proposés de quantifier le DPG dans ces « extraits de parfum » par RMN ^{13}C . Il s'agissait pour nous de quantifier les trois isomères du DPG (DPG₁- DPG₃) en mélange en donnant pour chacun d'eux un résultat correspondant à la somme des diastéréoisomères. La mise au point de la procédure d'analyse quantitative a nécessité différentes étapes, à savoir :

- la caractérisation par RMN ^{13}C des trois formes isomères de ce composé, sans pour autant attribuer les résonances de chaque diastéréoisomère, ce qui ne présentait pas d'intérêt dans le cadre de cette étude,
- l'adaptation d'un protocole expérimental qui permette de réaliser une quantification correcte des constituants,
- enfin, la validation du protocole par l'analyse de DPG de haut degré de pureté seul, puis additionné à plusieurs huiles essentielles.

III. 1. Caractérisation par RMN ^{13}C des trois isomères du DPG

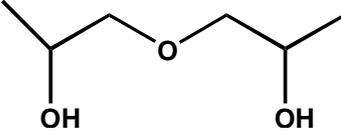
Le spectre RMN ^{13}C du dipropylène glycol présente vingt trois signaux. En nous basant sur les intensités de ces signaux, nous pouvons distinguer trois doubles séries de déplacements chimiques (deux séries de 3x2 signaux et une série de 6x2 signaux), correspondant manifestement aux trois couples de diastéréoisomères avec une seule superposition. Dans chaque série double, l'intensité des signaux est homogène, signifiant que les diastéréoisomères ont une teneur similaire deux à deux, conformément à ce qui est reporté dans la littérature (Campbell *et al.*, 1989). Compte tenu que l'isomère DPG₁ est le seul à être non symétrique, il correspond donc à la série de 6 signaux doubles. L'attribution des carbones est réalisée par comparaison avec les données décrites par Campbell *et al.* ainsi qu'à l'aide du spectre DEPT.

Tableau II. 8. Déplacements chimiques des carbones du 2-(2-hydroxypropoxy)-propanol (DPG₁)

	DEPT	N°C	Mélange		Référence	
	CH	2	77,32	76,26	76,55	75,70
	CH	4	67,10	66,23	67,13	66,23
	CH ₂	3	75,06	73,83	74,13	72,99
	CH ₂	1	66,21	66,16	65,69	65,62
	CH ₃	6	15,97	15,73	15,45	15,34
	CH ₃	5	18,75	18,71	18,34	18,29

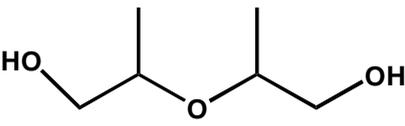
En ce qui concerne l'isomère DPG₂ symétrique, l'attribution de ses carbones est aisée en se référant aux informations apportées par le spectre DEPT. Toutefois, nous n'avons pas trouvé dans la littérature les données RMN ¹³C de cet isomère.

Tableau II. 9. Déplacements chimiques des carbones du 1,1'-oxydipropan-2-ol (DPG₂)

	DEPT	Mélange	
	CH ₂	77,11	76,72
	CH	66,53	66,16
	CH ₃	18,69	18,69

Enfin, l'attribution des carbones de l'isomère C3 symétrique est de nouveau réalisée sur la base du spectre DEPT et par comparaison des valeurs décrites par Campbell et al. (1989).

Tableau II. 10. Déplacements chimiques des carbones du 2,2'-oxydipropanol (DPG₃)

	DEPT	Mélange		Référence	
	CH ₂	66,65	66,47	65,89	57,47
	CH	76,32	72,88	75,65	72,01
	CH ₃	17,81	16,16	17,48	15,74

Les valeurs de résonance de chacun des carbones des trois couples de diastéréoisomères seront ensuite utilisées pour réaliser la quantification du DPG.

III. 2. Analyse quantitative

Dans cette partie de l'étude nous nous proposons de mettre au point une méthode de quantification du dipropylène glycol en mélange avec des composés terpéniques. Plusieurs séquences impulsionsnelles peuvent être employées pour la quantification des constituants d'un mélange par RMN ^{13}C . Un angle d'impulsion de 90° associé à un délai d'attente entre deux impulsions de cinq fois T_1 du T_1 le plus long, permet d'obtenir à la fois une quantité de signal maximale et la relaxation de tous les carbones. A l'opposé, la quantification peut être réalisée par une série rapide d'impulsions courtes. Ces techniques sont détaillées dans le chapitre I.

Toutefois, quelle que soit la méthode utilisée, la quantification d'un composé au sein d'un mélange nécessite la comparaison des aires ou des intensités des signaux de ce composé avec celles d'une référence interne (étalonnage interne) ou l'utilisation de droites de calibration (étalonnage externe). L'utilisation de la méthode de l'étalonnage interne par RMN, nécessite d'obtenir une réponse homogène des noyaux de ^{13}C des composés et de la référence interne. Il est alors possible de quantifier chacun des constituants identifiés dans un mélange par l'intégration de leurs signaux, puisque la valeur de l'aire ou de l'intensité (hauteur du pic) est directement proportionnelle au nombre de noyaux qui résonnent (Günther, 1994).

Les conditions optimales de séquence sont celles qui permettent de réduire au maximum les différences d'aimantation entre les noyaux de T_1 différents, tout en permettant d'obtenir un rapport S/B suffisant dans un laps de temps aussi court que possible. La détermination de ces conditions peut être appréhendée par un calcul théorique suivant l'équation [1] qui permet de calculer, pour des valeurs de T_1 et du délai de relaxation donnés, l'aimantation restaurée d'un noyau.

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

S/B : rapport signal sur bruit ; *M_o* : aimantation initiale ; *D* : délai entre deux impulsions exprimé en secondes ; *T₁* : temps de relaxation longitudinal exprimé en secondes ; *α* : angle d'impulsion exprimé en degrés.

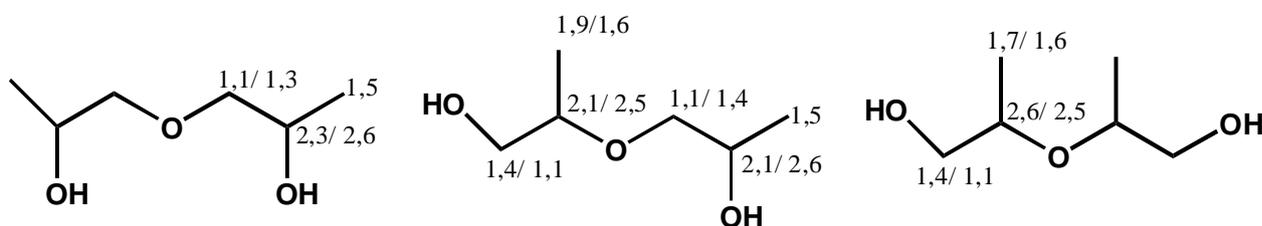
Une fois définie de façon théorique, cette méthode doit être validée (justesse, précision et linéarité des mesures) par l'analyse de composés purs et/ou de mélanges artificiels, avant d'être appliquée à la quantification des constituants d'un mélange naturel.

III. 2. 1. Détermination des paramètres d'enregistrement des spectres

Nous avons choisi de réaliser l'analyse quantitative par la méthode de l'étalonnage interne. L'hexane-1,6-diol ($T_1 = 1,0s$) a été choisi comme référence interne car il s'agit d'une molécule symétrique (faible nombre de signaux et utilisation d'une faible quantité de produit pour obtenir un signal mesurable) dont les carbones résonnent à des fréquences peu susceptibles de provoquer des superpositions de pics avec les autres composés.

Les T_1 des carbones du dipropylène glycol ont été mesurés par la méthode d'inversion récupération. Ils sont compris entre 1,1 et 2,6 secondes (Figure II. 5).

Figure II. 5. Temps de relaxation longitudinale (en secondes) des carbones des isomères du dipropylène glycol

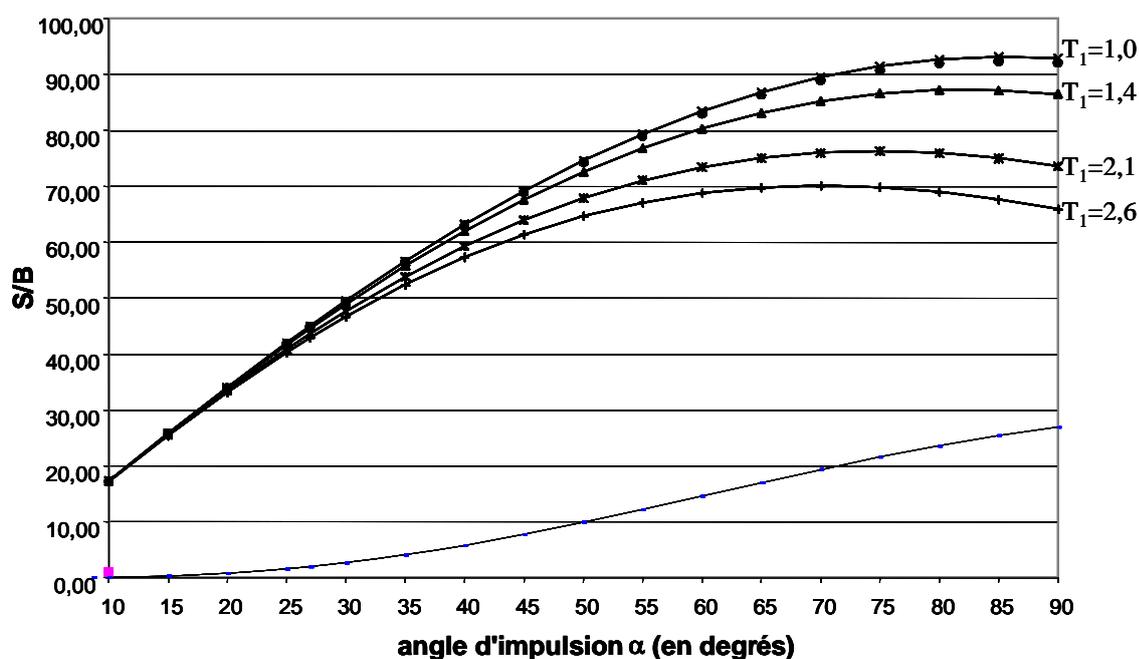


Pour chaque isomère DPG_1 - DPG_3 , nous avons fait figurer les valeurs des deux diastéréoisomères

Nous avons ensuite déterminé les paramètres de la séquence impulsionnelle en appliquant la formule [1] pour différentes valeurs de T_1 (1,0 à 2,6 s) et pour un délai entre deux impulsions de 2,8 s (temps d'acquisition = 2,7 s et délai de relaxation = 0,1s). Les courbes de variation de magnétisation restaurée (S/B) en fonction de l'angle d'impulsion α ainsi obtenues, indiquent que dans ces conditions un angle d'impulsion de 45° permet à la fois d'obtenir une quantité de signal maximum et une différence de magnétisation restaurée relativement faible entre les carbones du DPG et ceux de l'hexane-1,6-diol. Nous aurions pu choisir un angle d'impulsion plus petit afin d'avoir

une différence de magnétisation restaurée plus faible, cependant la quantité de signal aurait été alors moins importante.

Figure II. 6. Courbes de restitution de la magnétisation (S/B) d'un noyau en fonction de l'angle d'impulsion α , pour un délai de relaxation de 2,8s et des valeurs de T_1 comprises entre 1,0 s et 2,6 s.



III. 2. 2. Validation de la méthode de quantification

Pour réaliser le calcul quantitatif, nous avons pris en compte, pour chacun des isomères DPG₁-DPG₃, la moyenne des intensités des signaux des carbones (I_C) des diastéréoisomères, non superposés et parfaitement résolus et la moyenne des intensités des signaux de l'hexane-1,6-diol (I_H).

Nous avons d'abord testé la justesse de notre procédure quantitative en comparant les quantités pesées de dipropylène glycol à différentes concentrations (entre 15,1 et 74,4 mg de DPG dilué dans 0,5 mL de $CDCl_3$), avec celles déterminées par RMN. La masse de DPG a été calculée selon la formule [2] (Tableau II. 11, 12, 13).

$$m_c = \frac{2I_C \times M_C \times m_H}{I_H \times M_H} \quad [2]$$

Le facteur 2 est dû à la symétrie de la molécule d'hexane-1,6-diol; I_C : moyenne des intensités des signaux des carbones des isomères DPG_1 - DPG_3 du DPG (pour les composés DPG_2 et DPG_3 la moyenne tient compte de la symétrie des molécules); M_C masses molaires des isomères DPG_1 à $DPG_3 = 134,18 \text{ g.mol}^{-1} \times 2$; m_H : quantité en mg d'hexane-1,6-diol; I_H : moyenne des intensités des signaux correspondant à l'hexane-1,6-diol; M_H : masse molaire de l'hexane-1,6-diol = $118,18 \text{ g.mol}^{-1}$.

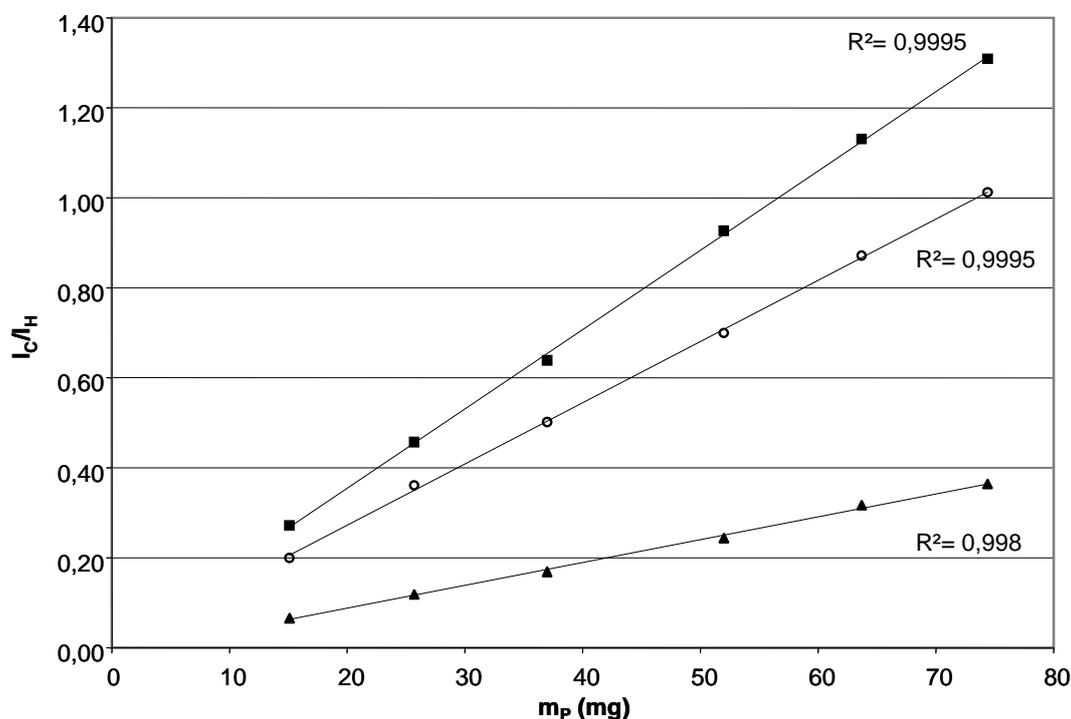
Tableau II. 11. Quantification des trois formes du DPG (DPG_1 DPG_2 DPG_3) par RMN ^{13}C en utilisant l'hexane-1,6-diol comme référence interne.

Quantification du dipropylène glycol						
I_H	98,8	98,8	99,2	75,8	70,6	68,4
I_{DPG1}	13,4	22,6	31,7	35,1	39,9	44,8
I_{DPG2}	9,9	17,8	24,9	26,5	30,8	34,6
I_{DPG3}	3,3	5,9	8,4	9,2	11,2	12,4
Masse DPG_1	7,6	12,9	18,0	26,1	31,8	36,9
Masse DPG_2	5,6	10,2	14,1	19,7	24,5	28,5
Masse DPG_3	1,9	3,3	4,8	6,9	8,9	10,3
Masse calculée DPG m_c (mg)	15,1	26,3	36,9	52,6	65,3	75,6
Masse pesée DPG m_p (mg)	15,1	25,7	37,0	52,0	63,7	74,4
ER %	0,0	2,3	-0,3	1,2	3,9	-1,6

la masse de l'hexane-1,6-diol est de 12,4 mg; m_p et m_c : quantité (mg) pesée et quantité calculée (masse de DPG_1 + masse DPG_2 + masse DPG_3) selon la formule [2]; ER: erreur relative (en %) entre m_c et m_p .

Les erreurs relatives entre les masses pesée et calculée sont comprises entre 0,0% et 3,9% pour l'ensemble des mesures, ce qui indique une très bonne justesse. En exprimant le rapport de l'intensité moyenne des carbones protonés (I_C) avec celle de l'hexane-1,6-diol (I_H), en fonction de la quantité pesée (m_p), nous avons tracé les droites d'étalonnage des 3 formes du dipropylène glycol (Figure II. 7). Nous avons ainsi observé une bonne linéarité des mesures puisque le coefficient de détermination (R^2) est de 0,998 à 0,999.

Figure II. 7. Droite d'étalonnage de la quantification par RMN du ^{13}C des 3 formes du DPG



Quantité d'hexan-1,6-diol: 12,4 mg ; I_C/I_H : rapport de la moyenne des intensités des signaux des carbones de chacune des 3 formes du DPG sur la moyenne des intensités des signaux de l'hexane-1,6-diol ; ■ 2-(2-hydroxypropoxy)-1-propanol (DPG₁) ; ○ 1,1'-oxydi-2-propanol (DPG₂) ; ▲ 2,2'-oxydipropanol (DPG₃) ; m_p : quantité (mg) pesée de DPG.

Dans le but d'évaluer la précision de la méthode mise au point, nous avons effectué cinq analyses d'un échantillon contenant 19,3 mg de DPG. Les cinq spectres ont été enregistrés dans les mêmes conditions expérimentales. Pour chaque analyse, les masses de DPG ont été calculées selon la formule [2] et comparées aux masses de DPG pesées. Sur l'ensemble des cinq expériences les erreurs relatives (entre la moyenne des masses calculées et les quantités pesées), toujours inférieures à 3,9% et la valeur de répétabilité de +/- 1mg (exprimées avec un intervalle de confiance de 99%, coefficient bilatéral de = 5,84), présentent une bonne justesse et une bonne précision des mesures.

Les résultats que nous venons de présenter concernant la justesse, la linéarité et la précision de la quantification par RMN ^{13}C des trois formes du DPG (DPG₁-DPG₃) témoignent de la robustesse du protocole expérimental d'analyse que nous avons mis

au point. Pour achever la validation de cette méthode, nous avons ensuite testé sa capacité à quantifier le DPG en mélange avec une huile essentielle (huile essentielle dopée).

III. 2. 3. Quantification du DPG dans deux huiles essentielles dopées

Nous avons enregistré le spectre de RMN ^{13}C , dans les conditions quantitatives précédemment décrites, de deux huiles essentielles de cèdre et de pin maritime que nous avons préalablement dopées avec du DPG. Nous avons identifié dans ces deux mélanges les constituants habituels présents dans ce type d'huile essentielle. Dans l'échantillon de cèdre, il s'agit essentiellement de monoterpènes oléfiniques (α et β -pinène, myrcène, limonène) et de sesquiterpènes oléfiniques (β -caryophyllène, (E)- β -fanésène, α - et β -himachalène). Dans l'échantillon de pin maritime, les principaux constituants sont également des monoterpènes oléfiniques (α -pinène, myrcène, limonène) et des sesquiterpènes oléfiniques (germacrène D, (E)- β -caryophyllène), mais on note également la présence de diterpènes (abiétadiène). Dans les deux cas, nous observons tous les signaux des différents isomères du DPG ainsi que ceux de l'hexanediol, sans aucune superposition, avec ceux des composés terpéniques, ce qui signifie que la quantification du DPG peut être réalisée dans de bonnes conditions. La masse (en mg) de DPG a alors été calculée à l'aide de la formule [2] en prenant en compte l'intensité moyenne de l'ensemble de ses signaux. Les pourcentages massiques, calculés selon la formule [3] sont donnés dans le tableau II. 12.

$$\% C = \frac{m_c}{m} \times 100$$

%C : pourcentage de chaque composé ; m_c : masse calculée à partir de la formule pour chaque composé, en mg ; m : masse totale de l'échantillon.

Tableau II. 12. Quantification du dipropylène glycol dans des huiles essentielles de pin maritime et de cèdre dopées

Huile essentielle	Pin maritime			Cèdre		
	I _C	Masse	%m _C	I _C	Masse	%m _C
DPG ₁	25,0	18,3	24,9	27,9	12,9	22,0
DPG ₂	19,1	13,9	18,9	20,8	9,6	16,4
DPG ₃	6,5	4,8	6,5	7,1	3,3	5,6
Masse calculée DPG m _c (mg)		37,0			25,9	
Masse pesée DPG m _p (mg)		38,8			26,2	
ER %		4,6			1,1	

Intensités moyenne des signaux des carbones sélectionnés: du DPG = I_C; de hexan-1,6-diol I_H (pin maritime) = 99,4, (cèdre) = 100; masse d'huile essentielle (HE) de pin maritime=34,7mg, masse HE de cèdre= 32,5mg; masse d'hexane-1,6-diol : m_H= 16,0 mg (pin maritime) et m_H=10,2mg (cèdre), masse molaire de l'hexan-1,6-diol=118,18 g.mol⁻¹; m_C: somme des masses de DPG₁, DPG₂ et DPG₃ calculée grâce à la formule [2] et %m_C pourcentage massique des trois isomères de DPG calculé selon la formule [3].

Les erreurs relatives, calculées par rapport à la masse de DPG pesée sont pour les deux huiles essentielles dopées inférieures à 5%. La méthode que nous avons mise au point est donc tout à fait adaptée à la quantification du DPG avec des terpènes.

III. 2. 4. Application à l'analyse du dipropylène glycol dans deux échantillons commerciaux d'« extraits de parfum »

Nous avons ensuite appliqué cette méthode à la quantification du dipropylène glycol contenu dans deux « extraits de parfum » commerciaux. Pour cela nous avons enregistré, dans les conditions quantitatives, un spectre de RMN ¹³C «d'extrait de parfum » de cèdre rouge et un autre « d'extrait de parfum » de cyprès. Nous repérons distinctement, dans les spectres des deux mélanges, les 23 signaux correspondant aux DPG, sans superposition. Parallèlement, nous identifions également les principaux constituants terpéniques. Les plus importants dans l'échantillon de cèdre rouge sont : l'α-et le β-pinène, le γ-himachalène, le bornéol, le cédrool et l'acétate de bornyle. Dans le cas de l'échantillon de cyprès, il s'agit essentiellement de l'acétate d'isobornyle et de l'isobornéol. Ensuite, à l'aide de la formule [2] nous avons calculé la masse (en mg) de DPG dans ces deux extraits de parfum, en prenant en compte de l'intensité moyenne de l'ensemble de ses signaux. Nous avons également calculé les

pourcentages massiques du DPG selon la formule [3], que nous avons reportés dans le tableau II. 13.

Tableau II. 13: Quantification du dipropylène glycol dans des « extraits de parfum » commerciaux de cèdre rouge et de cyprès

Huile essentielle	Cèdre rouge			Cyprès		
Composé	I _C	Masse	%m _C	I _C	Masse	%m _C
DPG ₁	18,4	18,4	34,1	3,6	3,6	7,8
DPG ₂	15,3	15,3	28,2	3,5	3,5	7,5
DPG ₃	4,4	4,4	8,1	0,7	0,7	1,5
Masse calculée DPG m_C (mg)		38,1	70,4		7,8	16,8

Intensités moyenne des signaux des carbones sélectionnés: du DPG = I_C; de hexan-1,6-diol I_H (cèdre rouge) = 98,6, (cyprès) = 90,9. Masse d'extrait de parfum de cèdre rouge=54,3mg Masse d'extrait de parfum de cyprès=46,4mg Masse hexan-1,6-diol : m_H= 13,1mg (cèdre rouge) et m_H=15,4 mg (cyprès), masse molaire de l'hexan-1,6-diol=118,18 g.mol⁻¹; m_C: somme des masses des de DPG₁, DPG₂ et DPG₃ calculée grâce à la formule [2] et %_C pourcentage massique des trois isomères de DPG calculé selon la formule [3].

Dans l'extrait de parfum de cèdre rouge, le dipropylène glycol représente 70,4% de la composition chimique globale, alors qu'il ne représente que 16,8% dans le cas de l'extrait de parfum de cyprès.

En conclusion, nous avons mis au point et validé une méthode de quantification rapide (moins de 1h) du DPG par RMN ¹³C. Nous avons ensuite appliqué cette méthode à la quantification du DPG présent dans deux « extraits de parfum » commerciaux de cèdre rouge et de cyprès.

Chapitre III

LES HUILES ESSENTIELLES
DE *JUNIPERUS*
DE CORSE

Le genre *Juniperus* (Cupressacées), qui comprend soixante-sept espèces poussant principalement dans l'hémisphère nord, est divisé en trois sections :

- *Caryocedrus* représentée par une seule espèce *J. drupacea* Labill.
- *Juniperus* (= *Oxycedrus*) regroupant dix espèces dont *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa*.
- *Sabina*, la plus importante, comprenant cinquante six espèces.

En Corse, le genre *Juniperus* est représenté par six espèces : *J. communis* var. *communis*, *J. communis* ssp. *alpina*, *J. oxycedrus* ssp. *oxycedrus*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *macrocarpa*, *J. phoenicea* subsp. *turbinata* et *J. thurifera*.

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la caractérisation des genévriers de Corse à travers la composition chimique de leurs huiles essentielles. Dans ce but, nous nous sommes intéressés aux trois espèces qui n'avaient pas encore fait l'objet d'études. Ainsi, nous avons étudié les huiles essentielles de *J. thurifera* et de *J. communis* ssp. *communis*, qui sont des espèces très localisées en Corse, de même que celles de *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa* qui est une espèce protégée. Parallèlement, il nous a paru intéressant de compléter l'étude de la variabilité chimique des huiles essentielles de *J. communis* ssp. *alpina*, initiée au laboratoire (Gonny, 2003 ; Gonny *et al.*, 2006) par un plus large échantillonnage.

I. JUNIPERUS THURIFERA L.

Le genévrier thurifère est une espèce dont l'aire de répartition est limitée à la partie occidentale du bassin méditerranéen. Présent en Italie, en France, en Espagne, au Maroc et en Algérie, cet arbre présente non seulement une distribution très morcelée, mais également très inégale. En effet, suivant les pays, les surfaces occupées par le genévrier thurifère varient de quelques centaines d'hectares (ha) en France à environ 150 000 ha dans les montagnes de l'Atlas. Les peuplements d'un seul tenant concernent généralement des superficies restreintes, accentuant de ce fait le caractère fragmenté de sa répartition (Adams, 2008).

J. thurifera présente deux sous espèces sur la base du nombre de graines par galbule (Adams, 2008):

- *J. thurifera* var. *africana* Bull., [synonymes : *J. thurifera* var. *africana* Maire, *J. africana* (Maire) Villar, *J. thurifera* subsp. *africana* (Maire) Gauquelin], dont l'aire de répartition se limite aux hautes montagnes de l'Atlas et à quelques endroits d'Algérie,
- *J. thurifera* var. *thurifera*, qui est présent de manière localisée en Espagne, dans les Pyrénées, dans les Alpes françaises et en Corse. Selon Adams (2008), on le trouve sous de nombreuses appellations : *J. bonatiana* Vis., *J. cinerea* Carriere, *J. hispanica* Mill., *J. sabinoidea* Endl. Syn. Conif., *J. thurifera* L. var *gallica* (Coincy), *J. thurifera* L. ssp. *gallica* (Coincy) Rouy, *J. thurifera* L. ssp. *gallica* (Coincy), *Sabina foetidissima* (Willd.), *S. thurifera* (L.), *S. pseudothurifera* Antoine.

J. thurifera var. *thurifera* revêt donc un caractère relictuel qui lui confère un très grand intérêt patrimonial. Le type de paysage pré-steppique que cet arbuste caractérise est tout à fait original, ainsi que la biodiversité qui l'accompagne. C'est dans cet esprit que l'Union Européenne a classé ces peuplements comme habitats naturels communautaires prioritaires (Adams, 2008). Trois chimiovars ont été définis en fonction de la teneur en prodelphinidine des fruits : *hispanica* (Espagne et Pyrénées) à faible teneur en prodelphinidine ; *gallica* (Alpes du Sud-Est français), moyennement pourvu en prodelphinidine ; *corsicana* (en Corse), riche en prodelphinidine (Lebreton et Muracciole, 1999).

En Corse, *J. thurifera* var. *thurifera*, appelé « soliu » ou « legnu di ferru » (Gamisans et Gruber, 1979 ; Conrad, 1986) a été découvert tardivement, par Escarel (1952) et se rencontre uniquement dans la moitié Nord de l'île, à l'intérieur des terres. Les principaux peuplements sont localisés dans le vallon de Pinnara près du village d'Asco (De Litardière, 1956) et dans la vallée du Golu (Niolu) (Conrad, 1986).

Le genévrier thurifère, est aussi appelé genévrier porte-encens, à cause de sa résine odorante, ou genévrier d'Espagne. C'est un arbuste à feuillage persistant, de trois à six mètres de hauteur. Il est reconnaissable grâce à sa couleur vert glauque persistante, il fleurit de février à mars et ses fruits sont mûrs à l'automne. Les rameaux

apparus les premiers possèdent des feuilles en aiguilles, qui se raccourcissent ensuite et se transforment en écailles. Le fruit (galbule) est charnu, noir bleuâtre, recouvert d'une poudre vert glauque (la pruine) et à chair assez molle. C'est une espèce dioïque, c'est-à-dire que le pied mâle et le pied femelle sont différenciés. Espèce relativement longévive (plus de 200 ans) à croissance lente, elle colonise les moyennes et hautes altitudes (700 à 1800m) (Adams, 2008).

I. 1. Etude bibliographique et objectif du travail

Les huiles essentielles de genévrier thurifère ont fait l'objet de quelques études. La plupart d'entre elles ont permis l'identification de nouvelles molécules, notamment dans les huiles essentielles de bois (Barrero *et al.*, 1996 ; 2000). Une publication décrit la composition chimique d'un échantillon d'huile essentielle de bois dans laquelle quatre sesquiterpènes, le cédrol (41%), le thujopsène (20%), le widdrol (16%) et l' α -cedrène (12%) sont les composés majoritaires (Barrero *et al.*, 2005). En ce qui concerne l'huile essentielle de baies, deux publications décrivent le limonène comme composé ultra-majoritaire (84-88%) (Hernandez *et al.*, 1987 ; Teresa *et al.*, 1980). Enfin, Adams *et al.* (1999a, 2003) a décrit la composition chimique de l'huile essentielle de feuilles provenant de diverses régions : Maroc, Espagne, Pyrénées, Alpes françaises et Corse. Les échantillons du Maroc sont riches en sabinène (12-46%), α -pinène (4-17%) et parfois en élémol (0,5-14,7%) alors que tous ceux des autres provenances possèdent le limonène comme composé majoritaire (28-75%) (Adams *et al.*, 1999a, 2003), Précisons que dans l'échantillon de Corse, le taux de limonène est de 60,6%.

Le but de ce travail était donc de caractériser le genévrier thurifère de Corse à travers la composition chimique de l'huile essentielle de feuilles. Pour cela, nous avons réalisé :

- l'analyse de trois échantillons d'huile essentielle, choisis en fonction de leur profil chromatographique et de la quantité de produit disponible, deux par CPG(Ir), CPG-SM et par RMN ^{13}C sans séparation préalable, le troisième par CPG(Ir) et RMN ^{13}C , après fractionnement sur colonne de silice.

▪ l'analyse de 16 échantillons d'huiles essentielles préparés avec des feuilles récoltées dans les deux stations de Corse où ce végétal est présent: la région d'Asco et le Niolu (vallée de Golu). Les résultats ont ensuite été soumis à un traitement statistique, en vue de mettre en évidence une homogénéité de la composition ou une éventuelle variabilité chimique intraspécifique dans le territoire délimité que représente l'île.

I. 2. Analyse de trois échantillons d'huile essentielle de feuilles

Les échantillons numéro 11 et 15 ont été analysés par CPG(Ir), CPG-SM et RMN ^{13}C , sans séparation préalable des constituants (Tableau III. 1). Ces échantillons contiennent divers monoterpènes et des sesquiterpènes hydrocarbonés que l'on trouve habituellement dans les huiles essentielles de genévriers. Si la plupart des constituants présentaient, en SM, une note de concordance correcte par comparaison avec les spectres de référence, pour d'autres cette note était moins bonne. Enfin, l'identification de quelques constituants s'est avérée délicate voire impossible, en particulier quand ces constituants co-éluient.

Tableau III. 1. Analyse de trois échantillons d'huile essentielle de feuilles de *J. thurifera*

Solvant Pentane/Ether		HE	100/0	95/5	90/10	50/50	
Masse (mg)		1000	456,4	52,3	20,2	187,9	
		F1 F2 F3 F4					
N°	Composés	Ir ^a	Ir ^p	n° échantillon			
				11	15	1	
1	α -pinène	930	1020	7,6	6,1	7,9	6,6
2	sabinène	963	1108	0,4	0,3	0,4	0,5
3	β -pinène	969	1105	0,4	0,4	0,8	0,9
4	myrcène	979	1155	2,7	2,9	3,3	4,2
5	δ 2-carène	994	1125	2,3	2,0	2,4	2,9
6	δ 3-carène	1004	1142	6,4	9,6	8,0	9,2
7	p-cymène	1010	1263	0,1	0,1		
8	limonène	1022	1201*	48,9	46,1	45,7	65,3
9	β -phellandrène	1022	1206*	0,4	0,3	0,5	0,6
10	terpinolène	1077	1275	3,2	1,4	1,5	1,3
11	linalol	1081	1544	1,4	8,2	4,0	19,5

12	<i>trans</i> -limonène 1,2 epoxyde	1120	1456	0,2	0,1	0,1		1,0		
13	bornéol	1146	1698	0,1	0,3	0,4		9,0	0,4	
14	<i>p</i> -cymène-8-ol	1158	1803	0,4	0,1	0,1			0,4	
15	terpinén-4-ol	1161	1598	0,4	0,4	0,4			1,8	
16	α -terpinéol	1170	1694	0,3	1,3	0,9			4,6	
17	myrténol	1180	1789	0,2	0,2	0,1			0,6	
18	<i>trans</i> -carvéol	1196	1830	0,1	0,2	0,4			0,5	
19	citronellol	1208	1761*			tr			0,3	
20	nérol	1208	1797*			0,2			0,7	
21	pulégone	1215	1647	0,3	0,2	0,6	1,0	13,0		
22	pipéritone	1225	1729	1,5	2,6	1,3	2,7	1,2	6,6	
23	géraniol	1231	1844	0,1	0,6	0,5			2,4	
24	acétate de linalyle	1240	1553	0,4	2,4	1,7	29,7			
25	acétate de bornyle	1269	1575	0,1	0,1	0,7	4,4	7,8		
26	acétate d' α -terpinyle	1333	1681	0,5	0,8	1,0	19,6			
27	acétate de néryle	1341	1725		0,2	0,2	3,3			
28	acétate de géranyle	1359	1748		0,4	0,2	6,4			
29	α - <i>trans</i> -bergamotène	1417	1580	0,4	0,3					
30	bicyclogermacrène	1491	1727	0,2	0,1					
31	γ -cadinène	1505	1752	0,6	0,2					
32	δ -cadinène	1513	1740	0,9	0,6	1,5	2,7			
33	élémol	1537	2080	1,2	0,6	2,5			13,6	
34	germacra-1(10),5-dièn-4 β -ol	1568	2046	0,4	0,2	0,7		26,5		
35	β -oplopénone	1590	2070	0,1	0,2	0,4	8,8	1,5		
36	sesquithuriférol	1594	2106	0,1	-	tr		2,4		
37	cédrol	1594	2116			2,6			14,4	
38	τ -cadinol	1628	2165*			0,7			3,5	
39	γ -eudesmol	1628	2193*			0,2			0,9	
40	τ -muurolol	1628	2181*			0,6			3,2	
41	α -eudesmol	1638	2217	0,5	0,6	0,1			1,2	
42	α -cadinol	1641	2229	1,0	0,2	1,6			8,8	
Total:				83,8	90,3	94,2	94,2	76,9	61,4	83,4

*L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les indices sont suivis d'un astérisque * : pourcentage sur colonne polaire. Les échantillons n°11 et 15 ont été analysés par CPG-SM. L'échantillon n°1 a été analysé par RMN*

Un troisième échantillon (n°1) a été fractionné sur colonne de silice. L'huile essentielle et toutes les fractions de chromatographie ont été analysées par CPG(Ir) et RMN ¹³C (Tableau III. 1). L'analyse directe de cet échantillon par les deux techniques a permis d'identifier les 13 composés majoritaires (neuf monoterpènes et quatre

sesquiterpènes) qui représentent 86,9% de la composition chimique globale, ce qui serait suffisant pour caractériser l'huile essentielle. L'analyse des fractions de chromatographie a confirmé l'identification de certains composés identifiés par SM et de mettre en évidence trois sesquiterpènes qui co-éluent sur colonne apolaire, τ -cadinol, γ -eudesmol et τ -muurolol. Au total, 38 composés ont été identifiés par RMN ^{13}C dans cet échantillon.

Les trois échantillons d'huile essentielle ont une composition assez proche, caractérisée par une teneur importante en monoterpènes oléfiniques (environ 70%) avec le limonène (45,7-48,9%) comme constituant nettement majoritaire. L' α -pinène (6,1-7,9%), le δ -3-carène (6,4-9,6%) sont les deux seuls composés présents à des teneurs appréciables. Les monoterpènes oxygénés sont principalement représentés par le linalol (1,4-8,2%) quoique divers esters monoterpéniques soient également présents à des teneurs pouvant atteindre 2,4%. La fraction sesquiterpénique, est surtout composée de sesquiterpènes oxygénés à savoir l'élémol (0,6-2,5%) et l' α -cadinol (0,2-1,6%) ainsi que le cédrol (2,6% dans l'échantillon n°1, analysé par RMN ^{13}C).

I. 3. Variabilité de l'huile essentielle de feuilles de *Juniperus thurifera*

Dans le but de mettre en évidence une éventuelle variabilité chimique de l'huile essentielle de genévrier thurifère de Corse, nous avons analysé 16 échantillons d'huile essentielle obtenus par hydrodistillation des feuilles de pieds individuels. Ceux-ci proviennent des deux régions où la présence de ces arbres a été recensée, à savoir la vallée d'Asco et le Niolu (Annexe D). Il s'agit de deux régions montagnardes de l'île situées à plus de 1000 m d'altitude. Le matériel végétal a été récolté durant les mois de mars et d'avril 2007. Les feuilles fraîches ont été hydrodistillées avec un appareil de type Clévenger. Les rendements en huile essentielle, calculés par rapport au poids de végétal frais varient considérablement puisqu'ils sont compris entre 0,16 et 0,89% (Tableau III. 2.).

Les échantillons obtenus ont ensuite été analysés par CPG(Ir) et en plus des trois échantillons dont l'analyse est décrite dans le paragraphe précédent (n°1, 11 et 15), quatre autres échantillon (n° 3, 4, 7, 8), choisis en fonction de leur profil

chromatographique ont été analysés par RMN ^{13}C . Au total, de 33 à 42 constituants représentant de 84,3 à 99,9% de la composition chimique des échantillons ont été identifiés. Parmi ces composés, on dénombre 28 monoterpènes et 14 sesquiterpènes. Le limonène (29,7-67,0%) ; l' α -pinène (1,9-15,6%) ; l'élémol (0,5-19,7%) ; le linalol (0,8-12,8%) ; le δ -3-carène (0,2-9,6%) ; la pipéritone (0,4-8,5%) ; l' α -cadinol (0,2-3,0%) ; le terpinolène (0,9-4,9%) ; le δ -2-carène (0,6-4,3%) ; le myrcène (1,0-3,4%) ; l'acétate de linalyle (0,3-2,9%) ; le τ -cadinol (0,2-2,6%) ; l'acétate d' α -terpinyle (0,3-1,6%) ; le terpinèn-4-ol (0,1-1,5%) ; l' α -terpinéol (0,1-1,3%) ; le β -pinène (0,1-1,0%) ; le géraniol (0,1-0,6%) et le β -phellandrène (0,2-0,5%) sont présents dans tous les échantillons à des teneurs supérieures à 0,1%.

Afin d'obtenir une description statistique de notre échantillonnage, nous avons soumis ces résultats à une Analyse en Composante Principale (ACP) et parallèlement nous avons mis en œuvre l'algorithme de partition des centres de groupes (*k*-means) (Figure III. 1.). L'analyse statistique indique que nous sommes en présence d'un seul type de composition chimique, avec néanmoins deux compositions atypiques qui se distinguent (échantillon n°3 et 6) (Figure III. 2.).

Figure III. 1. ACP de 16 échantillons de d'huiles essentielles de feuilles de *J. thurifera*

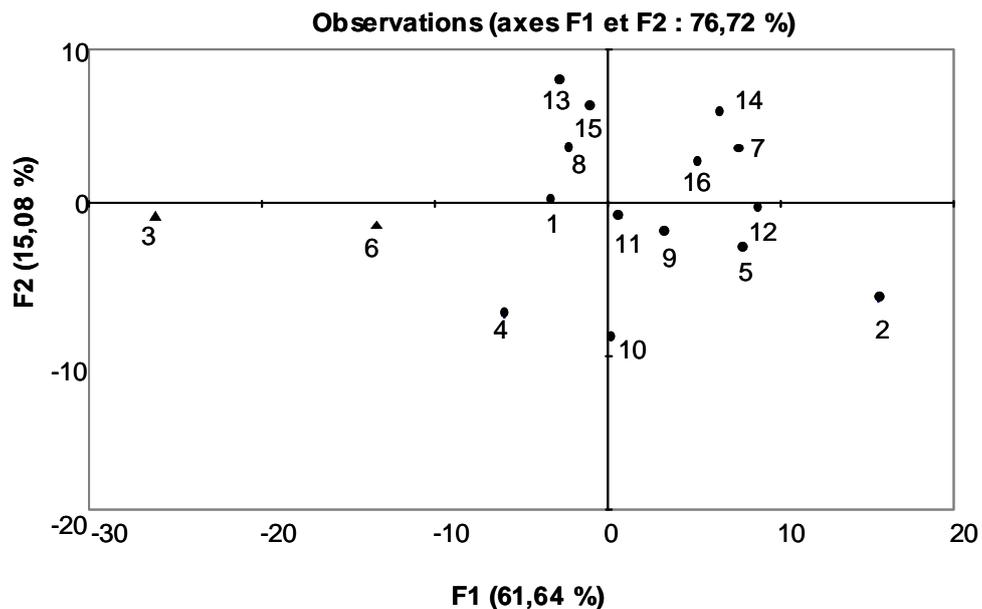


Tableau III. 2. Composition chimique des 16 échantillons d'huiles essentielles de feuilles de *J. thurifera* de Corse.

Composés	Ir ^a	Ir ^p	2	12	5	7	14	16	9	10	11	4	15	8	1	13	6	3
1 α -pinène	930	1020	7,2	4,2	5,2	1,9	2,6	7,4	8,7	15,6	7,6	14,2	6,1	6,0	7,9	5,6	2,4	2,1
2 sabinène	963	1108	0,3	0,3	0,4	-	0,2	0,2	0,2	0,3	0,4	0,2	0,3	0,3	0,4	0,2	3,3	0,1
3 β -pinène	969	1105	0,5	0,2	0,3	0,2	0,1	0,5	0,7	1,0	0,4	0,7	0,4	0,2	0,8	0,4	0,2	0,2
4 myrcène	979	1155	3,3	3,0	3,1	3,4	3,1	2,7	3,4	2,9	2,7	3,1	2,9	2,5	3,3	3,1	2,2	1,0
5 δ 2-carène	994	1125	1,8	1,1	1,9	4,3	1,7	0,6	3,1	1,2	2,3	2,1	2,0	1,4	2,4	2,2	1,8	1,0
6 δ 3-carène	1004	1142	4,0	8,2	3,7	2,0	0,2	4,4	4,2	2,6	6,4	3,2	9,6	3,5	8,0	9,5	2,2	3,4
7 p-cymène	1010	1263	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1
8 limonène	1022	1201*	67,0	58,1	57,8	56,6	55,3	53,7	52,4	50,9	48,9	46,2	46,1	46,1	45,7	43,7	40,6	29,7
9 β -phellandrène	1022	1206*	0,4	0,2	0,3	0,4	0,2	0,2	0,5	0,5	0,4	0,4	0,3	0,3	0,5	0,4	0,3	0,2
10 terpinolène	1077	1275	1,9	4,2	4,9	1,1	2,5	0,9	2,9	1,9	3,2	1,6	1,4	1,9	1,5	2,7	0,9	0,3
11 linalol	1081	1544	1,9	3,4	2,0	6,6	12,8	9,6	3,1	0,8	1,4	2,6	8,2	7,2	4,0	9,1	2,4	2,0
12 <i>trans</i> -1,2-époxyde limonène	1120	1456	tr	0,1	0,1	0,3	0,7	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1
13 bornéol	1148	1698	0,2	0,2	-	0,6	0,3	0,1	-	0,1	0,1	-	0,3	-	0,4	0,4	0,4	-
14 p-cymèn-8-ol	1158	1803	-	0,5	0,9	0,2	0,6	0,2	0,3	0,1	0,4	0,2	0,1	0,4	0,1	0,7	0,1	0,3
15 terpinèol-4	1161	1598	0,3	0,4	0,4	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,2	0,4	0,5	0,4	0,4	1,5	0,1
16 α -terpinéol	1170	1694	0,8	0,9	0,7	0,8	0,6	1,3	0,5	0,3	0,3	0,7	1,3	0,1	0,9	1,2	0,9	0,8
17 myrténol	1180	1789	-	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	-	0,2	0,2	0,1	0,2	-	0,2
18 <i>trans</i> -carvéol	1196	1830	-	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	0,4	0,3	0,5	0,3
19 citronellol	1208	1761*	-	0,2	-	0,9	-	0,2	0,2	0,1	0,1	-	0,1	0,2	tr	-	-	0,3
20 nérol	1208	1797*	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	-	0,5	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	-
21 pulégone	1215	1647	tr	0,4	0,1	0,4	0,2	0,3	0,2	0,2	0,3	-	0,2	0,4	0,6	0,2	-	0,4
22 pipéritone	1225	1729	1,5	0,7	2,4	8,5	2,2	0,4	4,3	1,4	1,5	1,2	2,6	4,4	1,3	4,4	1,7	1,1
23 géraniol	1231	1844	0,3	0,4	0,4	0,2	0,2	0,6	0,4	0,1	0,1	0,3	0,6	0,4	0,5	0,4	0,4	0,5
24 acétate de linalyle	1240	1553	0,6	2,5	0,9	1,3	1,4	2,9	0,7	0,3	0,4	0,5	2,4	2,0	1,7	0,9	1,2	1,0

25 acétate de bornyle	1269	1575	-	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,7	0,2	0,2	0,2
26 acétate d' α -terpinyle	1333	1681	1,5	0,8	1,3	1,2	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,8	0,8	1,6	1,0	1,5	1,0	1,1
27 acétate de néryle	1341	1725	tr	0,2	-	0,1	0,3	0,3	0,1	-	-	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
28 acétate de géranyle	1359	1748	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,5	0,1	0,1	-	0,2	0,4	0,4	0,2	0,2	0,3	0,4
29 <i>Trans</i> - α -bergamotène	1417	1580	-	-	-	-	0,1	0,2	0,1	0,1	0,4	-	0,3	0,3	-	0,1	0,1	0,2
30 bicyclogermacrène	1491	1727	-	-	0,1	-	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	-	0,1	0,2	-	0,1	0,2	0,2
31 γ -cadinène	1505	1752	-	-	-	0,1	0,4	0,3	0,1	0,3	0,6	0,1	0,2	0,4	-	0,2	0,2	0,3
32 δ -cadinène	1513	1740	0,6	0,1	-	0,1	0,6	0,4	0,3	0,8	0,9	-	0,6	0,8	1,5	0,6	1,0	0,5
33 élémol	1535	2079	1,9	1,0	2,4	0,9	1,2	1,2	2,3	5,7	1,2	10,2	0,6	2,8	2,5	0,5	13,6	19,7
34 germacra-1(10),5-dièn-4 β -ol	1568	2046	tr	-	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,4	0,4	0,2	0,2	0,6	0,7	0,1	0,4	0,5
35 β -oplopénone	1592	2071	0,8	-	0,7	0,1	0,4	-	-	0,3	0,1	0,3	0,2	-	0,4	-	0,6	-
36 sesquithuriférol	1594	2106	-	-	0,4	tr	0,5	-	-	-	0,1	-	-	-	tr	-	tr	0,2
37 cédrol	1597	2021	0,8	1,0	0,7	-	1,3	0,2	0,2	0,3	-	-	-	0,3	2,6	0,4	0,7	6,9
38 τ -cadinol	1628	2165*	0,5	0,5	0,5	0,2	0,6	0,4	0,6	1,0	0,4	1,4	0,2	0,6	0,7	0,3	2,6	1,8
39 γ -eudesmol	1628	2193*	0,2	tr	tr	tr	0,1	0,1	tr	0,1	tr	0,1	tr	0,1	tr	0,1	0,3	0,1
40 τ -muurolol	1628	2181*	0,1	tr	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2	0,6	0,3	0,4	0,2	0,4	0,6	0,3	1,3	0,5
41 α -eudesmol	1638	2217	tr	0,5	0,7	0,3	0,8	0,7	1,1	1,0	0,5	2,0	0,6	0,5	0,1	0,2	3,1	2,4
42 α -cadinol	1641	2229	1,0	0,8	1,2	0,5	1,2	1,0	1,5	2,3	1,0	3,0	0,2	1,5	1,6	0,8	6,4	3,8
Total:			99,9	95,3	94,8	94,7	94,8	93,6	94,3	95,3	85,1	96,8	91,0	89,4	94,0	92,2	95,5	84,2
Rendement			0,22	0,45	0,86	0,84	0,61	0,82	0,28	0,20	0,65	0,42	0,89	0,48	0,35	0,49	0,22	0,16

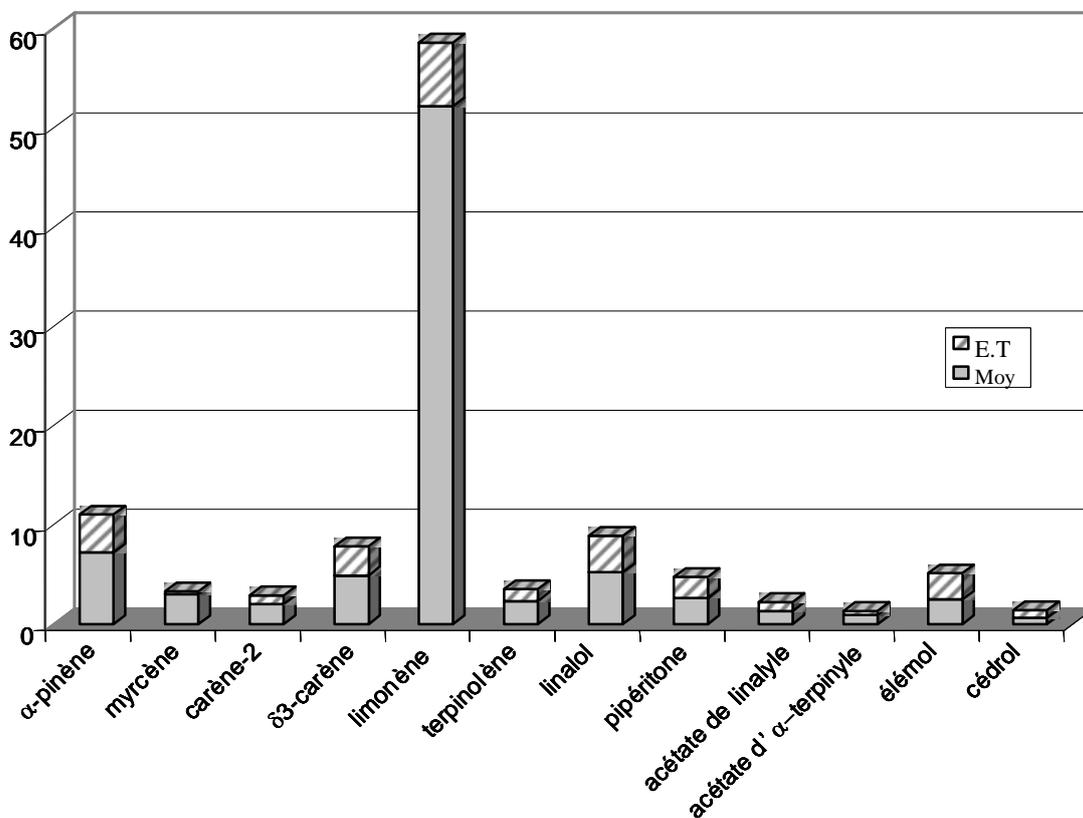
L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les indices sont suivis d'un astérisque

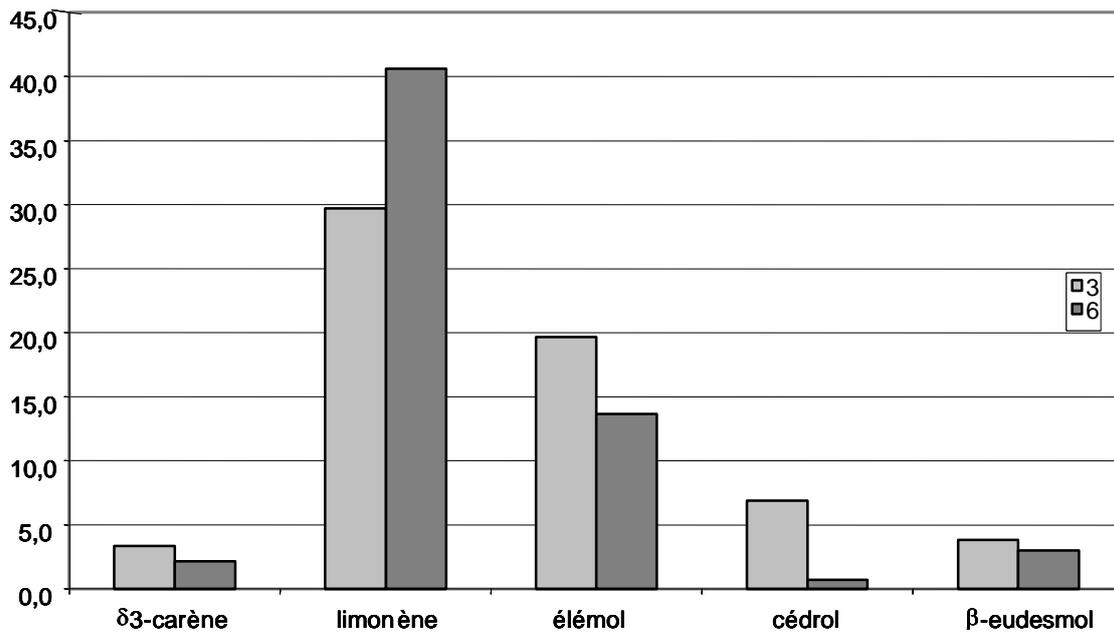
* : pourcentage sur colonne polaire.

La composition chimique des échantillons du groupe principal (14 échantillons sur 16) est caractérisée par une teneur importante en limonène (moyenne (M)=52,0% ; écart-type (ET)=6,5) viennent ensuite l' α -pinène (M=7,2 ; ET=3,8), le δ -3-carène (M=5,0 ; ET=2,9) et le linalol (M=5,2 ; ET=3,7). Cette composition riche en limonène se rapproche de celle décrite par Adams *et al.* (1999a, 2003) pour des échantillons provenant d'Espagne, des Pyrénées, des Alpes et de Corse. Cependant, dans cette étude, les huiles essentielles d'Espagne et des Alpes se distinguent de nos échantillons par des taux d'acétate de linalyle assez importants (3,3-13,6%) (Adams *et al.*, 2003).

Les échantillons atypiques 3 et 6 sont caractérisés par une teneur importante en limonène (29,7% et 40,6% respectivement) et également en élémol (19,7% et 13,6%). Leur composition chimique se distingue donc de celles décrites dans la littérature qui ne présentent jamais le couple limonène/élémol à des teneurs importantes (Adams *et al.*, 2003).

Figure III. 2. Principaux composés de l'huile essentielle de feuilles de *J. thurifera*





II. JUNIPERUS OXYCEDRUS SSP. MACROCARPA

L'espèce *Juniperus oxycedrus* regroupe trois sous espèces, une endémique à l'Espagne, ssp. *badia* et deux présentes en Corse :

- ssp. *oxycedrus* dont les huiles essentielles (baies et aiguilles) ont déjà fait l'objet d'une étude dans notre laboratoire (Boti *et al.*, 2006b),
- ssp. *macrocarpa* qui est une espèce protégée et qui sera l'objet de ce travail.

J. oxycedrus subsp. *macrocarpa* (Smith) Ball. est aussi appelé oxycèdre, genévrier ou cade à gros fruit. Il se présente sous la forme d'un arbuste de 2 à 5 m de haut. Ces aiguilles disposées en verticilles de trois mesurent de 12 à 20 mm de long et 2 à 2,5 mm de large. Elles possèdent une double bande blanche stomacale divisée par une nervure verte sur la surface intérieure. Les fruits sont assez gros (12-18 mm de diamètre) et de couleur verte. Ils deviennent rougeâtres à maturité et sont recouverts d'une couche cireuse variable (Adams, 2008).

Le genévrier à gros fruit est une espèce originaire de Méditerranée, on le trouve du sud-est de l'Espagne jusqu'à l'ouest la Turquie ainsi que dans les principales îles. En Corse, il semble exclusivement localisé sur les substrats sableux littoraux qu'il

colonise au fur et à mesure de leur fixation et qu'il contribue à consolider. Il peut y former des peuplements relativement denses. On trouve ces groupements sur les plages de Saleccia (Agriates), de l'Ostriconi, de Roccapina, de la région de Porto-Vecchio (Palumbaggia) et de diverses arrières plages de la côte orientale notamment à Mucchiatana (Vescovato) (Gamisans, 1991) (Annexe D).

II. 1. Etude bibliographique

La composition chimique des huiles essentielles obtenues à partir des aiguilles et des baies de *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa* a fait l'objet d'assez peu d'études.

Les huiles essentielles d'aiguilles :

Quatre publications décrivent la composition chimique de l'huile essentielle d'aiguilles de genévrier à gros fruit :

- La première étude date de 1995 et concerne un échantillon de Grèce analysé par CPG-SM. Le constituant majoritaire est l' α -pinène (26,9%), suivi du cédrol (13,9%) et du dihydro-*p*-cymèn-8-ol (8,5%) (Stassi *et al.*, 1995),
- En 1999, une étude d'Adams portant sur un échantillon d'Espagne a montré que le sabinène (26,5%) et l' α -pinène (22,6%) sont les deux principaux constituants (Adams *et al.*, 1999b),
- Valentini *et al.* en 2003 ont comparé les huiles essentielles d'aiguilles d'Italie de deux provenances ; région montagneuse (récolte en été et automne) et zone de dune (récolte en été). L'huile essentielle de montagne est composée très majoritairement d' α -pinène, quelle que soit la saison de récolte (81% en été et 73,5% à l'automne). Celle extraite de pieds poussant dans les dunes renferme essentiellement de l' α -pinène (23%), de l' α -terpinéol (18%), du 1,8-cinéole (9%) et du (Z,E)-farnésol (8%) (Valentini *et al.*, 2003),
- Enfin, Sezik *et al.* en 2005, reportent l'étude d'un échantillon d'huile essentielle de Turquie distillé à trois périodes de l'année (Mai, Aout, Octobre). La teneur des trois constituants majoritaires varie sensiblement d'une saison à l'autre ; oxyde de manoyle (7,7 ; 21,9 ; 9,1%), α -pinène (7,6 ; 7,2 ; 11,1%) et cédrol (2,3 ; 9,7 ; 3,4%). Ainsi, on observe pour l'été une composition chimique dominée par l'oxyde de manoyle, alors

que pour les autres saisons, aucun de ces trois composés n'atteint une teneur importante (Sezik *et al.*, 2005).

Les huiles essentielles de baies :

A notre connaissance, seulement trois études rapportent la composition chimique des huiles essentielles de baies de *J. oxycedrus ssp. macrocarpa* :

- la première date de 1995 et porte sur un échantillon de Grèce dans lequel l' α -pinène est le composé majoritaire (63%), les autres constituants n'atteignant pas 10% chacun, il s'agit essentiellement du myrcène (8%), et de l' α -terpinéol (4%) (Stassi *et al.*, 1995),
- la seconde (2003) concerne deux échantillons d'Italie, de la même provenance que dans le cas des aiguilles, à savoir d'une région montagneuse et d'une zone de dunes. Le premier de ces échantillons a une composition semblable à celle de l'huile essentielle de Grèce (α -pinène 53%, myrcène 6%, α -terpinéol 7%). Dans le second échantillon, l' α -pinène est de nouveau le composé ultra-majoritaire (85%) en revanche le principal composé minoritaire est le (Z,E)-farnésol (8%) (Valentini *et al.*, 2003),
- enfin, l'étude la plus récente (2005) rapporte la composition chimique de deux échantillons d'Espagne dominée une fois encore par l' α -pinène (70,5 et 59,8%) suivi du myrcène (15,2% et 14,8%) (Velasco-Negueruela *et al.*, 2005).

L'objectif de ce travail était de caractériser les huiles essentielles d'aiguilles et de baies de *Juniperus oxycedrus ssp. macrocarpa* de Corse et de mettre en évidence une éventuelle variabilité chimique intraspécifique. Dans ce but, nous avons analysé 18 échantillons d'aiguilles et 5 de baies, obtenus à partir d'un échantillonnage effectué en mai et en juin 2008 à différents endroits de l'île, Palumbaggia, Roccapina, Mucchiatana, et l'Ostriconi.

Les huiles essentielles d'aiguilles et de baies ont été obtenues par hydrodistillation avec un appareil de type Clévenger avec des rendements par rapport à la masse de végétal frais, compris entre 0,02% et 0,17% pour les aiguilles et 0,10% à 0,22% pour les baies. Les analyses qualitatives et quantitatives de ces échantillons ont été réalisées par CPG(Ir) et pour plusieurs d'entre eux également par RMN ^{13}C et

CPG-SM. L'utilisation de la CPG-SM permet d'identifier les constituants minoritaires dont les teneurs sont trop faibles pour permettre l'identification par RMN ^{13}C .

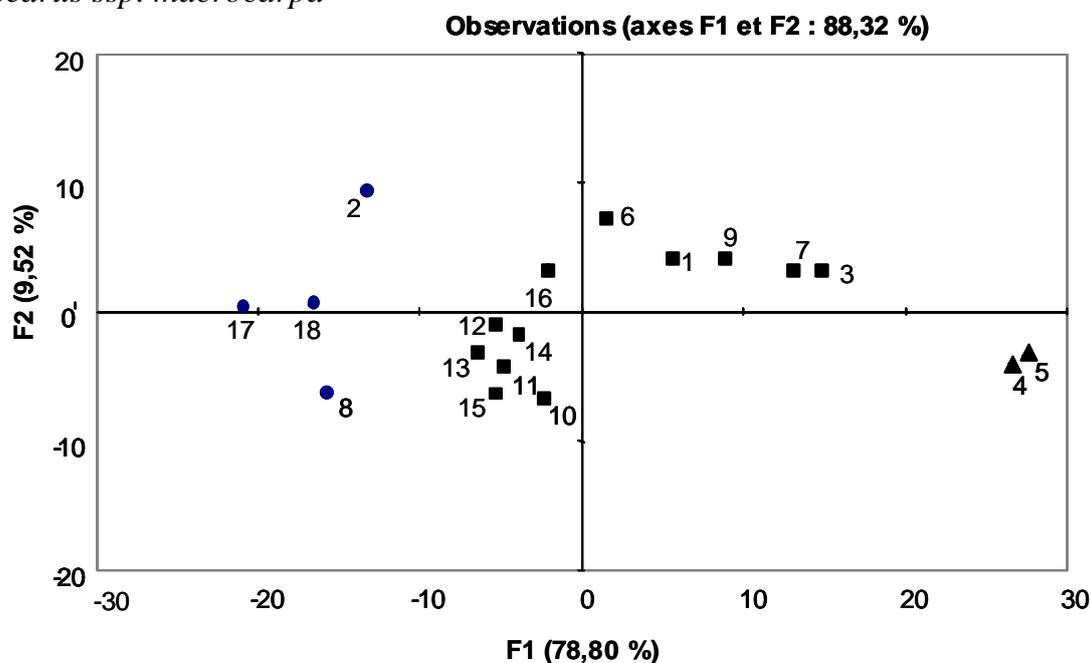
II.2. Caractérisation des échantillons d'huile essentielle d'aiguilles

Les dix-huit échantillons d'huile essentielle d'aiguilles ont d'abord été analysés par CPG(Ir). En fonction de leur profil chromatographique et pour identifier le maximum de composés, 10 échantillons (n°1, 2, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16) ont été analysés par RMN ^{13}C et 3 échantillons (n°1, 11, 12) par CPG-SM. Au total, sur l'ensemble des échantillons, de 45 à 58 composés représentant de 82,6% à 95,8% de la composition chimique globale de chaque échantillon sont identifiés (Tableau III. 3.). Parmi ceux-ci, on dénombre 37 monoterpènes, 18 sesquiterpènes et 3 diterpènes (oxyde de manoyle, déhydroabiétane, abiétadiène). L' α -pinène est toujours le composé majoritaire, sa teneur varie de 28,7 à 76,4%. Plusieurs autres composés sont présents dans tous les échantillons à des teneurs supérieures à 0,1% : le β -phellandrène (0,1-12,3%), l' α -terpinéol (0,5-8,6%), le limonène (0,2-5,5%), le *p*-cymène (0,2-5,0%), le myrcène (0,9-4,2%), l' α -campholénal (0,5-2,7%), le *trans*-verbénol (0,6-2,6%), le *trans*-pinocarvéol (0,4-2,6%), l' α -phellandrène (0,1-2,6%), le β -pinène (1,1-2,5%), le camphène (0,2-1,7%), le terpinolène (0,1-1,3%), le sabinène (0,1-0,9%), le *cis*-verbénol (0,1-0,9%), le myrténal (0,1-0,6%), le myrténol (0,1-0,6%) et le verbénène (0,1-0,4%).

Afin d'obtenir une description statistique de notre échantillonnage et de pouvoir mettre en évidence une éventuelle variabilité chimique, nous avons soumis les résultats à une analyse en composante principale (ACP) (Figure III. 3.). Celle-ci montre que les trois premières composantes principales représentent 95,4% de la variation totale. La représentation graphique des échantillons suivant les composantes 1 et 2, qui expriment respectivement 78,8% et 9,5% de l'information globale, suggère une répartition optimale des échantillons en un seul groupe avec toutefois quelques échantillons atypiques. Parallèlement, les résultats de l'algorithme de partition des centres de groupes (*k*-means) vont dans le même sens que ceux de l'ACP, en proposant également un seul groupe.

Ainsi en fonction de la teneur en α -pinène, composé majoritaire, on distingue un sous-groupe principal (2/3 des échantillons) dans lequel cette teneur varie de 43,3% à 63,8% (moyenne=50%); quatre échantillons (2, 8, 17, 18) avec une teneur plus faible (28,7-35,3%) et enfin deux échantillons (4, 5) avec une teneur nettement plus élevée (75,5% et 76,4%). On remarque également que le β -phellandrène est présent avec des pourcentages qui varient nettement d'un échantillon à l'autre (0,1-12,3%). Par ailleurs, le δ -3-carène, dont la teneur est inférieure ou égale à 0,1% dans 11 échantillons, est ponctuellement présent à des teneurs appréciables (jusqu'à 17,3% pour l'échantillon 8).

Figure III. 3. ACP de 18 échantillons de d'huiles essentielles de feuilles de *J. oxycedrus ssp. macrocarpa*



Dans nos échantillons comme dans ceux de Grèce et d'Italie, l' α -pinène est le composé majoritaire. Néanmoins, les huiles essentielles de Corse se distinguent par l'absence de cédrol (présent à 13,9% en Grèce) (Stassi *et al*, 1995) et par une teneur assez faible en α -terpinéol (présent à 18% en Italie) (Valentini *et al*, 2003). Par ailleurs, la composition des deux échantillons très riches en α -pinène (4 et 5) est voisine de celle des huiles essentielles d'Italie de montagne (α -pinène : 73 et 81%) (Valentini *et al*, 2003).

Tableau III. 3. Composition chimique de 18 échantillons d'huile essentielle feuilles de *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa*

Lieu de récolte			P		P		P		P		R		O		M		P		O	
Composés	Ir ^a	Ir ^p	5	4	3	6	7	1	9	16	10	11	14	15	12	13	2	8	18	17
α -thujène	922	1030	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1
α -pinène	931	1032	76,4	75,5	63,8	62,0	58,0	54,5	50,3	47,4	47,2	45,3	45,3	44,6	43,9	43,3	35,3	35,1	32,7	28,7
camphène	943	1070	0,5	0,5	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	1,5	1,2	0,5	1,7	0,5	0,6	0,3	0,7	0,3	0,2
verbénène	947	1130	0,3	0,2	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,4	0,4	0,1	0,1	0,1
sabinène	965	1125	0,3	0,3	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,3	0,4	0,4	0,2	0,9	0,2	0,4	0,1	0,6	0,4	0,3
β -pinène	970	1112	1,4	2,5	1,2	1,2	1,6	1,5	1,4	2,4	1,5	1,6	1,3	1,4	1,2	1,3	1,1	1,4	2,1	1,4
myrcène	981	1159	1,9	2,1	2,4	2,6	3,1	2,5	3,3	4,2	1,3	2,0	0,9	1,1	1,5	2,1	2,9	2,9	2,8	2,5
α -phellandrène	998	1167	0,2	0,2	1,4	1,5	2,2	1,9	2,6	0,4	0,1	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2	2,0	1,2	0,3	0,5
δ 3-carène	1007	1147	tr	0,1	0,1	-	-	0,1	-	1,7	7,5	5,3	0,1	7,4	0,1	5,6	0,1	17,3	-	2,1
p-cymène	1012	1275	0,4	0,2	1,5	1,7	2,6	2,3	3,4	4,1	0,5	2,7	3,5	1,9	3,6	2,8	3,9	1,4	2,9	5,0
p-menthène	1020	1134	-	0,1	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4	-	0,2	0,1	-	0,2	-	0,1	tr	0,2	-	0,1
limonène	1020*	1206	1,1	1,2	1,5	1,7	1,7*	1,6	1,8	3,0	0,2	1,9	1,6	1,6	1,8	2,0	5,5	1,2	2,9	3,1
β -phellandrène	1020*	1216	1,2	0,4	7,9	8,0	8,3*	7,7	11,9	7,6	1,2	1,7	0,1	0,5	1,4	3,1	12,3	6,9	2,0	1,7
terpinolène	1079	1284	0,4	0,3	0,6	0,6	0,5	0,7	0,7	0,1	1,2	0,7	0,2	0,3	0,7	0,4	0,8	1,3	0,2	0,2
linalol	1083	1554	tr	-	0,1	tr	0,1	0,2	0,3	0,2	0,1	0,4	0,7	0,4	0,5	0,2	0,1	0,2	0,5	0,2
α -campholenal	1104	1493	1,0	0,8	1,4	1,6	2,1	2,0	1,4	0,6	0,7	0,5	1,3	1,1	0,9	0,9	2,7	0,6	0,5	0,7
camphre	1121	1517	0,1	tr	0,1	tr	tr	0,1	tr	0,2	0,3	0,2	1,2	0,3	0,4	0,3	0,2	tr	0,1	0,4
<i>trans</i> -pinocarvéol	1125	1657	0,4	0,9	1,5	1,7	2,2	2,1	1,5	1,1	0,7	0,9	1,3	1,4	1,5	1,4	2,6	0,7	1,0	1,3
<i>trans</i> -verbénol	1128	1676	0,9	0,6	0,8	0,8	1,1	1,9	1,2	0,9	1,7	1,5	2,6	2,1	1,9	1,1	2,5	0,9	1,3	1,2
<i>cis</i> -verbénol	1130	1655	0,2	0,1	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,9	0,5	0,5	0,4	0,4	0,2	0,4	0,5
p-mentha-1,5-diène-8-ol	1145	1711	0,4	0,4	0,8	0,9	1,2	1,1	1,0	tr	0,2	0,3	0,2	0,9	0,3	0,1	1,2	0,6	tr	tr
bornéol	1150	1704	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	0,3	0,2	tr	0,2	0,2	tr	0,2	0,1	0,2	tr	0,4

cryptone	1160	1665	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,4	tr	1,5	1,1	2,6	1,3	2,7	1,7	2,2	0,1	0,1	3,0	4,6
p-cymèn-8-ol	1162	1815	tr	tr	0,2	0,3	0,4	0,2	0,4	0,7	0,4	0,9	0,7	1,3	0,8	1,7	0,5	0,3	0,8	0,1
terpinéol-4	1169	1654	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	-	1,4	2,5	1,9	2,2	2,8	5,5	0,2	0,2	3,4	1,0
myrténal	1170	1633	0,2	0,1	0,3	0,3	0,5	0,4	0,4	0,3	0,4	0,3	0,5	0,4	0,4	0,5	0,6	0,3	0,3	0,4
α -terpinéol	1173	1698	0,5	0,6	0,8	1,5	1,1	1,7	1,8	3,4	1,0	0,8	1,8	1,9	1,1	1,0	1,8	0,7	0,8	8,6
myrténol	1179	1794	0,2	0,2	0,3	0,3	0,4	0,5	0,3	0,3	0,1	0,2	0,1	0,3	0,3	0,1	0,6	0,2	0,1	0,4
verbénone	1181	1711	0,1	0,2	0,2	0,2	0,6	0,6	0,7	0,5	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,5	0,4	0,1	0,8
<i>trans</i> -carvéol	1197	1834	0,1	0,2	0,4	0,5	0,7	0,9	0,6	0,5	0,7	0,5	0,5	0,9	0,6	0,6	1,1	0,3	0,4	0,6
<i>trans</i> -pipéritol	1205	1751	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,3	0,2	0,1	tr	0,5	0,1
<i>cis</i> -carvéol	1210	1865	tr	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	0,1	0,3	0,2	0,4	0,3	0,3	0,2	tr	0,6	0,7
oxyde de méthyle et de thymyle	1214	1589	0,1	0,1	0,2	0,1	tr	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,1	0,3	0,1	0,2	0,4	0,1	0,4	0,6
pipéritone	1228	1730	tr	0,1	tr	tr	0,1	0,1	0,3	0,5	0,3	0,2	0,4	0,3	0,2	0,6	0,1	0,1	0,2	1,7
acétate de menthyle	1281	1564	tr	-	tr	tr	tr	0,1	0,1	0,3	2,7	1,2	2,7	1,3	1,1	0,5	0,1	0,1	0,6	0,5
acétate de myrtényle	1301	1680	tr	-	tr	-	-	tr		0,1	1,7	0,2	1,5	0,9	0,6	0,3	-	-	0,4	0,1
acétate d' α terpinyle	1333	1681	0,2	-	1,0	0,3	1,8	1,8	0,3	0,3	0,8	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,5	0,1	3,2	0,4
α -cubébène	1350	1459	tr	0,1	tr	-	-	tr	tr	0,3	1,5	0,7	1,1	1,0	0,5	0,3	tr	-	0,6	0,8
α -copaène	1378	1488	tr	0,1	0,1	-	-	tr	tr	0,1	0,2	0,3	0,1	0,1	0,4	0,3	tr	-	0,2	0,3
β -élémente	1386	1591	tr	0,1	tr	tr	-	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,4	-	0,1	0,9	0,1	0,1	0,1	0,1
(<i>E</i>)- β -	1420	1591	0,2	0,2	tr	tr	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1
γ -muurolène	1453	1671	0,2	0,3	tr	-	-	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,3	0,3	0,5
germacrène D	1478	1711	1,2	2,2	0,3	0,1	0,2	0,4	0,4	0,1	0,1	0,1	0,2	0,4	0,4	0,2	0,4	2,4	0,3	0,2
α -muurolène	1508	1726	0,2	0,4	0,2	0,4	-	0,3	0,1	0,1	0,5	0,1	0,3	0,2	1,4	0,3	0,2	0,5	0,8	0,4
γ -cadinène	1510	1754	0,1	0,1	0,1	tr	-	0,3	tr	-	tr	tr	0,1	tr	0,2	0,2	0,1	0,3	0,1	-
δ -cadinène	1515	1754	0,3	0,7	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	-	0,7	0,3	-	0,3	0,3	0,5	-	-

(E)-nérolidol	1549	2038	0,4	0,3	0,1	0,4	0,4	0,2	0,3	0,3	0,4	0,4	1,0	0,3	1,0	0,3	0,5	0,8	0,6	0,4
oxyde de caryophyllène	1581	1988	0,2	0,4	tr	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,1	1,4	0,1	0,5	0,1	0,1	0,5	0,2	0,6
sesquithuriferol	1592	2110	-	0,1	-	0,2	-	0,1	0,1	0,5	0,7	0,6	1,2	0,4	1,7	0,5	0,1	tr	0,9	0,7
oxyde d'humulène	1597	2042	0,6	0,6	0,4	0,3	0,2	0,5	-	-	-	0,1	-	-	0,1	0,1	0,1	0,3	0,5	0,1
τ -cadinol	1630	2170	0,2	0,2	0,1	0,1	-	0,2	tr	0,3	0,5	0,2	0,6	0,2	0,7	0,3	0,2	0,5	0,7	0,5
α -cadinol	1639	2227	0,5	0,1	0,2	0,2	-	0,3	-	0,2	0,1	0,2	0,4	0,1	0,8	0,3	0,7	0,7	0,6	0,3
(Z)-pentadec-6-en-2-one	1651	2030	0,1	0,5	0,2	0,4	0,4	0,2	0,6	0,3	0,1	0,3	0,3	0,9	1,2	0,8	0,5	0,6	0,7	0,8
(EE)-farnesol	1701	2353	0,3	0,2	0,7	0,2	0,3	0,3	1,0	1,6	-	0,3	0,1	0,8	0,7	0,2	1,0	1,9	1,1	1,8
(EE)-farnesal	1716	2063	0,1	0,1	0,1	tr	-	0,1	-	0,3	-	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,4	0,6
oxyde de manoylène	1996	2353	0,6	0,6	1,0	-	0,6	1,1	2,2	2,4	0,9	4,5	2,0	1,5	3,7	2,4	3,4	2,4	8,1	1,5
déhydroabiétane	2039	2503	0,1	-	0,3	0,2	0,1	0,4	0,4	1,0	0,3	1,8	0,9	1,0	1,6	0,7	0,9	0,5	1,1	1,1
abietadiène	2077	2467	0,3	-	0,6	0,2	0,1	0,9	1,0	0,3	-	0,5	0,5	0,2	0,6	0,1	0,9	0,7	0,5	0,5
Total :			94,8	95,8	95,3	93,1	95,2	95,0	95,1	93,2	84,8	88,8	86,6	90,6	88,3	89,8	91,2	90,1	83,3	82,6
Rendement			0,03	0,09	0,11	0,10	0,10	0,20	0,15	0,06	0,03	0,06	0,02	0,05	0,06	0,17	0,04	0,02	0,03	0,03

*L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les indices sont suivis d'un astérisque * : pourcentage sur colonne polaire. Lieu de récolte P=Palumbaggia, R=Rocapina, O=Ostriconi, M=Mucchiatana. déhydroabiétane=abiétatriène.*

II. 3. Composition chimique des huiles essentielles de baies

Les cinq échantillons d'huiles essentielles de baies ont tous été analysés par CPG(Ir) et RMN ^{13}C puis pour deux d'entre eux, choisis selon leur profil chromatographique, par CPG-SM (n°1 et 2). Nous avons ainsi identifié 46 composés (dont 22 par RMN ^{13}C) représentant de 95,1 à 97,1% de la composition chimique globale de chacun des échantillons. Parmi eux, on dénombre 29 monoterpènes, dont 18 oxygénés, 14 sesquiterpènes dont 9 oléfiniques et trois diterpènes, l'oxyde de manoylé, l'abietadiène et l'abiétatriène.

Tableau III. 4. Composition chimique de 5 échantillons d'huile essentielle de baies de *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa*

N°	Composés	Ir ^a	Ir ^p	1	2	3	7	9	Mode d'identification
1	tricyclène	920	1020	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	Ir, SM
2	α -pinène	931	1032	56,4	56,7	78,9	66,7	67,1	Ir, SM, RMN ^{13}C
3	camphène	943	1072	0,4	0,3	0,4	0,3	0,4	Ir, SM, RMN ^{13}C
4	thuja-2,4(10)-diène	946	1123	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	Ir, SM
5	sabinène	965	1125	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	Ir, SM
6	β -pinène	970	1112	1,9	1,6	1,6	1,6	1,3	Ir, SM, RMN ^{13}C
7	myrcène	981	1159	11,9	14,1	2,2	9,8	9,0	Ir, SM, RMN ^{13}C
8	p-cymène	1012	1275	0,1	tr	0,1	0,1	0,2	Ir, SM
9	limonène*	1020	1206	1,9	1,7	0,9	1,3	1,5	Ir, SM, RMN ^{13}C
10	β -phellandrène*	1020	1216	0,4	0,7	0,4	0,4	0,3	Ir, SM, RMN ^{13}C
11	terpinolène	1079	1284	0,6	0,6	0,5	0,4	0,5	Ir, SM, RMN ^{13}C
12	linalol	1083	1549	0,2	0,1	-	0,1	0,1	Ir, SM
13	α -campholenal	1104	1493	0,4	tr	0,2	0,4	0,5	Ir, SM, RMN ^{13}C
14	camphre	1121	1517	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	Ir, SM, RMN ^{13}C
15	<i>trans</i> -pinocarvéol	1125	1657	0,3	tr	0,3	0,3	0,5	Ir, SM, RMN ^{13}C
16	<i>cis</i> -verbénol	1130	1655	0,1	tr	tr	0,1	0,1	Ir, SM
17	<i>trans</i> -pinocamphone	1138	1510	0,1	tr	tr	0,1	0,1	Ir, SM
18	cryptone	1146	1660	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	Ir, SM
19	p-cymen-8-ol	1162	1815	0,1	-	tr	tr	0,1	Ir, SM
20	terpinéol-4	1161	1600	0,4	0,2	0,2	0,2	0,3	Ir, SM
21	myrtenal	1170	1633	0,1	tr	0,1	0,1	0,2	Ir, SM
22	α -terpinéol	1173	1698	1,2	0,3	0,8	0,5	1,3	Ir, SM, RMN ^{13}C
23	myrténol	1179	1794	0,2	tr	0,1	0,1	0,2	Ir, SM
24	verbénone	1181	1711	0,1	tr	0,1	0,1	0,2	Ir, SM
25	<i>trans</i> -carvéol	1197	1834	0,1	-	tr	0,1	0,1	Ir, SM

26	<i>cis</i> -carvéol	1210	1865	tr	-	tr	tr	tr	Ir, SM
27	carvone	1225	1739	0,1	-	-	tr	tr	Ir, SM
28	acétate de bornyle	1269	1575	0,1	-	0,2	tr	-	Ir, SM
29	acétate d' α -terpinyle	1333	1681	0,4	tr	0,1	tr	tr	Ir, SM
30	α -cubébène	1350	1459	0,5	0,6	0,3	0,5	0,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
31	α -ylangène	1372	1475	tr	tr	tr	tr	tr	Ir, SM
32	α -copaène	1378	1488	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	Ir, SM
33	β -éléémène	1386	1591	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	Ir, SM
34	(<i>E</i>)- β -caryophyllène	1420	1591	0,9	0,9	0,5	0,6	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
35	γ -muurolène	1453	1671	0,8	0,8	0,4	0,4	0,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
36	germacrène D	1478	1711	10,3	12,4	6,0	7,2	4,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
37	α -muurolène	1508	1726	0,2	1,4	0,2	0,3	0,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
38	δ -cadinène	1515	1754	0,8	0,7	0,6	0,3	0,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
39	(<i>E</i>)-nérolidol	1549	2038	0,2	tr	0,1	1,3	1,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
40	oxyde de caryophyllène	1581	1988	0,2	0,1	tr	0,2	0,2	Ir, SM
41	oxyde d'humulène	1597	2042	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	Ir, SM
42	τ -cadinol	1630	2170	0,7	0,5	0,3	0,3	0,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
43	α -cadinol	1639	2227	0,5	0,3	0,1	0,2	0,3	Ir, SM, RMN ¹³ C
44	oxyde de manoyle	1996	2353	1,2	0,2	0,1	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
45	abiétatriène	2039	2503	0,1	tr	-	0,1	0,1	Ir, SM
46	abietadiène	2077	2467	0,5	0,8	0,1	0,9	0,7	Ir, SM, RMN ¹³ C
Total :				95,6	96,1	97,1	96,5	95,1	
Rendement:				0,10	0,19	0,22	0,10	0,15	

*L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les indices sont suivis d'un astérisque * : pourcentage sur colonne polaire. abiétatriène = déhydroabiétane*

Les cinq échantillons ont une composition chimique semblable, dominé par l' α -pinène dont la teneur varie de 56,4 à 78,9%. Deux autres composés sont présents à des teneurs appréciables, le germacrène D (4,5-12,4%), et le myrcène (2,2-11,9%). Les autres constituants n'atteignent pas 2% chacun (Tableau III. 4).

La composition chimique des échantillons de Corse et de ceux d'autres pays décrits dans la littérature est toujours dominée par l' α -pinène. Néanmoins, nos échantillons se distinguent au niveau des produits secondaires. Ainsi, la composition caractérisée par le couple α -pinène/myrcène (Espagne, Grèce et Italie région de montagne) (Velasco-Negueruela *et al.*, 2005, Stassi *et al.*, 1995, Valentini *et al.*,

2003) est différente de celles des échantillons de Corse (1, 2, 7 et 9) qui possède en plus de ces deux composés le germacrène D avec une teneur relativement importante (4,5-12,4%). Par ailleurs, l'échantillon de Corse n°3 dans lequel l' α -pinène ultramajoritaire (78,9%) est suivi par le germacrène D (6,0%), se différencie de l'échantillon d'Italie de la région des dunes (α -pinène 85%) qui ne renferme pas de germacrène D mais qui contient 8% de farnésol, absent de notre échantillon (Valentini *et al.*, 2003).

III. JUNIPERUS COMMUNIS VAR. COMMUNIS

Juniperus communis L., est la seule espèce de *Juniperus* présente dans les deux hémisphères, elle regroupe quatre variétés ou sous-espèces (Adams, 1998 ; Farjon, 1998) : var. *depressa* Pursh en Amérique du nord, var. *megistocarpa* au Canada, var. *saxatilis* Pall. en Europe, en Sibérie, en Asie centrale, au Groenland et enfin var. *communis* L. en Europe (Adams, 2008).

J. communis var. *communis* est communément désigné sous le terme genévrier commun. Il se présente sous la forme d'un arbrisseau ou un arbuste de 1 à 6 m de hauteur disséminé dans tous les pays européens et jusqu'au centre de la Russie. En France, on le rencontre dans la plupart des régions, en revanche en Corse, seuls quelques pieds sont répertoriés au col de Prato à 985 m d'altitude (Annexe D).

Les feuilles étroites, aiguës, verticillées par trois, sont marquées d'une ligne claire sur la face supérieure ce qui permet de distinguer cette espèce de *Juniperus oxycedrus* L. dont les feuilles possèdent deux lignes blanches. Les fruits, appelés baies de genièvre sont d'un bleu-violacé sombre à maturité. Ils sont utilisés comme condiments, dans la choucroute par exemple, ou macérés dans l'alcool pour donner certaines eaux de vie comme le gin ou le genièvre.

Son huile essentielle, obtenue à partir des baies, est très fluide, incolore à jaune vert, d'une odeur légèrement boisée et très agréable. Elle est surtout utilisée pour ses propriétés diurétiques, antalgiques et anti-rhumatismales.

III. 1. Etude bibliographique

De nombreuses études concernant les huiles essentielles d'aiguilles de cette espèce ont été effectuées. Bien que tous les échantillons soient constitués majoritairement de monoterpènes, plusieurs compositions ont été décrites. Ainsi :

(i) l' α -pinène est le composé ultramajoritaire dans des échantillons du Canada : 80,0% (Vernin *et al.*, 1988) et 73,5-83,0% (Lawrence, 1994) ; de Pologne (jusqu'à 90%) (Renata Ochocka *et al.*, 1997) ; de Suède (56%) (Lawrence, 2001a) et du Royaume-Unis (82%) (Banthorpe *et al.*, 1973) ;

(ii) l' α -pinène est le principal constituant, suivi d'un ou plusieurs autres monoterpènes dans des proportions non négligeables, comme :

- le sabinène dans les échantillons de Grèce (α -pinène : 41,3% ; sabinène : 17,4%) (Chatzopoulou et Katsiotis, 1993a) ; de Norvège (α -pinène : 34% et 40% ; sabinène : 22% et 18%) (Vernin *et al.*, 1988) ; d'Allemagne (α -pinène ; 40% et 33,7% ; sabinène 18% et 27,6%) (Hörster, 1973 ; Vernin *et al.*, 1988) ; de Pologne (α -pinène 54,6-36,8% ; sabinène 24,6-33,1%) (Renata Ochocka *et al.*, 1997), et de Roumanie (α -pinène 33,7% et sabinène 27,6%) (Lawrence, 1994) ;

- le myrcène dans les échantillons d'Italie (α -pinène 31,4-41,0% ; myrcène 12,3-14,9%) (Vidrich *et al.*, 1988).

- le couple sabinène / myrcène dans des proportions voisines dans un échantillon de Serbie (α -pinène 40%, myrcène 18% et sabinène 17%) (Damjanovic *et al.*, 2003) ;

- le limonène dans les échantillons de Norvège (α -pinène 47-71% et limonène 4-20%) (Vernin *et al.*, 1988 ; Baerheim Svendsen *et al.*, 1985) et de France (α -pinène 44,3% et limonène 18,0%) (Milhau *et al.*, 1997) ;

- le β -pinène dans des échantillons de Bulgarie (α -pinène 11,0-30,8% ; β -pinène 4,1-33,2%) (Stoyanova, 1996) ;

(iii) le sabinène est le composé ultramajoritaire dans un échantillon de Sardaigne (61%) (Angioni *et al.*, 2003) ;

(iv) le sabinène et l' α -pinène sont les deux principaux constituants des huiles essentielles provenant de France (Marseille) (48,4% et 16,5% respectivement) (Vernin *et al.*, 1988), de Norvège (Vidrich *et al.*, 1991), (29-48% et 10-28%) (Baerheim

Svendsen *et al.*, 1985), et d'Italie (30% et 20%) (Vidrich *et al.*, 1991). Dans d'autres échantillons d'Italie en plus du sabinène (32-48%) et de l' α -pinène (8,4-22,0%), le terpinèn-4-ol est présent en quantité non négligeable (5,6-11,0%) (Caramiello *et al.*, 1995) ;

(v) Enfin, on rencontre des échantillons possédant l'acétate de bornyle comme composé majoritaire (23-38%), suivi du sabinène (4-11%) (Lawrence, 2001a).

En ce qui concerne les huiles essentielles de baies de *Juniperus communis* var. *communis*, plusieurs études et plusieurs compositions chimiques sont de nouveau reportées dans la littérature :

(i) l' α -pinène est le composé ultra majoritaire d'échantillons de Pologne (jusqu'à 90%) (Renata Ochocka *et al.*, 1997 ; Filipowicz *et al.*, 2003); de Lituanie (jusqu'à 65%) (Butkiene *et al.*, 2006) et de plusieurs échantillons d'huile essentielle de baies commerciales (62,2-70,5%) (Lawrence, 2001b ; 2006) ;

(ii) l' α -pinène et le myrcène sont les deux composés majoritaires de plusieurs échantillons de différentes provenances : Autriche (45,7% et 21,5% respectivement) (Sybilska *et al.*, 1994), Italie (52,3-33,6% et 11,0-15,3%) (Sybilska *et al.*, 1994 ; Cosentino, 2003 ; Bonaga et Galletti, 1985), Espagne (35% et 18%) (Lawrence, 1980) et Pologne (56,1-39,8% et 46,3-15,7%) (Renata Ochocka *et al.*, 1997 ; Filipowicz *et al.*, 2003 ; Lawrence, 1996b). On peut noter que dans certains échantillons de Pologne, en plus de l' α -pinène et du myrcène, le citronellol est présent à des teneurs pouvant atteindre 15% (Formacek et Kubeczka, 2002 ; Filipowicz *et al.*, 2003) ;

(iii) l' α -pinène et le sabinène dominant la composition chimique de quelques échantillons : Yougoslavie (16,7-27,8% et 10,8-14,6% respectivement) (Lawrence 2006), Grèce (27% et 13%) (Chatzopoulou et Katsiotis, 1993b) ;

(iv) l' α -pinène, le sabinène et le myrcène sont présents en proportions voisines dans un échantillon commercial (30%, 28% et 28% respectivement) (Lawrence, 1990) ;

(v) on trouve également des échantillons caractérisés par le couple α -pinène/terpinéol-4 (40,0%/9,5%), provenant de Hongrie (Taskinen et Nykänen, 1976) ;

(vi) des échantillons provenant de Pologne sont dominés par le couple α -pinène/*p*-cymène (23-44% / 12%) (Lawrence, 2006 ; Filipowicz *et al.*, 2003) ;

(vii) enfin, le limonène et l' α -pinène sont les deux composés majoritaires d'un échantillon provenant de Grèce (31% et 27% respectivement) (Koukos et Papadopoulou, 1997).

III. 2. Composition chimique des huiles essentielles d'aiguilles

Nous avons préparé neuf échantillons d'huile essentielle d'aiguilles de *J. communis* var. *communis* dans un appareil de type Clevenger pendant 3h30. Ces échantillons ont été récoltés au col de Prato, seul endroit de Corse où ce genévrier est recensé, au mois d'octobre 2006. Les rendements en huile essentielle sont compris entre 0,11 et 0,62% (Tableau III. 5). Les neuf échantillons ont été analysés par CPG(Ir) et RMN ^{13}C et deux d'entre eux (n° 1 et 2) ont aussi été analysés par CPG-SM. La combinaison de ces trois techniques a permis d'identifier 33 composés, représentant de 86,9 à 97,9% de la composition chimique de chacun des échantillons. Ces huiles essentielles sont composées très majoritairement de monoterpènes (87,3-98,2%) (27 composés sur 33). Parmi ces monoterpènes, l' α -pinène (6,9-70,4%), le sabinène (0,6-45,3%) et le terpinén-4ol (0,8-22,6%) sont les trois composés majoritaires en fonction des échantillons. Le myrcène (2,5-4,3%) et le limonène (2,3-5,6%) sont présents dans tous les échantillons en quantités non négligeables. Enfin, plusieurs constituants sont présents à des teneurs appréciables dans certains échantillons: le γ -terpinène (jusqu'à 6,0%), le β -phellandrène (jusqu'à 5,7%), l' α -thujène (jusqu'à 3,9%), le *p*-cymène (jusqu'à 3,2%) et l' α -terpinène (jusqu'à 3,1%) (Tableau III. 5).

Au regard de ces résultats, nous pouvons distinguer deux compositions chimiques distinctes :

- α -pinène ultra-majoritaire pour les échantillons n°3 et 7, (70,4 et 67,1% respectivement) les autres constituants, présents à des teneurs beaucoup plus faibles, sont essentiellement représentés par le myrcène (3,1 et 2,5%) et le limonène (2,3 et 3,7%) ;

Tableau III. 5. Composition chimique de 9 échantillons d'huile essentielle d'aiguilles de *J. communis* ssp. *communis* de Corse

N°	Composés	Ir ^a	Ir ^p	7	3	6	4	8	5	1	9	2	Mode d'identification
1	α -thujène	923	1026	0,2	0,1	3,9	3,6	3,1	3,5	3,4	2,8	2,7	Ir, SM, RMN- ¹³ C
2	α -pinène	931	1017	67,1	70,4	6,9	7,9	6,9	15,8	12,6	24,3	14,8	Ir, SM, RMN- ¹³ C
3	camphène	943	1072	0,4	0,2	-	0,1	-	0,1	0,1	0,2	0,1	Ir, SM
4	sabinène	965	1125	1,0	0,6	45,3	44,8	41,9	28,6	26,1	25,5	24,4	Ir, SM, RMN- ¹³ C
5	β -pinène	970	1112	1,6	1,5	0,7	0,8	0,8	0,9	0,9	1,4	1,0	Ir, SM, RMN- ¹³ C
6	myrcène	981	1159	2,5	3,1	4,3	3,8	3,3	3,2	3,5	2,9	3,8	Ir, SM, RMN- ¹³ C
7	carène-2	995	1133	0,3	0,5	0,6	0,1	-	0,2	0,1	0,1	-	Ir, SM, RMN- ¹³ C
8	α -phellandrène	997	1166	0,9	1,6	0,1	0,1	0,2	0,4	0,1	0,3	1,7	Ir, SM, RMN- ¹³ C
9	carène-3	1005	1147	-	0,3	-	0,1	0,1	-	0,1	0,5	0,1	Ir, SM
10	α -terpinène	1011	1246	0,2	-	2,8	2,1	2,1	2,5	3,1	2,6	3,1	Ir, SM, RMN- ¹³ C
11	p-cymène	1011	1268	0,6	0,7	1,2	2,4	3,1	3,2	0,9	2,1	2,0	Ir, SM, RMN- ¹³ C
12	limonène	1020	1206	3,7	2,3	3,5	5,6	2,6	3,1	2,9	2,7	2,5	Ir, SM, RMN- ¹³ C
13	β -phellandrène	1020	1213	1,0	3,1	2,0	0,6	0,6	1,0	1,6	0,7	5,7	Ir, SM, RMN- ¹³ C
14	γ -terpinène	1047	1243	0,4	0,2	5,0	4,5	4,8	4,8	6,0	4,4	5,0	Ir, SM, RMN- ¹³ C
15	<i>trans</i> -hydrate de sabinène	1053	1462	tr	0,2	0,9	0,7	1,0	0,8	0,6	0,6	0,6	Ir, SM, RMN- ¹³ C
16	terpinolène	1080	1285	0,9	0,8	2,8	2,1	2,2	2,1	2,2	1,9	2,2	Ir, SM, RMN- ¹³ C
17	β -thujone	1097	1439	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,3	0,3	0,4	0,3	Ir, SM, RMN- ¹³ C
18	<i>trans</i> -verbénol	1128	1676	0,6	1,1	0,6	0,8	0,9	1,2	1,0	1,0	0,8	Ir, SM, RMN- ¹³ C
19	<i>cis</i> -verbénol	1130	1655	0,4	0,9	0,2	0,4	0,5	0,5	0,3	1,1	0,2	Ir, SM, RMN- ¹³ C
20	cryptone	1160	1665	0,3	0,6	-	-	tr	0,3	tr	0,4	tr	Ir, SM, RMN- ¹³ C
21	Terpinén-4-ol	1160	1600	1,5	0,8	13,3	14,2	19,0	16,2	22,6	16,2	16,7	Ir, SM, RMN- ¹³ C

22	α -terpinéol	1173	1698	-	1,5	1,3	0,6	0,8	1,1	1,1	1,3	1,0	Ir, SM, RMN- ¹³ C
23	myrtenol	1177	1789	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,4	0,2	0,3	tr	Ir, SM
24	<i>cis</i> -pipéritol	1184	1681	0,2	0,8	0,2	0,3	0,3	0,4	0,3	0,5	0,3	Ir, SM, RMN- ¹³ C
25	<i>trans</i> -pipéritol	1196	1751	0,6	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	Ir, SM, RMN- ¹³ C
26	acétate de bornyle	1269	1575	0,5	tr	tr	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2	0,2	Ir, SM, RMN- ¹³ C
27	acétate d' α -terpinyle	1332	1681	tr	tr	tr	0,5	tr	0,4	0,2	tr	1,7	Ir, SM, RMN- ¹³ C
28	germacrène D	1478	1711	0,6	0,7	0,1	0,6	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	Ir, SM
29	γ -cadinène	1510	1754	-	0,5	tr	-	-	-	-	-	-	Ir, SM
30	δ -cadinéne	1515	1752	-	0,2	0,1	0,4	-	0,2	0,3	-	0,2	Ir, SM, RMN- ¹³ C
31	spathuléol	1572	2115	0,7	0,5	tr	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2	0,3	Ir, SM, RMN- ¹³ C
32	τ -cadinol	1630	2170	0,1	0,4	-	tr	tr	0,2	tr	-	0,1	Ir, SM
33	α -cadinol	1639	2228	0,5	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	Ir, SM, RMN- ¹³ C
Total :				87,3	94,3	96,3	98,2	95,4	92,6	88,4	95,3	92,3	
Rendement				0,27	0,33	0,42	0,35	0,17	0,62	0,11	0,20	0,33	

*L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les indices sont suivis d'un astérisque * : pourcentage sur colonne polaire.*

▪ Les sept autres échantillons ont pour composés majoritaires le sabinène, le terpinèn-4-ol et l' α -pinène. Cependant deux sous-groupes peuvent être distingués en fonction des teneurs en sabinène et en α -pinène : sabinène entre 41,9 et 45,3% et α -pinène entre 6,9 et 7,9% pour le premier sous-groupe et sabinène entre 24,4 et 28,6% et α -pinène entre 12,6 et 24,3% pour le second sous-groupe.

Les échantillons n°3 et 7, riches en α -pinène, ont une composition chimique proche de celles décrites pour des échantillons du Canada (80%) (Vernin *et al.*, 1988) et 73,5-83% (Lawrence, 1994), de Pologne (jusqu'à 90%) (Renata Ochocka *et al.*, 1997), de Suède (56%) (Lawrence, 2001a) et du Royaume-Uni (82%) (Banthorpe *et al.*, 1973).

Tous les autres échantillons dans lesquels le sabinène est le composé majoritaire, suivi du terpinèn-4-ol et de l' α -pinène, se distinguent de ceux de France (Vernin *et al.*, 1988), de Norvège (Baerheim Svendsen *et al.*, 1985), et d'Italie (Vidrich *et al.*, 1991) par une teneur importante en terpinèn-4-ol. Ce dernier est présent à des teneurs non négligeables uniquement dans des échantillons d'Italie, mais toujours en proportions inférieures par rapport à nos échantillons.

III. 3. Les huiles essentielles de baies

Nous avons analysé trois échantillons d'huile essentielle de baies de genévrier commun de Corse, récoltés sur trois pieds ayant également fournis des huiles essentielles d'aiguilles. Nous avons identifié, par combinaison des trois techniques habituelles CPG(Ir), CPG-SM et RMN ^{13}C , 51 composés au total qui représentent 81,6% ; 96,8% et 97,4% de la composition chimique des échantillons.

Parmi ces 51 composés, nous dénombrons 28 monoterpènes dont 15 oxygénés, une cétone linéaire (undécane-2-one) et 22 sesquiterpènes dont 9 oxygénés (Tableau III. 6.). La plupart des sesquiterpènes est identifiée par RMN ^{13}C .

L' α -pinène est le composé majoritaire de ces trois échantillons (22,0% ; 19,9% et 43,0% respectivement pour les échantillons 3, 4, 7). Néanmoins, ces huiles

essentielles se distinguent au niveau des constituants secondaires. Ainsi, l'échantillon n°7 renferme une quantité importante de myrcène (24,1%) alors que ce composé est présent à moins de 10% dans les deux autres échantillons. Trois autres monoterpènes, le sabinène, le limonène et le terpinèn-4-ol, sont relativement abondants dans l'échantillon n°4 uniquement (17,3 ; 14,0 et 13,8% respectivement). Par ailleurs, l'échantillon n°3 est relativement riche en sesquiterpènes (42,2% dont 6,5% de β -élémane et 7,4% de γ -curcumène), alors que les échantillons n°4 et 7 n'en contiennent que 2,6 et 12,9% respectivement.

Tableau III. 6. Composition chimique de trois échantillons d'huile essentielle de baies de *J. communis* var. *communis* de Corse

N°	Composés	Ir ^a	Ir ^p	3	4	7	Mode d'identification
1	α -thujène	923	1026	0,1	2,2	0,1	Ir, SM, RMN ¹³ C
2	α -pinène	931	1032	22,0	19,9	43,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
3	camphène	943	1072	0,1	0,2	0,3	Ir, SM
4	sabinène	965	1125	1,4	17,3	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
5	β -pinène	970	1112	0,9	1,9	2,3	Ir, SM, RMN ¹³ C
6	myrcène	981	1159	7,2	9,2	24,1	Ir, SM, RMN ¹³ C
7	δ -2-carène	995	1132	-	-	0,1	Ir, SM
8	α -phellandrène	997	1166	-	0,4	0,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
9	m-cymène	1009	1272	0,1	2,1	0,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
10	p-cymène	1011	1268	0,2	1,2	0,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
11	limonène	1020*	1206	1,9	14,0	3,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
12	β -phellandrène	1020*	1213	0,5	0,8	1,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
13	γ -terpinène	1047	1236	0,3	4,0	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
14	<i>trans</i> -hydrate de sabinène	1052	1467	0,1	0,5	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
15	<i>cis</i> -hydrate de sabinène	1078	1285	0,6	2,4	1,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
16	linalol	1081	1439	0,3	0,6	1,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
17	<i>trans</i> -mentha-2,8-dièno	1106	1617	0,1	0,7	0,1	Ir, SM, RMN ¹³ C
18	<i>trans</i> -verbénol	1128	1676	0,4	0,5	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
19	<i>cis</i> -verbénol	1130	1655	0,3	-	-	Ir, SM
20	terpinèn-4-ol	1169	1698	1,4	13,8	2,7	Ir, SM, RMN ¹³ C
21	α -terpinéol	1173	1700	0,7	0,8	1,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
22	verbénone	1179	1709	0,2	0,3	0,2	Ir, SM
23	<i>trans</i> -pipéritol	1189	1751	-	0,2	0,1	Ir, SM
24	isoascaridole	1196		0,1	0,1	-	Ir, SM
25	citronellol	1208	1764	0,1	-	0,4	Ir, SM, RMN ¹³ C

26	acétate de bornyle	1268	1576	0,3	0,4	1,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
27	undecan-2-one	1272	1592	-	0,1	0,3	Ir, SM
28	acétate de carvyle	1313	1729	-	0,1	-	Ir, SM
29	acétate d' α terpinyle	1331	1681	0,1	0,4	0,1	Ir, SM, RMN ¹³ C
30	α -copaène	1379	1488	0,4	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
31	β -élèmène	1386	1591	6,5	0,1	0,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
32	isocaryophyllène	1407	1571	3,7	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
33	(E)- β -caryophyllène	1420	1591	1,1	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
34	longifolène	1427	1574	1,8	0,2	0,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
35	β -gurjunène	1439	1591	0,5	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
36	α -humulène	1451	1665	0,5	-	0,4	Ir, SM, RMN ¹³ C
37	alloaromadendrène	1462	1638	1,2	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
38	γ -curcumène	1474	1682	7,4	-	-	Ir, SM, RMN ¹³ C
39	γ -humulène	1476	1722	1,4	0,1	0,8	Ir, SM, RMN ¹³ C
40	α -muurolène	1508	1726	2,0	0,1	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
41	γ -cadinène	1510	1754	3,3	0,1	0,3	Ir, SM, RMN ¹³ C
42	δ -cadinène	1514	1752	1,5	0,5	1,2	Ir, SM, RMN ¹³ C
43	élémol	1534	2073	0,7	0,2	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
44	(E)-nérolidol	1553	1546	2,0	-	0,3	Ir, SM, RMN ¹³ C
45	spathuléol	1565	2117	1,7	0,2	0,8	Ir, SM, RMN ¹³ C
46	oxyde de caryophyllène	1571	1980	0,2	-	0,2	Ir, SM
47	cédrol	1592	2117	2,0	-	2,0	Ir, SM, RMN ¹³ C
48	époxyde d'humulène	1595	2039	0,3	-	0,3	Ir, SM
49	caryophylla-4(14),8(15)-dien-5-ol	1614	2285	0,5	-	0,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
50	τ -muurolol	1627	2177	2,0	0,4	1,5	Ir, SM, RMN ¹³ C
51	α -cadinol	1639	2228	1,6	0,6	2,6	Ir, SM, RMN ¹³ C
Total :				81,7	96,6	97,4	

L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les indices sont suivis d'un astérisque * : pourcentage sur colonne polaire.

La composition chimique de l'échantillon n°7, dominé par l' α -pinène et le myrcène s'assimile à celles décrites dans la littérature pour les échantillons d'Autriche (Sybilska *et al.*, 1994), d'Italie (Sybilska *et al.*, 1994 ; Cosentino *et al.*, 2003 ; Bonaga et Galletti, 1985), d'Espagne (Lawrence, 1980) et de Pologne (Renata Ochocka *et al.*, 1997 ; Filipowicz *et al.*, 2003 ; Sybilska *et al.*, 1994 ; Lawrence, 1996b).

L'échantillon n°4, qui contient comme constituants majoritaires à la fois l' α -pinène, le sabinène, le limonène, le terpinèn-4-ol et dans une moindre mesure le

myrcène, semble original. En fait, ces composés sont souvent reportés dans la littérature comme principaux constituants des huiles essentielles de baies, mais jamais ensemble dans le même échantillon. Enfin, la composition chimique de l'échantillon n°3 semble, elle aussi, assez originale en raison de sa teneur relativement élevée en sesquiterpènes qui, à notre connaissance, n'ont jamais été reportés en quantité aussi importante.

IV. JUNIPERUS COMMUNIS SSP. ALPINA

Juniperus communis L. ssp. *alpina* communément appelé « genévrier nain » ou « genévrier des montagnes » possède de nombreux synonymes dont voici une liste non exhaustive : *Juniperus communis* L. var *saxatilis* Pall. ; *J. alpina* S.F. Gray ; *J. communis* L. var *alpina* Suter ; *J. communis* L. ssp. *alpina* (Suter) Celak ; *J. communis* L. var *montana* Aiton ; *J. communis* L. subsp *nana* (Willd) Syme ; *J. communis* L. subsp *saxatilis* (Pall.) E. Murray ; *J. sibirica* Burgsd. ; *J. sibirica* Burgsd. var. *montana* (Aiton) Beck ; *J. communis* ssp. *nana* (Hooker) Syme, etc(Farjon, 1998 ; Adams, 2008).

Le genévrier nain est un arbuste de 70 cm de haut au maximum, très touffu, à tiges et rameaux couchés sur le sol. Les feuilles sont courtes, dressées contre les rameaux et disposées en verticilles de trois. Elles sont assez rétrécies en une pointe courte et aigüe et présentent une bande blanche sur la face stomacale. Les fruits ovoïdes-globuleux sont assez petits (4 à 7 mm de diamètre), de couleur verte ils deviennent d'une couleur noir-bleuâtre à maturité (Bonnier et Douin, 1990). Le genévrier nain pousse entre 600 et 2400 m d'altitude, on le trouve en Corse à partir de 1000 m. Son huile essentielle, obtenue à partir des parties aériennes, est très fluide, légèrement teintée, d'une odeur fraîche. Elle est produite par les producteurs locaux et utilisée pour ses propriétés diurétiques.

IV. 1. Etude bibliographique

La composition chimique des huiles essentielles et/ou des extraits obtenus à partir des aiguilles, des baies ou du bois de genévrier nain a fait l'objet d'un grand nombre d'études (Lawrence, 2001a). Dans la suite de cet exposé, nous présenterons une synthèse des études portant sur les huiles essentielles d'aiguilles, objet de nos travaux, en respectant les dénominations utilisées par les auteurs respectifs.

Bien que la plupart de ces huiles essentielles soient considérées comme très riches en monoterpènes, plusieurs compositions se distinguent :

(i) l' α -pinène est le composé ultramajoritaire d'un échantillon d'Angleterre (93%) (Banthorpe *et al.*, 1973), de Norvège (82%) (Looman et Baerheim Svendsen, 1992), de Mongolie (58,2%) (Adams, 1998 ; 2000) et de deux échantillons d'Italie (42,8% et 46,2%) (Caramiello *et al.*, 1995).

(ii) l' α -pinène et le sabinène dominent la composition chimique de plusieurs échantillons, l'un ou l'autre étant le composé majoritaire : Norvège (12-61% et 18-54%) (Looman et Baerheim Svendsen, 1992), Mongolie (32-55% et jusqu'à 14%) (Shatar, 1984), Turquie (30,5% et 29,6%) (Tanker et Sarer, 1975), Italie (trois échantillons) (18,7-37,3% et 13,4-18,8%) (Caramiello *et al.*, 1995), Norvège (22 et 41%) (Baerheim Svendsen *et al.*, 1985), Suisse (14,1 et 32,8%) (Adams, 2000) et Portugal (18,2 et 28,2%) (Cavaleiro, 2001a);

(iii) l' α -pinène et le limonène sont les composés majoritaires de l'huile essentielle provenant de Bulgarie (28,3-42,1% et 8,1-10,0%) (Stoyanova, 1996) et de Norvège (51% et 24%) (Looman et Baerheim Svendsen, 1992) ainsi que de plusieurs échantillons du Portugal (38,4-48,8% et 16,7-30,6%) (Cavaleiro, 2001a). Parmi eux, la teneur en limonène dépasse parfois celle en α -pinène ;

(iv) le limonène (44,4%) est le seul composé majoritaire d'un échantillon d'Italie (Marongiu *et al.*, 2006),

(v) quelques huiles essentielles possèdent également un monoterpène oxygéné parmi les composés majoritaires. Par exemple, le sabinène et le terpinèn-4-ol (25,3 et 23,4%) caractérisent un échantillon d'Italie (Caramiello *et al.*, 1995), et

quelques échantillons provenant du Portugal (16,0-19,3% et 14,0-15,7%) (Cavaleiro, 2001a).

Enfin, deux études assez récentes ont été réalisées dans notre laboratoire sur *J. communis* ssp. *alpina* de Corse. L'une d'elles reporte l'étude comparative des huiles essentielles d'aiguilles, de baies, de bois et de racines. Elle montre que les compositions chimiques des échantillons de feuilles, de baies et de bois sont similaires et caractérisées par la prédominance de monoterpènes oléfiniques tandis que celles des échantillons de racines sont totalement différentes, caractérisées par une forte teneur en composés sesquiterpéniques de structures tricycliques (Gonny *et al.*, 2006). L'autre étude, réalisée exclusivement sur les huiles essentielles d'aiguilles met en évidence l'existence d'une variabilité chimique au sein de la population insulaire (Gonny, 2003). Ainsi, 69 échantillons ont été analysés par combinaison de la CPG(Ir), de la CPG-SM et de la RMN ^{13}C , et les résultats ont mis en évidence l'existence de deux types de compositions chimiques, l'un à limonène (très majoritaire) et l'autre à sabinène/limonène.

Il ressort clairement des données de la littérature que les huiles essentielles d'aiguilles de genévrier nain présentent une variabilité chimique. De plus, une étude récente portant sur les critères phytochimiques et génétiques de cette espèce suggère que ces compositions dominées par l' α -pinène seul ou l' α -pinène et le sabinène sont reliées à l'origine géographique (Filipowicz *et al.*, 2006).

Le but de ce travail était de poursuivre l'étude sur la variabilité chimique de l'huile essentielle d'aiguilles de genévrier nain de Corse, débutée au laboratoire, par un nouvel échantillonnage réalisé six années plus tard (2007). Parallèlement, nous avons effectué une étude comparative entre les huiles essentielles d'aiguilles extraites par hydrodistillation et celles extraites par micro-onde qui n'ont jamais été étudiées à notre connaissance.

Ainsi, nous décrirons successivement dans ce chapitre :

- la comparaison de l'huile essentielle d'aiguilles de *J. communis* ssp. *alpina* obtenue par hydrodistillation avec celle obtenue par micro-ondes ;

- la variabilité chimique de cette espèce au sein de la population insulaire.

IV. 2. Comparaison de la composition chimique de l'huile essentielle obtenue par extraction sans solvant assistée par micro-ondes (ESSAM) et par hydrodistillation

Depuis quelques années, l'extraction de composés organiques en utilisant les micro-ondes (MAE = microwave assisted solvent extraction) a été développée dans plusieurs laboratoires (Lucchesi *et al.*, 2004a, 2004b, 2005, 2007 ; Wang *et al.*, 2006) et peut être considérée aujourd'hui comme une alternative viable aux techniques conventionnelles en raison de son efficacité et de sa rapidité. La technique la plus utilisée, appelée SFME (Solvent Free Microwave Extraction), combine un chauffage par micro-ondes et une distillation sèche. Cette technique effectuée à pression atmosphérique, en l'absence de solvant ou d'eau ajoutée, permet d'extraire des composés naturels à partir de la plante fraîche ou après avoir humidifié les végétaux secs. C'est un procédé simple, rapide et économique qui peut être considéré comme de la chimie verte. Cette méthode nécessite de placer le végétal dans le réacteur du micro-ondes. Le chauffage de l'eau présente dans la plante entraîne l'éclatement des glandes qui contiennent l'huile essentielle. Celle-ci est ainsi libérée et entraînée à la vapeur par l'eau, elle aussi contenue dans la matière végétale. Cette eau est ensuite recondensée dans un appareil de type Clévenger. La SFME est une technique voisine de la MAE, technique qui utilise des solvants organiques et d'une hydrodistillation modifiée qui utilise une grande quantité d'eau.

De nombreuses publications comparent les compositions chimiques d'échantillons obtenus par SFME et par hydrodistillation. On peut citer celles de Lucchesi *et al.* qui ont ainsi étudié les huiles essentielles de Labiées (Lucchesi *et al.*, 2004b): *Ocimum basilicum* L., *Mentha crispa* L. et *Thymus vulgaris* L. ainsi que celles d'épices de *Elleteria cardamomum* L. (Lucchesi *et al.*, 2007). Dans ce dernier cas, il a été nécessaire de faire tremper le végétal dans l'eau avant l'extraction. Pour éviter cette étape Wang *et al.* (2006) ont utilisé des poudres à base de fer pour augmenter l'absorption des micro-ondes et améliorer ainsi le rendement en huile essentielle de

Cuminum cyminum L. et *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. Enfin, Phutdhawong *et al.* (2007) ont comparé les deux modes d'extraction pour *Cinnamomum iners* et Bendahou *et al.* (2008) ont effectué une étude similaire sur *Origanum glandulosum* Desf. d'Algérie. Ces différentes comparaisons entre l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (ESSAM) et l'hydrodistillation (HD) ont permis de mettre en évidence des différences :

- d'un point de vue quantitatif, le comportement du végétal dépend de la nature de la matrice. En effet, l'extraction par micro-ondes est nettement plus performante que l'hydrodistillation pour l'extraction de l'huile essentielle de plantes aromatiques fraîches, car en trente minutes on obtient une quantité d'extrait équivalente à 270 minutes d'HD. En revanche, pour les végétaux sous forme de graines sèches ou d'aiguilles, l'HD reste plus performante en termes de rendement ;

- d'un point de vue qualitatif, les extraits par ESSAM sont dans tous les cas plus riches en composés oxygénés et donc plus valorisables d'un point de vue olfactif. Il semblerait que ce soit les composés oxygénés possédant un point d'ébullition élevé, qui distillent les premiers du fait de leur solubilité plus élevée dans l'eau. C'est pour cette raison que dans les extraits obtenus plus rapidement par micro-ondes, cette fraction de produits oxygénés est plus importante que celle de la même plante extraite par hydrodistillation (Lucchesi, 2005). Par ailleurs, l'observation des végétaux par microscopie électronique à balayage montre des différences en termes d'altération des glandes à huile essentielle. Celles-ci semblent totalement détruites sous l'effet des micro-ondes alors que par un chauffage classique lors d'une hydrodistillation, le végétal est moins détérioré. Ceci permet de penser à l'existence d'un phénomène spécifique à l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes, au niveau du comportement des glandes et des canaux sécréteurs d'huile essentielle des végétaux étudiés.

Nous avons réalisé une étude comparative des extraits obtenus, d'une part, par ESSAM et d'autre part, par hydrodistillation avec un appareil classique de type Clevenger. Trois pieds individuels de *J. communis* ssp. *alpina* provenant de la station de Vergio, récoltés en février 2008, ont servi de base à cette étude. De plus, nous

avons réalisé les expériences trois fois à partir de l'un des pieds pour s'assurer de la répétabilité des résultats.

Sur l'ensemble des échantillons (deux par pied), analysés par CPG(Ir) et par RMN ^{13}C , nous avons identifié 41 constituants (27 monoterpènes, 13 sesquiterpènes et un diterpène) représentant de 78,6 à 95,1% de la composition chimique globale. Trente-sept composés ont été identifiés au moins une fois par RMN ^{13}C , les 4 autres (minoritaires et donc non détectables par cette technique) ont été identifiés par CPG(Ir) par comparaison avec leurs indices de rétention observés lors de l'étude de la variabilité chimique décrite dans le paragraphe (IV. 3.) (Annexe E). Les expériences (extraction et analyse) menées trois fois sur le lot d'aiguilles n°1 indiquent une bonne répétabilité des résultats puisque les teneurs de chaque constituant sont très homogènes d'une expérience à l'autre pour chaque type d'extraction, bien que les rendements obtenus par hydrodistillation soient assez fluctuants.

Pour les trois lots d'aiguilles, nous constatons que les rendements obtenus par ESSAM sont nettement inférieurs à ceux de l'hydrodistillation (0,05 à 0,33% *vs* 0,33 à 0,87%). Malgré plusieurs essais et l'examen de plusieurs paramètres (temps de chauffage, puissance de chauffage, teneur en humidité du végétal), nous n'avons jamais pu reproduire par micro-ondes, les rendements obtenus par hydrodistillation, mesurés à partir du végétal frais. Les compositions chimiques de tous les échantillons, dominées par le limonène, le β -phellandrène et l'acétate d' α -terpinyle, sont assez homogènes entre elles, même si nous avons noté quelques variations au niveau de la teneur de ces constituants majoritaires. Néanmoins, nous remarquons que le pourcentage de composés oxygénés est légèrement plus élevé dans le cas des huiles essentielles extraites par ESSAM, en accord avec ce qui est reporté dans la littérature. Toutefois, étant donné l'écart de rendement entre les deux techniques, la comparaison des compositions chimiques s'avère délicate. Dans ce cas, l'extraction par micro-ondes permet d'obtenir rapidement, de manière simple et économique, une « huile essentielle » de composition voisine de celle obtenue par hydrodistillation.

Tableau III. 7. Comparaison des compositions chimiques de 3 échantillons d'extraits de feuilles de *J. communis* ssp. *alpina* obtenus par hydrodistillation et par ESSAM.

N°	Lots Composés Rendement	Ir		Mode d'identification	1.1		1.2		1.3		2		3	
		BP- 1	BP- 20		HE	MO								
					0,53	0,29	0,63	0,18	0,87	0,20	0,44	0,05	0,33	0,33
1	α -thujène	922	1025	Ir	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	-	0,7
2	α -pinène	931	1025	Ir, RMN ¹³ C	2,6	2,2	2,4	2,0	2,6	2,0	1,9	2,5	7,1	5,1
3	sabinène	965	1123	Ir, RMN ¹³ C	0,1	0,3	0,5	0,1	0,1	0,6	0,4	-	0,2	6,5
4	β -pinène	970	1112	Ir, RMN ¹³ C	0,5	-	-	0,4	0,5	0,4	-	0,1	0,9	0,7
5	myrcène	981	1162	Ir, RMN ¹³ C	3,2	2,9	3,1	2,4	3,4	2,5	2,8	1,0	3,2	2,8
6	δ 2-carène	996	1132	Ir	-	-	0,3	-	-	-	-	0,1	-	0,3
7	α -phellandrène	998	1167	Ir, RMN ¹³ C	4,2	2,6	3,8	2,3	4,4	2,5	3,2	1,0	4,2	3,0
8	δ 3-carène	1007	1147	Ir, RMN ¹³ C	4,1	5,2	4,4	4,0	4,1	3,8	3,3	0,5	-	-
9	α -terpinène	1009	1181	Ir	0,2	-	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,5
10	p-cymène	1012	1274	Ir, RMN ¹³ C	1,6	1,6	1,4	1,5	1,4	1,4	1,2	1,0	1,3	1,7
11	limonène	1020	1206*	Ir, RMN ¹³ C	32,1	32,9	31,0	28,3	33,4	27,6	29,4	11,5	31,1	18,0
12	β -phellandrène	1020	1216*	Ir, RMN ¹³ C	16,9	14,0	15,6	13,4	16,7	13,0	14,5	6,2	16,2	15,2
13	γ -terpinène	1049	1245	Ir	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,8
14	terpinolène	1079	1284	Ir, RMN ¹³ C	1,5	1,2	1,6	1,1	1,6	1,1	1,2	0,5	1,4	1,2
15	linalol	1083	1554	Ir	0,1	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,4
16	<i>cis</i> -p-menth-2-èn-1-ol	1108	1558	Ir, RMN ¹³ C	0,5	0,3	0,7	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4	0,7	0,6
17	<i>trans</i> -p-menth-2-èn-1-ol	1123	1622	Ir, RMN ¹³ C	0,4	0,4	0,5	0,3	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4
18	cryptone	1160	1665	Ir	0,4	-	0,5	0,3	0,4	-	0,2	0,4	0,2	0,2
19	p-cymèn-8-ol	1162	1845	Ir	0,5	-	0,6	0,3	0,5	0,9	0,2	0,3	0,1	2,2

20	terpinèn-4-ol	1169	1594	Ir	0,1	-	-	-	0,1	0,1	0,1	0,2	0,7	0,1
21	α -terpinéol	1174	1694	Ir, RMN ¹³ C	4,2	3,2	3,5	4,2	3,5	3,3	2,4	3,5	10,0	4,2
22	myrténol	1180	1790	Ir	0,6	-	0,4	0,2	0,6	0,6	0,4	0,4	1,1	0,7
23	<i>trans</i> -pipéritol	1190	1743	Ir	0,2	-	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2
24	citronello	1208	1755	Ir, RMN ¹³ C	0,6	0,5	0,7	0,5	0,6	0,5	0,5	1,2	1,3	0,4
25	acétate de bornyle	1270	1578	Ir	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1
26	acétate de myrtényle	1306	1685	Ir, RMN ¹³ C	1,2	1,1	1,3	1,0	1,2	1,1	1,0	1,6	1,3	1,7
27	acétate d' α -terpinyle	1334	1704	Ir, RMN ¹³ C	14,0	14,4	15,3	15,9	13,6	14,6	15,4	20,0	8,0	10,6
28	β -élèmene	1390	1588	Ir, RMN ¹³ C	0,1	0,4	0,1	0,4	0,1	0,5	1,5	1,4	0,2	1,3
29	α -humulène	1454	1668	Ir	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	0,6	0,1	0,3
30	α -sélinène	1495	1519	Ir, RMN ¹³ C	0,1	0,7	0,2	0,8	0,1	0,3	0,5	1,4	0,1	0,2
31	γ -cadinène	1510	1754	Ir, RMN ¹³ C	0,1	0,6	0,1	0,7	0,1	0,6	0,7	1,6	0,2	0,6
32	δ -cadinène	1518	1754	Ir, RMN ¹³ C	0,3	1,2	0,4	1,5	0,3	1,1	1,4	2,8	0,4	1,2
33	β -élémol	1538	2092	Ir, RMN ¹³ C	0,8	1,2	0,6	1,1	0,8	1,2	1,5	3,3	0,1	1,8
34	(E)-nérolidol	1549	2049	Ir	0,1	0,4	0,1	0,3	0,1	0,3	0,3	0,7	-	0,3
35	γ -eudesmol	1622	2170	Ir	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	-	0,1
36	τ -cadinol	1630	2170	Ir, RMN ¹³ C	0,2	0,4	0,1	0,1	0,5	0,5	0,4	0,9	0,4	0,3
37	τ -muurolol	1630	2186	Ir	0,2	0,4	0,5	0,1	0,1	0,1	0,4	0,1	0,4	0,3
38	α -cadinol	1642	2236	Ir, RMN ¹³ C	0,5	1,0	-	0,6	1,2	0,8	0,4	2,1	0,5	0,4
39	α -eudesmol	1645	2230	Ir, RMN ¹³ C	0,3	-	-	-	-	-	0,3	1,4	-	0,3
40	(2E,6E)-farnésol	1702	2353	Ir, RMN ¹³ C	0,5	1,2	0,3	0,8	0,5	1,2	1,3	4,0	0,3	1,4
41	manool	2048	2628	Ir, RMN ¹³ C	0,5	0,9	0,5	2,1	0,4	1,9	1,0	4,4	0,1	2,0
Total:					94,2	92,3	91,7	88	95,1	86,5	89,6	78,6	93,1	88,8

*L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les indices sont suivis d'un astérisque * : pourcentage sur colonne polaire.*

IV.3. Variabilité chimique de l'huile essentielle d'aiguilles

Dans le but de poursuivre la caractérisation chimique de l'huile essentielle de genévrier nain de Corse débutée en 2001 au laboratoire par Gonny, nous avons analysé 40 échantillons supplémentaires récoltés dans quatre régions montagnardes de l'île, à des altitudes supérieures à 1000m : Vergio, Vizzavona, Bastelica et Soccia (Annexe D). Deux de ces sites (Vergio et Vizzavona) avaient déjà été échantillonnés par Gonny en 2001. Dans la suite de cet exposé, nous présenterons l'ensemble des résultats des deux échantillonnages (2001 et 2007), afin d'avoir une vue globale de cette huile essentielle. Les aiguilles ont été récoltées de manière homogène sur l'ensemble de chaque arbuste. Les 109 échantillons d'huile essentielle (69 en 2001, et 40 en 2007) ont été analysés par CPG(Ir). Par rapport à leur profil chromatographique, 22 échantillons ont été également analysés par RMN ^{13}C et 7 par CPG-SM.

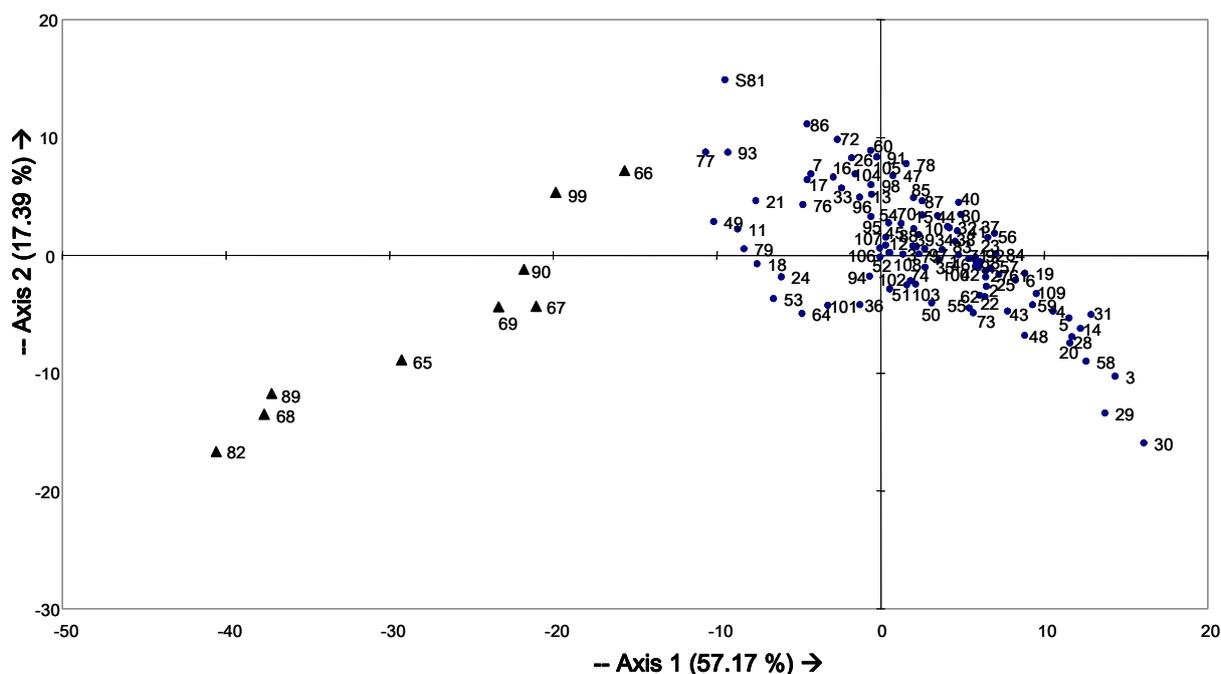
Sur l'ensemble des échantillons, 44 constituants, représentant de 86,7 à 98,0% de la composition chimique globale ont été identifiés (Annexe E). Ils se répartissent en 29 monoterpènes, 14 sesquiterpènes, et un diterpène. Chacun de ces composés a été identifié au moins dans 4 échantillons par RMN ^{13}C et/ou par CPG-SM. Ces huiles essentielles sont caractérisées par une très forte proportion de monoterpènes (76,1-95,6%). Les principaux constituants sont le limonène (9,2-53,9%), l' α -pinène (1,4-33,7%), le sabinène (0,1-33,6%) et le β -phellandrène (3,7-25,2%). Deux monoterpènes oxygénés sont présents en quantité appréciable : l'acétate d' α -terpinyle (jusqu'à 16,9%) et le terpinèn-4-ol (jusqu'à 15,2%). D'autres constituants sont fréquemment rencontrés, comme le γ -terpinène (jusqu'à 6,8%), l' α -phellandrène (jusqu'à 6,8%), le myrcène (jusqu'à 5,2%) ou encore le *p*-cymène (jusqu'à 5,1%). Parmi les sesquiterpènes, le β -élémol et le δ -cadinène sont souvent présents à des teneurs modérées.

Afin d'obtenir une description statistique de l'ensemble de l'échantillonnage et de confirmer la variabilité chimique qui se dégageait à l'issue de la première étude datant de 2001, nous avons réalisé une Analyse en Composante Principale (ACP) des données. La représentation graphique des échantillons sur le plan de l'ACP défini par

les composantes principales 1 et 2, qui décrivent respectivement 57,2% et 17,4% de la variation totale, suggère une répartition des échantillons en deux groupes d'inégale importance (Figure III. 4).

Ce résultat est confirmé par l'algorithme de partition des centres de groupes (*k*-means) que nous avons mis en œuvre en parallèle à l'ACP. Nous avons symbolisé différemment les échantillons des groupes I et II sur la figure III. 4. Les pourcentages moyens (M) ainsi que les écart-types (ET) des constituants dans chacun des deux groupes sont rassemblés dans le tableau III. 8. La figure III. 5 représente les pourcentages moyens et les écart-types des constituants principaux.

Figure III. 4. ACP des 109 échantillons d'huiles essentielles de feuilles de *J. communis* L. ssp *alpina*



La composition des échantillons du groupe I (environ 92% des échantillons) est dominée par le limonène (M=34,5% ; ET=7,0). Les autres constituants présents en teneurs importantes sont le β -phellandrène (M=17,0% ET=3,4), l'acétate d' α -terpinyle (M=9,7 ; ET=2,8) et l' α -pinène (M=7,7; ET=5,3). La teneur de chacun des produits restants n'atteint pas 5,0%.

Dans les échantillons du groupe II (environ 8% des échantillons), le sabinène (M=19,1% ; ET=10,1) est le composé majoritaire alors qu'il atteint seulement 1% en moyenne dans les échantillons du groupe I. Le limonène (M=13,8% ; ET=3,4), le β -phellandrène (M=10,4% ; ET=5,6), le terpinèn-4-ol (M=8,7% ; ET=5,2), l' α -pinène (M=7,3% ; ET=2,4) et l'acétate d' α -terpinyle (M=5,6% ; ET=2,9) sont les autres composés importants. Toutefois, les pourcentages de ces composés varient sensiblement d'un échantillon à l'autre. Nous avons à faire à un groupe dont la composition chimique est assez hétérogène. Enfin, les autres constituants sont présents avec un maximum de 4% chacun.

Tableau III. 8. Pourcentages moyens et écart-type des constituants des huiles essentielles de feuilles de *J. communis* L. ssp *alpina* dans les groupes I et II.

N°	Composés a)	Ir		Moyenne [ET]		Mode d'identification
		BP-1	BP-20	Groupe I	Groupe II	
1	α -thujène	922	1025	0,1 (0,4)	2,3 (0,8)	Ir, SM, RMN ¹³ C
2	α -pinène	931	1025	7,7 (5,3)	7,3 (2,4)	Ir, SM, RMN ¹³ C
3	camphène	943	1070	0,1 (0,0)	0,1 (0,0)	Ir, SM
4	sabinène	965	1123	1,0 (2,8)	19,1 (10,1)	Ir, SM, RMN ¹³ C
5	β -pinène	970	1112	0,9 (0,3)	0,8 (0,3)	Ir, SM, RMN ¹³ C
6	myrcène	981	1162	3,8 (0,4)	4,0 (0,3)	Ir, SM, RMN ¹³ C
7	2-carène	996	1132	0,4 (0,2)	0,2 (0,1)	Ir, SM, RMN ¹³ C
8	α -phellandrène	998	1167	4,4 (1,0)	2,9 (1,4)	Ir, SM, RMN ¹³ C
9	δ -3-carène	1007	1147	0,5 (1,5)	0,1 (0,4)	Ir, SM, RMN ¹³ C
10	α -terpinène	1009	1181	0,3 (0,4)	2,6 (0,8)	Ir, SM, RMN ¹³ C
11	p-cymène	1012	1274	1,5 (0,7)	1,2 (0,4)	Ir, SM, RMN ¹³ C
12	limonène ^{b)}	1020	1206	34,5 (7,0)	13,8 (3,4)	Ir, SM, RMN ¹³ C
13	β -phellandrène ^{b)}	1020	1216	17,0 (3,4)	10,4 (5,6)	Ir, SM
14	γ -terpinène	1049	1245	0,3 (0,6)	4,0 (1,6)	Ir, SM, RMN ¹³ C
15	terpinolène	1079	1284	1,3 (0,3)	2,4 (0,4)	Ir, SM, RMN ¹³ C
16	linalol	1083	1554	0,3 (0,2)	0,5 (0,4)	Ir, SM, RMN ¹³ C
17	<i>cis</i> -p-menth-2-èn-1-ol	1108	1558	0,2 (0,2)	0,3 (0,3)	Ir, SM
18	<i>trans</i> -p-menth-2-èn-1-ol	1123	1622	0,3 (0,1)	0,5 (0,2)	Ir, SM, RMN ¹³ C
19	cryptone	1160	1665	0,2 (0,3)	0,1 (0,2)	Ir, SM, RMN ¹³ C
20	p-cymèn-8-ol	1162	1845	0,3 (0,4)	1,5 (2,8)	Ir, SM, RMN ¹³ C
21	terpinèn-4-ol	1169	1594	1,1 (1,9)	8,7 (5,2)	Ir, SM, RMN ¹³ C
22	α -terpinéol	1174	1694	2,3 (1,4)	1,2 (0,7)	Ir, SM, RMN ¹³ C
23	myrténol	1180	1790	0,1 (0,2)	0,0 (0,0)	Ir, SM, RMN ¹³ C

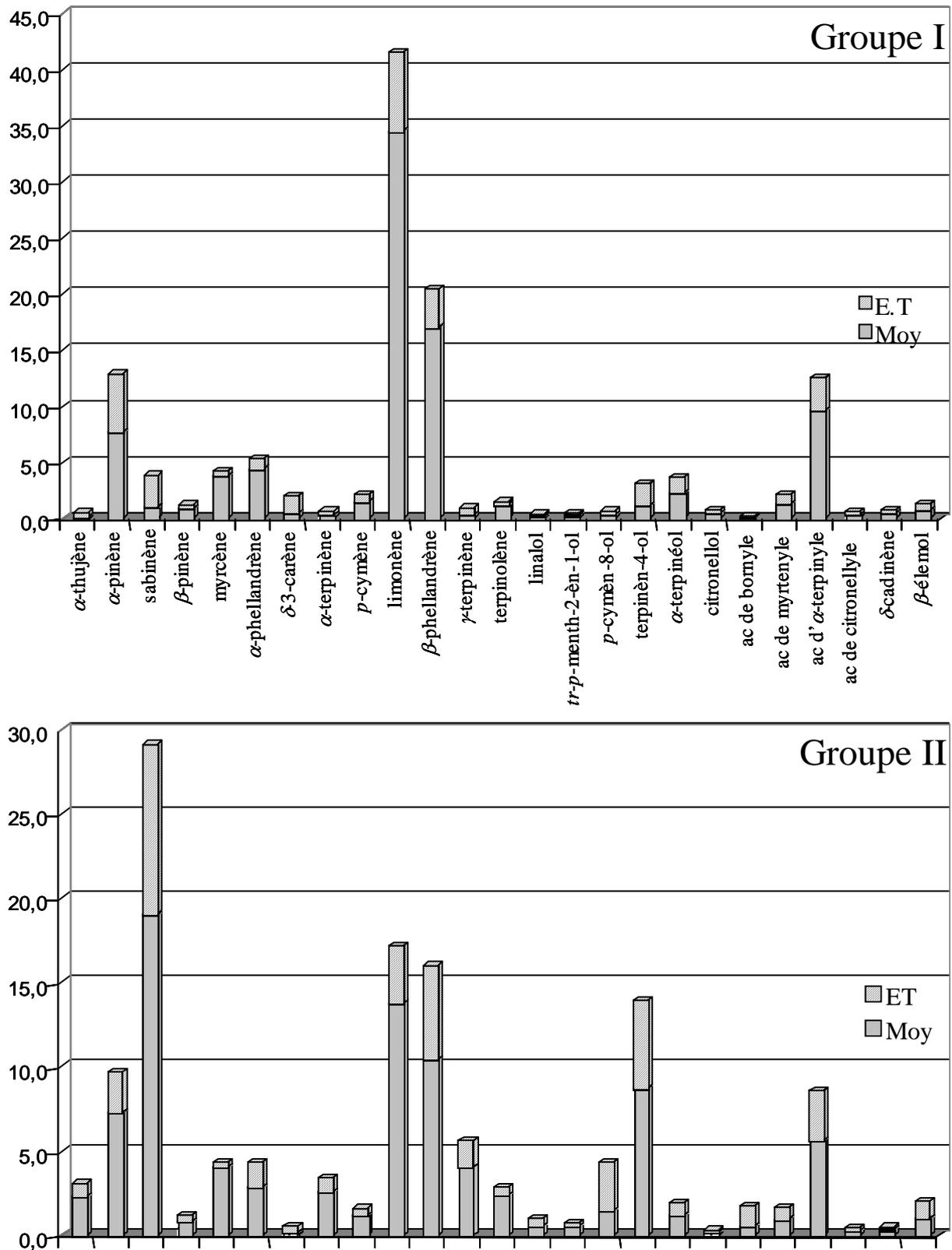
24	<i>trans</i> -pipéritol	1190	1743	0,1 (0,1)	0,2 (0,1)	Ir, SM
25	citronellol	1208	1755	0,5 (0,3)	0,3 (0,1)	Ir, SM, RMN ¹³ C
26	acétate de bornyle	1270	1578	0,1 (0,1)	0,5 (1,2)	Ir, SM, RMN ¹³ C
27	acétate de myrtényle	1306	1685	1,3 (0,8)	0,9 (0,7)	Ir, SM, RMN ¹³ C
28	acétate d' α -terpinyle ^{b)}	1334	1704	9,7 (2,8)	5,6 (2,9)	Ir, SM, RMN ¹³ C
29	acétate de citronellyle ^{b)}	1334	1658	0,4 (0,2)	0,3 (0,2)	Ir, SM, RMN ¹³ C
30	β -élémente	1390	1588	0,3 (0,1)	0,2 (0,1)	Ir, SM, RMN ¹³ C
31	α -humulène	1454	1668	0,1 (0,1)	0,0 (0,0)	Ir, SM
32	α -sélinène	1495	1519	0,1 (0,1)	0,1 (0,1)	Ir, SM
33	γ -cadinène	1510	1754	0,2 (0,1)	0,1 (0,0)	Ir, SM
34	δ -cadinène	1518	1754	0,5 (0,3)	0,3 (0,2)	Ir, SM
35	β -élémol	1538	2092	0,7 (0,6)	1,0 (1,0)	Ir, SM, RMN ¹³ C
36	(E)-nérolidol	1549	2049	0,1 (0,1)	0,1 (0,1)	Ir, SM, RMN ¹³ C
37	γ -eudesmol	1622	2170	0,1 (0,1)	0,2 (0,2)	Ir, SM, RMN ¹³ C
38	τ -cadinol ^{b)}	1630	2170	0,2 (0,1)	0,1 (0,1)	Ir, RMN ¹³ C
39	τ -muurolol ^{b)}	1630	2186	0,1 (0,1)	0,1 (0,1)	Ir, RMN ¹³ C
40	β -eudesmol	1640	2236	0,4 (0,3)	0,3 (0,2)	Ir, SM, RMN ¹³ C
41	α -cadinol	1642	2236	0,1 (0,1)	0,2 (0,2)	Ir, SM
42	α -eudesmol	1645	2230	0,1 (0,1)	0,2 (0,2)	Ir, SM, RMN ¹³ C
43	(2E,6E)-farnésol	1702	2353	0,2 (0,2)	0,3 (0,2)	Ir, SM, RMN ¹³ C
44	manool	2048	2628	0,1 (0,1)	0,0 (0,0)	Ir, SM

^{a)} L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire (BP-1) sauf pour les composés avec ^{b)},

^{b)} Pourcentage donné sur colonne polaire (BP20)

L'huile essentielle d'aiguilles de *J. communis* ssp. *alpina* de Corse présente donc une variabilité chimique avec deux types de composition, l'un dominé par le limonène, qui rassemble 92% des échantillons et l'autre par le sabinène. Les deux compositions sont présentes dans toutes les stations de récolte, exceptée celle de Bastelica où l'on rencontre uniquement des échantillons appartenant au groupe I (majoritaire). Ainsi, la variabilité chimique du genévrier nain est indépendante des conditions pédoclimatiques, elle est probablement due à des facteurs génétiques. Des résultats similaires avaient été observés pour *J. phoenicea* var. *turbinata* de Corse (Rezzi *et al*, 2001). Nous pouvons noter enfin que les deux compositions sont rencontrées quelle que soit l'année de récolte (2001-2007).

Figure III. 5. Principaux constituants des groupes I et II de l'huile essentielle de *J. communis* ssp. *alpina*



La composition chimique des échantillons du groupe I, dominée par le limonène, suivi du β -phellandrène, est assez originale. Le limonène a été reporté comme étant le composé majoritaire d'un échantillon d'huile essentielle d'Italie et de quelques échantillons (6 sur 25) provenant du Portugal. Néanmoins, dans les échantillons portugais, l' α -pinène est le second composé majoritaire alors que le β -phellandrène est présent à des teneurs beaucoup plus faibles que dans nos échantillons (0,8-6,3%).

Les huiles essentielles de *J. communis* ssp. *alpina* dominées par le sabinène sont plutôt rares en dehors de la Corse. Le sabinène est reporté comme étant le composé majoritaire d'un échantillon d'Italie (25,3%) (Caramiello *et al.*, 1995), de Norvège (41%) (Baerheim Svenden *et al.*, 1985), de Suisse (32,8%) (Adams, 1998), et de cinq du Portugal (16,0-28,2%) (Cavaleiro, 2001a). Ce composé est aussi reporté à des teneurs appréciables à côté de l' α -pinène dans des échantillons de Mongolie (jusqu'à 14%) (Shatar, 1984) et de Turquie (29%) (Tanker et Sarer, 1975).

Chapitre IV

CARACTERISATION CHIMIQUE
DE L'HUILE ESSENTIELLE
ET DE L'OLEORESINE DE
***PINUS PINASTER* DE CORSE**

Ce travail entre dans la continuité des travaux menés au laboratoire sur la caractérisation chimique des résineux de Corse au cours desquels la résine et l'huile essentielle de *Pinus nigra* ssp. *laricio* ainsi que l'huile essentielle d'*Abies alba* ont été étudiées. Dans chaque cas, un échantillonnage suffisant a permis de mettre en évidence une variabilité chimique intraspécifique. Ainsi, les 53 échantillons d'huiles essentielles d'aiguilles d'*A. alba* analysés se répartissent en deux groupes en fonction du composé majoritaire : limonène ou camphène (Duquesnoy *et al.*, 2007). En ce qui concerne *P. nigra* ssp. *laricio*, 123 échantillons d'huiles essentielles d'aiguilles ont été analysés et deux compositions chimiques se distinguent, l'une dominée par l' α -pinène et l'autre par l'oxyde de manoyle (Rezzi *et al.*, 2001b). Par ailleurs, l'analyse de 18 échantillons d'oléorésine de cette même espèce a aussi permis de mettre en évidence deux compositions différentes, l'une caractérisée par l'acide lévopimarique et l'autre par l'acide déhydroabiétique (Rezzi *et al.*, 2005).

L'objectif de ce travail est de caractériser le pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.) de Corse, qui n'a pas encore fait l'objet d'étude au laboratoire, à travers la composition chimique de l'huile essentielle extraite de ses aiguilles (qui est commercialisée) et de la fraction acide de sa résine.

I. PINUS PINASTER AITON

I.1. Localisation et description

Le Pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.), parfois appelé "arbre d'or", est un conifère de la famille des Pinacées. On l'appelle aussi pin mésogéen, pin des Landes, pin de Bordeaux ou pin de Corte (Mayer, 2007). Son aire naturelle d'origine comprend le pourtour occidental de la Méditerranée, la façade Atlantique du sud-ouest de la France et elle s'étend jusqu'à l'Atlas marocain. Le pin maritime a également été introduit dans l'hémisphère sud, notamment en Afrique du Sud où il fait l'objet d'une culture à grande échelle. Cet arbre se retrouve ainsi au cœur des enjeux forestiers de la planète (Richardson, 1998). En France, l'essentiel du peuplement est situé dans le massif forestier landais mais le pin maritime est également présent sur le pourtour

méditerranéen, en Bretagne, en Sologne et dans la vallée de la Loire. En Corse, son aire de prédilection se situe à l'étage mésoméditerranéen, où il est associé au maquis à bruyère et à arbousier. Toutefois, on le rencontre jusque dans l'étage montagnard où il occupe le versant Sud des stations sèches, accompagné parfois de pins laricio (Office National des Forêts).

Le pin maritime peut atteindre 20 à 35 m de haut. Sa longévité est de 120 à 200 ans. Son tronc est généralement flexueux, son bois, de couleur rougeâtre et de grain grossier a une odeur de résine très prononcée et il présente parfois des poches de résine. Son écorce, gris pâle sur les jeunes arbres, prend une coloration rougeâtre puis rougeâtre-noir chez les sujets adultes. Elle est très épaisse et se fissure profondément au fur et à mesure que l'arbre croît. Ses aiguilles, géminées, incurvées en gouttière, mesurent 15 à 20 cm de long. De couleur vert foncé, elles sont épaisses, rigides, luisantes, pointues et persistantes (environ quatre ans). Il s'agit d'une espèce monoïque, c'est-à-dire que les fleurs mâles et femelles sont distinctes mais présentes simultanément sur le même arbre. Les inflorescences femelles sont des cônelets brun-rougeâtres uniques ou par groupe de deux à cinq autour du bourgeon initial. Les inflorescences mâles sont des chatons ovoïdes de couleur jaune pâle, disposés sur les jeunes pousses de l'année. Le fruit du pin maritime est un cône de forme ovoïde qui se présente en général par groupe de deux ou trois. Pointu, brillant et allongé, il possède une coloration qui évolue depuis le vert jusqu'au brun roux lorsque le fruit est mature. De grande dimension, il mesure de 10 à 20 cm de long et 5 à 8 cm de large et présente des écailles plus ou moins proéminentes, souvent courbées à la base et presque toujours symétriques. Après maturation, les cônes peuvent rester sur les branches plusieurs années (Mayer, 2007).

I. 2. Propriétés naturelles et emplois

Le pin maritime est une composante majeure de la forêt française, puisqu'il représente plus de 10% de la surface totale boisée et 30% de la production nationale de bois résineux. Tout dans l'arbre peut être valorisé : le bois, bien sûr, mais aussi la

résine, l'écorce, les aiguilles, les cônes, le pollen, les graines et les racines. Par exemple :

- Le bois du pin maritime dur, lourd, moyennement nerveux et pas très flexible, résiste bien à la compression. Il se travaille bien, se cloue et se peint bien et est utilisé en menuiserie du bâtiment ainsi que pour la fabrication des charpentes classiques et lamellées-collées, des parquets, des poteaux télégraphiques, de la fibre d'emballage et du papier. Les grosses billes fournissent du bois de déroulage utilisé en ébénisterie.

- L'écorce du pin maritime est réputée pour être la plus décorative en parterre urbain grâce à son calibre, sa texture et sa couleur.

- Ses racines, fines, flexibles et résistantes sont utilisées en vannerie et ses aiguilles aux fibres longues et robustes ont servi autrefois à fabriquer une matière textile utilisée pour rembourrer les matelas, appelée « laine des forêts ».

- La colophane, résidu solide obtenu après distillation de l'oléorésine, composée à 90% d'un mélange d'acides diterpéniques, est utilisée dans la fabrication des colles, des savons, des encres, des peintures et des vernis ainsi que dans celle des chewing-gums. On l'emploie aussi pour enduire les crins des archets, ou encore en poudre pour une meilleure adhésion des mains et des pieds des gymnastes et des danseurs (Mayer, 2007).

II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

II. 1. Les huiles essentielles de *Pinus pinaster* Ait.

Les aiguilles, le bois, les cônes de pin maritime fournissent par hydrodistillation une huile essentielle dont la composition chimique a fait l'objet de diverses études. Trois compositions principales se distinguent, dominées respectivement par des monoterpènes oléfiniques, par des sesquiterpènes oléfiniques ou par une combinaison de mono- et sesquiterpènes oléfiniques.

Ainsi, l' α -pinène est le composé majoritaire des huiles essentielles d'aiguilles de pin maritime de Russie (99,8%) (Kolesnikova *et al.*, 1983), du Portugal (97,5%) (Kolesnikova *et al.*, 1983), et d'Argentine (83,2%) (Valente *et al.*, 1969) ainsi que des

huiles essentielles de petit-bois d'Italie (61,6%) (Macchioni *et al.*, 2002). L' α -pinène et le β -pinène sont les deux composés majoritaires des huiles essentielles d'aiguilles d'Italie (28,9% et 21,7% respectivement) (Macchioni *et al.*, 2003), du Portugal (27,4 et 20,2%) (Carmo et Frazao, 1986) et de France (44,1% et 29,5%) (Kubeczka et Schultze, 1987) mais aussi des huiles essentielles de petit-bois d'Italie (40,4% et 23,1%) (Macchioni *et al.*, 2003) et de France (43,5% et 25,1%) (Chalchat *et al.*, 1989).

Les compositions dominées par les sesquiterpènes sont caractérisées par la présence soit du (E)- β -caryophyllène (26,6%) et de l'allo-aromadendrène (12,5%) (huile essentielle d'aiguilles d'Algérie) (Dob *et al.*, 2005) soit du longifolène (34,6%) (huile essentielle de bois d'Espagne) (Garcia-Vallejo, 1994).

La composition intermédiaire, contenant une combinaison de mono et sesquiterpènes oléfiniques en quantité à peu près équivalente a été décrite :

- pour l'huile essentielle d'aiguilles de la forêt des Landes (France): α -pinène (10,2%), β -pinène (16,0%), (E)- β -caryophyllène (12,6%) et germacrène D (11,5%) (Pauly *et al.*, 1973),
- pour l'huile essentielle obtenue à partir de cônes de pins d'Italie : α -pinène (24,7%), β -pinène (29,2%) et longifolène (20,8%) (Macchioni *et al.*, 2003),
- pour l'huile essentielle obtenue à partir d'aiguilles de pins du Maroc : α -pinène (21,4%) et (E)- β -caryophyllène (22,2%) (Hmamouchi *et al.*, 2001).
- et enfin pour l'huile essentielle d'aiguille de pins de Grèce : α -pinène (20,9%), germacrène-D (19,2%) et (E)- β -caryophyllène (14,8%), valeurs moyennes obtenues à partir de dix échantillons (Petrakis *et al.*, 2001, 2005).

Une étude particulière portant sur la fraction oléfinique sesquiterpénique d'une huile essentielle d'aiguilles de France a été effectuée par Gleizes *et al.* (1984). Cette fraction, qui représente 40% des composés hydrocarbonés totaux, contient majoritairement le (E)- β -caryophyllène et le δ -cadinène (12,9% et 7,3%). Finalement, une teneur importante en diterpènes (jusqu'à 26,9%) a été mise en évidence dans 31 échantillons d'huile essentielle d'aiguilles de pin maritime d'Espagne (Dominguez Garrido *et al.*, 1988). Cependant, aucun de ces composés n'a été identifié.

Cette étude bibliographique nous permet de mettre en avant plusieurs points :

- la composition chimique des huiles essentielles de *Pinus pinaster* a fait l'objet d'une douzaine d'études, néanmoins la plupart de ces études concerne seulement un échantillon par pays et en conséquence la composition reportée n'est pas forcément représentative de l'huile essentielle de pin maritime du pays mentionné ;
- la présence de diterpènes dans ces huiles essentielles n'a été mentionnée que dans une seule étude, cependant aucun de ces composés n'a été identifié (Dominguez Garrido *et al.*, 1988) ;
- aucune étude ne concerne l'huile essentielle provenant de pins maritimes poussant sur une île de Méditerranée (excepté l'île de Corfu) (Petraakis *et al.*, 2005).

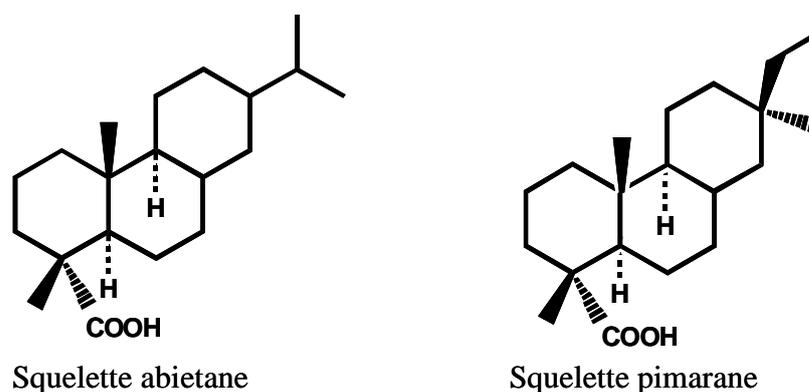
II. 2. Les résines de *Pinus pinaster* Ait.

La plupart des conifères produisent, à côté de l'huile essentielle, de l'oléorésine qui est une sécrétion de l'aubier. Egalement appelée gomme, c'est une substance visqueuse et combustible, produite entre autres par diverses espèces de pins. L'utilisation des résines remonte aux plus anciennes sociétés humaines. Les Egyptiens les utilisaient dans leur processus de momification, les Japonais en décoration dans la fabrication des laques. Elles ont aussi servi de médicaments comme désinfectant pour les blessures et plus récemment comme mastic ou dans la fabrication des cosmétiques (Fiebach et Kramer, 1993). Traditionnellement, l'oléorésine des pins est extraite par gemmage, opération qui consiste à effectuer une incision sur le tronc écorcé par laquelle elle s'écoule lentement jusque dans un réceptacle. L'oléorésine de pin, ressource naturelle renouvelable, conduit par distillation à la vapeur d'eau à la production d'une fraction volatile, l'essence de térébenthine et d'un résidu, la colophane.

- L'essence de térébenthine représente environ 20% de l'oléorésine et elle est connue depuis des centaines d'années (Chenard, 1836) mais fait encore l'objet d'études récentes (Ghanmi *et al.*, 2005). Elle est très riche en monoterpènes (α - et β -pinène essentiellement). Sa production est en grande partie absorbée par l'industrie des parfums, le reste étant destiné à des secteurs divers (solvants, colles, détergents).

▪ La colophane est utilisée en l'état ou bien modifiée par divers traitements chimiques (saponification, estérification, hydrogénation, polymérisation) dans la fabrication des colles et des adhésifs, de l'encre d'imprimerie, de peintures et de vernis (Fiebach et Kramer, 1993). Elle est essentiellement constituée de diterpènes tricycliques (abiétanes et pimaranes), bicycliques (labdanes) qui peuvent être acides (acides résiniques) ou neutres. Les acides résiniques les plus fréquemment rencontrés dans les oléorésines de pins ont les squelettes abiétane et pimarane représentés ci-dessous (Figure IV. 1) (Coppen *et al.*, 1998 ; Lange *et al.*, 1994 ; Lange et Spanoudaki, 1995 ; Cheung *et al.*, 1994 ; Tobolski et Zinkel, 1982 ; Lange et Weißmann, 1988b ; Lange et Stevanovic Janežic, 1993 ; Song *et al.*, 1995). On retrouve d'ailleurs ces acides résiniques dans divers extraits aux solvants (Uçar et Fengel, 1995 ; Arrabal et Cortijo 1994a,b ; Yano et Furuno, 1994) ainsi que dans le « tall oil » (Nogueira et Pereira, 1994, 1995 ; Magee et Zinkel, 1992 ; Niemelä, 1988 ; Holmbom, 1977) et dans les goudrons obtenus par distillation destructrice (température > 300°C) du bois de genévriers ou de pins (Hafizoglu, 1994 ; Reunanen *et al.*, 1996).

Figure IV. 1. Principaux squelettes des acides résiniques



Quelques études portant sur la composition chimique des oléorésines de *Pinus pinaster* ont été décrites dans la littérature. Ainsi, Jactel et Kleinhentz (Jactel *et al.*, 1996, Kleinhentz *et al.*, 1999) ont étudié la composition chimique de la fraction volatile (essence de térébenthine) de 24 échantillons d'oléorésines de pins maritime du sud de la France. Les auteurs ont mis en évidence que l' α - et le β -pinène sont les

composés les plus importants avec des teneurs relativement stables d'un échantillon à l'autre (valeurs moyennes = 58,5% +/- 1,80% et 31,9% +/- 1,77%, respectivement). Une étude récente sur la composition de l'essence de térébenthine d'une résine du Maroc reporte également l' α -pinène comme composé majoritaire (78,3%), suivi du β -pinène (7,3%) (Ghanmi *et al.*, 2005).

Lange et Weißmann (1989) ont fractionné la colophane d'une résine provenant d'arbres de France (Landes) en trois fractions:

- la fraction hydrocarbonée est majoritairement constituée de pimara-8(9),15-diène (24%), d'isopimara-7,15-diène (18%) et de palustradiène (12%);
- la fraction carbonylée est dominée par le pimara-8(14),15-diène (45%) et l'isopimaral (26%);
- et enfin la fraction alcoolique est riche en pimara-8(14),15-diène-18-ol (53%) et isopimarol 16% (Lange et Weißmann, 1987).

Walter *et al.* (1985) ont étudié la composition en acides diterpéniques de résines de pins maritimes d'origine corse et landaise mais cultivés dans le sud ouest de la France. Les constituants majoritaires des fractions acides de ces résines sont l'acide abiétique (24,5-46,6%) et l'acide néoabiétique (16,8-30,0%). Les acides lévopimarique et palustrique qui n'ont pu être quantifiés individuellement sont également présents à des teneurs relativement importantes (17,7-33,0% à eux deux). Les auteurs n'ont pas observé de différence notable en fonction de la provenance des résines.

Seules deux études reportent la composition chimique globale d'oléorésines de pins maritimes (Arrabal *et al.*, 2002 ; 2005). Elles concernent des échantillons d'Espagne qui sont composés de 27,7-30,3% de monoterpènes, de 2,0-2,9% de sesquiterpènes, de 0,4-2,0% de diterpènes neutres et de 62,2-63,8% d'acides résiniques. Les composés volatiles (mono- et sesquiterpènes) et les diterpènes ont été quantifiés séparément :

- parmi les composés volatils, l' α -pinène (70,9-83,1%), et le β -pinène (4,5-13,9%) sont les plus abondants ;

- la fraction des diterpènes est dominée par l'acide néoabiétique (16,1-17,2%) et l'acide abiétique (12,8-14,7%), vient ensuite le couple acides palustrique et lévopimarique (41,2-45,3%, composés à nouveau co-élus).

Il ressort de cette étude bibliographique que la résine de pin maritime est majoritairement constituée d'acides diterpéniques (60-70%), comme cela est d'ailleurs le cas pour la résine de la plupart des pins. L'analyse de ces composés est toujours réalisée par CPG-SM après dérivatisation. Néanmoins dans ces conditions les acides lévopimarique et palustrique, qui font partie des composés majoritaires, sont toujours quantifiés ensemble en raison de leur co-élution en CPG, ce qui peut être préjudiciable dans le cas d'une étude de la variabilité chimique. Par ailleurs, la fraction volatile des résines, essentiellement constituée d' α - et de β -pinène, a une composition chimique relativement stable d'un échantillon à l'autre.

Enfin, des travaux réalisés au laboratoire ont révélé une variabilité chimique des résines de *Pinus nigra* ssp. *laricio* de Corse, basée sur les teneurs en acides résiniques, alors que les composés neutres (mono- sesqui- et diterpènes) sont présents en proportions relativement stables. Compte tenu de ces observations, nous avons cherché à caractériser les résines de pins maritimes de Corse et de mettre en évidence une éventuelle variabilité chimique, à travers la composition de la fraction acide.

Enfin, des travaux réalisés au laboratoire ont révélé une variabilité chimique aussi bien des huiles essentielles que des résines de *Pinus nigra* ssp. *laricio* de Corse. Deux compositions d'huiles essentielles ont été décrites, dominées soit par des monoterpènes (α -pinène en particulier), soit par un diterpène (oxyde de manoyl) (Rezzi et al., 2001b, 2005). La variabilité des résines est basée sur les teneurs des divers acides résiniques, alors que les composés neutres (mono- sesqui- et diterpènes) sont présents en proportions relativement stables. Compte tenu de ces observations, nous nous sommes proposé de caractériser le pin maritime poussant à l'état spontané en Corse à travers la composition de l'huile essentielle et de la résine. Il s'agissait également de mettre en évidence soit une homogénéité, soit une éventuelle variabilité

chimique, à la fois de l'huile essentielle et de la résine à travers la composition de la fraction acide.

III. LES HUILES ESSENTIELLES DE *PINUS PINASTER*

Le but de ce travail est donc de caractériser le pin maritime de Corse à travers la composition chimique de l'huile essentielle obtenue à partir de ses aiguilles. Pour cela, nous avons d'abord réalisé en parallèle une analyse d'un échantillon par CPG(Ir) et CPG-SM et l'étude détaillée de cet échantillon en combinant un fractionnement sur colonne de silice avec l'analyse par CPG(Ir) et RMN ^{13}C . Ensuite, en vue de mettre en évidence une éventuelle variabilité chimique intraspécifique dans le territoire délimité que représente l'île, nous avons préparé et analysé 46 échantillons extraits d'aiguilles récoltées dans les principales forêts de Corse. Les résultats des analyses ont ensuite été soumis à un traitement statistique.

III.1. Analyse d'un échantillon d'huile essentielle d'aiguilles par CPG(Ir), CPG-SM et RMN- ^{13}C

Nous avons débuté cette étude par l'analyse par CGP(Ir), CPG-SM et RMN ^{13}C d'un échantillon d'huile essentielle obtenu par hydrodistillation d'aiguilles récoltées sur trois pins maritimes adultes de la forêt de Guagno. En ce qui concerne l'analyse par CPG-SM, nous avons identifié un certain nombre de composés, tout particulièrement des monoterpènes et des sesquiterpènes hydrocarbonés, quelques sesquiterpènes oxygénés et deux diterpènes. Nombre d'entre eux présentaient une note de concordance correcte par comparaison avec les spectres de référence. Pour d'autres molécules, cette note était moins bonne. Les résultats de ces analyses sont reportés dans le tableau bilan IV. 11. Cependant, l'identification de diterpènes présents à des teneurs non négligeables d'après le chromatogramme s'est avérée délicate dans certains cas, impossible dans d'autres. C'est pourquoi nous avons réalisé l'analyse détaillée de cet échantillon par CPG(Ir) et RMN ^{13}C après fractionnement, qui est décrite dans le paragraphe III. 2.

L'analyse directe par CPG(Ir) et RMN ^{13}C de cet échantillon nous a permis d'identifier 15 composés qui représentent environ 70% de la composition chimique globale (Tableau IV. 1). L'huile essentielle est principalement composée d'oléfines parmi lesquelles les plus importantes sont l' α -pinène (23,3%), l'abiétadiène (13,3%) et le (E)- β -caryophyllène (10,0%).

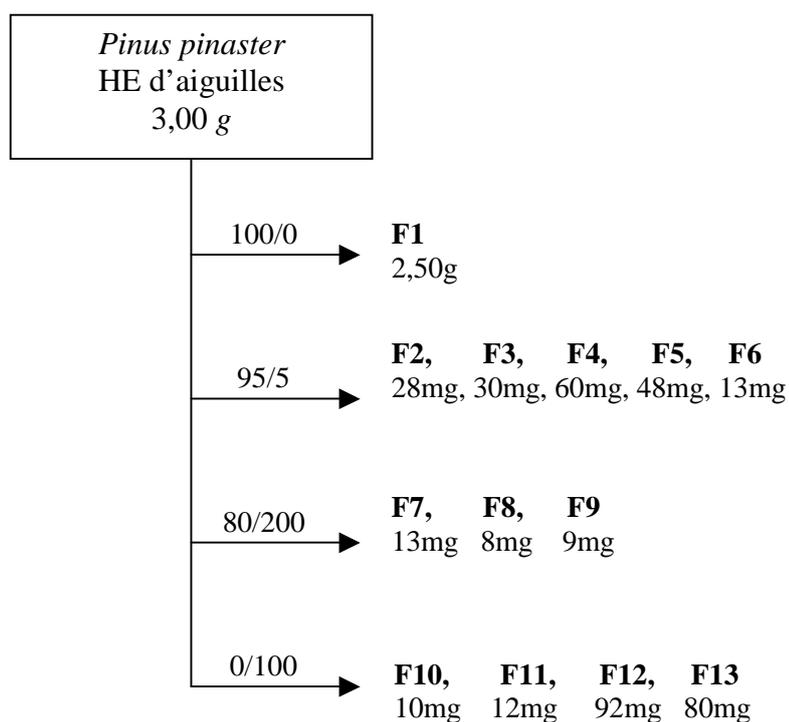
Tableau IV. 1 : Composés identifiés dans un échantillon d'huile essentielle d'aiguilles de *Pinus pinaster* par RMN ^{13}C

Composés	Ir ^a	Ir ^p	% ^a
α -pinène	932	1028	23,3
β -pinène	971	1113	2,7
myrcène	982	1164	4,8
δ -3-carène	1006	1151	0,6
limonène	1022*	1203	0,6
β -phellandrène	1022*	1213	0,5
terpinolène	1078	1284	0,4
α -terpinéol	1171	1696	0,8
(E)- β -caryophyllène	1420	1597	10,0
α -humulène	1453	1670	1,6
isovalérate de phényléthyle	1461	1975	1,4
germacrène D	1477	1713	8,7
acétate de (2Z, 6E) farnesyle	1814	2264	0,7
déhydroabiétane	2049	2498	0,9
abiétadiène	2090	2473	13,3
Total:			70,3

*L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les indices sont suivis d'un astérisque * : pourcentage sur colonne polaire*

Nous avons ensuite soumis cet échantillon (3,0g) à une séparation par chromatographie sur colonne de silice en utilisant un gradient pentane/oxyde de diéthyle 100/0-0/100. Treize fractions (F1-F13) ont été obtenues, dont une éluée au pentane (F1 ; 2,5g), cinq avec un mélange 95/5 (F2-F6 ; 0,179g), trois avec un mélange 80/20 (F7-F9 ; 0,03g) et les quatre dernières éluées à l'éther (F10-F13 ; 0,194g) (Figure IV. 2). Toutes les fractions ont ensuite été analysées par CPG(Ir) et plusieurs d'entre elles (F1, F2, F3, F4, F7, F9, F12, F13) également par RMN ^{13}C .

Figure IV. 2. Fractionnement de l'huile essentielle d'aiguilles de *Pinus pinaster*



III. 2. Analyse détaillée suite à un fractionnement

III. 2. 1. Etude de la fraction hydrocarbonnée

La fraction hydrocarbonnée est la plus importante, elle représente 85% de la masse de l'huile essentielle totale. L'analyse par CPG(Ir) et RMN ^{13}C a conduit à l'identification de trois oléfines supplémentaires par rapport à celles déjà mises évidence dans l'huile essentielle brute. Il s'agit d'un monoterpène, le camphène et de deux sesquiterpènes, l' α -muurolène et le δ -cadinène (Tableau IV.2).

Néanmoins, trois composés (A, B, et C) présents en quantité appréciable (7,4%; 2,4% et 1,5%) n'ont pas été identifiés. Les valeurs des indices de rétention (Ira/Irp A : 2017/2341, B : 2023/2352 et C : 2137/2560) indiquent qu'il s'agit probablement de diterpènes oléfiniques. Leur identification est détaillée dans le paragraphe III.3.2.

Tableau IV. 2 : Composés identifiés dans la fraction oléfinique d'un échantillon d'huile essentielle de *Pinus pinaster*.

Composés	Ir ^a	Ir ^p	% ^a
α -pinène	932	1028	25,6
camphène	944	1071	0,3
β -pinène	971	1113	3,1
myrcène	982	1164	4,8
δ -3-carène	1006	1151	0,6
limonène	1022*	1203	0,7
β -phellandrène	1022*	1213	0,5
terpinolène	1078	1284	0,3
(E)- β -caryophyllène	1420	1597	12,1
α -humulène	1453	1670	1,6
germacrène D	1477	1713	7,4
α -muurolène	1506	1722	0,4
δ -cadinène	1515	1757	1,5
A	2017	2341	7,4
B	2023	2352	2,4
déhydroabiétane	2049	2498	8,1
abiétadiène	2084	2473	14,3
C	2137	2560	1,5
Total:			92,6

*L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les indices sont suivis d'un astérisque * : pourcentage sur colonne polaire*

III. 2. 2. Etude des fractions oxygénées

L'analyse par CPG(Ir) et RMN ¹³C des cinq fractions éluées avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle 95/5 nous a permis d'identifier sept composés supplémentaires, à savoir quatre monoterpènes (acétate de bornyle, acétate de géranyle, isovalérate de néryle et isovalérate de géranyle), le 2-méthylbutyrate de phényléthyle et deux diterpènes (déhydroabiétal et labda-8(17)-13(E)-dièn-19-al) (Tableau IV. 3).

Tableau IV. 3. Composés identifiés dans les fractions oxygénées de l'huile essentielle de *P. pinaster*

Solvant	Pentane/Ether		95/5					80/20			0/100			
	Masse (mg)		F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13
Composés	BP-1	BP-20	28,1	29,8	59,7	48,1	13,4	13	7,6	9,4	10	12	92	80,2
linalol	1081	1543	-	-	-	-	-	-	-	10,4	15,2	11,2	0,8	0,6
terpinén-4ol	1160	1598	-	-	-	-	-	-	2,4	6,2	5,5	1,7	0,7	-
α-terpinéol	1171	1696	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	1,4	19,3	22,8
acétate de bornyle	1268	1578	0,8	1,9	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
acétate de géranyle	1360	1748	0,5	5,8	14,7	22,7	27,7	-	-	-	-	-	-	-
méthyleugénol	1367	2014	-	-	-	-	-	2,7	5,2	1,1	-	-	-	-
2-méthylbutyrate de phényléthyle	1461	1975	7,5	19,5	15,4	10,1	3,2	-	-	-	-	-	-	-
isovalérate de phényléthyle	1464	1980	6,2	28,3	30,9	33,2	20,5	-	-	-	-	-	-	-
oxyde de caryophyllène	1571	1986	-	-	-	-	-	17,3	-	-	-	-	-	-
isovalérate de néryle	1581	1897	2,8	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
isovalérate de géranyle	1586	1920	8,5	2,7	3,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
épi cubénol	1616	2067	-	-	-	-	-	3,5	30,0	15,9	1,4	-	-	-
γ-eudesmol	1626	2171	-	-	-	-	-	-	-	7,1	3,2	-	-	-
τ-muurolol	1628	2187	-	-	-	-	-	-	-	-	27,4	38,9	5,3*	0,7
τ-cadinol	1628	2171	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	1,8	2,0*	1,2
α-cadinol	1641	2233	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10,6	13,0
(2E-6E)-Farnesol	1699	2355	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,9	5,5
acétate de farnésyle	1814	2264	0,4	7,3	14,8	19,8	20,2	-	-	-	-	-	-	-
isoabiéanol	2090	2734	-	-	-	-	-	-	2,3	10,2	7,4	2,8	-	-
déhydroabiétal	2112	2651	5,3	4,5	1,3	-	-	2,9	-	-	-	-	-	-
labda-8(17)-13(E)-dièn-19-al	2144	2716	5,5	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
labda-8(17)-13(Z)-dièn-15-al	2208		-	-	-	-	-	7,5	2,5	-	-	-	-	-
labda-8(17)-13(E)-dièn-15-ol	2213		-	-	-	-	-	-	-	-	3,5	2,4	22,5	22,7
labda-8(17)-13(E)-dièn-15-al	2239		-	-	-	-	-	17,4	8,1	-	-	-	-	-

L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les pourcentages sont suivis d'un astérisque *: pourcentage sur colonne polaire

Dans les fractions F7, F8 et F9, éluées avec un mélange pentane/oxyde de diéthyle 80/20, dix composés supplémentaires ont été identifiés: deux monoterpènes (linalol et terpinèn-4ol), un phénylpropanoïde (méthyleugénol), trois sesquiterpènes (oxyde de caryophyllène, épi-cubénol et γ -eudesmol) et quatre diterpènes (isoabiéanol, déhydroabiétal, labda-8(17)-13(E)-dièn-15-al ainsi que l'isomère Z). Enfin, l'analyse des quatre fractions éluées à l'éther a permis l'identification de cinq composés supplémentaires ; quatre sesquiterpènes (τ -muurolol, τ -cadinol, α -cadinol et (2E,6E)-farnésol) et un diterpène (labda-8(17)-13(E)-dièn-15-ol). Plusieurs composés identifiés dans les fractions oxygénées l'ont été à partir des données de la littérature. Il s'agit du 2-méthylbutyrate de phényléthyle (F3), du labda-8(17)-13(E)-dièn-15-ol (F12), du labda-8(17)-13(E)-dièn-15-al ainsi que l'isomère Z (F7).

III. 2. 3. Fractionnement d'une huile essentielle au cours de l'hydrodistillation

Lors de l'étude de la fraction hydrocarbonée par RMN ^{13}C et CPG(Ir), trois composés présents à des teneurs appréciables, manifestement des diterpènes (A : 7,4% Ira=2017, Irp=2341 ; B : 2,4% Ira=2023, Irp=2352 ; C : 1,5% Ira=2137, Irp=2560), n'ont pu être identifiés, ni à partir de la banque de spectres du laboratoire, ni de celle construite avec les données de la littérature. De plus, les signaux des deux composés minoritaires B et C (2,4 et 1,5%) n'étant pas tous repérés avec certitude sur le spectre du mélange, cela rendait la recherche de leur structure délicate.

Nous avons donc essayé de concentrer ces trois composés de manière à faciliter la recherche de leur structure. Pour cela, nous avons réalisé une hydrodistillation fractionnée à partir du même lot d'aiguilles, c'est-à-dire en récupérant l'huile essentielle à différents moments de la distillation. En opérant de la sorte, nous pouvions raisonnablement espérer recueillir les diterpènes, qui sont les composés les plus lourds de cette huile essentielle, majoritairement dans la dernière fraction. Ainsi, nous avons récupéré l'huile essentielle après 15 minutes (min) (T1), 45 min (T2), 4h (T3) et 5h30 (T4). L'analyse par CPG(Ir) des quatre fractions montre que les monoterpènes sont majoritairement présents dans la fraction T1, les sesquiterpènes plutôt dans T2 et le pourcentage de diterpènes est maximum dans T4, notamment en

ce qui concerne les trois composés recherchés A, B, et C (respectivement 14,5% ; 13,2% et 2,7%) (Tableau IV. 4). Partant de ce constat nous avons soumis T4 à une analyse par RMN ^{13}C .

Tableau IV. 4. Composés identifiés après hydrodistillation fractionnée

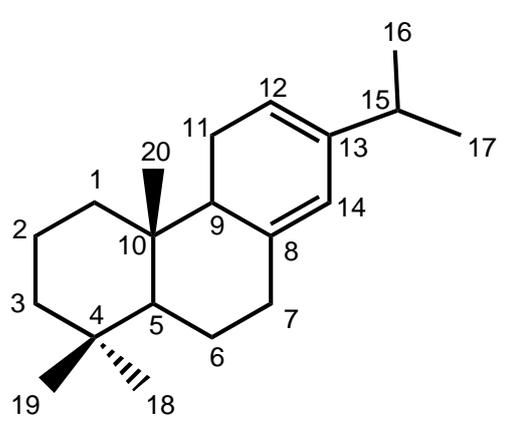
Composés	Ir ^a	Ir ^p	T1=15mn	T2=45mn	T3=4h	T4=5h30
α -pinène	932	1028	21,4	7,3	3,9	3,8
camphène	944	1071	0,2	0,1	0,1	0,1
β -pinène	971	1113	14,4	5,7	2,6	1,9
myrcène	982	1164	7,2	2,9	1,5	1,3
δ -3-carène	1006	1151	2,3	1,0	0,5	0,4
limonène	1022*	1203	2,8	1,3	0,8	0,6
β -phellandrène	1022*	1213	0,7	0,3	0,1	0,1
terpinolène	1078	1284	0,2	0,1	0,2	0,2
α -terpinéol	1171	1696	tr	0,1	0,8	0,7
(E)- β -caryophyllène	1420	1597	13,7	18,3	7,5	4,4
α -humulène	1453	1670	1,8	2,7	1,4	0,9
isovalérate de phényléthyle	1461	1993	0,5	1,1	1,3	0,7
germacrène D	1477	1713	15,9	27,0	12,8	6,2
δ -cadinène	1515	1757	1,3	2,8	2,1	1,9
acétate de 2E, 6Z farnésyle	1814	2264	-	0,1	0,4	0,3
A	2017	2341	1,3	3,7	12,0	14,5
B	2023	2352	1,1	4,3	12,6	13,2
abiétatriène (déhydroabiétane)	2049	2498	0,8	1,3	2,6	3,0
abietadiène	2084	2473	2,6	6,6	22,4	31,9
C	2137	2560	0,2	0,5	1,8	2,7
Total:			88,4	87,2	87,4	88,8

*L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire, excepté pour les composés dont les pourcentages sont suivis d'un astérisque * : pourcentage sur colonne polaire, tr: trace (< 0,05%).*

Ainsi, nous avons confirmé l'identification des constituants de cette fraction T4 dont la teneur était suffisamment élevée pour pouvoir être détectés par RMN ^{13}C . Néanmoins, l'examen du spectre laissait apparaître la présence de plusieurs signaux non attribués et d'intensité relativement importante, correspondant vraisemblablement aux composés A et B (14,5% et 13,2%). Nous avons pu identifier l'une de ces molécules en interrogeant la bibliothèque de spectres de diterpènes construite à partir de données de la littérature. Il s'agit du lévopimaradiène qui avait été décrit par

Schepmann *et al.* (2001). L'attribution du lévopimaradiène au composé A ou B est décrite ultérieurement (Tableau IV.5).

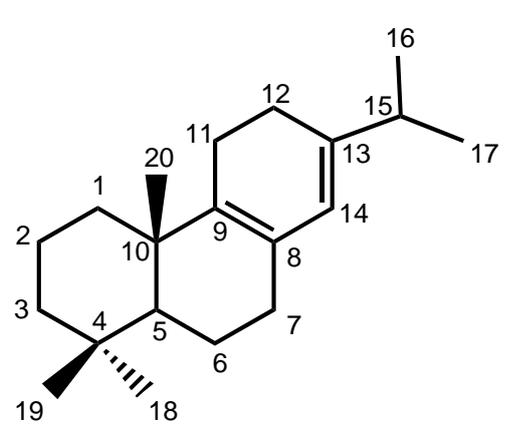
Tableau IV. 5. Structure et déplacements chimiques du lévopimaradiène

Levopimaradiène	C	δ ref CDCl ₃ (ppm)	δ CDCl ₃ (ppm)
	1	37,91	37,90
	2	19,00	18,89
	3	42,21	42,20
	4	33,45	33,42
	5	55,23	55,23
	6	23,80	23,81
	7	36,15	36,16
	8	139,46	139,38
	9	49,61	49,61
	10	40,75	40,41
	11	22,75	22,74
	12	114,87	114,84
	13	138,91	138,87
	14	118,73	118,73
	15	33,26	33,25
	16	21,37	21,35
	17	21,45	21,45
	18	33,48	33,48
	19	21,80	21,79
	20	14,10	14,08

Parmi les signaux restants non identifiés et d'intensité relativement importante, nous retrouvons quatre carbones oléfiniques (138,39 ; 124,75 ; 142,98 et 120,38 ppm) qui indiquent la présence de doubles liaisons carbone-carbone. L'huile essentielle étant riche en labdanes, l'autre composé important non identifié (A ou B) est probablement aussi un labdane ayant une isomérisation de position des doubles liaisons carbone-carbone avec l'abiétadiène et/ou le lévopimaradiène. C'est pourquoi nous avons fait une étude bibliographique en recherchant les isomères potentiels de ces composés. Dans une publication datant de 2001, Lee *et al.* (2001) ont effectué la synthèse et la caractérisation de quatre labdanes isomères : l'abiétadiène, le lévopimaradiène, le palustradiène et le néoabietadiène. Cependant les auteurs

décrivent des données RMN ^{13}C issues de spectres enregistrés dans C_6D_6 . Nous avons donc effectué un enregistrement du spectre de la fraction T4 dans C_6D_6 afin de confirmer ou d'infirmer la présence de certains de ces composés dans cette huile essentielle. Ainsi, par comparaison des valeurs des déplacements chimiques enregistrées dans C_6D_6 avec celles de la littérature, nous avons pu identifier le palustradiène. Ensuite, nous avons aisément retrouvé les valeurs des déplacements chimiques du palustradiène dans CDCl_3 par comparaison et en tenant compte de l'intensité des signaux (Tableau IV. 6).

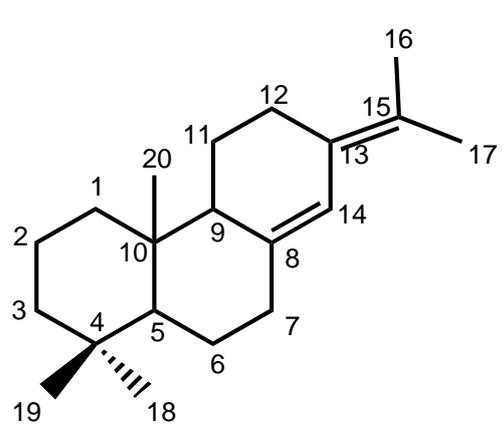
Tableau IV. 6. Structure et déplacements chimiques du palustradiène

Palustradiène					
	C	$\delta \text{C}_6\text{D}_6$ ref	$\delta \text{C}_6\text{D}_6$	δCDCl_3	Intensité /100
	1	36,1	36,27	35,94	40,4
	2	19,3	19,39	19,00	73,1 sup C6
	3	42,1	42,21	41,82	41,3
	4	33,4	33,49	33,44	13,8 *sup
	5	51,9	52,03	51,78	42,7
	6	19,3	19,39	19,00	sup C2
	7	31,0	31,14	30,72	41,9
	8	138,2	138,20	138,39	13,60
	9	125,4	125,40	124,75	15,5
	10	37,9	38,04	37,72	17,9
	11	23,0	23,08	22,59	45,6
	12	26,6	26,70	26,32	43,8
	13	142,5	142,55	142,98	15,3
	14	121,3	121,35	120,36	38,2
	15	34,7	34,77	34,28	38,2
	16	21,2	21,32	21,05	42,5
	17	20,8	20,88	20,55	40,8
	18	33,4	33,49	32,93	47,7
	19	21,7	21,70	21,26	44,4
	20	21,5	21,60	21,54	46,3

En procédant de la même manière, nous avons identifié dans la fraction T4 un autre labdane, le néoabiétadiène (Tableau IV. 7). L'intensité des signaux de ce composé dans le spectre RMN ^{13}C nous permet de repérer ce dernier dans le

chromatogramme avec une teneur de 2,7%. Les valeurs de ses indices de rétention (Ira/Irp : 2137/2560), nous indiquent qu'il s'agit du composé C.

Tableau IV. 7. Déplacements chimiques du néoabiétadiène

Neoabietadiène	C	δ C ₆ D ₆ ref	δ C ₆ D ₆	δ CDCl ₃	Intensité/100
	1	39,7	39,82	39,59	6,9
	2	19,3	19,22	18,77	5,2
	3	42,4	42,49	42,36	4,5
	4	33,4	33,57	33,69*	5,3 *sup
	5	54,7	54,84	54,57	6,3
	6	22,9	22,83	22,34	5,2
	7	36,4	36,50	36,09	7,3
	8	139,0	139,04	139,32	2,2
	9	51,7	51,87	51,50	6,8
	10	38,4	38,57	38,25	2,8
	11	22,9	22,83	22,50	8,0
	12	26,4	26,26	25,94	8,3
	13	129,0	129,17	128,71	1,9
	14	122,6	122,70	121,67	6,2
	15	122,8	122,85	123,01	3,4
	16	19,8	19,90	19,67	5,3
	17	20,4	20,29	20,33	4,7
	18	33,8	33,95	33,62	5,6
	19	22,2	22,38	22,17	7,3
	20	15,2	15,33	15,15	6,1

Ensuite, d'après l'intensité moyenne des signaux du lévopimaradiène et du palustradiène dans le spectre RMN ¹³C de la fraction T4, nous pouvons affirmer que le levopimaradiène est légèrement moins abondant que le palustradiène. En conséquence, le composé A (14,5%) (Ira=2017, Irp=2341) est le palustradiène et le composé B (13,2%) (Ira=2023, Irp=2352) est le lévopimaradiène. Nous avons vérifié cette attribution en comparant les intensités des signaux du palustradiène et du lévopimaradiène dans le spectre de l'échantillon n°1 dans lequel les composés A et B sont présents à des teneurs très différentes (A : 7,5% ; B : 13,3%).

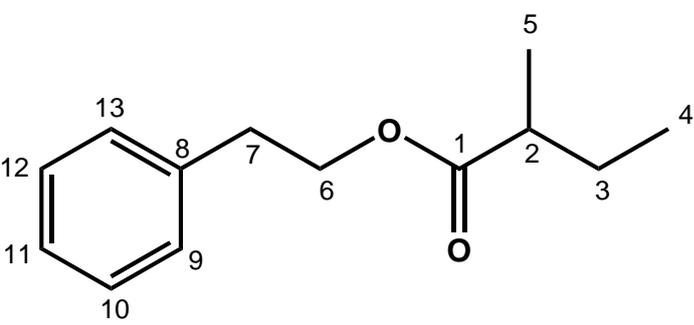
III. 2. 4. Identification des constituants oxygénés de l'huile essentielle de *P. pinaster* à partir des données de la littérature

Dans ce paragraphe, nous décrivons l'identification par RMN ^{13}C d'un ester benzénique et de quatre diterpènes, présents dans certaines fractions oxygénées de chromatographie, par consultation des banques de RMN « Littérature » du laboratoire. Pour chaque molécule, nous présentons la structure, l'attribution des déplacements chimiques de chaque carbone, ainsi que la comparaison des raies de résonance observées dans les fractions (où le composé est le plus important) avec celles décrites dans la littérature.

a) 2-méthylbutyrate de phényléthyle

Le 2-méthylbutyrate de phényléthyle a été identifié par comparaison de ses raies de résonance dans le spectre de RMN ^{13}C de la fraction F3 dans laquelle il est présent à 19,5%, avec celles qui sont contenues dans la bibliothèque « Littérature ». Tous les carbones ont été observés et les déplacements chimiques repérés dans le spectre de la fraction correspondent parfaitement à ceux qui sont décrits par Bremser *et al.* (1987) (Tableau IV. 8).

Tableau IV. 8. Structure et déplacements chimiques (ppm) du 2-méthylbutyrate de phényléthyle

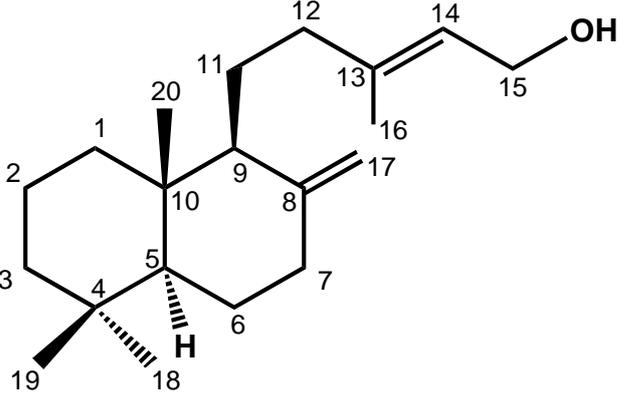
2-méthylbutyrate de phényléthyle	C	δ ref	δ
	1	176,45	176,62
	2	41,23	41,07
	3	26,80	26,73
	4	11,48	11,56
	5	16,53	16,56
	6	64,59	64,61
	7	35,42	35,18
	8	138,13	137,89
	9	128,52	128,47
	10	128,96	128,89
	11	126,57	126,52
	12	128,96	128,89
	13	128,52	128,47

δ ref: déplacements chimiques observés dans la littérature, δ : déplacements chimiques observés dans la fraction F3.

b) Labda-8(17),13(E)-dièn-15-ol ou 9,10-Anti-copalol

De la même manière, nous identifions dans le spectre de la fraction F12 un diterpène oxygéné présent à 22,5%, le labda-8(17),13(E)-dièn-15-ol communément appelé 9,10-anti-copalol, par comparaison de ses déplacements chimiques dans le spectre du mélange avec ceux publiés par Monti et *al.* (1999) (Tableau IV. 9).

Tableau IV. 9. Déplacements chimiques du 9,10-Anti-copalol ou Labda8(17),13(E)-dièn-15-ol

9, 10-anti-copalol	C	δ ref	δ
	1	39,19	39,05
	2	21,75	21,69
	3	42,29	42,13
	4	33,68	33,53
	5	55,67	55,49
	6	24,55	24,41
	7	38,45	38,32
	8	148,67	148,54
	9	56,34	56,29
	10	39,74	39,61
	11	19,49	19,36
	12	38,49	38,41
	13	140,82	140,22
	14	124,00	123,02
	15	59,55	59,21
	16	16,48	16,30
	17	106,34	106,23
	18	33,71	33,58
	19	21,81	21,76
	20	14,60	14,46

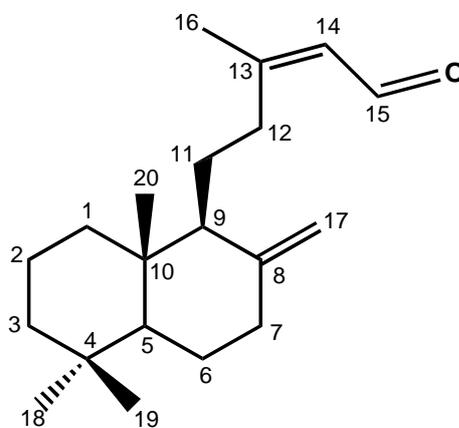
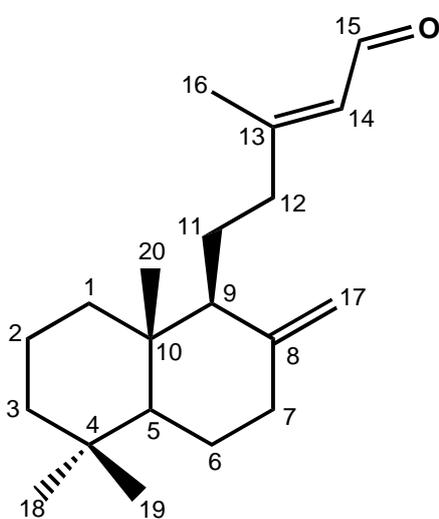
c) Labda-8(17),13(E)-dièn-15-al et Labda-8(17),13(Z)-dièn-15-al

Sur le spectre de la fraction F7, deux séries de vingt raies de résonance avec un rapport d'intensité d'environ 2/1 chacune, restent non attribuées. Les signaux correspondent manifestement à deux composés repérés sur le chromatogramme avec une teneur de 17,4% (Ira=2239) et 7,5% (Ira=2208). L'examen des déplacements chimiques indique qu'il s'agit de deux diterpènes portant une fonction aldéhyde

(signaux à 191,34 et 191,04 ppm) ainsi que deux doubles liaisons carbone-carbone chacun (deux séries de signaux entre 106,35 et 164,89 ppm). L'interrogation de la bibliothèque « Littérature » a permis d'identifier le labda-8(17),13(E)-diène-15-al et le labda-8(17),13(Z)-diène-15-al. En effet, les valeurs de déplacements chimiques repérées dans le mélange correspondent avec celles décrites par Carman et Duffield. (1995) (Tableau IV. 10). Par ailleurs, en combinant l'intensité des signaux de RMN ^{13}C de ces deux diterpènes avec leur pourcentage en CPG, nous en déduisons que l'isomère E correspond au pic à 17,4% et l'isomère Z au pic à 7,5%.

Tableau IV. 10. Structure et déplacements chimiques du labda-8(17),13E-diène-15-al et du labda-8(17),13Z-diène-15-al.

C	Labda-8(17),13E-dien-15-al		Labda-8(17),13Z-dien-15-al	
	δ ref	δ	δ ref	δ
1	39,0	39,50	38,9	39,15
2	19,3	19,33	19,3	19,33
3	42,0	42,07	41,9	42,04
4	33,5	33,54	33,4	33,57
5	55,4	55,50	55,3	55,51
6	24,4	24,40	24,7	24,41
7	38,2	38,25	38,0	38,15
8	148,1	148,19	148,0	148,17
9	56,1	56,19	55,6	55,82
10	39,7	39,73	39,5	39,62
11	21,2	21,60	22,1	22,29
12	39,5	39,10	31,0	30,39
13	164,9	164,89	164,6	164,82
14	127,1	127,13	129,9	129,07
15	191,3	191,34	190,8	191,04
16	17,6	16,97	24,3	27,20
17	106,3	106,35	106,4	106,51
18	33,5	33,57	21,5	21,66
19	21,7	21,68	33,6	33,54
20	14,4	14,44	14,4	14,55



III. 3. Bilan de l'analyse détaillée de l'huile essentielle d'aiguilles de pin maritime de Corse

Le fractionnement de l'huile essentielle d'aiguilles de *P. pinaster* de Corse et l'analyse des fractions de chromatographie par RMN ^{13}C et CPG(Ir) a conduit à l'identification de 42 composés (15 monoterpènes, 13 sesquiterpènes, 11 diterpènes, ainsi que deux esters de phényléthyle et un de phénylpropanoïde) qui représentent environ 95% de la composition chimique totale. Cette huile essentielle est caractérisée par une forte teneur en diterpènes oléfiniques (environ un tiers de la composition globale).

L'analyse par CPG-SM de cet échantillon d'huile essentielle après fractionnement a permis l'identification de 18 composés supplémentaires ayant des teneurs comprises entre 0,05-0,4%. Parmi eux, on dénombre quatre monoterpènes oléfiniques, 12 sesquiterpènes oléfiniques (dont le bisabolène et le γ -cadinène), deux sesquiterpènes oxygénés (le bulnésol et le (E)-nérolidol). Cependant, cette technique analytique n'a pas permis d'identifier neuf des onze diterpènes identifiés par RMN, ces composés étant absents des différentes bibliothèques à notre disposition.

Au terme de cette étude, nous avons identifié, par combinaison de la CPG(Ir), de la RMN ^{13}C et de la CPG-SM, 60 composés représentant 99,2% de la composition chimique globale de l'huile essentielle. Parmi les diterpènes identifiés, sept d'entre eux, le palustradiène, le levopimaradiène, le néoabiétadiène, le labda-8(17),13(E)-diène-19-al, le labda-8(17),13(Z)-diène-15-al, le labda-8(17),13(E)-diène-15-ol, le labda-8(17),13(E)-diène-15-al, étaient absents de notre bibliothèque « Terpènes ». Ils ont du être caractérisés par comparaison de leurs données spectrales avec celles qui sont décrites dans la littérature. Ces composés sont à notre connaissance, décrits pour la première fois dans l'huile essentielle de pin maritime. Nous avons également enrichi notre bibliothèque de spectres de RMN ^{13}C de produits de référence en identifiant de 2-méthylbutyrate de phényléthyle grâce aux données de la littérature (Tableau IV .11).

Tableau IV. 11: Composition chimique de l'huile essentielle de *P. pinaster*

N°	Composés	Ira	Irp	%a	Mode d'identification		
1	tricyclène	921	1028	tr	CPG-Ir	SM	
2	α -pinène	932	1028	23,3	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
3	camphène	944	1071	0,2	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
4	β -pinène	971	1113	2,7	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
5	myrcène	982	1164	4,8	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
6	δ -3-carène	1005	1151	0,6	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
7	limonène	1022*	1203	0,6	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
8	β -phellandrène	1022*	1213	0,5	CPG-Ir		RMN ¹³ C
9	(Z)- β -ocimène	1025	1230	tr	CPG-Ir	SM	
10	(E)- β -ocimène	1036	1249	0,1	CPG-Ir	SM	
11	γ -terpinène	1048	1245	0,1	CPG-Ir	SM	
12	terpinolène	1078	1284	0,4	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
13	linalol	1081	1543	0,2	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
14	terpinèn-4-ol	1160	1598	0,1	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
15	α -terpinéol	1171	1696	0,8	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
16	acétate de bornyle	1268	1578	0,1	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
17	acétate de géranyle	1360	1748	0,8	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
18	méthyleugénol	1367	2014	tr	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
19	α -ylangène	1372	1476	tr	CPG-Ir	SM	
20	α -copaène	1377	1488	0,3	CPG-Ir	SM	
21	β -bourbonène	1385	1515	tr	CPG-Ir	SM	
22	β -élémente	1388	1589	0,1	CPG-Ir	SM	
23	longifolène	1408	1571	0,4	CPG-Ir	SM	
24	(E)- β -caryophyllène	1420	1597	10,0	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
25	β -copaène	1431	1581	0,1	CPG-Ir	SM	
26	β -gurjunène	1439	1591	tr	CPG-Ir	SM	
27	α -humulène	1453	1670	1,6	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
28	2-méthylbutyrate de phényléthyle	1461	1975	0,6	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
29	isovalérate de phényléthyle	1464	1980	1,4	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
30	γ -muurolène	1472	1681	0,4	CPG-Ir	SM	
31	germacrène D	1477	1713	8,7	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
32	α -muurolène	1485	1719	0,2	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
33	γ -cadinène	1506	1752	0,4	CPG-Ir	SM	
34	δ -cadinène	1515	1757	1,2	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
35	cadina-1,4-diène	1518	1763	tr	CPG-Ir	SM	
36	α -cadinène	1525	1743	0,1	CPG-Ir	SM	
37	α -(E)-bisabolène	1532	1753	0,4	CPG-Ir	SM	

38	(E)-nérolidol	1545	2039	0,1	CPG-Ir	SM	
39	oxyde de caryophyllène	1571	1986	0,1	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
40	isovalérate de néryle	1581	1897	0,1	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
41	isovalérate de géranyle	1586	1920	0,2	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
42	épi-cubenol	1616	2067	0,1	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
43	γ-eudesmol	1626	2171	0,1	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
44	τ-muurolol	1628	2181	0,4	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
45	τ-cadinol	1638	2171	0,1	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
46	α-cadinol	1641	2233	0,4	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
47	bulnésol	1651	2200	tr	CPG-Ir	SM	
48	(2E, 6E)-farnésol	1699	2355	0,2	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
49	acétate de (2Z, 6E)-farnésyle	1814	2264	0,7	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
50	palustradiène ⁺	2017	2341	7,4	CPG-Ir ¹		RMN ¹³ C
51	lévopimaridiène ⁺⁺	2023	2352	8,9	CPG-Ir ¹		RMN ¹³ C
52	abiétatriène ⁺⁺⁺	2049	2498	0,9	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
53	abiétadiène ⁺⁺⁺⁺	2090	2473	13,3	CPG-Ir	SM	RMN ¹³ C
54	isoabiénol	2099	2734	0,1	CPG-Ir		RMN ¹³ C
55	déhydroabiétal	2112	2651	0,2	CPG-Ir		RMN ¹³ C
56	néoabietadiène ⁺⁺⁺⁺⁺	2137	2560	3,0	CPG-Ir ¹		RMN ¹³ C
57	labda-8(17)-13(Z)-dièn-19-al	2144	2716	0,2	CPG-Ir ¹		RMN ¹³ C
58	labda-8(17)-13(Z)-dièn-15-al	2208		0,2	CPG-Ir ¹		RMN ¹³ C
59	labda-8(17)-13(E)-dièn-15-ol	2213		0,8	CPG-Ir ¹		RMN ¹³ C
60	labda-8(17)-13(E)-dièn-15-al	2239		0,5	CPG-Ir ¹		RMN ¹³ C
Total:				99,2			

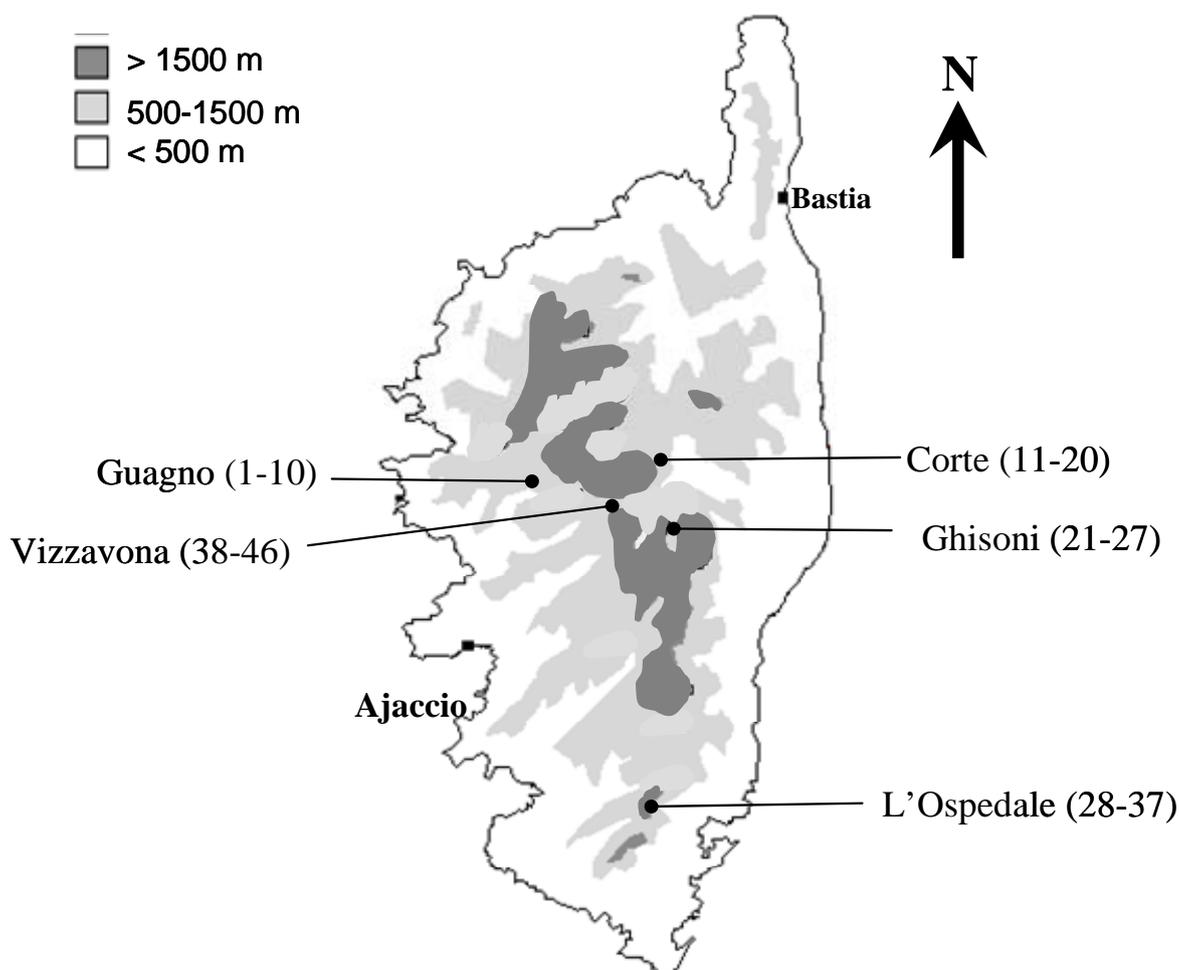
L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire sauf pour les composés dont les indices sont suivis d'un astérisque (): pourcentages sur colonne polaire. tr: trace (< 0,05%); ⁺synonyme: abieta-8,13-diene, ⁺⁺synonyme: abieta-8,12-diene, ⁺⁺⁺synonyme: déhydroabiétane ⁺⁺⁺⁺synonyme: abiéta-7,13-diène; ⁺⁺⁺⁺⁺synonyme: abieta-8(14),13(15)-diene; ¹ Ir mesuré dans une fraction de distillation ou de chromatographie.*

III. 4. Variabilité chimique

Quarante-six échantillons d'huile essentielle d'aiguilles de pins maritimes adultes poussant dans cinq forêts de Corse (Figure IV. 3) ont été obtenus par hydrodistillation dans un appareil de type Clévenger et analysés par CPG(Ir). Quinze de ces échantillons (1-3, 6-8, 12, 14, 20, 30, 31, 33, 37, 42, 44), sélectionnés en fonction de leur profil chromatographique, ont également été analysés par RMN ¹³C et trois d'entre eux (14, 20, 30) ont été soumis à une analyse par spectrométrie de masse. Au total, 60 composés représentant de 82,9 à 97,0% de la composition chimique des

échantillons étudiés ont été identifiés, il s'agit des mêmes composés déjà identifiés lors de l'analyse détaillée.

Figure IV. 3. Répartition géographique des échantillons d'huile essentielle de *Pinus pinaster* de Corse



Parmi ces constituants, on rencontre : 19 monoterpènes, 27 sesquiterpènes, 11 diterpènes, deux esters de phényléthyle (isovalérate et 2-méthylbutyrate) et un phénylpropanoïde (méthyleugenol). La composition des échantillons varie sensiblement et elle est dominée par des oléfines soit monoterpéniques, soit sesquiterpéniques, soit encore diterpéniques. L' α -pinène (6,7-29,4%), le (E)- β -caryophyllène (4,4-19,9%), le germacrène-D (1,7%-21,4%) et l'abiétadiène (6,8-34,2%) sont les principaux constituants. D'autres composés sont fréquemment rencontrés à des teneurs assez importantes : le lévopimaradiène (jusqu'à 18,1%), le β -

pinène (jusqu'à 15,7%), le palustradiène (jusqu'à 12,8%) et le myrcène (jusqu'à 7,6%). A côté de plusieurs monoterpènes, deux sesquiterpènes (l' α -humulène et le δ -cadinène jusqu'à 3%) et deux diterpènes, abiétatriène (jusqu'à 7,2%) et néoabiétadiène (jusqu'à 3,5%) sont présents dans tous les échantillons à des teneurs non négligeables.

Afin d'obtenir une description statistique de notre échantillonnage, nous avons soumis les résultats à une Analyse en Composantes Principales (ACP) et parallèlement nous avons mis en œuvre l'algorithme de partition des centres de groupes (k -means) (Figure IV. 4). L'analyse statistique indique que nous sommes manifestement en présence d'un seul type de composition chimique, avec néanmoins des variations de pourcentage d'un échantillon à l'autre en ce qui concerne les composés majoritaires. Le tableau IV. 12 présente trois compositions différentes, respectivement dominées par des monoterpènes (échantillon n°20), des sesquiterpènes (échantillon n°6) et des diterpènes (échantillon n°30) ainsi que les pourcentages minimum et maximum de chacun des constituants pour tous les autres échantillons.

Figure IV. 4. ACP de 46 échantillons d'huiles essentielles de feuilles de *P. pinaster*

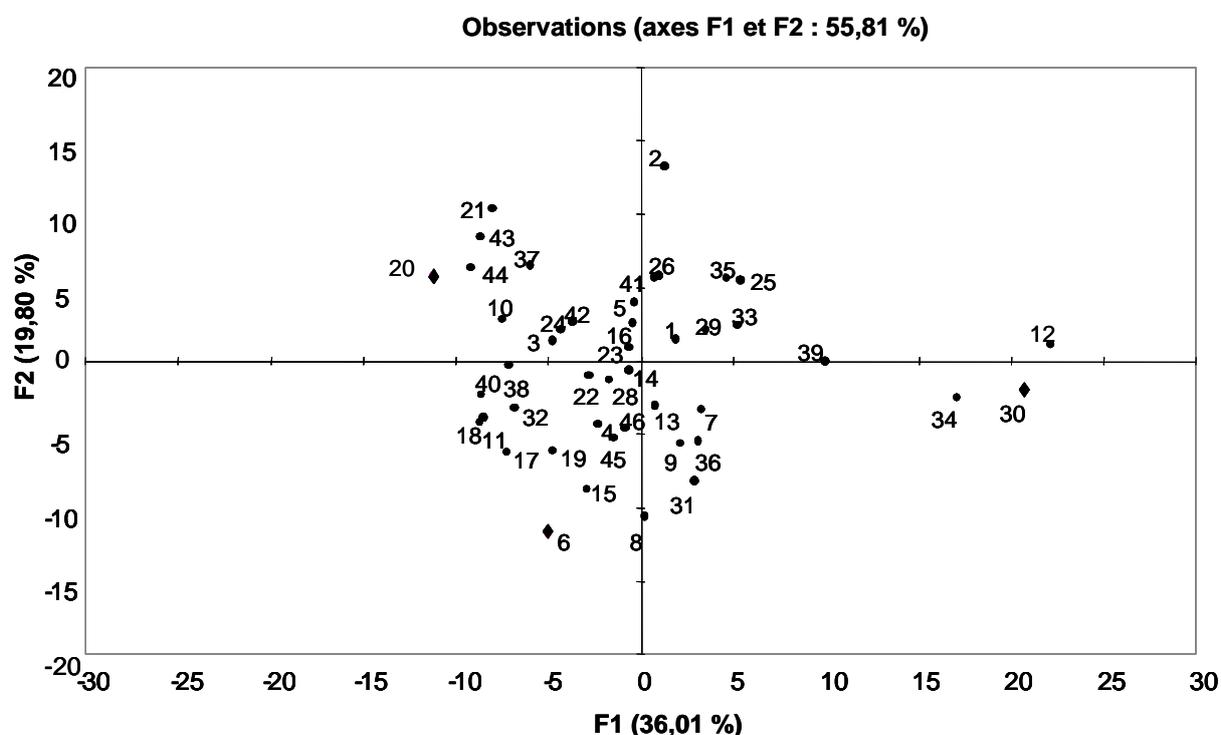


Tableau IV. 12. Composition chimique de trois échantillons d'huile essentielle de *P. pinaster* de Corse

N°	Composés	Ir		Echantillons			Min	Max
		BP-1	BP-20	20	6	30		
1	tricyclène	921	1028	tr	tr	tr	0,0	0,2
2	α -pinène	932	1028	26,8	8,7	8,1	6,7	29,4
3	camphène	944	1071	0,3	0,1	0,2	tr	0,5
4	β -pinène	971	1113	1,2	0,5	0,4	0,4	15,7
5	myrcène	982	1164	3,0	2,8	2,9	0,5	7,6
6	δ -3-carène	1006	1151	1,8	1,6	0,1	0,0	5,8
7	limonène*	1022	1203	0,8	1,8	0,2	0,2	3,5
8	β -phellandrène*	1022	1213	0,4	0,2	0,3	0,2	1,1
9	(Z)- β -ocimène	1025	1230	tr	tr	-	0,0	0,6
10	(E)- β -ocimène	1036	1249	tr	tr	tr	0,0	0,2
11	γ -terpinène	1048	1245	tr	-	tr	0,0	0,9
12	terpinolène	1078	1284	1,1	0,3	0,2	0,2	1,4
13	linalol	1081	1543	0,1	0,2	tr	0,0	0,3
14	terpinèn-4-ol	1160	1598	tr	tr	tr	0,0	0,8
15	α -terpinéol	1171	1696	0,3	0,5	0,8	0,2	1,6
16	acétate de bornyle	1268	1578	0,1	tr	tr	0,0	0,2
17	acétate de gèranyle	1360	1748	tr	0,6	0,1	0,0	1,3
18	méthyleugénol	1367	2014	tr	tr	0,1	0,0	0,4
19	α -ylangène	1372	1476	tr	tr	0,3	0,0	0,3
20	α -copaène	1377	1488	0,7	0,3	0,4	tr	0,9
21	β -bourbonène	1385	1515	tr	tr	tr	0,0	0,2
22	β -élémente	1388	1589	0,2	0,3	0,1	tr	0,3
23	longifolène	1408	1571	0,1	0,3	0,2	tr	1,8
24	(E)- β -caryophyllène	1420	1597	11,7	14,1	5,4	4,4	19,9
25	β -copaène	1431	1581	0,2	0,2	0,2	0,0	0,9
26	β -gurjunène	1439	1591	tr	tr	0,2	0,0	0,2
27	α -humulène	1453	1670	1,7	2,2	0,9	0,4	3,0
28	2-méthylbutyrate de phényléthyle	1461	1975	0,4	0,5	0,3	0,1	1,0
29	isovalérate de phényléthyle	1464	1980	1,5	1,5	0,5	0,2	2,4
30	γ -muurolène	1472	1681	0,8	0,9	1,3	0,0	1,7
31	germacrène D	1477	1713	13,5	20,1	6,9	1,7	21,4
32	α -muurolène	1485	1719	0,1	tr	0,6	0,0	0,6
33	γ -cadinène	1506	1752	0,5	0,9	0,8	0,0	1,1
34	δ -cadinène	1515	1757	1,4	1,8	2,3	0,6	3,0
35	cadina-1,4-diène	1518	1763	tr	-	tr	0,0	0,2

36	α -cadinène	1525	1743	tr	tr	0,1	0,0	0,2
37	α -(E)-bisabolène	1532	1753	0,3	1,3	0,5	0,1	1,3
38	(E)-nérolidol	1545	2039	0,2	0,1	tr	0,0	0,2
39	oxyde de caryophyllène	1571	1986	0,7	0,5	tr	0,0	0,9
40	isovalérate de néryle	1581	1897	0,1	0,1	tr	0,0	1,2
41	isovalérate de géranyle	1586	1920	0,6	0,2	0,6	0,0	1,1
42	épi-cubénol	1616	2067	tr	1,0	0,1	0,0	1,0
43	γ -eudesmol	1626	2171	0,6	0,3	0,4	0,0	0,8
44	τ -muurolol	1628	2181	0,2	0,5	tr	0,0	0,6
45	τ -cadinol	1638	2171	0,3	tr	0,7	0,0	0,9
46	α -cadinol	1641	2233	0,1	0,9	-	0,0	1,0
47	bulnésol	1651	2200	0,1	tr	0,2	0,0	0,2
48	(2E,6E)-farnesol	1699	2355	tr	0,3	0,1	0,0	3,4
49	acétate de (2Z,6E)-farnesyle	1814	2264	0,1	0,9	0,3	0,1	1,7
50	palustradiène ⁺	2017	2341	2,4	7,0	10,9	2,4	12,8
51	lévopimaradiène ⁺⁺	2023	2352	2,3	5,9	7,3	1,2	18,1
52	abiétatriène ⁺⁺⁺	2049	2498	4,5	3,8	1,2	0,1	7,9
53	abiétadiène ⁺⁺⁺⁺	2090	2473	8,0	8,5	32,3	6,8	34,2
54	isoabiénol	2099	2734	-	0,3	0,3	0,0	0,5
55	déhydroabiétal	2112	2651	0,1	0,2	0,2	0,0	0,3
56	néoabietadiène ⁺⁺⁺⁺⁺	2137	2560	0,7	1,4	3,4	tr	4,3
57	labda-8(17)-13(E)-dièn-19-al	2144	2716	-	tr	tr	0,0	0,1
58	labda-8(17)-13(Z)-dièn-15-al	2208	-	0,3	0,4	0,9	tr	1,6
59	labda-8(17)-13(E)-dièn-15-ol	2213	-	1,0	tr	0,7	0,0	1,3
60	labda-8(17)-13(E)-dièn-15-al	2239	-	0,9	0,5	tr	0,0	0,9
Total:				92,2	94,5	94,0		

L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire sauf pour les composés dont les indices sont suivi d'un astérisque (): pourcentages sur colonne polaire. tr: trace (< 0,05%); ⁺synonyme: abieta-8,13-diene, ⁺⁺synonyme: abieta-8,12-diene ;⁺⁺⁺synonyme : déhydroabiétane ;⁺⁺⁺⁺synonyme : abiéta-7,13-diène ;⁺⁺⁺⁺⁺synonyme: abieta-8(14),13(15)-diene.*

La composition chimique de l'huile essentielle de *P. pinaster* de Corse est très différente de celle riche en α -pinène provenant de *P. pinaster* de Russie (Kolesnikova *et al.*, 1983), du Portugal (Kolesnikova *et al.*, 1983), ou d'Argentine (Valente *et al.*, 1969). Peu d'échantillons de Corse, possèdent l' α -pinène et le β -pinène comme composés majoritaires, comme c'est le cas dans des huiles essentielles d'Italie (Macchioni *et al.*, 2003), du Portugal (Carmo *et al.*, 1986) et de France (Kubeczka et Schultze *et al.*, 1987).

En ce qui concerne les échantillons riches en sesquiterpènes, plusieurs d'entre eux possèdent un taux assez important de (E)- β -caryophyllène et de germacrène-D, ces composés pouvant même être dans certains cas majoritaires. Cependant, bien que ces compositions chimiques montrent certaines ressemblances avec celles de France (Pauly *et al.*, 1973) (forêts des Landes) ou de Grèce (Petraakis *et al.*, 2001, 2005), aucun de nos échantillons ne renferme comme composés majoritaires le longifolène ou l'allo-aromadendrene, caractéristiques de plusieurs huiles essentielles d'Algérie (Dob *et al.*, 2005) et d'Espagne (Garcia-Vallejo, 1994).

Il est difficile de comparer les compositions chimiques riches en diterpènes de Corse et d'Espagne (Domiguez Garrido *et al.*, 1988). En effet, en ce qui concerne ces derniers, les auteurs mentionnent la présence de diterpènes sans pour autant les identifier. Quoiqu'il en soit, une composition chimique de l'huile essentielle d'aiguilles de pin maritime renfermant une teneur aussi élevée en diterpènes (pouvant aller jusqu'à 61%) est reportée pour la première fois à notre connaissance.

IV. LES RESINES DE PIN MARITIME

Lors d'une étude précédente réalisée au laboratoire, il a été montré que les résines de *Pinus nigra* ssp. *laricio* poussant dans les différentes forêts de Corse présentaient une variabilité dans leur composition chimique. Par ailleurs, si de nombreuses études ont été réalisées sur l'isolement et l'identification structurale des acides résiniques, très peu d'entre elles concernent la composition chimique globale des résines. En conséquence, il nous a semblé intéressant d'examiner la composition des résines de *Pinus pinaster* de Corse et de mettre en évidence une éventuelle variabilité chimique.

IV. 1. Identification et quantification des acides résiniques des oléorésines du pin maritime

Nous avons choisi d'étudier les fractions acides des résines car elles constituent l'essentiel de la résine et d'après la bibliographie (paragraphe II.2.), les fractions

neutres présentent pas ou peu de variabilité chimique. Pour cela, nous avons récolté vingt-trois échantillons d'oléorésines par gemmage d'individus adultes dans trois forêts de Corse (Vizzavona, Pont du Vecchio, Guagno) et nous les avons soumis à un lavage acido-basique, afin d'obtenir les fractions acides correspondantes.

Pour réaliser l'identification et la quantification des constituants des fractions acides, nous avons choisi d'utiliser la RMN ^{13}C selon un protocole mis en place au laboratoire (Rezzi *et al.*, 2002), plutôt que la CPG après dérivation. En effet, la RMN ^{13}C permet, avec un temps d'analyse compatible avec l'étude de la variabilité chimique, d'identifier et de quantifier les diterpènes en mélange alors qu'en CPG, certains composés majoritaires comme les acides lévopimarique et palustrique sont toujours quantifiés ensemble du fait de leur co-élution, ce qui peut être préjudiciable dans le cas d'une étude de la variabilité chimique. La méthode d'analyse que nous utilisons est assez rapide et permet d'obtenir un rapport S/B suffisant pour l'identification des composés en mélange, sans avoir à attendre la période de cinq fois T_1 du T_1 le plus long (les valeurs des T_1 des carbones des acides résiniques étant comprises entre 0,2 à 2,0s). La séquence utilise un angle d'impulsion de 30° (bon compromis entre la génération d'un rapport S/B suffisant et des écarts de magnétisation restaurée relativement faibles pour les noyaux de T_1 différents) et une période d'attente entre deux acquisitions successives de 1,4s. Ainsi, l'enregistrement d'un spectre de 5000 accumulations est réalisé en deux heures, ce qui correspond à un temps d'analyse raisonnable pour l'étude de la variabilité chimique. La quantification de ces composés est réalisée par comparaison de l'aire moyenne des signaux de leur carbones protonés avec celles des méthylènes du diglyme (référence interne, $T_1=3,8\text{s}$).

Les fractions acides des résines ont été analysées par RMN ^{13}C (identification et quantification). L'enregistrement des spectres a été réalisé dans les conditions quantitatives citées ci-dessus. Les constituants ont été identifiés à partir de ces spectres, en utilisant notre logiciel d'aide à l'identification par interrogation de la banque de spectres « acides résiniques » du laboratoire. Les constituants identifiés ont été ensuite quantifiés en utilisant la formule [1] suivante, à partir de 30 à 50% de leurs signaux. Pour chacun des composés, nous avons pris soin, dans un souci

d'homogénéité, de toujours utiliser la même série de signaux, à savoir les signaux des carbones protonés, non superposés et parfaitement résolus. Les résultats sont reportés dans le tableau IV. 13.

$$m_C = \frac{2A_C \times M_C \times m_R}{A_R \times M_R} \quad [1]$$

A_C et A_R : Aires des signaux des carbones pris en compte respectivement pour le composé considéré et pour la référence interne (diglyme), m_R : quantité en mg de diglyme, M_R : masse molaire du diglyme ($134,17\text{g.mol}^{-1}$) ; M_C : masse molaire du composé considéré. Le facteur 2 est dû à la symétrie de la molécule de diglyme.

De manière à accéder au rapport des différents acides, nous avons exprimé la masse de chaque acide comme un pourcentage (%C) calculé selon la formule [2].

$$\% C = \frac{m_C}{m} \times 100 \quad [2]$$

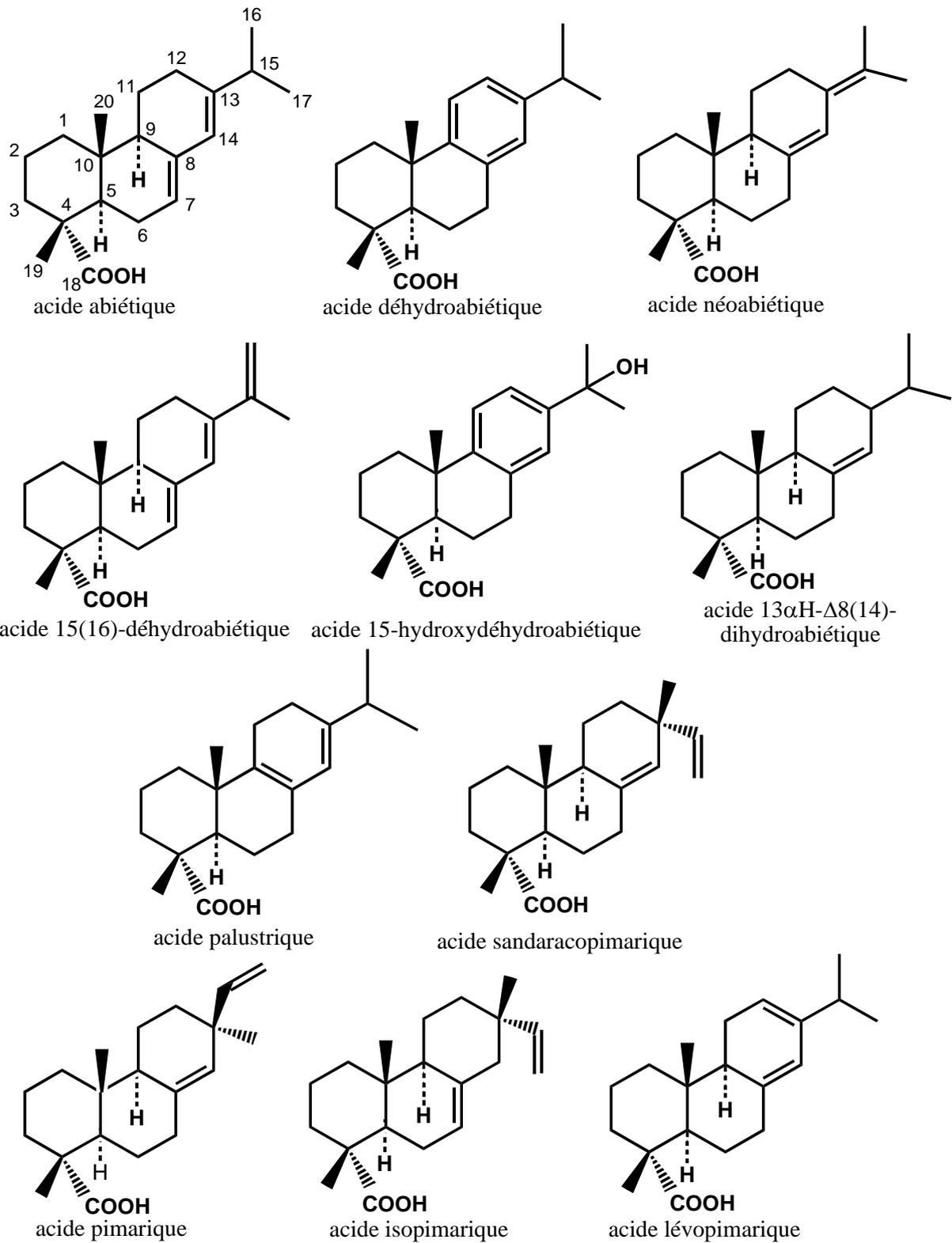
%C : pourcentage de chaque composés ; m_c : masse calculée à partir de la formule [2] pour chaque composé, en mg ; m : masse totale de l'échantillon.

Sur l'ensemble de l'échantillonnage, nous avons identifié 11 acides résiniques (Figure IV. 5). Nous remarquons que les acides déhydroabiétique (5,2-37,6%), abiétique (9,6-24,7%), pimarique (5,2-17,2%), isopimarique (1,6-15,5%), palustrique (4,6-13,6%) et néoabiétique (2,1-13,3%) sont présents dans tous les échantillons. A côté de ces constituants, l'acide lévopimarique apparaît dans 22 échantillons à des teneurs parfois importantes (jusqu'à 35,5%) et l'acide sandaracopimarique dans 19 échantillons à des teneurs voisines de 1%. A l'opposé, l'acide 13- α H- Δ 8(14)-dihydroabiétique et l'acide 15-hydroxydéhydroabiétique ne sont présents que dans quatre échantillons à des teneurs comprises respectivement entre 0,7-4,6% et 1,5-8,8%. L'acide 15(16)-déhydroabiétique n'est identifié que dans deux échantillons à 1,4 et 2,8% (Tableau IV. 13) .

Tableau IV. 13. Composition chimique des 23 fractions acides d'oléorésine de *P. pinaster* de Corse

Lieu de recolte	Guagno							Pont du Vecchio							Vizzavona								
Echantillons	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
ac. abiétique	12,4	13,7	12,7	15,3	13,6	13,0	12,9	11,4	15,6	24,2	24,7	12,0	16,7	22,6	18,8	16,1	15,4	14,7	15,5	13,8	12,3	16,4	9,6
ac. déhydroabiétique	5,2	6,8	23,2	12,2	5,2	23,3	20,6	36,5	18,4	27,3	23,2	11,6	37,6	20,9	11,7	28,6	22,1	18,2	16,3	20,3	16,6	10,9	17,1
ac. néoabiétique	12,9	12,2	3,8	9,3	13,3	4,6	4,8	2,8	8,0	3,6	4,4	10,9	2,1	5,6	9,5	6,4	6,8	7,3	6,8	7,3	8,2	9,3	6,3
ac. 15(16)- déhydroabiétique	-	-	-	1,4	-	-	-	-	2,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ac. 15-OH- déhydroabiétique	-	-	-	1,5	-	-	-	-	5,7	-	-	-	8,8	-	-	-	-	-	-	-	3,8	-	-
ac. 13- α -H- Δ 8(14)- déhydroabiétique	-	-	-	0,7	-	-	-	-	2,3	-	-	-	4,6	-	-	-	-	-	-	-	1,3	-	-
ac. palustrique	8,0	9,9	4,6	9,1	10,3	11,1	7,1	6,4	10,0	6,1	7,0	7,9	3,3	9,7	9,5	10,0	10,9	10,6	13,6	10,4	7,4	13,3	7,7
ac. pimarique	5,2	7,7	10,1	7,9	6,4	15,3	9,0	17,2	8,8	9,3	8,1	10,0	10,1	7,2	10,6	12,2	8,7	12,2	10,8	9,3	13,1	12,3	14,0
ac. lévopimarique	35,5	20,5	7,9	16,0	24,9	8,7	9,6	1,0	11,8	4,8	1,0	19,5	0,0	7,0	13,9	12,0	10,8	13,0	10,0	11,8	12,4	19,5	20,2
ac. isopimarique	2,2	3,0	10,8	3,6	5,1	1,6	6,4	3,4	5,0	11,4	15,5	8,3	5,2	7,5	14,1	7,0	6,6	4,3	6,8	6,2	5,6	4,4	7,9
ac. sandaracopimarique	-	1,4	1,7	1,5	1,2	1,3	1,3	3,7	1,4	1,5	-	1,4	-	0,7	0,7	1,1	-	1,4	1,3	1,1	1,3	1,7	2,6
pinorésinol	-	-	6,4	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1	2,6	2,0	-	-	-	2,8	0,3	-	7,7
Total:	81,4	75,2	81,2	79,7	80,0	79,0	71,8	82,4	89,8	88,2	83,9	81,6	88,4	82,3	91,4	95,4	81,3	81,7	81,1	83,0	82,3	87,8	93,1

Figure IV. 5. Structure des acides résiniques présents dans l'oléorésine de pin maritime



IV. 2. Identification et quantification du pinorésinol

En général, il ne reste sur le spectre de RMN ^{13}C qu'un nombre limité de signaux, avec des intensités faibles par rapport à celles des acides identifiés. Néanmoins, dans les spectres de huit échantillons (n° 3, 4, 14, 15, 16, 20, 21, 23), on note la présence d'une série de dix déplacements chimiques non attribués, avec une intensité des signaux assez importantes dans les échantillons 3 et 23 (ce qui permet de bien repérer les dix signaux). L'interrogation de notre bibliothèque de spectres de diterpènes construite à partir des données de la littérature ne donne pas non plus de résultat.

Nous avons alors tenté de retrouver la structure de cette molécule à l'aide des valeurs de ses déplacements chimiques et de la multiplicité des signaux. Pour cela, nous avons enregistré des spectres en utilisant la série de séquences DEPT, à partir de l'échantillon n°3 dans lequel la teneur du composé inconnu est la plus élevée d'après les intensités de ses signaux (intensité entre 9,5/100 et 20,7/100).

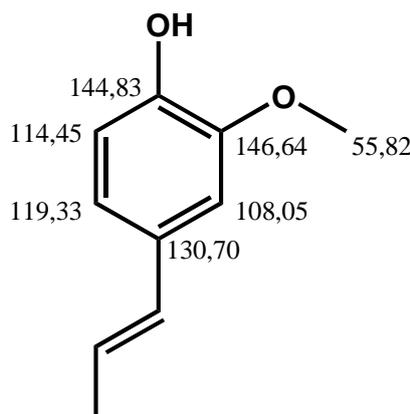
Ainsi nous avons mis en évidence :

- 3 carbones quaternaires à 146,74 ; 145,22 et 132,82 ppm
- 5 groupements méthynes (CH) : 118,99 ; 114,31 ; 108,65 ; 85,86 ; 54,11 ppm
- 1 groupement méthylène (CH_2) : 71,63 ppm
- 1 groupement méthyle (CH_3) : 55,96 ppm.

L'examen de ces données (six signaux de carbone sp^2 dont trois quaternaires et trois CH et un CH_3O -) indique que l'on est probablement en présence d'un motif guaiacol (2-méthoxyphénol) substitué par une chaîne, comme en témoigne la bonne concordance de plusieurs de ces valeurs avec celles du (*E*)-isoeugenol. Le carbone quaternaire restant (132,82 ppm) correspond probablement au carbone C4 du cycle aromatique. Quant aux trois derniers carbones, on peut imaginer qu'ils appartiennent à la chaîne propanoïque. Les valeurs correspondantes des signaux, combinées à la multiplicité montrent qu'il s'agit vraisemblablement de groupements CH-O - (85,86 ppm), $\text{CH}_2\text{-O}$ (71,63 ppm) et d'un CH aliphatique (54,11 ppm). Nos différentes bibliothèques de composés de référence (laboratoire et littérature) ne contiennent pas

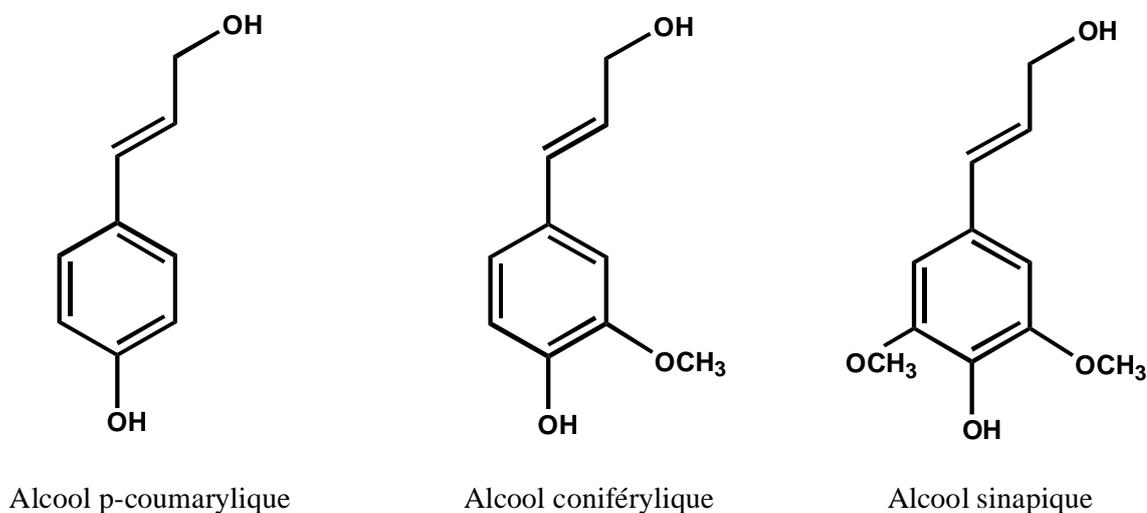
de phénylpropanoïde dont la chaîne carbonée soit doublement substituée par un oxygène. Il devenait alors probable que nous n'étions pas en présence d'un phénylpropanoïde monomère, mais plutôt d'un dimère symétrique (Tableau IV. 14).

Tableau IV. 14. Comparaison des données RMN ^{13}C du (*E*)-isoeugenol et de la molécule non-identifiée

<i>(E)</i> -isoeugenol	δ (<i>E</i>)-isoeugenol (ppm)	δ Molécule non identifiée (ppm)
	146,64	146,74
	144,83	145,22
	130,70	132,82
	119,33	118,99
	114,45	114,31
	108,05	108,65
	55,82	55,93

Nous avons alors orienté nos recherches vers la famille des lignanes, qui ont pour précurseurs les trois phénylpropanoïdes classiques à chaîne oxygénée : l'alcool coniférylique, l'alcool *p*-coumarylique et l'alcool sinapique (Figure IV. 6). L'alcool coniférylique possède le motif guaiacol, tout comme la molécule dont nous recherchons la structure. Les lignanes constituent un vaste groupe de substances naturelles polyphénoliques très répandues chez les végétaux supérieurs et des centaines de molécules appartenant à cette famille ont déjà été identifiées dans diverses familles de plantes. Néanmoins, si l'on se réfère aux nombreuses publications concernant ce sujet, il apparaît que trois lignanes sont trouvés dans les végétaux à une fréquence et une teneur beaucoup plus élevées que les autres : il s'agit du laricirésinol, du secoisolaricirésinol et du pinorésinol.

Figure IV. 6. Structures de l'alcool *p*-coumarylique, l'alcool sinapique et l'alcool coniférylique



A partir des données RMN ^{13}C de ces trois composés, nous avons identifié le pinorésinol, dont les déplacements chimiques dans le spectre du mélange correspondent avec ceux qui sont décrits par Fonseca *et al.* (1979) (Tableau IV. 15). Cette molécule qui possède un élément de symétrie et dont la structure est une des plus simples de la famille des lignanes, est construite à partir de deux molécules d'alcool coniférylique.

Tableau IV. 15. Déplacements chimiques du pinorésinol

Pinorésinol		C	δ ref (ppm)	δ spectre (ppm)
		1	132,0	132,82
		2	108,8	108,65
		3	146,8	146,71
		4	145,2	145,25
		5	114,4	114,31
		6	118,5	118,99
		7	85,7	85,87
		8	53,7	54,11
		9	71,3	71,63
		OMe	55,6	55,96

Afin de quantifier le pinorésinol en mélange dans la fraction acide des résines de pin maritime, nous avons mesuré les valeurs des T_1 des carbones protonés de ce composé en mélange dans l'une de ces fractions (échantillon n°3). Ces valeurs s'étendent de 0,5 à 1,6s, c'est-à-dire qu'elles sont comprises dans la fourchette de valeurs des T_1 des carbones protonés des acides résiniques (0,2-2,0s), cela indiquait que le pinorésinol pouvait être quantifié dans les mêmes conditions (séquence, référence interne) que les acides diterpéniques, en utilisant donc les mêmes spectres que ceux qui ont servi à son identification. Ainsi, nous avons déterminé que le pinorésinol représente jusqu'à 7,7% (échantillon n°23) de la fraction acide des résines étudiées (Tableau IV. 13).

Chez les plantes vasculaires, les lignanes peuvent être isolés à partir des tiges, des rhizomes, de l'écorce, des racines mais aussi des graines. Ils sont rarement présents à des concentrations élevées, leur teneur excède rarement 1 mg pour 100g de matière sèche de végétal, soit 0,001%. Le pinorésinol et le laricirésinol sont les composés de base de la voie de biosynthèse des lignanes possédant des propriétés phyto-oestrogènes, comme le sécoisolaricirésinol et le matairésinol, susceptibles de prévenir et de limiter le développement de pathologies cardiovasculaires et de certains cancers, particulièrement du poumon et des leucémies (Lamblin *et al.*, 2008). Ces deux derniers composés se trouvent le plus abondamment dans la graine de lin oléagineux (166 et 0,5 mg/100 g de matière sèche soit 0,16% et 0,0005%, respectivement pour le sécoisolaricirésinol et pour le matairésinol) et à de plus faibles concentrations dans les graines de blé, de seigle, de sarrasin, de noix de cajou, de sésame et d'amande. Compte tenu de leur faible abondance naturelle et de leurs propriétés, les lignanes sont des molécules à forte valeur ajoutée. Ainsi, à titre d'exemple, le prix du pinorésinol avoisine 1000€ pour 100 mg de produit pur.

IV. 3. Variabilité chimique des fractions acides d'oléorésines de pin maritime de Corse

Dans le but d'obtenir une description statistique de notre échantillonnage et de pouvoir mettre en évidence une éventuelle variabilité chimique intraspécifique, nous avons réalisé une analyse en composante principale (ACP) à partir des pourcentages des constituants identifiés parmi les 23 échantillons d'oléorésines. La représentation graphique des échantillons suivant les composantes 1 et 2 (Figure IV. 7), qui expriment respectivement 71% et 13% de l'information totale, suggère une répartition des échantillons en deux groupes d'inégale importance. Parallèlement, l'algorithme de partition des centres de groupes (*k*-means) propose une partition optimale des échantillons également en deux groupes (I et II). Les pourcentages moyens (M) ainsi que les écarts types (ET) des constituants dans chacun des deux groupes sont rassemblés dans le tableau IV. 16 et la figure IV. 8.

Figure IV. 7. ACP des échantillons d'oléorésines de Corse

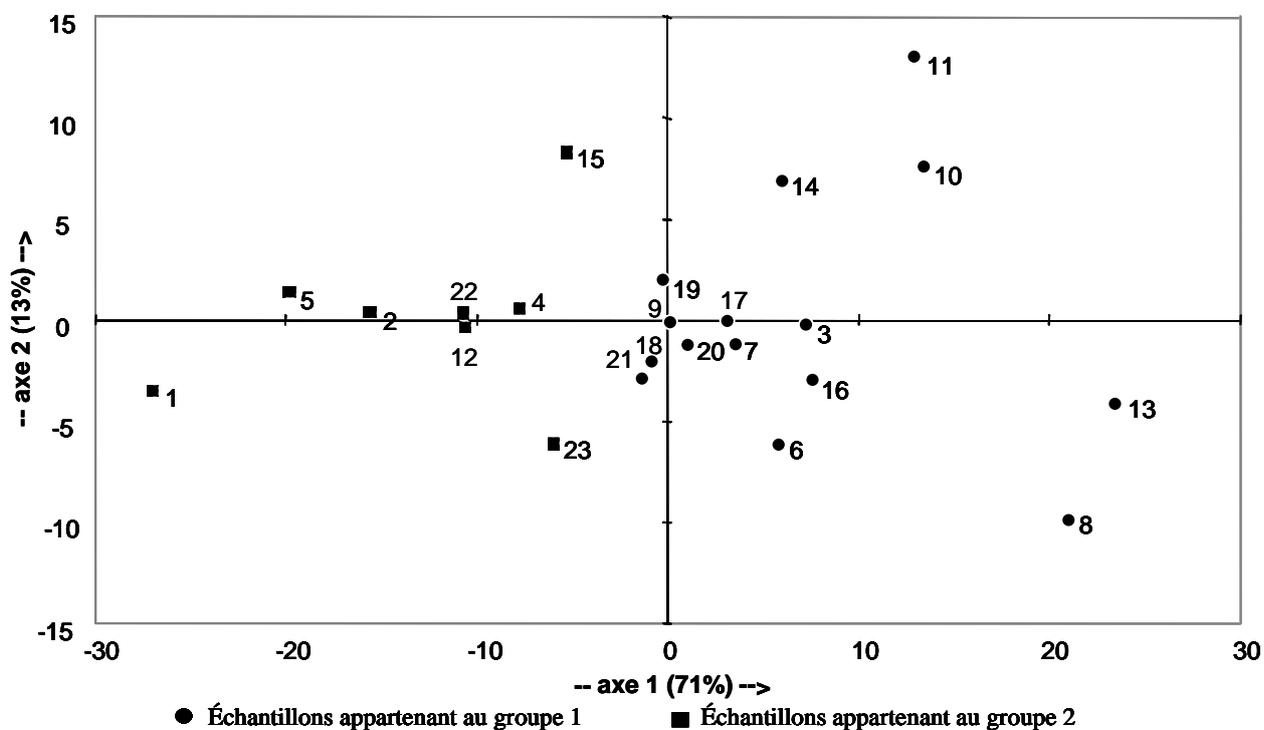


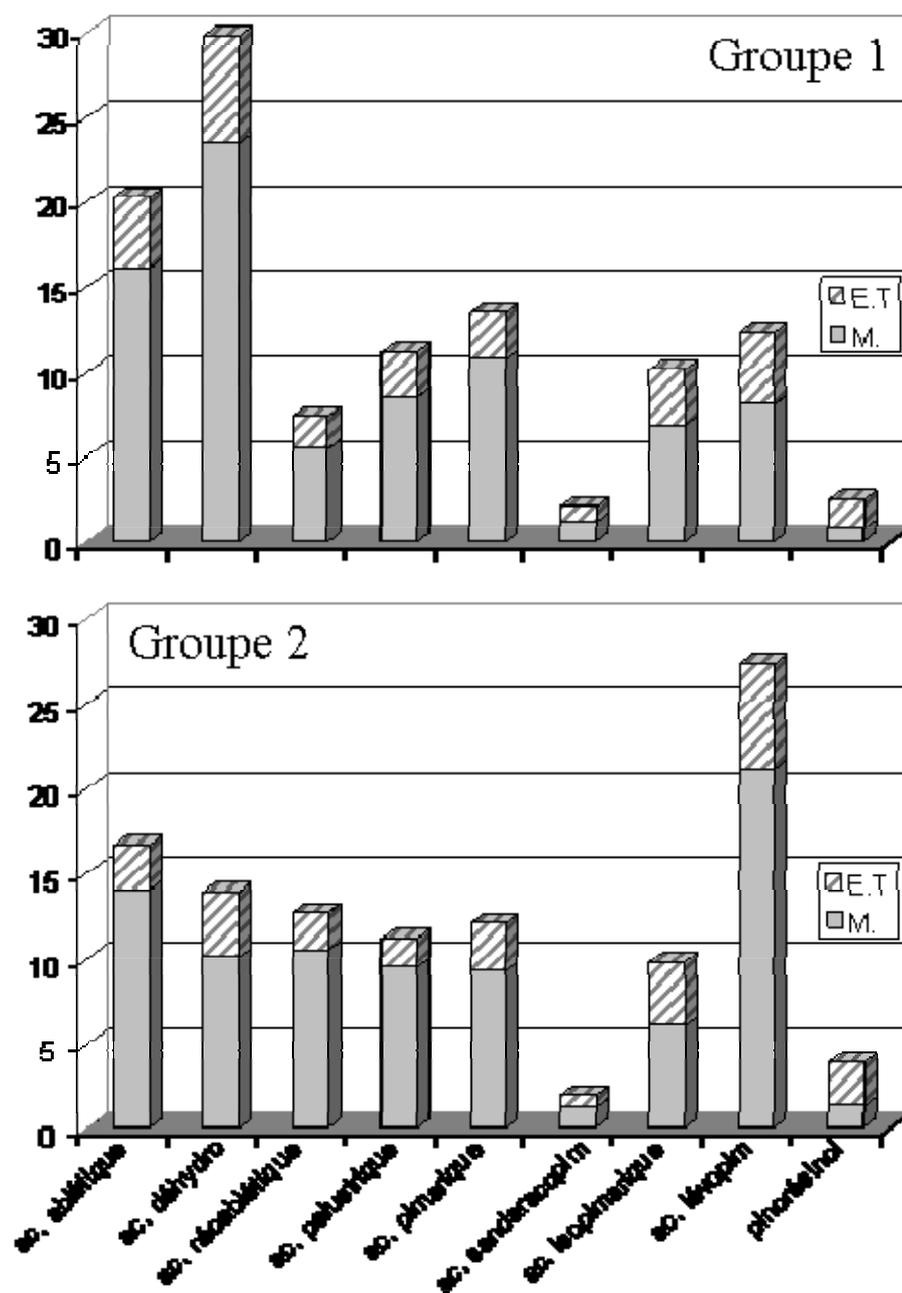
Tableau IV. 16. Moyennes (M.) et Ecart-types (E.T.) des échantillons d'oléorésine des groupes 1 et 2.

Composés	Groupe 1		Groupe 2	
	M.	E.T	M.	E.T
ac. abiétique	16,1	4,2	14,0	2,7
ac. déhydroabiétique	23,5	6,3	10,1	3,8
ac. néoabiétique	5,5	1,9	10,5	2,2
ac. 15(16)-déhydroabiétique	0,2	0,7	0,2	0,5
ac. 15-OH-déhydroabiétique	1,2	2,6	0,2	0,5
ac. 13- α -H- Δ 8(14)-déhydroabiétique	0,5	1,3	0,1	0,2
ac. palustrique	8,5	2,7	9,5	1,7
ac. pimarique	10,8	2,7	9,3	2,8
ac. sandaracopimarique	1,2	0,9	1,3	0,7
ac. isopimarique	6,9	3,3	6,1	3,7
ac. lévopimarique	8,1	4,3	21,2	6,2
pinorésinol	0,8	1,7	1,4	2,5

Ainsi les échantillons du groupe I (15 échantillons), sont caractérisés par une teneur importante en acide déhydroabiétique (M = 23,5%; ET = 6,3), qui est le produit majoritaire devant les acides abiétique (M = 16,1%; ET = 4,2), pimarique (M = 10,8%; ET = 2,7), palustrique (M = 8,5%; ET = 2,7), lévopimarique (M = 8,1%; ET = 4,3) et isopimarique (M = 6,9%; ET = 3,3), les autres constituants n'atteignant pas 6% chacun. Deux échantillons (n°8 et n°13) se distinguent par leur faible teneur en acide lévopimarique (1,0 et 0,0% respectivement) et leur teneur très élevée en acide déhydroabiétique (36,5 et 37,6% respectivement).

Le groupe II (8 échantillons) comprend les échantillons dans lesquelles le composé majoritaire est l'acide lévopimarique (M = 21,2%; ET = 6,2), suivi des acides abiétique (M = 14,0%; ET = 2,7), néoabiétique (M = 10,5%; ET = 2,2), palustrique (M = 9,5%; ET = 1,7), déhydroabiétique (M = 10,1%; ET = 3,8) et pimarique (M = 9,3%; ET = 2,8), tandis que les autres composés ne dépassent pas 6% chacun.

Figure IV. 8. Principaux composés des échantillons d'oléorésines de *P. pinaster* de Corse



Nous remarquons que les huit échantillons renfermant du pinorésinol (0,3-7,7%) se répartissent dans les deux groupes. Par ailleurs, nous constatons que les échantillons des deux groupes sont trouvés dans toutes les stations, la localisation n'influe donc pas sur la composition chimique. A notre connaissance, aucune étude portant sur la composition chimique de l'oléorésine issue du gemmage de *P. pinaster* de Corse n'est reportée dans la littérature. Cependant, plusieurs études reportent la composition en acides diterpéniques d'oléorésines de pins maritimes de diverses

provenances. L'une d'elles concerne des arbres du sud de la France (d'origine corse et landaise (Walter *et al.*, 1985)) et les deux autres des arbres d'Espagne (Arrabal *et al.*, 2002, 2005). Dans ces études, les acides lévopimarique et palustrique ne sont pas quantifiés individuellement à cause de leur co-élution en CPG. Ainsi, nous pouvons faire les remarques suivantes :

- Les échantillons d'Espagne et de France décrits dans la littérature se rapprochent de nos échantillons appartenant au groupe II, par la prépondérance du couple «acides lévopimarique/palustrique », en supposant que l'acide lévopimarique est prépondérant sur l'acide palustrique dans les échantillons de la littérature, ainsi que de l'acide abiétique également présent à des teneurs appréciables.
- En revanche, les échantillons du groupe I se différencient de ceux décrits dans la littérature par l'acide déhydroabiétique, produit majoritaire qui n'est présent qu'à de faibles teneurs dans les fractions acides des oléorésines de *P. pinaster* d'Espagne et de France.

En conclusion, l'analyse par RMN ¹³C de la fraction acide de 23 échantillons de résines de *P. pinaster* de Corse a permis de mettre en évidence deux types de composition chimique, sur la base des teneurs en acides déhydroabiétique et lévopimarique. Par ailleurs, cette étude a également révélé, pour la première fois à notre connaissance dans les oléorésines, la présence d'un lignane (jusqu'à 7,7%).

CONCLUSION

Ce travail, réalisé au sein de l'UMR UCPP-CNRS 6134 « Sciences Pour l'Environnement », axe « Ressources Naturelles », s'est inscrit dans le cadre de la valorisation non énergétique de la biomasse végétale. En effet, outre son utilisation à des fins énergétiques (combustion ou production de bio-carburants), la biomasse végétale représente un vaste réservoir de produits naturels à forte valeur ajoutée. À titre d'exemple, l'activité forestière génère chaque année en Corse une quantité importante de biomasse résiduelle, abandonnée sur place, susceptible de constituer une matière première intéressante pour la production d'huiles essentielles ou d'extraits végétaux. En effet, l'exploitation de ces produits pourrait contribuer à rendre l'utilisation de la biomasse plus attractive économiquement. Cependant, la valorisation de ces produits naturels, qui sont pratiquement toujours des mélanges complexes, passe souvent par une étape préalable d'analyse dans le but de les caractériser, d'en contrôler la qualité ou bien encore de mettre en évidence une éventuelle spécificité (biodiversité insulaire). L'analyse des mélanges naturels est une opération délicate qui demande compétence et expérience. Elle nécessite la mise en œuvre de techniques qui sont adaptées au type de produit que l'on traite et au type d'information que l'on attend. Deux stratégies sont actuellement privilégiées pour ces analyses :

- la première se base sur le couplage « en ligne » d'une technique chromatographique (en général la CPG pour les composés volatils et éventuellement la CLHP) qui individualise les constituants du mélange et une technique spectroscopique, (la SM ou l'IRTF ou éventuellement la RMN du proton), qui permet d'identifier les constituants par comparaison avec les données spectrales de produits de référence contenues dans une bibliothèque de spectres ;
- la deuxième démarche s'apparente à celle employée lors de l'analyse structurale d'une nouvelle molécule puisqu'elle consiste à purifier, par des techniques chromatographiques, les constituants du mélange complexe avant de les identifier par comparaison de leurs caractéristiques spectrales (incluant les informations fournies par la RMN du proton et si possible du carbone-13), avec celles de produits de référence.

Depuis quelques années, l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse a mis en œuvre et développé une méthode d'identification des constituants des

mélanges naturels, basée sur l'analyse assistée par ordinateur, du spectre de RMN ^{13}C , sans séparation préalable ou avec une étape de séparation réduite au minimum. Le principe de cette méthode repose sur la comparaison, grâce à un logiciel d'aide à l'identification, des signaux contenus dans le spectre du mélange avec ceux des spectres de composés de référence contenus dans diverses bibliothèques, construites avec des spectres enregistrés au laboratoire ou avec les données de la littérature récente.

Ce travail de thèse a d'abord consisté à montrer les différentes possibilités de la méthode d'analyse par RMN ^{13}C à travers i) l'étude d'huiles essentielles du genre *Cymbopogon*, ii) l'étude de la variabilité chimique des huiles essentielles d'hybrides entre clémentine commune et mandarine Willow Leaf et iii) la mise au point d'une méthode de quantification du dipropylène glycol. Ensuite d'un point de vue plus finalisé, diverses méthodes d'analyse ont été appliquées à la caractérisation des huiles essentielles extraites à partir de végétaux poussant à l'état spontané en Corse, à savoir quatre espèces de genévriers (*Juniperus thurifera*, *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa*, *J. communis* var. *communis* et *J. communis* ssp. *alpina*) ainsi que le pin maritime (*Pinus pinaster*) dont nous avons aussi étudié la composition des résines.

Dans le premier chapitre, nous avons décrit une synthèse bibliographique des principales techniques d'analyse des mélanges naturels. Puis, nous avons tout d'abord positionné notre méthode d'analyse par RMN ^{13}C par rapport aux méthodes conventionnelles et nous avons détaillé les domaines dans lesquels elle présente un intérêt particulier.

Le deuxième chapitre avait pour but de montrer l'étendue des domaines d'application de la RMN ^{13}C . Nous avons décrit dans un premier volet, la composition chimique de l'huile essentielle de trois espèces de *Cymbopogon* : *C. winterianus*, *C. flexuosus* et *C. tortilis*. Pour cela, nous avons utilisé la complémentarité de la chromatographie sur colonne de silice (CC), de la CPG associée aux indices de rétention (Ir), de la CPG-SM et de la RMN ^{13}C . Ces huiles essentielles sont caractérisées par la prédominance soit du géraniol soit du couple néral/géranial. La

RMN ^{13}C s'est révélée particulièrement utile pour l'identification de deux monoterpènes tétrahydrofuraniques isomères, les *cis* et *trans*-7-hydroxy-3,7-diméthyl-(3,6)-oxyoctanal. Dans un deuxième volet, nous avons examiné la variabilité chimique des huiles essentielles de zestes de 68 hybrides mandarines entre Willow Leaf et Clementine commune. Cette étude a été réalisée dans la continuité de travaux menés au laboratoire, en collaboration avec le centre INRA de Corse, qui concernaient la caractérisation d'huiles essentielles de feuilles des mêmes hybrides. Elle avait pour objectif de déterminer si les huiles essentielles de feuilles de jeunes plantules peuvent être utilisées comme marqueurs précoces du profil aromatique des fruits, ce qui n'est pas le cas. Enfin, dans un troisième volet, nous avons exposé la mise au point d'une méthode de quantification du dipropylène glycol par RMN ^{13}C . Ce composé, qui se présente sous la forme de plusieurs isomères, entre dans la formulation de nombreux produits industriels et cosmétiques. Nous avons quantifié ce composé dans deux « extraits de parfum » commerciaux.

Dans le troisième chapitre, nous avons décrit la composition chimique d'huiles essentielles de quatre espèces du genre *Juniperus*, poussant à l'état spontané en Corse. Pour chacune des espèces, nous avons réalisé un échantillonnage aussi important que possible en fonction de la disponibilité de la plante. Les huiles essentielles, préparées par hydrodistillation, ont été analysées par combinaison de différentes techniques, CC, CPG(Ir), CPG-SM, RMN ^{13}C . Les résultats des analyses ont été soumis à un traitement statistique des données (ACP, k-means) quand le nombre d'échantillons était suffisant.

- En ce qui concerne *J. thurifera*, l'analyse détaillée d'un échantillon d'huile essentielle de feuilles a conduit à l'identification de 42 composés qui représentent environ 94% de la composition chimique totale. Par ailleurs, l'analyse de 16 échantillons indique que la composition chimique est globalement dominée par le limonène, avec néanmoins deux échantillons atypiques.

- Dans le cas de *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa*, 18 échantillons d'huile essentielle d'aiguilles ont été analysés. Au total, 58 composés représentant de 81% à 95% de la composition chimique globale de chaque échantillon ont été identifiés. La teneur en α -pinène, qui est toujours le composé majoritaire, varie considérablement d'un

échantillon à l'autre (28,7-76,4%). Cinq échantillons d'huile essentielle de baies ont également été étudiés. Ils possèdent une composition chimique également dominée par l' α -pinène (56,4- 78,9%), le germacrène D étant présent à des teneurs appréciables (4,5-12,4%).

- Pour ce qui est de *J. communis* var. *communis*, qui est une espèce très localisée en Corse, nous avons analysé un nombre restreint d'huiles essentielles (neuf échantillons d'aiguilles et trois de baies). Dans le cas des huiles essentielles d'aiguilles, deux types de composition chimique se distinguent : α -pinène ultra-majoritaire (2 échantillons) et sabinène/terpinéol-4/ α -pinène dans des proportions variables (7 échantillons). En ce qui concerne les huiles essentielles de baies de cette espèce, l' α -pinène est le composé majoritaire des trois échantillons, néanmoins, ces huiles essentielles se différencient au niveau des constituants secondaires.

- Enfin la dernière partie de ce chapitre concerne *Juniperus communis* ssp. *alpina*, dont les huiles essentielles sont produites en Corse et commercialisées. Nous décrivons d'abord une étude comparative de la composition chimique de huile essentielle d'aiguilles obtenue d'une part par hydrodistillation et d'autre part par micro-onde SFME (Solvant Free Extraction Microwave), méthode rapide et respectueuse de l'environnement. Les résultats montrent une composition très voisine quelle que soit la méthode utilisée, dominée par le limonène, le β -phellandrène et l' α -pinène. Enfin, nous avons complété l'étude de la variabilité chimique des huiles essentielles d'aiguilles, entreprise au laboratoire, par l'analyse d'une quarantaine d'échantillons supplémentaires. Il en résulte que cette huile essentielle présente deux types de composition, l'un dominé par le limonène (92% des échantillons) et l'autre par le sabinène.

Dans le dernier chapitre, nous nous sommes intéressés à l'huile essentielle et aux oléorésines du pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.) poussant à l'état spontané en Corse. Ainsi, nous avons caractérisé l'huile essentielle par l'analyse de 46 échantillons provenant d'aiguilles récoltées dans les différents massifs forestiers de l'île. Nous observons 3 types de compositions dominées respectivement par des monoterpènes (α -pinène), des sesquiterpènes (germacrène D) ou par des diterpènes (abiétadiène), sans

qu'il soit possible pour autant de dégager des groupes bien définis. On peut signaler que les compositions très riches en diterpènes, n'ont jamais été rapportées dans la littérature à notre connaissance. Nous avons également décrit la composition chimique de la fraction acide de 23 échantillons d'oléorésines de pin maritime, provenant de trois forêts de Corse. Sur l'ensemble de l'échantillonnage, nous avons identifié 11 acides résiniques. L'analyse statistique (ACP, *K*-means) de ces résultats suggère l'existence de deux groupes, sur la base des teneurs des acides lévopimarique et déhydroabiétique. De plus, le pinorésinol, produit à forte valeur ajoutée de la famille des lignanes, a été mis en évidence, pour la première fois à notre connaissance, dans des résines de pins.

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel végétal et échantillonnage

Hybride clémentinier commun x mandarinier Willow Leaf

Le matériel végétal provenant de la station INRA-CIRAD de San Ghjulianu est située aux latitudes 42°27'N et longitude 9°32'E. Il correspond à 70 arbres provenant du croisement entre le clémentinier commun (SRA85) et le mandarinier Willow Leaf (SRA113). Ce croisement a été réalisé en 1995 par pollinisation de fleurs du clémentinier à l'aide du pollen du mandarinier. Les échantillons de fruits ont été prélevés du 21 janvier au 9 mars 2005 dans les mêmes conditions afin que les facteurs environnementaux n'influencent pas la composition chimique des huiles essentielles. Le verger est soumis à un climat méditerranéen, le sol est acide (pH 5,0-5,6) et constitué d'alluvions. Tous les arbres sont en bon état sanitaire et sont soumis aux mêmes conditions culturales (eau, fertilisants, traitements phytosanitaires) et pédoclimatiques.

Hydrodistillations :

Hybride Clémentinier commun x Mandarinier Willow Leaf

Généralement, les huiles essentielles de zestes sont extraites de façon mécanique (Lota, 1999), par expression à froid du péricarpe des fruits frais. Ceux-ci étant trop fins chez les fruits à notre disposition, nous avons choisi d'effectuer des hydrodistillations des péricarpes. Elles ont été réalisées avec un appareil de type Clévenger et dans un réacteur d'1L ou de 2L selon la quantité de matériel végétal disponible. Après deux heures d'hydrodistillation, l'huile essentielle a été recueillie, conservée au réfrigérateur à l'abri de la lumière. Les rendements ont été calculés par rapport à la masse de végétal frais. Les 70 échantillons d'huiles essentielles sont identifiés par leur position parcellaire (par exemple E5).

Juniperus et Pinus pinaster

Les huiles essentielles de *Juniperus* (baies et feuilles) et de *Pinus pinaster* (aiguilles) ont été préparées au laboratoire par hydrodistillation avec un appareil de type Clévenger (réacteur 2L) jusqu'à extraction totale de l'huile essentielle (entre 3h30 et 4h en moyenne). Les rendements par rapport à la masse de végétal frais sont reportés dans les tableaux respectifs.

Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes (ESSAM):

Les extractions sans solvant assistées par micro-ondes ont été réalisées avec un four micro-ondes de laboratoire Milestone DRYDIST dont les dimensions sont les suivantes 35 cm x 35 cm x 35 cm (recouvert de PTFE). La fréquence micro-ondes est de 2450 MHz avec une puissance maximale de 1200 W. Le contrôle de la température et la programmation sont réalisés à l'aide du logiciel de contrôle : « easy-control ». Les conditions expérimentales sont les suivantes : environ 200 g d'aiguilles de *J. communis* ssp. *alpina* sont placées dans le réacteur de 2 L. La durée d'extraction est de 45 minutes avec une puissance 500W et une température de 200°C.

Chromatographie sur colonne de silice (CC):

Les chromatographies sur colonne de silice (CC) de type « flash », qui permettent de séparer les composés hydrocarbonés des composés oxygénés, ont été réalisées avec de la silice ICN 200-500 μm , 60Å.

L'éther anhydre est préparé par passage sur alumine basique (ICN, alumina B, super 1, 800 mL Et₂O pour 100 g d'alumine) et conservé sur tamis moléculaire Merck, 0,4 nm en perle de 2 mm.

Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG):

Les analyses chromatographiques en phase gazeuse ont été réalisées à l'aide d'un appareil Perkin-Elmer autosystem GC, équipé d'un injecteur diviseur, de deux colonnes (50 x 0,22 mm d.i. ; épaisseur du film : 0,25 μm), apolaire (BP-1, polyméthylsiloxane) et polaire (BP-20, polyéthylène glycol) et de deux détecteurs à ionisation de flamme. Les conditions opératoires sont les suivantes : gaz vecteur, hélium ; pression en tête de colonne : 20 psi ; température de l'injecteur et des détecteurs : 250°C ; programmation de température : de 60 à 220°C (80 min) à 2°C/min, avec un palier de 20 min à 220°C ; injection : mode diviseur avec un rapport 1/60. La quantité d'échantillon injectée est de 0,5 μL d'une solution de 50 μL de mélange (huile essentielle ou fraction de chromatographie) dilué dans 350 μL de CCl₄.

Résonance Magnétique Nucléaire (RMN):

Les spectres de RMN du carbone-13 ont été enregistrés sur un appareil Bruker 400 Avance équipé d'une sonde de 5 mm, opérant à 400,132 MHz pour le proton et à 100,623 MHz pour le carbone. Le solvant utilisé est le chloroforme deutéré CDCl_3 . Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm par rapport au tétraméthyl silane (TMS) pris comme référence interne.

▪ **Huiles essentielles :**

Les spectres RMN du ^{13}C des huiles essentielles ont été enregistrés avec les paramètres suivants :

Angle d'impulsion 45° ; temps d'acquisition = 2,73 s correspondant à une acquisition de 128 K avec une largeur spectrale (SW) de 25000 Hz (250 ppm) ; délai de relaxation $D_1=0,1\text{s}$; résolution digitale de 0,183 Hz/pt. Le nombre d'accumulations est compris entre 2000 et 5000 pour chaque enregistrement. Les données du signal de précession libre (FID) sont multipliées avant la transformée de Fourier par une fonction exponentielle (LB = 1,0 Hz)

▪ **Dipropylene Glycol (DPG)**

Les spectres de RMN ^{13}C utilisés pour identifier et quantifier le DPG ont été enregistrés avec les mêmes paramètres que les huiles essentielles. L'hexane-1,6-diol a été utilisé comme référence interne. Le nombre d'accumulations est compris entre 500 (produit pur) et 1000 (huiles essentielles dopées, extraits de parfum) pour chaque enregistrement.

▪ **Fractions acides des oléorésines de *Pinus pinaster***

Les spectres de RMN ^{13}C utilisés pour identifier et quantifier les acides résiniques et le pinorésinol ont été enregistrés avec les paramètres suivants: sonde de 5 mm ; angle d'impulsion 30° ; découplage total des protons (power gated decoupling) temps d'acquisition 1,36 s correspondant à une acquisition de 64 K, délai de relaxation $D_1 = 0,1\text{s}$, largeur spectrale (SW) de 25000 Hz (250 ppm) ; résolution digitale de 0,366 Hz/pt ; référence interne : diglyme (10 à 14 mg). Le nombre d'accumulations est de 5000 pour chaque enregistrement.

▪ **Mesure des temps de relaxation longitudinale (T_1)**

Pour mesurer les temps de relaxation T_1 des carbones, nous avons utilisé la technique dite d'inversion récupération. Chaque spectre est le résultat d'une séquence d'impulsions $180^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ$ avec $D_1=25\text{s}$ (DPG) et $D_1=20\text{s}$ (pinorésinol). Les T_1 ont été calculés par interpolation de la fonction : $I_{(t)}=I_{(0)}+P.e^{(-\tau/T_1)}$.

L'enregistrement de l'ensemble des spectres a été réalisé à partir de 40 à 60 mg d'échantillon (huiles essentielles, fractions acides des oléorésines, extraits de parfum) dilués dans CDCl_3 (volume total : 0,5 mL).

Spectrométrie de Masse (SM) :

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

Fractionnement acido-basique des résines de pin maritime :

Les échantillons d'oléorésine (1g) ont été dissous dans environ 50 mL d'oxyde de diéthyle (Et_2O) puis lavés avec une solution de KOH à 0,2 N (3 x 80 mL). Après décantation, les phases organiques ont été récupérées, séchées sur Na_2SO_4 et évaporées pour donner les composés neutres. Les phases aqueuses ont été acidifiées (H_2SO_4 , 0,2N) puis extraites (Et_2O , 3 x 150 mL) avant d'être séchées et évaporées pour récupérer les composés acides.

Analyses statistiques :

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

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams RP. **1989**. Identification of essential oils by Ion Trap Mass Spectroscopy, Academic Press. Inc.: San Diego.
- Adams RP. **1998**. The Leaf Essential Oils and Chemotaxonomy of *Juniperus* sect. *Juniperus*. *Biochem Syst Ecol* **26**: 637-645.
- Adams RP. **1999a**. Systematics of multi-seeded eastern hemisphere *Juniperus* based on leaf essential oils and RAPD DNA fingerspringing. *Biochem Syst Ecol* **27**: 709-725.
- Adams RP, Altarejos J, Fernandez C, Camacho A. **1999b**. The leaf essential oils and taxonomy of *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus*, subsp. *badia* (H. Gay) Debeaux, and subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. *J Essent Oil Res* **11**: 167-172.
- Adams RP. **2000**. Systematics of *Juniperus* sect. *Juniperus* Based on Leaf Essential Oils and Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs). *Biochem Syst Ecol* **28**: 515-528.
- Adams RP. **2001**. *Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy*. Allured: Carol Stream, IL.
- Adams RP, Mumba LE, James SA. **2003**. Geographic Variation in the Leaf Oils and DNA Fingerprints (RAPDs) of *J. thurifera* L. from Morocco and Europe, *J. Essent Oil Res* **15**: 148-154.
- Adams RP. **2008**. *Juniperus of the World: The genus Juniperus*, 2nd Edition. Trafford Publishing Co., Vancouver.
- Adio AM, Paul C, Kloth P, Konig WA, **2004**. Sesquiterpenes of the liverwort *Scapania undulate*. *Phytochem* **65**: (2), 199-206.
- Albert K, Schlotterbeck G, Tseng LH, Braumann U. **1996**. Application of On-Line Capillary High-Performance Liquid Chromatography-Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry Coupling for the Analysis of Vitamin A Derivatives. *J Chromatog. A* **750**: 303-309.
- Albert K, Dachtler M, Glaser E, Händel H, Lacker T, Schlotterberck G, Strohschein S, Tseng LH, Braumanu U. **1999**. On-line coupling of separation techniques to NMR. *J High Resol Chromatogr* **22**: 135-143.
- Alemanly LB. **1989**. Exceptional Resolution and New Signals Detected in the ¹³C NMR Spectra of Alkanes. *Magn Res Chem* **27**: 1065-1073.
- Allerhand A, Maple SR. **1987**. Ultrahigh-resolution NMR. This new technique makes it possible to use NMR for the non-separative structural and quantitative analysis of complex mixtures. *Anal Chem* **59**: 441A-452A.
- Andrade Fabio DP, Santos Lourdes C, Datchler Markus, Albert K, Vilegas W. **2002**. Use of on-line liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectroscopy for the rapid investigation of flavonoids from *Sorocea bomplandii*. *J Chromatogr A* **953**: 287-291.

- Angioni A, Barra A, Russo TM, Coroneo V, Dessi S, Cabras P. **2003**. Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity *J Agric Food Chem* **51**: 3073-3078.
- Arrabal C, Cortijo M. **1994a**. Acid fraction evolution in wood extractives of *Pinus pinaster* Ait. *Journal of the American Oil Chemists Society* **71**: 665-667.
- Arrabal C, Cortijo M. **1994b**. Fatty and resin acids of Spanish *Pinus pinaster* Ait. Subspecies. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **71**: 1039-1040.
- Arrabal C, Cortijo M, Fernandez de Simon B, Garcia Vallejo MC, Cadahia E. **2002**. *Pinus pinaster* Oleroresin in Plus Trees. *Holzforschung* **56**: 261-266.
- Arrabal C, Cortijo M, Fernandez de Simon B, Garcia-Vallejo M-C, Cadahia E. **2005**. Differentiation among five spanish *Pinus pinaster* provenances based on its oleoresin terpenic composition. *Biochemical systematics and Ecology* **33**: 1007-1016.
- Baerheim Svendsen A, Scheffer JJC, Looman A. **1985**. A Comparative Study of the Composition of the Essential Needle Oils of Norwegian Low Lands Juniper and High Mountains Juniper. *Scientia Pharmaceutica* **53**: 159-161.
- Baldovini N, Ristorcelli D, Tomi F, Casanova J. **2000**. Intraspecific variability of the essential oil of *Calamintha nepeta* from Corsica (France). *Flav Fragr J* **15**: 50-54.
- Baldovini N, Tomi F, Casanova J. **2001a**. Identification and Quantitative Determination NMR of Furanodiene, a Heat-sensitive Compound, in Essential Oils by ¹³C-NMR. *Phytochem Anal* **12**: 58-63.
- Baldovini N, Tomi F, Casanova J. **2001b**. Enantiomeric differentiation of terpenic olefins by carbon-13 NMR using chiral binuclear shift reagents. *Magn Reson Chem* **39**: 621-624.
- Baldovini N, Tomi F, Casanova J. **2003**. Enantiomeric differentiation of bornyl acetate by carbon-13 NMR using a chiral lanthanide shift reagent. *Phytochem Anal* **14**: 241-244.
- Banthorpe DV, Davies HffS, Gatford SR, Williams SR. **1973**. Monoterpene patterns in juniperus and thuja species. *Planta Med* **23**: 64-69.
- Barkley NA, Roose ML, Krueger RR, Federici CT. **2006**. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theoretical and Applied Genetics* **112**: 1519-1531.
- Barrero AF, Alvarez-Manzaneda E, Lara A. **1996**. Novel tricyclic sesquiterpenes from *J. Thurifera* chemical confirmation of duprezianane skeleton. *Tetrahedron* **37**: (21) 3757-3760.
- Barrero AF, Quílez del Moral J, Lara A. **2000**. Sesquiterpenes from *Juniperus thurifera* L. stereochemistry in unusual cedrane and duprezianane series. *Tetrahedron* **56**: (23) 3717-3723.

- Barrero AF, Quilez del Moral JF, Lara A, Mar Herrador M. **2005**. Antimicrobial activity of sesquiterpenes from the essential oil of *J. thurifera* Wood. *Panta Medica* **71**: 67-71.
- Becker ED, Ferretti JA, Gambhir PN. **1979**. Selection of optimum parameters for pulse Fourier transform nuclear magnetic resonance. *Anal Chem* **51**: 1413-1420.
- Bendahou M, Muselli A, Grignon-Dubois M, Benyoucef M, Desjobert JM, Bernardini AF, Costa J. **2008**. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. Essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chem* **106**: 132-139.
- Bielicka-Daszkiwicz K, D'bicka M, Voelkel A. **2004**. Comparison of three derivatization ways in the separation of phenol and hydroquinone from water samples *J Chromatogr A* **1052**: 233-236.
- Bighelli A, Casanova J. **2009**. Analytical Methodes for Cymbopogon Oils in *Essential Oil-Bearing Grasses, The genus Cymbopogon*. Taylor and Francis : London.
- Bilia AR, Flamini G, Taglioli V, Morelli I, Vincieri FF. **2002**. GC-MS analysis of essential oil of some commercial Fennel teas. *Food Chem* **76**: (3), 307-310.
- Blanc MC, Muselli A, Bradesi P, Casanova J. **2004**. Chemical Composition and Variability of the Essential Oil of *Inula graveolens* (L.) from Corsica. *Flav. Fragr J* **19**: 314-319.
- Blanc MC, Bradesi P, Casanova J. **2005**. Quantitative Determination of Eudesman-Type Acids from *Dittrichia viscosa* sp. *viscosa* Essential Oil using ¹³C-NMR Spectroscopy. *Phytochem Anal* **16**: 150-154.
- Bonaga G, Galletti G. **1985**. Analysis of volatile components in juniper oil by high resolution gas chromatography and combined gas chromatography/ mass spectroscopy. *Annali di Chimica* **75**: 131-135.
- Bonnet M, Denoyer C, Renou JP. **1990**. High Resolution ¹³C NMR Spectroscopy of Rendered Animal Fats: Degree of Saturation of Fatty Acid Chains and Position on Glycerol. *Int Food Sci Tech* **25**: 399-408.
- Bonnier G, Douin R. **1990**. La Grande Flore en Couleurs. Ed. Belin: Paris.
- Bothe F, Dettmer K, Engewald W. **2003**. Determination of perfume oil in household products by headspace solid-phase microextraction and fast capillary gas chromatography. *Chromatographia Supplement* **57**: 199-206.
- Boti JB, Koukoua G, N'Guessan TY, Muselli A, Bernardini AF, Casanova J. **2005**. Composition of leaf, stem bark and root bark oils from *Isolona cooperi* investigated by GC/RI, GC/MS and ¹³C-NMR spectroscopy. *Phytochem Anal* **16**: 357-363.
- Boti JB, Akoua Yao P, Koukoua G, N'Guessan TY, Casanova J. **2006a**. Components and chemical variability of *Isolona campanulata* Engler & Diels leaf oil. *Flavour Fragr J* **21**: 166-170.
- Boti JB, Bighelli A, Cavaleiro C, Salgueiro L, Casanova J. **2006b**. Chemical variability of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* berry and leaf oils from

- Corsica, analysed by combination of GC, GC/MS and ^{13}C -NMR. *Flav Fragr J* **21**: 268-273.
- Bousmaha L, Boti JB, Bekkara FA, Castola V, Casanova J. **2006**. Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Lavandula dentata* L. from Algeria, *Flav Fragr J* **21**: 368-372.
- Bradesi P, Tomi F, Terriaga I, Casanova J. **1994**. Identification of Dihydrocarvéol Stereoisomers and their Acetates using Carbon-13 NMR Spectroscopy. *Spectrosc Lett* **27**: 921-933.
- Bradesi P, Bighelli A, Tomi F, Casanova J. **1996**. L'analyse des mélanges complexes par RMN du carbone-13. *Canadian J Appl Spectrosc Partie 1* **41** : 15-24 ; *Partie 41*: 41-50.
- Braun NA, Meier M, Kohlenberg B, Hammerschmidt FJ. **2001**. δ -Terpinyl acetate. A new natural component from the essential leaf oil of *Laurus nobilis* L. (Laureaceae). *J Essent Oil Res* **13**: 95-97.
- Brekke T, Aksnes DW, Sletten E. **1988**. Solvent shifts and component identification of hydrocarbon mixtures by carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance spectrometry, *Ana. Chem* **60**: 591-596.
- Brekke T, Kvalheim OM. **1996**. Signal treatment and signal analysis in NMR, Chap.20, Rutledge D.N. Ed., Elsevier : Amsterdam.
- Bremser W, Ernst L, Fachinger W, Gerhards R, Hardt A, Lewis PME. **1987**. ^{13}C NMR Spectral Data, 4 edition, VCH: Weinheim.
- Bruins AP. **1979**. Negative ion chemical ionisation mass spectrometry in the determination of components in essential oils. *Anal Chem* **51**: 967-972.
- Burgar MI, Karba D, Kikelj D. **1979**. ^{13}C NMR Analysis of the essential oils of Dalmatian Sage (*Salvia officinalis*). *Farmaceutski Vestnik* **30**: 253-261.
- Butkiene R, Nivinskiene O, Mockute D. **2006**. Differences in the essential oils of the leaves (neddles), unripe and ripe berries of *J. communis* L. growing wild in Vilnius district (Lithuania). *J Essent Oil Res* **11**: 167-172.
- Cambon A. **1989**. La spectrométrie de masse multidimensionnelle et ses applications à l'analyse des mélanges complexes. *Science, Technique, Technologie* **11**: 4-10.
- Campbell C, Heatley F, Holcroft G, Booth C, **1989**. Preparation and ^{13}C NMR spectroscopy of uniform oligopropylene glycols. *Eur Polym J* **25**: (7/8) 831-837.
- Caramiello R, Bocco A, Buffa G, Maffei M. **1995**. Chemotaxonomy of *Juniperus communis*, *J. sibirica* and *J. Intermedia*. *J Essent Oil Res* **7**: 133-145.
- Carlson LHC, Machado RAF, Spricigo CB, Pereira LK, Bolzan A. **2001**. Extraction of lemongrass essential oil with dense carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids* **21**: 33-39.
- Carman RM, Duffield AR, **1995**. The Optical Rotation of Some C-15 Oxygenated Labda-8(17),13-dienes. *Aust J Chem* **48**: 1357-1366.

- Carmo MM, Frazao S, **1986**. The Essential Oil of Portuguese Pine Needles. In *Progress in Essential Oil Research*, de Gruyter W (eds). Proceedings of the International Symposium on Essential Oils: Berlin, 169-174.
- Castola V, Mazzoni V, Corticchiato M, Bighelli A, Casanova J. **1997**. Hydrogen bonding effect on Carbon-13 NMR chemical shifts of naturally occurring phenols. *Can J Anal Science & Spectro* **42**: 90-94.
- Castola V, Bighelli A, Casanova J. **1999**. Direct Qualitative and Quantitative Analysis of Triterpenes using ¹³C NMR Spectroscopy Exemplified by Dichloromethanic Extracts of Cork. *Appl Spectro* **53**: 344-350.
- Castola V, Bighelli A, Conti L, Scano G, Mascia S, Casanova J. **2000a**. Identification and quantification of anhydrosugars in biomass pyrolytic oils using carbon-13 NMR spectroscopy. *Canadian J Anal Sci Spectrosc* **45**: 102-106.
- Castola V, Bighelli A, Casanova J. **2000b**. Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica. *Biochem Syst Ecol* **28**: 79-88.
- Castola V, Bighelli A, Melloni G, Gladiali S, Desjobert JM, Casanova J. **2002**. Chemical Variability of the Triterpenic Fraction of Dichloromethanic Extracts of Cork (*Quercus suber* L.) from Corsica and Sardinia *Industrial Crops and Products* **15**: 15-22.
- Cavaleiro C. **2001a**. Oleos essenciais de *Juniperus* de Portugal. Thèse de Doctorat, Université de Coimbra: Portugal.
- Cavaleiro C, Rezzi S, Salgueiro L, Bighelli A, Casanova J, Proença da Cunha A. **2001b**. Intraspecific chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* from Portugal. *Biochem Syst Ecol* **29** : 1175-1183.
- Cavalli JF, Tomi F, Bernardini AF, Casanova J. **2003**. Composition and Chemical Variability of the Bark Oil of *Cedrelopsis grevei* H. Baillon from Madagascar. *Flavour Fragr J* **18**: 532-538.
- Cavalli JF, Tomi F, Bernardini AF, Casanova J. **2004**. Combined analysis of *Chenopodium ambrosioides* essential oil by GC, GC-MS and ¹³C-NMR spectroscopy. Quantitative determination of Ascaridole, a heat-sensitive compound. *Phytochem Anal* **15**: 275-279.
- Chalchat JC, Garry RPh, Michet A, Bastide P, Malhuret R. **1989**. Corrélation composition chimique/Activité antimicrobienne : comparaison de l'activité d'huiles essentielles naturelles et oxygénées vis-à-vis de six souches. *Plantes Médicinales et Phytothérapie* **23**: (4) 305-314.
- Chatzopoulou PS, Katsiotis ST. **1993a**. Chemical investigation of the leaf oil of *Juniperus communis* L. *J Essent Oil Res* **5**: 603-607.
- Chatzopoulou PS, Katsiotis ST. **1993b**. Study of the essential oil from *Juniperus communis* "berries" (cones) growing wild in Greece. *Planta Med* **59**: 554-556.
- Chenard LD. **1836**. Traité de Chimie élémentaire théorique et pratique, Ed : Louis et Hauman, Bruxelles, Belgique.

- Chericoni S, Flamini G, Campeol E, Cioni PL, Morelli I. **2004**. GC-MS analyses of the essential oil from the aerial parts of *Artemisia verlotiorum*: variability during the year. *Biochem Syst Ecol* **32**: (4) 423-429.
- Cheung HTA., Fu SL, Smal MA. **1994**. Inhibition of platelet aggregation by diterpene acids from *Pinus massoniana* resin. *Arzneimittel-Forschung* **44**: 17-25.
- Chon C, Poulard A, Rabiller C. **1996**. Analyse quantitative des principaux constituants du vin par RMN de carbone-13: optimisation de la méthode. *Journal international des Sciences de la Vigne et du Vin* **30**: 73-83.
- Claridge TDW. **1999**. High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry, Tetrahedron Organic Chemistry Series volume 19, Elsevier : Oxford.
- Coleman III WM, Gordon BM, Lawrence BM. **1989**. Examinations of the matrix isolation fourier transform infrared spectra of organic compounds: part XII. *Appl Spectrosc* **43**: 298-304.
- Coleman WM, Lawrence BM. **1997**. A comparison of selected analytical approaches to the analysis of an essential oil. *Flav Fragr J* **12**: 1-8.
- Conrad M. **1986**. Essai sur la répartition de *Juniperus thurifera* L. en Corse, en 1985. *Le monde des plantes* **423-424**: 1-2.
- Coppen JJW, James DJ, Robinson JM, Subansenee W. **1998**. Variability in xylem resin composition amongst natural populations of Thai and Filipino *Pinus merkusii* de Vriese. *Flavour and Fragrance Journal* **13**: 33-39.
- Corticchiato M, Tomi F, Bernardini AF, Casanova J. **1998**. Composition and intraspecific variability of essential oil from *Thymus herba-barona* Lois., *Biochem Syst Ecol* **26**: 915-932.
- Cosentino S, Barra A, Pisano B, Cabizza M, Pirisi FM, Palmas F. **2003**. Composition and antimicrobial activity properties of Sardinian *Juniperus* Essential Oils against Foodborne Pathogens and Spoilage Microorganisms. *Journal of Food Protection* **66**: (7) 1288-1291.
- Cosmetic ingredient review, **1985**. Final report on the safety assessment of butylene glycol, hexylene glycol, ethoxydiglycol, and dipropylene glycol. *Journal of american college of toxicology* **4**: 5.
- Cremin P, Donnelly DMX, Wolfender JL, Hostettmann K. **1995**. Liquid Chromatographic-Thermospray Mass Spectrometric Analysis of Sesquiterpenes of *Armillaria* (Eumycota : Basidiomycotina) species. *J Chromatogr A* **710**: 273-285.
- Dallüge J, Beens J, Brinkman UAT. **2003**. Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool. *J Chromatogr A* **1000**: 69-108.
- Damjanovic MB, Skala D, Petrovic-Djakov D, Baras J. **2003**. A comparaison between the oil, hexane extract and supercritical carbon dioxide extract of *Juniperus communis* L. *J Essent Oil Res* **15**: 90-92.

- Decouzon M, Geribaldi S, Rouillard M, Stural JM. **1990**. A New Look at the Spectroscopic properties of Dihydrocarveol Stereoisomers. *Flav Fragr J* **5**: 147-152.
- De Litardière R. **1956**. Sur la présence en Corse de *Juniperus thurifera* L. *C.R. Ac.Sc.*, **242**: 2198-2201.
- Dob T, Berramdane T, Chelghoum C. **2005**. Analysis of essential oil from the needles of *Pinus pinaster* growing in Algeria. *Chemistry of Natural Compounds* **41**: (5) 545-548.
- Dominguez Garrido M, Garcia Martin D, Garcia Vallejo MC. **1988**. The Essential Oil of Needles from Spanish *Pinus Pinaster* Aiton. In *Flavors and Fragrances. A World Perspective*, Lawrence BM, Mookherjee BD, Willis BJ (eds). Proceedings of the 10th International Congress of Essentials, Fragrances and Flavors, Washington, DC, 1986, Elsevier : Amsterdam, 211-229.
- Dugo P, Mondello L, Dugo L, Stancanelli R, Dugo G. **2000**. LC-MS for the identification of oxygen heterocyclic compounds in citrus essential oils. *J pharm Biomed Anal* **24**: 147-154.
- Duquesnoy E, Castola V, Casanova J. **2007a**. Identification and quantitative determination of triterpenes in the hexane extract of *Olea europaea* L. leaves using ^{13}C NMR spectroscopy. *Phytochem Anal* **18**: 347-353.
- Duquesnoy E, Castola V, Casanova J. **2007b**. Composition and chemical variability of the twig oil of *Abies alba* Miller from Corsica. *Flavour Fragr J* **22**: 293-299.
- Duquesnoy E, Castola V, Casanova J. **2008**. Identification and quantitative determination of carbohydrates in ethanolic extracts of two conifers using ^{13}C NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research* **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**: 246-252.
- Escarel G. **1952**. Notes sur les herborisations en Corse et confirmation de l'existence de quelques espèces rares. *Bull Soc bot Fr* **99**: 144-145.
- Farjon A. **1998**. World Checklist and Bibliography of Conifers, Royal Botanic Gardens Press, Kew: London.
- Fatope MO, Marwah RG, Al Hadhrami NM, Onifade AK, Williams JR. **2008**. Identification of the chemotypes of *Ocimum forskolei* and *Ocimum basilicum* by NMR Spectroscopy. *Chemistry & Biodiversity* **5**: (11), 2457-2463.
- Ferrari B. **2003**. La RMN du carbone-13, outil d'analyse : des mélanges naturels : caractérisation d'huiles végétales, d'huiles essentielles et d'extraits aux solvants, Thèse de Doctorat de l'Université de Corse.
- Ferrari B, Castilho P, Tomi F, Rodrigues AI, Costa MdC, Casanova J. **2005a**. Direct identification and quantitative determination of costunolide and dehydrocostulactone in the fixed oil of *laurus novocanariensis* by ^{13}C -NMR spectroscopy. *Phytochem Anal* **16**: 104-106.

- Ferrari B, Tomi F, Casanova J. **2005b**. Composition and chemical variability of *Ferula communis* essential oil from Corsica. *Flav Fragr J* **20**: 180-185.
- 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.
- Fiebach K, Kraemer LR. **1993**. Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, vol. A23, p. 73-88, Resins, Natural, VCH Publishers, Inc.: Bremen.
- Filipowicz N, Kaminski M, Kurlenda J, Asztemborska M, Renata Ochocka J. **2003**. Antibacterial and Antifungal Activity of Juniper Berry Oil and its Selected Components *Phytother Res* **17**: 227-231.
- Filipowicz N, Piotrowski A, Renata Ochocka J, Asztemborska M. **2006**. The phytochemical and genetic survey of common and Dwarf Juniper (*Juniperus communis* and *Juniperus nana*) Identifies Chemical Races and Close Taxonomic Identity of the species. *Planta med* **72**: 850-853.
- Fonseca FS, Nielsen LT, Ruveda EA. **1979**. Lignans of *Araucaria angustifolia* and ^{13}C NMR analysis of some phenyltetralin lignans. *Phytochemistry* **18**: 1703-08.
- Formáček V, Kubeczka KH. **1982a**. *Essential oils analysis by capillary gas chromatography and carbon-13 NMR spectroscopy*. Wiley: Chichester.
- Formáček V., Kubeczka K.H. **1982b**. *^{13}C NMR analysis of essential oils, in aromatic plants: Basic and applied aspects*. Margaris N, Koedam A, Vokou D. Ed., Martinus Nijhoff Publishers : La Haye, 177-181.
- Formacek, Kubeczka. **2002**. Juniper berry oil, *Essential oils analysis by capillary gaz chromatography and ^{13}C NMR spectroscopy*. Wiley, 2nd edition: New-York, p125.
- Gamisans J, Gruber M. **1979**. La végétation du Niolu (Corse) *Ecol Mediterr* **4**: 141-156.
- Gamisans J. **1991**. *La végétation de la Corse*. Edisud: Aix-en-Provence.
- Gancel AL. **2004**. Etude de l'hérédité des composés d'arôme chez des hybrides somatiques d'agrumes. Thèse de doctorat de l'Université de Corse.
- Garcia-Vallejo M-C **1994**. Volatile Wood Oils of the Brazilian *Pinus Caribaea* Var. *Hondurensis* and Spanish *Pinus Pinaster* Var. *Mediterranea* *J braz Chem Soc* **5**:(2) 107-112.
- Gazea F, Calvarano I, Calvarano M. **1998**. Characteristics of new Citrus hybrid essential oil, *Citrus clementina* x *C. Limon*. *Journal Essential Oil Research* **10**: 235-239.
- Ghanmi M, El Abid A, Chaouch A, Aafi A, Aberchane M, El Alami A, Farah A, **2005**. Etude du rendement et de la composition de l'essence de térébenthine du Maroc: cas du pin maritime et du pin d'Alep. *Acta Bot Gallica* **152**: (1) 3-10.

- Gleizes M, Marpeau A, Pauly G, Bernard-Dagan C. **1984**. Sesquiterpene biosynthesis in maritime pine needles. *Phytochemistry* **23**: (6) 1257-1259.
- Gonny M. **2003**. Les huiles essentielles de *Daucus carota* L. et *Juniperus communis* L. ssp. *alpina* de Corse : Caractérisation par RMN de carbone 13, GC/Ir et CG/SM. Thèse de doctorat de l'Université de Corse, France.
- Gonny M, Bradesi P, Casanova J. **2004**. Identification of the components of the essential oil from wild Corsican *Daucus carota* L. using ^{13}C -NMR spectroscopy. *Flav Fragr J* **19**: 424-433.
- Gonny M, Cavaleiro C, Salgueiro L, Casanova J **2006**. Analysis of *Juniperus communis* ssp. *alpina* needles, berry, wood, and root oils by combination of GC, GC/MS and ^{13}C -RMN. *Flavour Fragr J* **21**: 99-106.
- Grenier-Loustalot MF, Grenier P, Bounoure J, Grall M. Panaras R. **1990**. Couplage direct chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) et résonance magnétique nucléaire du proton (RMN 1H). Appareillage, méthodologie, exemple d'application. *Analysis* **18**: 200-207.
- Gunstone FD, Pollard MR, Scrimgeour CM, Vedanayagam HS. **1977**. Fatty Acids. Part 50. ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Studies of Olefinic Fatty Acids and Esters. *Chem Phys Lipids* **18**: 115-129.
- Gunstone FD. **1991**. ^{13}C NMR Studies of Mono-, Di- and Tri-Acylglycerols Leading to Qualitative and Semi-Quantitative Informations About Mixtures of These Glycerol Esters. *Chem Phys Lipids* **58**: 219-224.
- 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.
- Hafizoglu H. **1994**. Occurrence of resin constituents in juniper tar. *Holz als Roh- und Werkstoff* **52**: 82.
- Hedges LM, Wilkins CL. **1991**. Components analysis of eucalyptus oil by Gas Chromatography-Fourier Transform-Infrared Spectrometry-Mass Spectrometry. *J Chromatogr Sci* **29**: 345-350.
- Hernandez EG, Lopez Martinez MDC, Villanova RG. **1987**. Determination by gas chromatography of terpenes in the berries of the species *J. oxycedrus* L. *J. thurifera* & *J. Sabina* L. *J of chromatography* **396**: 416-420.
- Hesse M, Meier H, Zeeh B. **1997**. Méthodes spectroscopiques pour la chimie organique, Masson : Paris.
- Hmamouchi M, Hamamouchi J, Zouhdi M, Bessiere JM. **2001**. Chemical and Antimicrobial Properties of Essential Oils of Five Moroccan Pinaceae. *J Essent Oil Res* **13**: 298-302.
- Hoi TM, Moi LD, Muselli A, Bighelli A, Casanova J. **1997**. Analyse de l'huile essentielle de *Cupressus funebris* du Viêt-Nam par RMN ^{13}C , 15^{ème} journées Internationales des Huiles Essentielles, Digne les Bains, 5-7/09-1996, Actes Rivista Italiana EPPOS 633-637.

- Holmbom B. **1977**. Improved gas chromatographic analysis of fatty and resin acid mixtures with special reference to tall oil. *Journal of the American Oil Chemists Society* **54**: 289-293.
- Hörster VH. **1973**. Variabilität der öle von *Juniperus communis*. *Planta med* **23**: (4) 353-362.
- Job A, Buenafe R, Abbas NM. **1998**. Determination of oxygenates in gasoline by FTIR. *Fuel* **77**: (15) 1861-1864.
- Jactel H, Kleinhentz M, Marpeau-Bezard A, Marion-Poll F, Menassieu P, Burban C. **1996**. Terpene variations in maritime pine constitutive oleoresin related to host tree selection by *Dioryctria sylvestrella* Ratz. *Journal of Chemical Ecology* **22**: (5) 1037-1050.
- Jinping T, Yingwu Y, Hongbing S, Xiaofeng L. **2002**. Magnesium chloride: an efficient ^{13}C NMR relaxation agent for amino acids and some carboxylic acids. *J magn res* **159**: 137-144.
- Joulain D, Laurent R. **1989**. Two closely related sesquiterpenols: 1-endobourbonanol and 1,6-germacradien-5-ol. *J Essent Oil Res* **1**: 299-301.
- 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.
- Kalinowski HO, Berger S, Braun S. **1991**. Carbon-13 NMR Spectroscopy, John Wiley & Sons : Chichester.
- Kanko C, Koukoua G, N'Guessan YT. **1999**. Composition and intraspecific variability of the leaf oil of *Lippia multiflora* Mold. from Ivory Coast. *J Essent Oil Res* **11**: 153-158.
- Khadri A, Serralheiro MLM, Nogueira JMF, Neffati M, Smiti S, Araújo MEM. **2008**. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of essential oils from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. Determination of chemical composition by GC-mass spectrometry and ^{13}C NMR. *Food chemistry* **109**: 630-637.
- Kleinhentz M, Jactel H, Menassieu P. **1999**. Terpene attractant candidates of *Dioryctria sylvestrella* in maritime pine (*P. pinaster*) oleoresin; needles, liber, and headspace samples. *Journal of Chemical Ecology* **25**: (12) 2741-56.
- Kolesnikova RD, Verissimo N, Ulyanova I. **1983**. *Rastit. Resur.* **19**: 364-366.
- 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. **1997**. Essential oil of *Juniperus communis* L. grown in northern Greece: variation of fruit oil yield and composition. *J Essent Oil Res* **9**: 35-39.
- Kováts E. **1965**. Gas chromatographic characterisation of organic substances in the retention index system. *Advances in Chromatography* **1**: 229-247.
- Kubeczka KH, Schultze W. **1987**. Biology and chemistry of conifers oils. *Flavour Fragrance Journal* **2**: 137-148.
- Lamblin F, Hano C, Fliniaux O, Mesnard F, Fliniaux M-A. **2008**. Intérêt des lignanes dans la prévention et le traitement de cancers. *Medecine/Sciences* **24**: (5) 511-519.
- Lange W, Weißmann G. **1987**. Zusammensetzung der Neutralteile des Balsamkolophoniums von *Pinus sylvestris* L., *Pinus nigra austriaca* Endl. und *Pinus pinaster* Ait. *Holz als Roh- und Werkstoff* **45**: 345-349.
- Lange G, Schultze W. **1988a**. Differentiation of isopulegol isomers by chemical ionization mass spectrometry, in *Bioflavour'87*, P. Schreier Ed., W. de Gruyter & Co.: Berlin, New-York, 115-122.
- Lange W, Weißmann G. **1988b**. Composition of *Pinus sylvestris* L. gum oleoresin from different sources. *Holz als Roh- und Werkstoff* **46**: 157-161.
- Lange W, Weißmann G. **1989**. Die Zusammensetzung der Diterpenkohlenwasserstoffe des Harzbalsams von *Pinus nigra austriaca* Endl., *Pinus sylvestris* L. und *Pinus pinaster* Ait. *Holzforshung* **43**: 359-362.
- Lange W, Stevanovic Janežic T. **1993**. Chemical composition of some *Pinus sylvestris* L. oleoresins from southern Serbia, Bosnia and Makedonia. *Holzforshung* **47**: 207-212.
- Lange W, Spanoudaki M, Stevanovic Janežic T. **1994**. The composition of Balkan white pine (*Pinus peuce* Griseb.) oleoresin. *Holzforshung* **48**: 368-370.
- Lange M, Spanoudaki M. **1995**. The composition of an oleoresin of *Pinus montezumae* Lamb. from Guatemala. *Holz als Roh- und Werkstoff* **53**: 68-71.
- La Torre GL, Saitta M, Vilasi F, Pellicanò T, Dugo G. **2006**. Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection. *Food Chem* **94**: 640-650.
- Lawrence BM. **1977a**. Progress in Essential Oils, Citronella Oil. *Perfumer & Flavorist* **2**: (2), 21-24.
- Lawrence BM. **1977b**. Progress in Essential Oils, Lemongrass Oil. *Perfumer & Flavorist* **2**: (4), 29-35.
- Lawrence BM. **1978**. Progress in Essential Oils, Lemongrass Oil. *Perfumer & Flavorist* **3**: (6), 18-22.
- Lawrence BM. **1980**. Progress in Essential Oils, Juniper berry oil, *Perfumer & Flavorist* **4**: (6) 31.

- Lawrence BM. **1982**. Progress in Essential Oils, Citronella Oil. *Perfumer & Flavorist*, **7**: (2), 29-33.
- Lawrence BM. **1984**. Progress in Essential Oils, Lemongrass Oil. *Perfumer & Flavorist* **9**: (4), 108-112.
- Lawrence BM. **1985**. Progress in Essential Oils, Citronella Oil. *Perfumer & Flavorist*, **10**: (4), 145-151.
- Lawrence BM. **1990**. Progress in Essential Oils, Juniper berry oil, *Perfumer & Flavorist* **15**: (4) 63.
- Lawrence BM. **1992**. Progress in Essential Oils, Lemongrass Oil, *Perfumer & Flavorist* **17**: (6), 55-64.
- Lawrence BM. **1993**. Progress in Essential Oils, Citronella Oil. *Perfumer & Flavorist*, **18**: (2), 73-84.
- Lawrence BM. **1994**. Progress in Essential Oils, Juniper Leaf Oil, *Perfumer & Flavorist* **19**: (1) 34.
- Lawrence BM. **1996a**. Progress in Essential Oils, Citronella Oil. *Perfumer & Flavorist*, **21**: (1), 37-45.
- Lawrence BM. **1996b**. Progress in Essential Oils, Juniper berry oil, *Perfumer & Flavorist* **21**: (1) 40.
- Lawrence BM. **1998**. Progress in Essential Oils, Lemongrass Oil. *Perfumer & Flavorist* **23**: (4), 37-50.
- Lawrence BM. **2001a**. Progress in Essential Oils, Juniper leaf branch and wood oils, *Perfumer & Flavorist* **26**: (4) 71.
- Lawrence BM. **2001b**. Progress in Essential Oils, Juniper berry oil, *Perfumer & Flavorist* **26**: (4) 68.
- Lawrence BM. **2006**. Progress in Essential Oils, Juniper berry oil and extract, *Perfumer & Flavorist* **31**: (3) 50.
- Lebreton P, Muracciole M. **1999**. Contribution chimiotaxonomique à l'étude des conifères de Corse. Bulletin des Sciences Sociales Historiques et Naturelles de la Corse **686-687**: 165-196
- Lee HJ, Ravn MM, Coates M. **2001**. Synthesis and Characterization of abietadiene, levopimaradiene, palustradiene, and neoabietadiene: hydrocarbon precursors of the abietane diterpene resin acids. *Tetrahedron* **57**: 6155-6167.
- Lesueur D, Ninh Khac Ban, Bighelli A, Muselli A, Casanova J. **2006**. Analysis of the root oil of *Fokienia hodginsii* (Dunn) Henry et Thomas (Cupressaceae) by GC, GC/MS and ¹³C-NMR. *Flavour Fragr J* **21**: 171-174.
- Lesueur D, Castola V, Bighelli A, Conti L, Casanova J. **2007**. Quantification of Hydroxyacetaldehyde in a Biomass Pyrolysis Liquid Using ¹³C NMR Spectroscopy. *Spectroscopy Letters* **40**: 591-602.

- Lesueur D, Bighelli A, Casanova J, Tran Minh Hoi and Tran Huy Thai, **2009**. Composition of the essential oil of *Piper bavinum* C. DC. from Vietnam. *J Essent Oil Res* **21**: 16-18.
- Liang YZ, Xieb P, Chan K. **2004**. Quality control of herbal medicines. *J Chromatogr B* **812**: 53-70.
- Liu C, Zhang J, Yiao R, Gan L. **1981**. Chemical studies on the essential oils of *Cymbopogon* genus. *Huaxue Kuebao* 241-247.
- Looman A, Baerheim Svendsen A. **1992**. The needle essential oil of Norwegian Mountain Juniper, *J. communis* L. var *saxatilis* Pall. *Flavour Fragr J* **7**: 23-26.
- Lota ML. **1999**. Les huiles essentielles d'agrumes : caractérisation par RMN du carbone -13 CPG-IK et CPG/SM. *Thèse de doctorat de l'Université de Corse*.
- Lota ML, de Rocca Serra D, Tomi F, Casanova J. **2000**. Chemical variability of peel and leaf essential oils of Mandarins from *Citrus reticulata* Blanco species. *Biochemical Systematics and Ecology* **28**: 61-78.
- Lota ML, de Rocca Serra D, Tomi F, Casanova J. **2001**. Chemical variability of peel and leaf essential oils of fifteen species of mandarins. *Biochemical Systematics and Ecology* **29**: 77-104.
- Lucchesi ME, Chemat F, Smadja J. **2004a**. Solvent Free Microwave Extraction: An Innovative Tool for Rapid Extraction of Essential Oil from Aromatic Herbs and Spices *J Microwave Power Electromagnetic Energy* **39**: 135-139.
- Lucchesi ME, Chemat F, Smadja J. **2004b**. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *J Chromatogr A* **1043**: 323-327.
- Lucchesi ME. **2005**. Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles, Thèse de l'Université de la Réunion.
- Lucchesi ME, Smadja J, Bradshaw S, Louw W, Chemat F, **2007**. Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L.: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *J food engineering* **79**: 1079-1086.
- Macchioni F, Cioni PL, Flamini G, Morelli I, Perrucci S, Franceschi A, Macchioni G, Ceccarini L. **2002**. Acaridial activity of pine essential oils and their main components against *Tyrophagus putrescentia*, a stored food mite. *J Agric Food Chem* **50**: (16) 4586-8.
- Macchioni F, Cioni PL, Flamini G, Morelli I, Ansaldi M. **2003**. Chemical composition of essential oils from needles, branches and cones of *Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster* and *P. nigra* from central Italy. *Flavour Fragrance Journal* **18**: 139-134.
- Magee TV, Zinkel DF. **1992**. Composition of american distilled tall oils. *Journal of the American Oil Chemists Society* **69**: 321-324.

- Maia JGS, Andradeb EH, das Graças M, Zoghbib B. **2004**. Aroma volatiles from two fruit varieties of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). *Food Chem* **85**: 195-197.
- Markowetz A, Rapp A. **1990**. ¹³C-NMR spectroscopy in the analysis of wine, fruit juices and honey. *Bruker Report* **1**: 38-39.
- Marongiu B, Porcedda S, Piras A, Sanna G, Murreddu M, Loddo R. **2006**. Extraction of *Juniperus communis* L. ssp. *nana* Willd. essential oil by supercritical carbon dioxide. *Flavour Fragr J* **21**: 148-154.
- Marriott P, Shellie R, Fergeus J, Ong R, Morrison P. **2000**. High resolution essential oil analysis by using comprehensive gas chromatographic methodology. *Flav Fragr J* **15**: 225-239.
- 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. *Analysis* **117**: 387-393.
- Matlengiewicz M, Henzel N, Lauer JC, Laurens T, Nicole D, Rubini P. **1994**. Computer aided analysis of carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance spectra of multicomponent mixtures. Part 3. Analysis of individual components of heavy gasoline from liquefaction of polish coal. *Fuel* **73**: 843-850.
- Mayer P **2007**. *Le pin maritime*, Actes Sud: Arles, France.
- Mazzoni V. **1998**. Analyse de mélanges naturels par RMN du carbone-13 : extraits lipidiques miels et huiles essentielles, thèse de doctorat de l'Université de Corse.
- Mc Lafferty FW, Stauffer DB. **1994**. Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th ed., Mass spectrometry library search system BenchTop/PBM, version 3.10d. Palisade Co.: Newfield.
- Mecherara-Idjeri S, Hassani A, Castola V, Casanova J. **2008**. Composition and chemical variability of the essential oil from *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Algeria Part II: fruit oil. *J Essent Oil Res* **20**: 215-219.
- Merle H, Morón M, Blasquez MA, Boira H. 2004. Taxonomical contribution of essential oils in mandarins cultivars. *Biochemical Systematics and Ecology* **32**: 491-497.
- Milhau G, Valentin A, Benoit F. **1997**. In vitro antimalarial activity of eight essential oils. *J Essent Oil Res* **9**: 329-333.
- Mondello L, Dugo P, Bartle KD, **1995**. Automated HPLC-HRGC: A Powerful Method for Essential Oil Analysis. Part V. Identification of Terpenes Hydrocarbons of Bergamot, Lemon, Mandarin, Sweet Orange, Bitter Orange, Grapefruit, Clementine and Mexican Lime Oils by Coupled HPLC-HRGC-MS (ITD). *Flav Fragr J* **10**: 33-42.
- Mondello L, Casilli A, Tranchida PQ, Dugo P, Dugo G. **2005**. Comprehensive two-dimensional GC for the analysis of citrus essential oils. *Flav Fragr J* **20**: 136-140.

- Monti H, Tiliacos N, Faure R. **1999**. Copaiba oil: isolation and characterization of a new diterpenoid with the dinorlabdane skeleton *Phytochemistry* **51**: 1013-1015.
- Mooney JR. **1989**. Analytical NMR, Field L.D., Sternhell S., Eds., Chap. 3, p. 41, Quantitative application of ^{13}C NMR, John Wiley & Sons: Chichester.
- Mroczek T, Ndjoko K, Glowniak K, Hostettmann K. **2004**. On-line structure characterization of pyrrolizidine alkaloids in *Onosma stellulatum* and *Emilia coccinea* by liquid chromatography-ion-trap mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1056**: 91-97.
- Munari F, Dugo G, Cotroneo A. **1990**. Automated On-line HPLC-HRGC with Gradient Elution and Multiple GC Transfer Applied to the Characterization of Citrus Essential Oils. *J High Resol Chromatogr* **13**: 56-61.
- Nath SC, Sarma KK, Vajezikova I, Leclercq PA. **2002**. Comparison of volatile inflorescence oils and taxonomy of certain *Cymbopogon* taxa described as *C. flexuosus* (Nees ex Steud.) Wats. *Biochemical Systematic and Ecology* **30**: 151-162.
- National Institute of Materia Medica, **1999**. *Selected Medicinal Plants in Vietnam*, vol. 1, Science and Technology Publishing House: Hanoi.
- National Institute of Standards and Technology. **1999**. PC Version 1.7 of *The NIST/EPA/NIH mass spectral library*. Perkin-Elmer Corporation: Norwalk, CT.
- Ng S. **1985**. Analysis of positional distribution of fatty acids in palm oil by ^{13}C NMR spectroscopy. *Lipids* **20**: 778-782.
- Nguyen Thi Phuong Thao, Nguyen Thi Thuy, Tran Minh Hoi, Tran Huy Thai, Muselli A, Bighelli A, Castola V, Casanova J. **2004**. *Artemisia vulgaris* L. from Vietnam: Chemical variability and composition of the oil along the vegetative life of the plant. *J Essen Oil Res* **16**: 358-361.
- Nicolosi E, Deng ZN, Gentile A, La Malfa S, Continella G, Tribulato E. **2000**. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* **100**: 1155-1166.
- Niemelä K. **1988**. GLC-MS studies on pine kraft black liquors. *Holzforschung* **42**: 169-173.
- Nogueira JMF, Pereira LC. **1994**. Comparison of quantitative methods for analysis of resinic acids in crude tall-oil. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **350**: 379-383.
- Nogueira JMF, Pereira LC. **1995**. Chromatographic methods for the analysis of crude tall-oil. *HRC. Journal of High Resolution Chromatography* **18**: 425-432.
- Novak P, Tepeš P, Fistrić I, Bratoš I, Gabelica V. **2006**. The application of LC-NMR and LC-MS for separation and rapid structure elucidation of an unknown impurity in 5-aminosalicylic acid. *J Pharm Biomed Anal* **40**: 1268-1272.
- Núñez CV, Roque NF. **1999**. Sesquiterpenes from the stem bark of *Guarea guidonia* (L.) Sleumer (Meliaceae) *J Essen Oil Res* **11**: 439-440.

- Ollitrault P, Jacquemond C, Dubois C, Luro F. **2003**. *Citrus*. In : P.Hamon, M. Seguin, X. Perrier, X. Glaszmann, *Genetic diversity of cultivated plants*. CIRAD Press: Montpellier, 193-197.
- ONF, *Contribution à la conduite de peuplements de pin laricio et habitats associés, projet LIFE « Pin laricio »*, édité et diffusé par l'ONF, Tome 1, 249 pages et Tome 2, 271 pages.
- Opdyke DL. **1978**. Fragrance raw materials monographs, *Dipropylene Glycol Food Cosmet. Toxicol* **16**: 729–730.
- 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.
- Pauly G, Gleizes M, Bernard-Dagan C. **1973**. Identification des constituants des aiguilles de l'essence des aiguilles de *Pinus pinaster* *Phytochemistry* **12**: 1395-1398
- Petelot A. **1952**. Les plantes médicinales du Cambodge, du Laos et du Viêt-nam, Renonculacées à Cornacées, Centre de Recherche Scientifiques et Techniques, Archives des Recherches Agronomiques, Tome I-III.
- Petrakis PV, Tsitsimpikou C, Tzakou O, Couladis M, Vagias C, Roussis V. **2001**. Needle volatiles from five *Pinus* species growing in Greece. *Flavour and Fragrance Journal* **16**: 249-252.
- Petrakis P, Roussis V, Tsitsimpikou V, Papadimitriou D, Vagias C, Tsitsimpikou C. **2005**. The effect of terpenoids extracts from 15 pine species on the feeding behavioural sequence of the late instars of the pine processionary caterpillar. *Thaumetopoea pityocamp. Behavioural processes* **69**: 302-322.
- Phillips JB, Beens J. **1999**. Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a hyphenated method with strong coupling between the two dimensions. *J. Chromatogr A* **856**: 331-347.
- Phutdhawong W, Kawaree R, Sanjaiya S, Sengpracha W, Buddhasukh D. **2007**. Microwave-Assisted Isolation of Essential oil of *Cinnamomum iners* Reinw. ex Bl.: Comparison with Conventional Hydrodistillation. *Molecules* **12**: 868-877.
- Pusecker K, Albert K, Bayer E. **1999**. Investigation of hop and beer bitter acids by coupling of highperformance liquid chromatography to nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Chromatogr A* **836**: 245–252.
- Radulovic N, Stojanovic G, Palic R. **2006**. Composition and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. essential oil. *Phytother Res* **20**: 85-88.

- Renata Ochocka J, Asztemborska M, Zook RD, Sybilska D, Perez G, Ossicini L. **1997**. Enantiomers of monoterpenic hydrocarbons in essential oils from *Juniperus communis*. *Phytochemistry* **44**: (5) 869-873.
- Reunanen M, Ekman R, Hafizoglu H. **1996**. Composition of tars from softwoods and birch, *Holzforschung* **50**: 118-120.
- Rezzi S, Cavaleiro C, Bighelli A, Salgueiro L, Proença da Cunha A, Casanova J. **2001a**. Intraspecific Chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* subsp. *turbinata* from Corsica. *Biochem Syst Ecol* **29**: 179-188.
- Rezzi S, Bighelli A, Mouillot D, Casanova J. **2001b**. Chemical variability of the needle essential oil of *Pinus nigra* subsp. *laricio* from Corsica. *Flav Fragr J* **16**: 379-383.
- Rezzi S, Bighelli A, Castola V, Casanova J. **2002**. Direct Identification and Quantitative Determination of Acidic and Neutral Diterpenes Using ^{13}C -NMR Spectroscopy. Application to the Analysis of Oleoresin of *Pinus nigra*. *Appl Spectrosc* **56**: 312-317.
- Rezzi S, Bighelli A, Castola V, Casanova J. **2005**. Composition and chemical variability of oleoresin of *Pinus nigra* subsp. *laricio* from Corsica. *Ind Crops Prod* **21**: 65-69.
- Richardson DM (Ed). **1998**. *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press: Cambridge UK.
- Ristorcelli D, Tomi F, Casanova J. **1997**. Enantiomeric differentiation of oxygenated monoterpenes by carbon-13 NMR in the presence of a chiral lanthanide shift reagent. *J Magn Reson Analysis* **3**: 40-46.
- Ristorcelli D, Tomi F, Casanova J. **1998**. Carbon-13 NMR as a Tool for Identification and Enantiomeric Differentiation of Major Terpenes Exemplified by the Essential Oil of *Lavandula Stoechas*. *Flav Fragr J* **13**: 154-158.
- Rojas-Escudero E, Alarcón-Jiménez AL., Elizalde-Galván P, Rojo-Callejas F. **2004**. Optimization of carbohydrate silylation for gas chromatography *J Chromatogr A* **1027**: 117-120.
- Rouessac F, Rouessac A. **2004**. *Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes*, 6ème édition, sciences sup : Dunod, Liège.
- Ruberto G, Renda A, Piattelli M, Rapisarda P, Starrantino A. **1997**. Essential oil of new pigmented Citrus hybrids, *Citrus clementina* x *C. Sinensis*. *J Agric Food Chem* **45**: 467-471.
- Sacchi R, Addeo F, Giudicianni I, Paolillo L. **1992**. Analysis of the Positional Distribution of Fatty Acids in Olive Oil Triacylglycerols by High Resolution ^{13}C -NMR of the Carbonyl Region. *Ital J Food Sci* **2** : 117-123.
- Salgueiro L, Vila R, Tomas X, Tomi F, Cañigüeral S, Casanova J, Proença da Cunha A, Adzet T. **1995**. Chemical polymorphism of the essential oil of *Thymus carnosus* from Portugal. *Phytochem* **38**: 391-396.

- Salgueiro LR, Vila R, Tomi F, Figueiredo AC, Barroso JG, Cañigüeral S, Casanova J, Proença da Cunha A, Adzet T. **1997a**. Variability of the essential oil of *Thymus caespititius* from Portugal. *Phytochem* **45**: 307-311.
- Salgueiro LR, Vila R, Tomi F, Tomas X, Cañigüeral S, Casanova J, Proença da Cunha A, Adzet T. **1997b**. Composition and intraspecific variability of the essential oil of *Thymus camphoratus*. *Phytochem* **45**: 1177-1183.
- Sasaki TA, Wilkins CL. **1999**. Gas chromatography with fourier transform infrared and mass spectral detection, *J. Chromatogr A* **842**: 341-349.
- Schepmann HG, Jihai Pang, Seiichi PT Matsuda. **2001**. Cloning and Characterization of Ginkgo biloba Levopimaradiene Synthase, Which Catalyzes the First Committed Step in Ginkgolide Biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **392**: (2) 263-269.
- Schultze W, Lange G, Schmaus G. **1992**. Isobutane and ammoniac chemical ionization mass spectrometry of sesquiterpene hydrocarbons. *Flav Fragr J* **7**: 55-64.
- Sellier N, Cazaussus A, Budzinski H, Lebon M. **1991**. Structure determination of sesquiterpenes in chinese vetiver oil by gas chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr A* **557**: 451-458.
- Senatore F, Arnold NA, Piozzi F. **2004**. Chemical composition of the essential oil of *Salvia multicaulis* Vahl. var. *simplicifolia* Boiss. growing wild in Lebanon *J Chromatogr A* **1052**: (1-2), 237-240.
- Sezik E, Kocakulak E, Baser KHC, Ozek T. **2005**. Composition of the essential oils of *Juniperus oxycedrus* subsp. *macrocarpa* from Turkey. *Chemistry and Natural Compounds* **41**: 3.
- Shatar S. **1984**. Mono- und sesquiterpene in asterischen ol mongolischer *Juniperus*-Arten. *Pharmazie* **39**: 66-67.
- Shaw P E, Goodner KL, Moshonas MG, Hearn CJ. **2001**. Comparison of grapefruit hybrid fruit with parent fruit based on composition of volatile components. *Scientia Horticulture* **91**: 71-80.
- Song Z, Liang Z, Liu X. **1995**. Chemical characteristics of oleoresins from Chinese pine species. *Biochemical Systematics and Ecology* **23**: 517-522.
- Songa SM, Marriott P, Kotsosb A, Drummerb OH, Wynne P. **2004**. Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry (GC/GC-TOFMS) for drug screening and confirmation. *Forensic Sci Int* **143**: (2-3), 87-101.
- Stassi V, Verykokidou E, Loukis A, Harvala A, Philianos S. **1995**. Essential oil of *Juniperus oxycedrus* subsp. *macrocarpa* (Sm.) Ball. *J Essent Oil Res* **7**: 675-676.
- Stoyanova M. **1996**. Comparative Study on the Needle Essential Oils of *J. communis* L. and *J. communis* var *nana* in Bulgaria, 27th International Symposium on Essential Oils, Vienne, September 8-11, Book of abstracts, 5.

- Swingle WT, Reece PC. **1967**. The botany of *Citrus and Relatives* in “*The Citrus Industry*”. Reuther W, Batchelor LD, Webber HJ, Eds: Univ. of California : Berkeley; 190-430.
- Sybilska D, Asztemborska M, Ochocka RJ, Kowalczyk JD, Ossicini L, Perez G. **1994**. Enantiomers composition of terpenic hydrocarbons in essential oils from *Juniperus communis* L. *J. of chromatography A* **659**: 389-94.
- Talzi VP. **2006**. A ¹³C and ¹H NMR analysis of perfumes. *Russian journal of applied chemistry* **79**: (1) 107-116.
- Tanaka T. **1961**. *Citologia : Semi Centennial Commemoration Papers on Citrus Studies*. Citologia Supporting Foundation : Osaka; 114.
- Tanker N, Sarer E. **1975**. Gas Liquid Chromatographic Researches on the Volatile Oils Obtained from Leaves and from Fruits of *Juniperus* Species. *J Fac Pharm Ankara* **54**: 171-182.
- Taskinen J, Nykänen L. **1976**. Volatile constituents of an alcoholic extract of juniper berry. *Flavours* **9**: 228-233.
- Teresa JP, Barrero AF, Feliciano AS, Caballero MC. **1980**. Componentes de las arcestidas de *J. thurifera* Linnaeus aceite esencial, *Rivista Italiana EPPOS* **62**: 116-120.
- Thomaidis NS, Georgiou CA. **1999**. Edible oil analysis by flow injection. *Lab Autom Inf. Manag* **34**: (2) 101-114.
- Tobolski JJ, Zinkel DF. **1982**. Variation in needle and cortex resin acids during shoot development in *Pinus sylvestris*, *P. nigra*, and *P. Strobus*. *Forest Science* **28**: 785-796.
- Tomi F, Bradesi P, Bighelli A, Casanova J. **1995**. Computer-aided identification on individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy. *J Magn Reson Anal* **1**: 25-34
- Tomi F, Casanova J. **2000**. Contribution de la RMN du carbone-13 à l’analyse des huiles essentielles. *Annales Fals & Expertise Chim* **93**: 313-330.
- Tomi F, Casanova J. **2006**. ¹³C-NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from Labiatae. *Acta Horticulturae* **723**: 185-192.
- Tomi F, Barzalona M, Casanova J, Luro F. **2008**. Chemical variability of the leaf oil of 113 hybrids from *Citrus clementina* (commun) x *Citrus deliciosa* (Willow Leaf). *Flavour and fragrance journal* **23**: (3) 152-163.
- Tranchida PQ, Dugo P, Dugo G, Mondello L. **2004**. Comprehensive two-dimensional chromatography in food analysis. *J. Chromatogr. A*; **1054**: (1-2), 3-16.
- Uçar G, Fengel D. **1995**. Variation in composition of extractives from wood of *Pinus nigra* varieties *Phytochemistry* **38**: 877-880.
- Usai M, Atzei A, Pintore G, Casanova J. **2003**. Composition and Variability of Essential Oil of Sardinian *Thymus herba-barona* Loisel. *Flav Fragr J* **18**:21-25.

- Valente HM, Montes AL, Vonesch EE. **1969**. Composicion de Esencias de Trementina de Diversas Especies de Pinos Cultivados en la Argentina. *Ciencia e Investigacion* 67-71.
- Valentini G, Bellomaria B, Maggi F, Manzi A. **2003**. The leaf and female cones oils of *Juniperus oxycedrus* L. *oxycedrus* and *Juniperus* ssp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.), Ball. From Abruzzo. *J Essent Oil Res* **15**: 418-421.
- Van Bruijnsvoort M, Ottink SJM, Jonker KM, de Boer E. **2004**. Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1058**: (1-2), 137-142.
- Velasco-Negueruela A, Pérez-Alonso MJ, Palà-Paul, Ñigo A, Lopez G. **2005**. The volatile oil composition of the berries of *Juniperus macrocarpa* Sibth. & Sm., Gathered in Spain. *J Essent Oil Res* **17**: 61-63.
- Vellutini M, Baldovini N, de Rocca Serra D, Tomi F, Casanova J. **2005**. β -Cyclolavandulyl and β -isocyclolavandulyl esters from *Peucedanum paniculatum* L., an endemic species to Corsica. *Phytochem* **66**: 1956-1962.
- Vendeuvre C, Bertoncini F, Duval L, Duplan JL, Thiébaud D, Hennion MC. **2004**. Comparison of conventional gas chromatography and comprehensive two-dimensional gas chromatography for the detailed analysis of petrochemical samples. *J Chromatogr A* **1056**: (1-2), 155-162.
- 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.
- Vernin G, Boniface C, Metzger J, Guiglione C, Hammoud A, Suon K-N, Fraisse D, Parkanyl C. **1988**. GC-MS-Specma bank analysis of *J. communis* needles and berries *Phytochemistry* **27**: (4) 1061-1064.
- Vernin E., Pujol L., Vernin G., Metzger J. **1989**. Analyse par CPG/SM/banque SPECMA des constituants mineurs d'une essence de feuilles de girofle d'Indonésie. Alkylation en catalyse par transfert de phase (CTP) des phénols du girofle. *Parfums, Cosmétiques, Arômes* **89**: 81-94.
- Vernin G, Metzger J, Suon KN, Fraise D, Ghiglione C, Hamoud A, Párkányi C. **1990**. GC/MS-SPECMA bank analysis of essential oils and aromas. GC/MS (EI-PCI) data bank analysis of sesquiterpenic compounds in juniper needle oil-Application of the mass fragmentometry SIM technique. *Lebensmittel-Wissenschaft and technology* **23**: 25-33.
- Vernin G. **1991**. Volatil constituents of the essential oil of *Santolina chamaecyparissus* L. *J Essent Oil Res* **3**: 49-53.
- Vidrich V, Michelozzi M, Bosetto M, Fusi P. **1988**. Primo contributo alla determinazione di oli essenziali e zuccheri liberi su campioni commerciali di coccole di *J. communis* L. subsp. *Communis*, dell'Italia centrale. *Monti e boschi* **4**: 57-60.

- Vidrich V, Michelozzi M, Fusi P. **1991**. Sulla costituzione di olio essenziale da foglia di *Juniperus communis* L. *L'Italia Forestale e Montana* **44**: 4.
- Walter J, Delmond B, Pauly G. **1985**. Les acides résiniques des aiguilles et des tissus corticaux de pins maritimes (*Pinus pinaster* Ait.) des Landes et de Corse: présence de l'acide anticopalique dans les aiguilles des pins d'origine Corse. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris série III* **301**: 539–542.
- Wang ZM, Ding L, Li TC, Zhou X, Wang L, Zhang HQ, Liu L, Li Y, Liu ZH, Wang HJ, Zeng H, He H. **2006**. Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cyminum* L. and *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. *J Chromatogr A* **1102**: 11-17.
- Waridel P, Wolfender JL, Lachavanne JB, Hostettmann K. **2004**. Identification of the polar constituents of Potamogeton species by HPLC-UV with post-column derivatization, HPLC-MSⁿ and HPLC-NMR, and isolation of a new ent-labdane glycoside. *Phytochem* **65**: 2401-2410.
- Webber HJ, Reuther W, Lawton HW. **1967**. *History and Development of the Citrus Industry, The Citrus Industry*. Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD. University of California Press : Berkeley; vol. 1.
- Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D. **1996**. New Sesquiterpene Ethers from Vetiver Oil. *Liebigs Ann* **7**: 1195-1199.
- Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D. **1997a**. New cis-Eudesm-6-ene Derivatives from Vetiver Oil. *Liebigs Ann* **7**: 1783-1787.
- Weyerstahl P, Schlicht V. **1997b**. Synthesis of rac-Bisabola-3(15),10-dien-7-ol. *Liebigs Ann* **8**: 1789-1790.
- Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D. **2000a**. 1,7-Cyclogermacra-1(10),4-dien-15-al, a Sesquiterpene with a Novel Skeleton, and Other Sesquiterpenes from Haitian Vetiver Oil. *Flav Fragr J* **15**: 61-83.
- Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D. **2000b**. Analysis of the Polar Fraction of Haitian Vetiver Oil. *Flav Fragr J* **15**: 153-173.
- Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D, Surburg H. **2000c**. Constituents of Haitian Vetiver Oil. *Flav Fragr J* **15**: 395-412.
- Williamson M, Neuhaus D. **1989**. The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis, VCH : New York.
- Wolfender JL, Hostettmann K. **1996**. Importance of LC/MS in plant analysis. *Spectroscopy Europe* **8**: 7-12.
- Wollenberg KF. **1990**. Quantitative High Resolution ¹³C Nuclear Magnetic Resonance of the Olefinic and Carbonyl Carbons of Edible Vegetable Oils. *J Am Oil Chem Soc* **67**: 487-494.
- Wollgast J, Pallaroni L, Agazzi ME, Anklam E. **2001**. Analysis of procyanidins in chocolate by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric and tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* **926**: 211-220.

- Yano S, Furuno T. **1994**. Resin acids from extracts of pine cones of Kurumatsu (*Pinus thunbergii*). *Mokuzai Gakkaishi* **40** : 72-77.
- Yarovaya OI, Salomatina OV, Korchagina DV, Polovinka MP, Barkhash VA. **2002**. Transformations of 6,7-Epoxy Derivatives of Citral and Citronellal in Various Acidic Media. *Russian Journal of Organic Chemistry* **38**: 1649-1660.
- Yost RA, Enke CG. **1979**. Triple Quadrupole Mass Spectrometry for Direct Mixture Analysis and Structure Elucidation. *Anal Chem* **51**: 1251-1264.
- Zupanc M, Prošek M, Dušan M. **1992**. Combined CI and EI Mass Spectra in the Analysis of Essential Oils. *J High Resol Chromatogr* **15**: 510-513.

ANNEXES

Annexe A : Compositions chimiques des échantillons appartenant au groupe 1

Echantillons			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29			
Composés	Ir ^a	Ir ^p	Clem	L7	N2	G4	I4	M4	G2	L2	J8	J4	D4	E8	H1	B8	I3	G3	B10	G7	N7	I9	H4	G6	L4	E6	G9	D9	G1	J5	N6			
			α-thujène	927	1035	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
α-pinène	931	1023	0,4	0,3	0,4	0,4	0,5	0,3	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,4	0,2	0,3	0,3	0,3		
sabinène	964	1130	0,9	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,3	0,1	0,1	1,4	0,1	0,1	0,1	0,7	0,1	0,7	0,6	0,1	0,1	0,9	0,8	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,6		
β-pinène	972	1110	0,1	-	tr	tr	-	-	-	0,1	tr	tr	tr	0,2	0,1	tr	tr	tr	-	0,1	0,4	0,1	0,1	tr	0,1	tr	0,2	0,2	0,1	0,1	tr			
octanal	979	1294	0,6	0,1	0,1	-	0,1	0,2	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	-	0,3	0,1	0,1	0,1	1,3	0,1	1,1	0,1	0,2	0,6	0,1	0,1	1,2			
myrcène	980	1165	1,6	1,5	1,6	1,6	1,7	1,5	1,4	1,6	1,5	1,4	1,5	1,4	1,7	1,5	1,4	1,3	1,4	1,4	1,4	1,3	1,4	1,3	1,3	1,4	1,3	1,3	1,3	1,2	1,2			
α-terpinène	1010	1186	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	tr	-	-	-	-	-	0,1	tr	-	-	-	0,1	-	0,1	0,1	-	-	-		
p-cymène	1011	1281	-	-	0,1	tr	-	0,2	0,1	0,1	-	-	tr	0,1	tr	-	tr	-	-	0,4	tr	0,1	0,1	-	-	-	1,3	0,4	0,2	0,1	-			
limonène	1030	1218	90,0	95,1	93,7	93,8	93,2	92,6	92,5	92,5	92,1	91,6	92,0	91,5	89,7	89,5	89,4	88,0	87,3	86,7	86,7	86,2	85,7	85,6	85,0	85,0	81,6	80,9	80,5	79,9	78,2			
β-phellandrène	1030	1215	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	0,5	0,3	0,3	-	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3			
(E)-β-ocimène	1034	1241	0,1	tr	-	-	0,1	-	-	tr	0,1	-	tr	tr	tr	-	-	tr	-	tr	tr	tr	-	tr	0,1	tr	-	-	-	-	-	0,1		
γ-terpinène	1051	1253	0,1	-	0,5	0,2	0,1	-	0,3	1,6	-	0,1	-	2,2	0,2	0,4	-	0,8	-	2,5	0,7	0,5	1,0	-	0,2	0,2	3,5	2,9	3,5	1,0	0,2			
octanol	1051	1550	0,1	tr	-	-	0,1	-	-	tr	tr	-	tr	-	0,1	-	-	-	-	tr	0,1	tr	-	-	0,2	-	tr	-	-	tr	0,3			
terpinolène	1079	1288	-	-	tr	-	-	-	-	0,1	-	-	-	0,1	-	0,1	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2	0,2	0,1	-			
linalol	1083	1550	3,8	1,5	0,4	1,3	1,6	1,5	3,2	1,2	1,3	1,0	1,0	0,5	2,5	2,6	1,6	4,6	5,3	3,4	2,0	7,4	4,8	0,7	5,6	3,4	4,9	1,4	4,5	5,1	13,0			
citronellal	1135	1489	0,2	tr	0,2	-	-	0,1	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,5	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,5	0,1			
terpinèn-4-ol	1162	1605	0,2	0,1	0,1	-	-	0,1	-	-	-	0,2	-	0,2	0,2	0,1	0,3	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	-	0,7	0,2	0,4	0,3	0,1	0,1	0,3			
α-terpinéol	1172	1702	0,3	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3	0,7	0,6	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1	0,7	0,4	0,3	0,6	0,5	0,8	0,3	0,3	0,3	0,5	0,7	0,4	0,5	0,9			
décanal	1188	1507	0,3	0,1	-	-	0,1	0,2	-	0,1	0,2	0,3	-	0,1	0,2	0,1	0,6	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,3	0,1	0,8	0,2	0,3	0,2	0,1	0,1	0,3			
nérol	1208	1792	-	0,1	-	-	-	-	0,2	0,1	0,1	0,2	-	-	-	-	0,6	-	-	0,1	-	0,1	0,1	-	0,1	-	-	-	-	-	0,1	0,2		
citronellol	1210	1772	0,1	-	0,2	-	0,1	0,1	-	0,1	-	0,4	0,1	-	0,2	-	0,4	-	0,3	0,1	0,2	0,2	0,3	0,5	0,1	0,3	0,3	0,3	0,6	0,5	0,2			
carvone	1222	1764	0,1	-	-	-	-	0,1	-	-	0,4	-	0,1	tr	0,8	-	0,6	-	1,0	-	0,3	-	0,1	0,1	-	0,2	0,2	-	-	0,4	0,3			
pipéritone	1232	1730	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	0,1	tr	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
péridaldehyde	1245	1792	0,1	0,1	0,3	0,2	-	0,2	-	0,1	0,2	-	0,6	0,1	0,1	0,3	0,4	0,5	0,1	0,1	0,8	-	0,4	0,5	0,3	-	0,1	0,4	0,5	0,8	-			
thymol	1266	2189	0,1	-	-	-	-	tr	0,1	0,1	0,3	0,1	-	0,1	-	-	-	-	-	0,1	0,2	0,3	-	-	-	0,2	0,5	-	0,5	-	0,1			
alcool perillylique	1268	2007	-	-	0,5	-	-	0,2	0,2	tr	0,1	-	0,3	-	tr	0,6	0,4	0,2	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-		
N-methyl-anthranilate de methyle	1377	2088	-	-	0,8	0,4	0,8	0,9	-	0,3	0,4	1,0	2,5	0,6	-	1,8	0,4	-	-	1,9	2,9	-	1,0	8,7	0,3	4,8	1,1	7,4	4,5	7,1	-			
(E)-β-caryophyllene	1424	1591	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	tr	0,1	tr	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
(E.E)-α-farnesène	1501	1745	-	-	tr	0,2	-	tr	-	tr	-	-	-	tr	-	-	-	0,1	-	tr	0,1	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
α-sinensal	1726	2340	-	-	-	0,3	-	0,1	-	-	0,1	-	0,1	0,3	0,1	0,2	0,1	0,4	0,2	0,3	0,5	0,4	0,1	-	0,5	0,7	0,5	0,1	0,7	0,2	0,2			
Total:			99,3	99,6	99,5	98,7	99,0	99,0	99,0	99,4	98,6	98,1	99,3	98,9	98,4	98,3	97,4	97,6	98,1	99,0	98,8	99,2	98,4	99,0	98,4	98,4	98,1	98,8	98,6	98,8	97,9			
Rendement :			0,21	0,16	0,27	0,20	0,47	0,22	0,35	0,13	0,15	0,09	0,15	0,05	0,24	0,15	0,09	0,11	0,16	0,03	0,09	0,14	0,19	0,11	0,04	0,03	0,09	0,14	0,09	0,06	0,14			

Annexe B : Compositions chimiques des échantillons appartenant au groupe 2

Echantillons			30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Composés	Ir ^a	Ir ^p																					
			F8	I8	D7	K6	H9	F2	C8	G10	E5	B7	I6	J6	D10	K5	K9	H7	K4	N8	D1	F4	H3
α-thujène	927	1035	0,3	0,5	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	0,6	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,6	0,6	0,4	0,2	0,5	0,4
α-pinène	931	1023	1,0	1,2	0,9	0,9	1,2	1,1	1,3	1,0	1,1	1,5	1,2	1,2	1,2	0,9	-	1,6	1,4	1,0	0,5	1,4	1,2
sabinène	964	1130	0,2	0,2	0,7	0,5	0,3	0,4	0,2	0,3	0,2	0,7	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,3
β-pinène	972	1110	0,8	1,2	0,8	0,8	1,0	1,0	1,4	0,9	1,0	1,3	1,0	1,0	1,4	0,9	1,0	1,4	1,4	1,1	0,6	1,3	1,1
octanal	979	1294	0,3	0,2	1,3	0,2	-	0,8	1,4	1,9	0,9	0,6	0,2	0,2	0,2	1,0	0,3	-	0,4	0,4	0,6	0,3	2,4
myrcène	980	1165	1,5	1,5	1,5	1,4	1,5	1,4	0,1	1,3	1,4	1,6	1,4	1,4	1,4	1,3	1,3	1,7	1,4	1,3	1,3	1,5	1,4
α-terpinène	1010	1186	0,3	0,4	0,3	0,2	0,4	0,3	0,5	0,3	0,4	0,4	0,4	0,3	0,5	0,4	0,4	0,4	0,5	0,4	0,3	0,4	0,3
p-cymène	1011	1281	0,5	0,5	0,7	2,9	0,5	3,0	0,7	0,9	0,6	1,2	0,8	1,0	0,8	0,9	0,6	1,7	1,6	1,4	1,3	2,8	2,5
limonène	1030	1218	76,6	75,1	74,2	73,9	73,4	73,3	73,1	71,9	71,8	71,7	71,7	71,6	71,5	70,9	70,1	69,8	69,8	69,4	68,8	68,4	67,4
β-phellandrène	1030	1215	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3
(E)-β-ocimène	1034	1241	-	tr	tr	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-
γ-terpinène	1051	1253	13,5	14,8	11,3	10,3	12,7	10,4	15,0	13,8	13,7	16,8	16,1	16,0	16,3	12,6	15,4	19,1	15,2	15,7	16,6	15,7	14,2
octanol	1051	1550	-	-	0,3	-	-	0,1	-	0,2	-	tr	-	-	-	-	-	tr	tr	0,1	0,2	-	-
terpinolène	1079	1288	0,6	0,7	0,6	0,5	0,6	0,5	0,7	0,6	0,6	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9	0,7	0,7	0,8	0,8	0,7
linalol	1083	1550	1,5	0,2	1,5	1,5	3,3	2,2	0,7	2,5	3,7	0,5	1,0	1,0	1,0	3,4	3,5	1,0	1,1	3,9	3,2	3,0	1,0
citronellal	1135	1489	-	-	0,2	0,1	-	0,1	0,2	-	-	-	-	-	0,2	-	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
terpinèn-4-ol	1162	1605	0,4	0,4	0,6	0,5	0,8	0,6	0,7	0,6	0,6	0,4	0,5	0,5	0,7	1,0	1,0	0,2	1,1	0,7	0,4	0,5	0,9
α-terpinéol	1172	1702	1,0	0,3	1,0	0,6	1,5	1,4	1,2	1,3	1,3	0,7	0,7	0,7	1,0	2,3	2,1	0,4	2,0	1,6	1,0	1,0	1,9
décanal	1188	1507	-	0,3	-	0,2	-	0,2	-	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	-	0,1	-	0,1	0,1	0,5	-	0,6
nérol	1208	1792	-	-	-	0,2	-	0,1	-	0,1	-	-	-	-	0,1	0,1	0,3	-	-	-	-	0,1	-
citronellol	1210	1772	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,4	0,1	0,1	0,1	-	-	0,1	0,2	0,1	-	-	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1
carvone	1222	1764	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	0,1	-	-
pipéritone	1232	1730	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
péрилaldehyde	1245	1792	-	0,2	0,2	-	-	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	-	-	-	0,3	0,2	-	0,4	0,2	0,1	-	0,3
thymol	1266	2189	0,3	0,2	0,9	0,6	0,3	0,2	-	-	0,2	-	0,3	0,3	-	-	-	-	0,1	-	0,2	-	-
alcool perillylique	1268	2007	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	0,2	0,2
N-methyl-anthranilate de méthyle	1377	2088	-	-	-	1,8	-	-	-	-	-	-	0,9	0,9	-	-	-	-	-	-	0,9	-	1,2
(E)-β-caryophyllène	1424	1591	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	-
(E.E)-α-farnésène	1501	1745	-	-	0,1	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-
α-sinensal	1726	2340	0,1	0,1	0,2	0,5	0,2	0,4	-	-	0,2	-	0,3	0,3	-	-	-	0,1	-	0,1	0,3	-	-
Total:			99,3	98,3	98,0	98,4	98,5	99,1	98,5	99,1	99,0	99,2	98,2	98,2	98,2	98,3	98,1	99,3	98,6	99,1	98,9	98,4	98,3
Rendement :			0,02	0,09	0,06	0,09	0,11	0,23	0,11	0,26	0,05	0,17	0,12	0,22	0,11	0,11	0,15	0,29	0,07	0,07	0,22	0,42	0,22

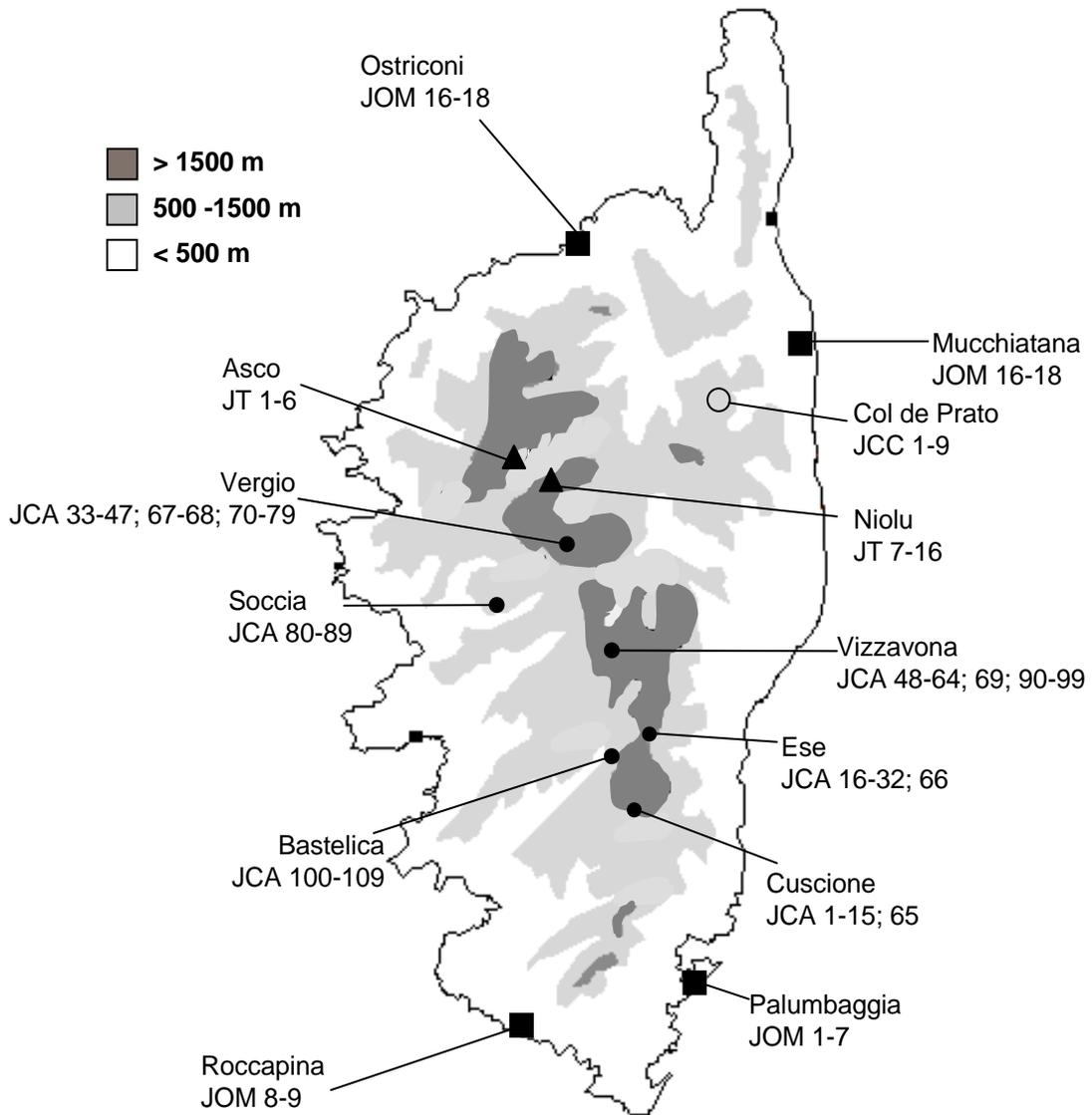
Annexe B (suite) : Compositions chimiques des échantillons appartenant au groupe 2

Echantillons	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70		
Composés	Ir ^a	Ir ^p	L3	M8	L9	B3	F3	F10	J1	D2	F5	F7	B9	F6	C10	C4	N1	C7	N4	L1	H8	Mand
α-thujène	927	1035	0,3	0,4	0,3	0,5	0,4	0,4	0,7	0,7	0,5	0,7	0,5	0,4	0,5	0,7	0,8	0,6	0,4	0,7	0,4	0,5
α-pinène	931	1023	0,7	1,0	0,8	1,3	1,0	1,1	1,7	1,8	1,3	1,6	1,2	1,0	1,2	1,7	1,9	1,3	0,9	1,6	0,6	1,3
sabinène	964	1130	0,2	0,2	0,2	0,2	0,5	0,2	0,2	0,2	0,6	0,2	0,3	0,2	0,4	0,3	0,3	0,2	1,0	0,5	0,4	0,2
β-pinène	972	1110	0,9	1,0	0,8	1,1	1,1	1,1	1,5	1,5	1,3	1,6	1,4	1,1	1,3	1,8	1,9	1,4	1,0	1,9	0,9	1,2
octanal	979	1294	1,1	0,3	-	1,0	0,8	0,2	0,6	0,1	1,3	0,1	1,0	0,7	0,9	0,5	-	1,5	0,2	2,6	3,1	0,2
myrcène	980	1165	1,2	1,3	1,3	1,4	1,2	1,3	1,6	1,5	1,5	1,5	1,3	1,2	1,2	1,4	1,5	1,3	1,2	1,2	0,9	1,5
α-terpinène	1010	1186	0,3	0,4	0,3	0,4	0,6	0,4	0,4	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	0,3	0,7	0,5	0,4
p-cymène	1011	1281	1,2	0,9	0,6	0,8	0,6	2,6	2,5	4,3	2,4	2,7	0,8	2,1	2,1	4,4	2,5	1,7	5,3	2,7	1,6	1,1
limonène	1030	1218	67,3	67,3	66,8	66,7	66,0	66,0	65,8	65,5	63,3	61,8	61,7	60,0	59,3	58,5	58,1	58,0	55,3	52,3	46,8	70,5
β-phellandrène	1030	1215	0,2	0,2	0,4	0,6	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,5	0,2	0,3	0,3	0,2
(E)-β-ocimène	1034	1241	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-
γ-terpinène	1051	1253	17,1	17,0	14,8	15,0	16,1	18,6	20,0	17,1	16,7	19,9	17,1	18,3	20,6	17,8	24,9	20,9	9,2	21,3	14,3	16,8
octanol	1051	1550	-	-	tr	-	-	-	-	-	0,1	tr	-	0,1	tr	0,1	-	0,1	-	-	1,6	tr
terpinolène	1079	1288	0,8	0,9	0,7	0,7	0,8	1,0	0,9	0,8	0,8	1,0	0,8	0,9	1,0	0,9	1,2	1,0	0,5	1,1	0,8	0,8
linalol	1083	1550	0,8	1,6	9,5	4,0	1,8	1,6	0,9	0,9	2,0	1,0	6,7	4,9	1,9	2,2	0,8	1,8	13,3	3,0	3,9	0,7
citronellal	1135	1489	-	-	-	0,2	0,1	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	1,8	0,1
terpinèn-4-ol	1162	1605	1,2	0,9	0,4	0,9	1,3	1,0	0,3	0,4	1,4	0,8	1,2	1,2	0,9	1,7	0,7	1,2	1,4	1,6	1,8	0,5
α-terpinéol	1172	1702	2,6	1,9	0,8	2,0	2,5	2,1	0,7	0,8	2,6	1,2	2,7	2,8	1,6	2,6	0,5	2,5	1,6	3,4	4,1	0,9
décanal	1188	1507	0,5	0,2	0,1	0,3	0,2	-	0,4	-	0,3	0,1	-	0,2	-	0,3	0,2	0,3	0,5	0,3	0,8	0,1
nérol	1208	1792	-	-	-	-	0,1	-	0,1	0,1	-	-	-	0,2	-	0,1	-	-	-	0,2	0,1	-
citronellol	1210	1772	0,3	0,2	0,1	0,3	0,2	-	-	-	0,2	0,1	0,2	-	0,1	0,2	-	0,1	0,1	-	0,3	0,2
carvone	1222	1764	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,1	-	-	-	-	-	0,3	-
pipéritone	1232	1730	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	0,1	-	-	0,2	-	-	0,1	-
périllaldehyde	1245	1792	0,4	-	-	0,2	0,5	0,4	-	-	0,2	0,2	-	0,2	0,2	0,3	-	0,4	-	0,4	1,0	0,1
thymol	1266	2189	0,4	1,5	0,5	1,0	0,8	-	0,1	-	0,4	0,9	-	1,1	1,5	0,6	-	1,0	1,0	1,1	2,4	0,3
alcool perillylique	1268	2007	-	-	-	0,1	0,1	-	-	-	0,8	-	-	-	0,1	0,3	-	-	1,9	-	0,3	-
N-méthyl-anthranilate de méthyle	1377	2088	1,0	0,6	0,1	-	1,6	-	0,5	2,3	-	2,5	-	0,5	1,4	-	1,3	1,0	-	1,4	8,8	1,3
(E)-β-caryophyllène	1424	1591	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	0,1
(E,E)-α-farnésène	1501	1745	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	0,1
α-sinensal	1726	2340	-	0,5	0,4	0,2	0,2	-	-	0,2	-	0,3	0,1	0,2	0,5	0,1	0,3	0,3	0,5	-	0,3	0,3
Total:			98,5	98,3	98,9	98,8	98,8	98,3	99,1	98,9	98,2	98,9	97,9	98,4	97,9	97,3	97,6	98,0	95,9	98,4	98,0	99,4
Rendement :			0,16	0,15	0,02	0,27	0,05	0,06	0,14	0,32	0,14	0,15	0,13	0,18	0,03	0,07	0,07	0,08	0,11	0,21	0,20	0,18

Annexe C. Classification des hydrides par rapport à leurs parents (clémentine = 1 ou mandarine = 2) d'après la composition chimique de leurs huiles essentielles.

Hybrides ayant conservés le profil du même parent dans les deux organes			Hybrides ayant changés de profil entre les deux organes		
Hybride	zestes	feuilles	Hybride	zestes	feuilles
B10	1	1	B8	1	2
G2	1	1	D4	1	2
G3	1	1	D9	1	2
G9	1	1	E6	1	2
H1	1	1	E8	1	2
I9	1	1	G1	1	2
L2	1	1	G4	1	2
L4	1	1	G6	1	2
L7	1	1	G7	1	2
N6	1	1	H4	1	2
B9	2	2	I3	1	2
C10	2	2	J4	1	2
C4	2	2	J5	1	2
C7	2	2	J8	1	2
D2	2	2	M4	1	2
F3	2	2	N2	1	2
F5	2	2	N7	1	2
F6	2	2	B7	2	1A
F7	2	2	D1	2	1A
H3	2	2	D7	2	1A
H8	2	2	E5	2	1A
I6	2	2	F2	2	1A
I8	2	2	G10	2	1A
J1	2	2	H9	2	1A
K6	2	2	K5	2	1A
K9	2	2	N4	2	1A
L1	2	2	B3	2	1B
L3	2	2	C8	2	1B
M8	2	2	D10	2	1B
N1	2	2	F10	2	1B
N8	2	2	F4	2	1B
Total 31			F8	2	1B
I4	<i>1</i>	<i>ND</i>	H7	2	1B
			J6	2	1B
			K4	2	1B
			L9	2	1B
			Total = 36		

1A= profile clémentine, 1B= sous-groupe clémentine 2= profile mandarine



Annexe D : Carte d'échantillonnage des genévriers de Corse

JCA ● : *J. communis* ssp. *alpina*; *JCC* ○ : *J. communis* ssp. *alpina* ; *JOM* ■ : *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa* ; *JT* ▲ : *J. thurifera*

Annexe E : Composition chimique des 109 échantillons d'huile essentielle de *J. communis* ssp. *alpina*

Echantillons	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Localisations	Cuscione															Ese							
Composés																							
α -thujène	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	0,8	-	-	-	-	-	-	1,2	-	-	-	-	-
α -pinène	10,7	9,0	3,7	2,8	3,3	4,1	7,1	4,1	6,4	6,6	10,0	13,8	11,7	3,4	7,3	11,7	15,5	8,9	4,6	7,9	27,5	11,1	9,5
camphène	0,1	0,1	-	-	-	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1
sabinène	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	1,9	0,2	0,2	0,2	4,7	0,3	0,3	0,3	0,2	0,1	0,2	6,5	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
β -pinène	1,6	1,2	0,6	0,5	0,5	0,8	1,1	0,6	0,9	1,0	1,3	2,2	1,3	0,6	1,2	1,2	1,7	0,9	0,8	1,0	0,9	1,3	1,2
myrcène	4,1	4,1	3,8	3,7	3,7	4,0	3,9	3,7	3,8	4,1	4,3	5,2	4,7	3,6	4,3	4,2	4,3	4,0	4,4	3,8	3,3	4,0	4,2
δ -2-carène*	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,0	0,5	0,3	0,4	0,4	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4
α -phellandrène*	4,6	4,4	3,7	4,1	4,8	0,4	4,7	4,9	4,0	4,4	3,9	4,5	5,3	3,5	4,8	4,9	4,8	4,6	4,8	3,9	4,1	4,6	4,5
δ -3-carène	-	-	4,2	-	-	4,9	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0	0,1	0,0	0,1	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
α -terpinène	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,4	0,2	0,1	0,1	0,9	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	1,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2
p-cymène	0,9	1,0	1,0	1,5	0,5	1,6	2,3	1,2	2,0	1,8	1,7	0,9	1,1	2,2	1,0	2,5	1,5	1,4	1,6	0,9	0,6	0,6	1,7
limonène*	36,1	39,7	49,5	43,9	45,2	40,7	26,2	38,1	38,1	33,3	24,7	32,7	30,3	46,2	33,6	27,3	26,1	27,5	41,3	46,3	24,6	40,0	36,6
β -phellandrène*	16,5	15,7	13,7	16,4	16,5	19,0	20,7	17,9	18,3	17,5	15,5	16,1	19,6	15,8	18,9	20,3	18,8	17,3	20,1	14,5	14,5	15,5	18,1
γ -terpinène	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,5	0,1	0,1	0,1	1,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	1,9	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
terpinolène	1,2	1,1	1,3	1,2	1,2	1,3	1,2	1,3	1,0	1,2	1,6	1,4	1,2	1,0	1,5	1,2	1,2	1,8	1,2	1,2	1,2	1,3	1,1
linalol	0,5	0,4	0,1	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,6	0,6	0,2	0,1	0,4	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	0,2
cis-p-menth-2-èn-1-ol*	0,3	0,4	0,2	0,3	0,4	0,2	0,4	0,4	0,3	0,4	0,5	0,3	0,4	0,3	0,4	0,4	0,3	0,4	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3
trans-p-menth-2-èn-1-ol*	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,4	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3	0,2	0,3	0,4	0,3	0,2	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,3
cryptone	0,1	0,1	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,5	0,3	0,1	0,2	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,0	0,0	0,3
p-cymèn-8-ol	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3	0,4	0,3	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2
terpinèn-4-ol	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	1,3	0,4	0,5	0,4	3,3	0,5	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	3,9	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
α -terpinéol	1,1	1,8	1,0	2,7	0,9	2,8	2,7	1,5	2,8	1,1	2,3	1,0	1,4	1,8	0,9	1,9	1,8	2,4	2,2	0,9	1,2	1,3	1,0
myrténol*	-	0,4	-	0,3	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,1	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,1
trans-pipéritol	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
citronellol	0,5	0,6	0,5	0,8	0,5	0,4	0,4	0,6	1,0	0,6	0,4	0,4	0,4	0,6	0,3	1,0	0,3	0,5	0,3	0,3	0,4	0,3	0,5
acétate de bornyle	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1

acétate de myrtényle	2,2	2,0	0,4	1,1	1,4	0,3	1,0	1,5	1,2	2,1	2,7	1,0	2,1	0,1	2,7	0,7	1,8	0,5	0,6	1,0	1,7	2,1	0,5
acétate d' α -terpinyle*	8,5	8,9	6,8	9,1	9,3	9,6	11,6	10,0	8,9	11,1	9,3	7,6	10,6	9,5	12,3	9,2	8,6	5,6	8,2	7,2	6,2	6,8	11,3
acétate de citronellyle*	0,6	0,4	0,4	0,7	0,7	0,4	0,4	0,8	0,4	0,8	0,4	0,4	0,5	0,5	0,4	0,8	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,2	0,5
β -élémostène	0,2	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,1	0,3	0,1	0,4	0,2	0,3	0,3	0,4	0,3	0,2	0,4	0,4	0,3
α -humulène	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
α -sélinène	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2
γ -cadinène	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1
δ -cadinène	0,4	0,4	0,2	0,3	0,4	0,3	0,4	0,8	0,4	0,3	0,3	0,4	0,2	0,7	0,3	0,6	0,7	0,6	0,5	0,5	1,0	0,9	0,4
β -élémol	0,4	0,8	0,6	0,6	0,9	0,5	0,2	1,0	0,5	1,4	0,2	0,1	0,4	0,4	0,3	1,1	0,1	0,4	0,9	1,0	1,0	0,2	0,3
(E)-nérolidol	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,2	0,4	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0
γ -eudesmol	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,2	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0	0,1	0,2	0,2	0,2	0,0	0,1
τ -cadinol*	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,2	0,3	0,1	0,2	0,2	0,4	0,3	0,1
τ -muurolol*	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,2	0,3	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,2
β -eudesmol	0,2	0,4	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3	0,5	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,1	0,6	0,8	0,3	0,4	0,5	0,9	0,6	0,4
α -cadinol	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,0	0,1	0,2	0,2	0,2	0,0	0,1
(2E,6E)-farnésol	0,2	0,5	0,2	0,2	0,5	0,2	0,5	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,1	0,1	0,3	0,4	0,4	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
manol	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,4	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,0	0,1	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1	0,3	0,0	0,0
Total	93,7	96,4	95,0	93,9	94,5	94,4	92,1	94,2	94,1	93,0	94,5	92,3	95,1	94,6	94,5	94,3	93,1	95,4	96,4	95,1	94,5	94,8	95,9
Rendements	0,7	0,7	0,9	0,7	0,8	0,9	0,6	0,6	0,5	1,1	1,0	0,6	0,6	1,0	0,8	0,4	0,6	1,1	0,9	1,3	1,1	1,1	0,8

*L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire sauf pour les composés suivis de * : pourcentage sur colonne polaire*

C= Cuscione E= Ese Vi= Vizzavona

Annexe E : Composition chimique des 109 échantillons d'huile essentielle de *J. communis* ssp. *alpina* (suite)

Echantillons	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47		
Localisations	Ese									Vergio																
Composés																										
α-thujène	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1	-	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
α-pinène	7,4	9,4	7,5	4,3	9,7	7,0	11,3	1,4	6,3	15,3	12,0	9,1	4,3	3,8	4,6	5,1	5,5	5,9	6,9	6,1	3,8	14,1	7,7	3,2		
camphène	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0		
sabinène	5,7	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	5,7	0,3	0,2	0,9	0,2	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2		
β-pinène	0,9	0,9	1,0	0,8	1,3	0,6	1,0	0,4	0,9	0,7	1,3	1,0	0,7	0,7	0,6	0,7	0,9	1,0	1,0	0,8	0,7	1,5	1,2	0,6		
myrcène	4,3	4,0	4,4	3,8	4,1	3,4	3,7	4,0	4,0	3,1	3,7	3,2	4,2	4,1	3,8	3,7	4,3	4,2	3,7	3,6	4,3	3,8	4,1	3,9		
δ-2-carène*	0,3	0,4	0,5	0,4	0,4	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4		
α-phellandrène*	3,8	4,7	6,0	3,6	4,2	2,8	2,5	4,7	5,1	4,5	5,9	4,7	4,2	5,9	5,3	4,7	6,8	5,5	4,6	3,7	6,1	4,5	4,7	6,1		
δ-3-carène	0,0	0,0	0,1	0,4	0,0	3,5	0,1	0,0	0,0	0,0	0,2	2,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,4	0,3	0,0	0,1	0,5	0,7		
α-terpinène	1,4	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	1,2	0,2	0,2	0,6	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2		
p-cymène	1,3	1,0	1,3	2,1	1,1	0,6	0,5	1,3	1,5	1,7	0,9	1,2	1,3	1,6	1,4	1,1	1,2	1,4	1,3	1,3	1,1	0,9	1,2	1,4		
limonène*	29,1	39,4	27,6	38,2	46,5	50,1	53,9	46,3	35,4	28,5	35,0	35,1	34,4	38,3	35,3	34,1	35,4	36,1	38,2	41,3	34,2	32,5	37,7	30,3		
β-phellandrène*	15,1	17,2	21,9	16,6	15,3	9,5	8,7	17,8	19,6	19,5	17,8	15,9	15,5	22,6	20,1	16,9	24,2	21,4	17,0	14,3	21,6	16,3	18,0	21,7		
γ-terpinène	2,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	1,8	0,1	0,1	0,8	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	
terpinolène	1,9	1,2	1,5	1,1	1,2	1,4	1,0	1,3	1,3	1,0	1,3	1,3	1,7	1,3	1,2	1,4	1,3	1,3	1,0	1,1	1,3	1,2	1,3	1,5		
linalol	0,2	0,1	0,1	0,5	0,2	0,3	0,1	0,1	0,3	0,0	0,1	0,3	0,2	0,1	0,0	0,2	0,1	0,3	0,6	0,4	0,2	0,3	0,3	0,4		
cis-p-menth-2-èn-1-ol*	0,4	0,3	0,3	0,4	0,2	0,2	0,1	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,5	0,3	0,3	0,5	0,4	0,4	0,6		
trans-p-menth-2-èn-1-ol*	0,3	0,2	0,2	0,4	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,4		
cryptone	0,1	0,1	0,2	0,8	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	
p-cymèn-8-ol	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	
terpinèn-4-ol	4,5	0,3	0,2	0,5	0,3	0,5	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	4,0	0,2	0,2	1,8	0,4	0,4	0,3	0,5	0,4	0,3	0,4	0,6		
α-terpinéol	1,9	1,2	1,1	2,7	1,3	1,3	1,0	0,9	1,0	2,6	1,7	2,6	2,1	1,7	2,3	2,9	1,5	1,5	2,2	3,2	1,9	1,5	1,6	1,9		
myrténol*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,5	0,0	0,0	0,0	0,3	0,4	0,2	0,2	0,3	0,3	0,0	0,2	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		
trans-pipéritol	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	
citronellol	0,7	0,1	0,3	0,4	0,3	0,9	0,5	0,5	0,3	0,3	0,4	0,5	0,4	0,3	0,5	0,4	0,3	0,9	0,8	0,6	0,6	0,4	0,3	0,5		
acétate de bornyle	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,0	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	

acétate de myrtényle	0,7	2,1	1,4	0,0	0,6	0,9	2,6	0,4	1,0	0,5	0,8	1,1	0,3	0,8	1,3	1,3	0,4	0,6	0,0	2,9	2,7	1,7	0,7	1,8
acétate d'α-terpinyle*	8,0	8,2	12,3	11,0	7,2	4,9	3,1	9,9	11,2	9,0	7,0	6,8	8,4	9,5	10,1	11,1	9,7	8,7	9,8	8,0	9,3	8,5	9,5	13,2
acétate de citronellyle*	0,7	0,2	0,6	0,4	0,3	0,9	0,6	0,6	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,6	0,8	0,6	0,5	0,7	1,0	0,5	0,5	0,5	0,4	0,6
β-élémente	0,2	0,5	0,6	0,2	0,3	0,2	0,5	0,2	0,4	0,3	0,2	0,4	0,3	0,4	0,4	0,3	0,2	0,2	0,1	0,5	0,4	0,7	0,3	0,1
α-humulène	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,2	0,2	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,7	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1
α-sélinène	0,2	0,2	0,4	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,3	0,2	0,0	0,2	0,1
γ-cadinène	0,1	0,2	0,4	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,3	0,2	0,4	0,1	0,1
δ-cadinène	0,5	0,9	1,4	0,4	0,3	0,4	1,0	0,3	0,6	0,5	0,5	0,6	0,5	0,3	0,7	0,7	0,4	0,3	0,2	0,8	0,6	1,1	0,4	0,2
β-élémol	0,5	0,6	0,9	0,7	0,3	1,9	0,0	1,2	1,9	0,6	1,0	0,6	0,5	0,2	1,7	0,9	0,6	0,9	1,6	0,1	0,8	0,4	0,3	0,8
(E)-nérolidol	0,1	0,0	0,2	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,2	0,2	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0
γ-eudesmol	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,5	0,0	0,2	0,3	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
τ-cadinol*	0,2	0,2	0,4	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,2	0,2	0,0	0,1	0,2	0,2	0,0	0,2	0,1	0,2
τ-muurolool*	0,2	0,2	0,4	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	0,1	0,1	0,0	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1
β-eudesmol	0,5	0,6	1,0	0,4	0,2	0,8	0,3	0,4	0,5	0,6	0,6	0,4	0,3	0,1	0,9	0,5	0,2	0,3	0,4	0,4	0,3	0,5	0,2	0,3
α-cadinol	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,5	0,0	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,0	0,4	0,2	0,1	0,2	0,3	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2
(2E,6E)-farnésol	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,4	0,3	0,1	0,5	0,3	0,5	0,3	0,4	0,1	0,4	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3	0,3	0,1	0,1	0,4
manol	0,2	0,3	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,2	0,1	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1
Total	95,6	96,2	95,9	92,4	97,3	95,9	96,6	94,9	96,4	93,2	95,2	91,9	96,5	95,1	95,7	94,2	96,7	95,7	96,0	94,0	94,1	94,2	94,1	93,6
Rendements	0,7	0,8	1,0	1,1	1,1	1,0	1,7	1,1	1,7	1,5	1,1	0,5	1,3	2,0	1,1	1,4	1,7	1,0	0,7	0,4	0,4	0,9	0,5	0,6

*L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire sauf pour les composés suivis de * : pourcentage sur colonne polaire*

C= Cuscione E= Ese Vi= Vizzavona

Annexe E : Composition chimique des 109 échantillons d'huile essentielle de *J. communis* ssp. *alpina* (suite)

Echantillons	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	
Localisations	Vizzavona																	C	E	Vergio		Vi	
Composés																							
α-thujène	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	1,1	2,7	1,3	2,1	2,9	3,0	
α-pinène	8,9	33,7	10,5	23,2	20,7	8,8	12,0	12,7	3,2	5,9	7,2	2,4	5,5	2,6	10,2	7,5	8,3	5,8	7,4	10,3	3,9	7,8	
camphène	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	
sabinène	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	7,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	1,7	8,4	23,6	7,0	13,7	31,3	9,8	
β-pinène	1,0	1,3	1,0	0,8	2,0	0,9	1,3	1,3	0,6	0,8	0,9	0,4	0,8	0,5	1,2	1,0	1,1	0,8	0,8	0,9	0,5	0,7	
myrcène	3,6	3,5	3,4	3,4	4,1	4,3	3,9	3,8	4,1	4,1	3,7	3,5	4,0	3,9	3,9	3,6	4,6	4,4	4,4	3,7	4,3	4,2	
δ-2-carène*	0,8	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4	0,3	0,4	0,4	0,8	0,3	0,6	0,4	0,9	0,4	0,3	0,2	0,4	0,3	0,1	0,2	
α-phellandrène*	3,6	3,8	3,4	3,2	4,1	3,8	4,7	3,5	5,3	5,0	4,4	4,3	6,7	4,9	4,1	3,6	4,3	2,3	5,5	3,4	1,6	2,9	
δ-3-carène	0,0	0,0	10,8	0,0	0,0	0,0	1,3	3,8	0,0	0,2	0,0	3,7	0,0	3,9	0,0	0,4	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
α-terpinène	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	1,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,4	1,1	2,9	1,4	2,6	2,6	4,2	
p-cymène	0,9	0,5	0,8	0,6	0,5	0,6	1,2	1,0	1,1	1,9	1,1	1,0	1,9	1,5	1,1	1,8	1,1	1,3	1,3	1,4	0,7	0,7	
limonène*	43,3	23,0	36,2	35,0	33,3	29,7	32,0	39,4	37,9	39,1	47,7	42,2	28,4	39,3	39,5	34,1	32,2	14,8	16,8	18,4	9,9	15,8	
β-phellandrène*	13,0	13,0	12,8	11,3	14,3	13,2	18,2	13,9	20,6	19,8	13,2	16,1	25,2	18,5	14,9	16,3	15,4	9,3	19,9	11,4	5,3	9,0	
γ-terpinène	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	1,9	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,6	1,7	4,7	2,1	4,1	4,3	6,8	
terpinolène	1,2	1,0	2,0	1,1	1,1	1,9	1,2	1,3	1,4	1,2	1,1	1,5	1,4	1,6	1,1	1,2	1,9	2,7	2,0	2,1	2,6	3,2	
linalol	0,2	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	0,2	0,4	0,3	0,2	0,3	0,7	0,1	
cis-p-menth-2-èn-1-ol*	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,3	0,2	0,4	0,3	0,2	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,7	0,5	0,6	0,6	0,6	
trans-p-menth-2-èn-1-ol*	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,5	0,3	0,4	0,9	0,4	
cryptone	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,0	0,4	0,2	0,2	0,0	0,3	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	
p-cymèn-8-ol	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,3	0,1	0,3	0,2	0,2	0,2	0,0	0,0	0,0	
terpinèn-4-ol	0,4	0,3	0,3	0,4	0,3	3,8	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,3	1,3	3,4	10,2	4,2	8,9	9,7	15,2	
α-terpinéol	3,6	3,6	2,6	1,5	1,5	1,2	2,3	1,5	3,1	4,2	4,8	2,6	3,4	3,0	4,4	3,7	1,3	1,0	1,2	1,9	0,6	1,7	
myrténol*	0,3	0,1	0,1	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,0	0,7	0,0	0,4	0,3	0,0	0,0	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	
trans-pipéritol	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,0	
citronellol	0,7	0,6	0,3	0,5	0,0	0,2	0,5	0,2	0,7	0,4	0,5	0,5	0,5	0,8	1,0	0,3	0,6	0,2	0,5	0,2	0,3	0,2	
acétate de bornyle	0,2	0,0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	3,8	0,1	

acétate de myrtényle	1,1	0,0	0,5	0,8	1,8	0,8	0,8	1,0	0,8	2,3	0,5	1,9	1,2	0,6	0,0	1,0	0,4	0,3	1,3	0,7	0,3	0,4
acétate d'α-terpinyle*	6,7	0,1	6,0	6,2	6,7	8,1	8,6	6,6	11,1	6,0	6,3	9,1	10,1	8,4	7,3	10,5	6,0	5,6	9,0	4,9	3,0	4,4
acétate de citronellyle*	0,7	0,0	0,4	0,5	0,0	0,3	0,5	0,2	0,5	0,1	0,5	0,5	0,4	0,6	0,8	0,4	0,4	0,2	0,7	0,3	0,4	0,2
β-élémente	0,4	0,7	0,2	0,4	0,2	0,5	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2	0,4	0,1
α-humulène	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0
α-sélinène	0,3	0,4	0,1	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2	0,2	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0	0,3	0,2	0,1	0,0	0,2	0,1	0,2	0,1
γ-cadinène	0,2	0,4	0,1	0,5	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,4	0,2	0,1	0,2	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
δ-cadinène	0,8	1,3	0,4	0,6	0,4	0,9	0,6	0,6	0,7	0,1	0,5	0,5	0,5	0,3	0,8	0,5	0,3	0,2	0,6	0,4	0,5	0,3
β-élémol	0,7	2,8	0,5	0,8	0,8	0,5	0,7	0,8	0,5	0,6	0,2	0,0	0,6	0,5	0,6	0,4	0,1	0,2	1,9	0,5	0,4	2,3
(E)-nérolidol	0,0	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0	0,7	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,3	0,0
γ-eudesmol	0,0	0,6	0,1	0,2	0,2	0,1	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,5	0,1	0,1	0,6
τ-cadinol*	0,1	0,5	0,2	0,4	0,1	0,4	0,0	0,1	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,0	0,2	0,1	0,1	0,1
τ-muurolool*	0,2	0,5	0,2	0,2	0,1	0,4	0,3	0,1	0,2	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,0	0,2	0,1	0,1	0,1
β-eudesmol	0,5	1,8	0,5	0,6	0,4	1,0	0,4	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,5	0,4	0,1	0,1	0,8	0,3	0,3	0,7
α-cadinol																						
α-eudesmol	0,2	0,6	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,0	0,0	0,2	0,1	0,2	0,1	0,0	0,0	0,4	0,1	0,1	0,5
(2E,6E)-farnésol	0,1	0,3	0,1	0,3	0,2	0,1	0,3	0,0	0,1	0,1	0,0	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,5	0,1	0,2	0,4
manol	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,2	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0
Total	95,4	96,2	95,5	95,8	95,6	95,6	95,0	96,1	96,1	96,8	96,1	94,3	95,3	94,9	96,4	94,6	96,9	96,0	94,9	95,6	93,9	97,1
Rendements	0,7	0,7	0,5	0,9	1,3	0,9	1,1	1,3	0,5	0,5	0,6	0,8	0,6	0,4	0,5	0,7	0,6	0,6	0,7	1,3	1,3	1,1

*L'ordre d'élution et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire sauf pour les composés suivis de * : pourcentage sur colonne polaire*

C= Cuscione E= Ese Vi= Vizzavona

acétate de myrtényle	0,9	3,5	3,6	0,4	2,5	1,3	2,7	1,8	2,0	0,3	1,7	2,5	0,4	1,5	0,8	1,4	2,4	2,0	1,2	1,2
acétate d' α -terpinyle*	10,4	10,8	14,6	12,7	6,6	11,3	9,9	11,2	15,3	11,2	12,7	15,5	0,9	12,3	11,8	11,7	16,9	14,1	11,1	4,7
acétate de citronellyle*	0,2	0,3	0,4	0,2	0,4	0,2	0,2	0,6	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
β -élémente	0,5	0,4	0,3	0,1	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2	0,4	0,1	0,2	0,2	0,4	0,1	0,2	0,3	0,1
α -humulène	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0	0,1	0,0	0,0
α -sélinène	0,2	0,2	0,0	0,1	0,2	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,2	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1
γ -cadinène	0,4	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
δ -cadinène	1,0	0,4	0,4	0,3	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,6	0,2	0,0	0,4	0,4	0,2	0,3	0,4	0,2
β -élémol	0,9	1,3	1,6	0,9	0,7	0,8	0,6	1,6	0,8	0,8	0,1	0,0	0,0	1,0	0,1	0,1	1,0	1,0	1,1	2,4
(E)-nérolidol	0,1	0,0	0,1	0,3	0,2	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1	0,0	0,8	0,2	0,1	0,0	0,0	0,1	0,4	0,1	0,0
γ -eudesmol	0,2	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,1	0,1	0,2	0,3
τ -cadinol*	0,3	0,3	0,2	0,0	0,2	0,2	0,2	0,3	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,3	0,0	0,0	0,2	0,1
τ -muurolol*	0,2	0,3	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
β -eudesmol	0,2	0,7	0,2	0,4	0,2	0,2	0,1	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0	0,3	0,2	0,0	0,3	0,0	0,1	0,2	0,3
α -cadinol	0,2	0,5	0,3	0,2	0,3	0,5	0,3	0,4	0,4	0,5	0,4	0,6	0,0	0,2	0,4	0,4	0,2	0,3	0,4	0,2
α -eudesmol	0,8	0,3	0,4	0,2	0,1	0,2	0,2	0,4	0,3	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,1	0,2	0,0	0,3
(2E,6E)-farnésol	0,6	0,0	0,0	0,2	0,2	0,6	0,0	0,7	0,2	0,6	0,2	0,0	0,0	0,3	0,2	0,0	0,0	0,2	0,3	0,5
manol	0,0	0,1	0,1	0,0	0,6	0,0	0,0	0,2	0,1	0,3	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,5	0,0
Total	89,7	94,1	92,6	87,1	86,4	94,9	90,0	89,8	95,7	95,5	95,8	92,8	93,7	91,9	95,6	94,3	91,8	95,5	93,6	93,5
Rendements	0,5	0,4	0,5	0,5	0,6	0,1	0,3	0,3	0,7	0,4	0,4	0,2	0,5	0,4	0,6	0,5	0,5	0,5	0,4	0,9

L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire sauf pour les composés suivis de * : pourcentage sur colonne polaire
C= Cuscione E= Ese Vi= Vizzavona

Annexe E : Composition chimique des 109 échantillons d'huile essentielle de *J. communis* ssp. *alpina* (suite)

Echantillons	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	
Localisations	Vizzavona										Bastelica										
Composés																					
α-thujène	1,6	0,0	0,1	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0	0,8	0,1	0,4	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
α-pinène	10,7	4,2	2,3	5,9	8,7	4,6	7,7	11,9	4,1	8,3	5,6	5,5	2,4	4,8	6,2	4,2	11,8	11,3	4,7	5,0	
camphène	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
sabinène	12,9	0,1	0,2	1,0	1,4	0,2	0,6	0,3	0,3	11,6	0,2	4,0	0,7	2,0	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
β-pinène	1,6	0,8	0,6	1,1	1,0	0,8	1,3	1,1	0,9	1,1	0,9	0,8	0,4	0,8	1,0	0,8	1,6	1,5	0,7	0,8	
myrcène	3,9	3,9	3,3	3,2	3,6	3,5	3,8	3,8	3,8	4,0	3,6	3,4	3,3	3,4	3,4	3,9	3,8	3,8	3,6	3,7	
δ-2-carène*	0,2	0,4	0,0	0,0	0,3	0,0	0,4	0,3	0,5	0,0	0,4	0,2	0,0	0,0	0,4	0,4	0,3	0,3	0,0	0,3	
α-phellandrène*	3,0	5,6	4,7	5,1	4,0	4,6	4,8	5,1	5,5	4,5	4,0	2,6	3,5	3,4	4,3	5,6	3,0	3,0	4,6	4,4	
δ-3-carène	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,4	1,2	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,2	
α-terpinène	1,7	0,1	0,2	0,1	0,4	0,1	0,1	0,4	0,4	2,0	0,1	1,0	0,3	0,6	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	1,4	
p-cymène	1,2	2,2	2,5	1,8	1,4	2,1	1,9	0,7	2,5	2,0	2,1	1,7	1,1	1,9	2,5	2,2	2,1	2,0	1,3	1,4	
limonène*	14,6	28,8	38,2	21,2	33,4	31,2	30,1	35,2	30,0	14,9	39,3	32,0	34,1	35,6	28,2	28,8	32,1	32,8	32,0	42,7	
β-phellandrène*	12,6	22,3	18,3	19,3	15,7	20,3	20,1	15,7	22,2	17,6	16,0	11,5	12,8	13,5	17,6	22,3	14,0	14,2	11,5	17,0	
γ-terpinène	2,6	0,1	0,1	0,1	0,6	0,1	0,1	0,2	0,2	1,9	0,1	1,5	0,3	0,8	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	
terpinolène	2,0	1,2	1,1	1,1	1,4	1,3	1,2	1,2	1,4	1,8	1,0	1,3	1,1	1,1	1,0	1,2	0,9	0,9	1,1	1,1	
linalol	0,5	0,1	0,3	0,2	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,3	0,3	0,4	0,6	0,1	0,4	0,4	0,1	0,3	
cis-p-menth-2-èn-1-ol*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
trans-p-menth-2-èn-1-ol*	0,6	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,2	0,3	0,5	0,3	0,4	0,3	0,4	0,6	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
cryptone	0,3	0,4	1,2	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,6	0,6	0,4	0,1	0,1	0,4	1,0	0,4	0,2	0,2	0,3	0,3	
p-cymèn-8-ol	7,3	0,3	0,4	0,8	1,8	0,4	0,4	0,4	0,5	5,5	0,0	0,1	0,3	3,3	0,9	0,0	0,4	0,3	0,3	0,2	
terpinèn-4-ol	0,0	0,0	4,2	8,9	6,3	7,4	4,7	2,1	4,6	3,1	2,2	5,3	1,3	1,3	0,1	0,0	0,4	0,5	0,0	0,6	
α-terpinéol	2,4	3,8	0,1	0,7	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,4	3,2	0,9	2,4	3,8	3,4	3,4	1,4	3,2	
myrténol*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
trans-pipéritol	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	
citronellol	0,5	0,4	0,7	0,3	0,2	0,1	0,2	0,1	0,3	0,1	0,2	0,4	1,6	0,7	0,7	0,4	0,8	0,8	0,0	0,4	
acétate de bornyle	0,1	0,1	0,2	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	

acétate de myrtényle	2,1	1,6	0,7	0,2	1,2	0,4	2,5	2,9	0,5	1,9	1,6	2,7	0,6	1,6	0,9	1,6	1,6	0,0	0,0	1,3
acétate d'α-terpinyle*	7,7	13,5	12,8	14,6	7,7	11,0	12,5	10,4	12,2	10,2	13,1	9,0	8,5	11,1	16,4	13,5	9,2	9,2	13,2	10,2
acétate de citronellyle*	0,2	0,2	0,0	0,0	0,3	0,2	0,0	0,3	0,3	0,1	0,3	0,4	0,2	0,2	0,0	0,2	0,2	0,0	0,0	0,2
β-élémane	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,0	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,0	0,1	0,2
α-humulène	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,3	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,3	0,1
α-sélinène	0,1	0,0	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,0	0,2	0,2	0,1	0,2
γ-cadinène	0,2	0,1	0,3	0,2	0,3	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,2	0,1	0,5	0,4	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2
δ-cadinène	0,4	0,2	0,2	0,5	0,0	0,2	0,2	0,4	0,4	0,1	0,4	0,6	0,3	0,0	0,0	0,2	0,4	0,5	0,3	0,6
β-élémol	0,1	1,7	0,2	2,5	0,2	0,4	0,4	1,2	0,3	1,3	0,9	0,1	1,6	0,2	0,1	1,7	1,6	1,5	0,0	0,1
(E)-nérolidol	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,2	0,2	0,0	0,1	0,1	0,0	0,2	0,0	0,0	0,5
γ-eudesmol	0,0	0,3	0,3	0,4	0,3	0,2	0,1	0,0	0,4	0,0	0,0	0,1	0,3	0,4	0,2	0,3	0,3	0,1	0,0	0,0
τ-cadinol*	0,0	0,2	0,2	0,5	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,4	0,1	0,2	0,5	0,4	0,2	0,3	0,0	0,0	0,0
τ-muurolool*	0,0	0,2	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,2	0,5	0,4	0,0	0,2
β-eudesmol	0,0	0,4	0,6	0,0	0,2	0,2	0,1	0,6	0,0	0,0	0,2	0,0	0,6	0,6	0,0	0,4	0,5	0,4	0,2	0,2
α-cadinol	0,3	0,3	0,2	0,0	0,1	0,5	0,0	0,0	0,0	0,1	0,4	0,5	0,3	0,0	0,0	0,3	0,4	0,4	0,0	0,3
α-eudesmol	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0
(2E,6E)-farnésol	0,5	0,2	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0	0,7	0,3	0,4	0,2	0,6	0,0	0,2	0,0
manol	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,4	0,4	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,5	0,1
Total	92,4	94,8	94,9	91,3	92,7	93,0	95,0	96,1	94,9	96,8	94,8	91,2	81,0	92,1	91,3	94,2	92,7	89,7	77,9	98,0
Rendements	1,0	0,5	0,5	0,5	0,4	0,6	0,4	0,4	0,2	1,9	0,5	0,4	0,3	0,5	0,4	0,5	0,3	0,3	0,7	0,8

*L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire sauf pour les composés suivis de * : pourcentage sur colonne polaire
C= Cuscione E= Ese Vi= Vizzavona*

Annexe F : Composition chimique des 46 échantillons d'huile essentielle de *Pinus pinaster* de Corse

Lieux de récolte	Guagno										Corte										Ghisoni						
Composés	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
tricyclène	tr	-	-	tr	tr	tr	-	tr	-	0,2	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr
α-pinène	16,5	27,4	19,0	13,9	19,3	8,7	12,2	8,5	10,9	21,3	17,3	10,8	12,7	16,5	10,9	16,8	15,8	18,8	12,4	26,8	29,4	16,2	17,1	19,1	17,9	18,6	19,4
camphène	0,1	0,3	0,2	0,2	0,3	0,1	0,2	tr	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	0,3	0,2	0,4	0,2	0,3	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,3	0,3
β-pinène	0,8	1,1	0,9	0,5	10,3	0,5	9,6	3,6	6,0	0,9	0,8	4,1	8,5	0,9	5,8	6,0	6,9	1,3	8,5	1,2	1,4	0,9	8,3	15,7	8,9	1,0	0,9
myrcène	3,2	4,4	5,6	2,4	3,5	2,8	1,4	1,5	2,9	5,8	4,9	1,7	4,8	5,4	3,3	4,3	1,3	5,6	6,2	3,0	1,4	4,9	3,2	6,2	3,8	6,9	6,6
δ-3-carène	tr	tr	tr	1,4	0,8	1,6	2,8	0,5	2,0	tr	3,4	0,3	2,1	-	-	tr	1,1	tr	2,8	1,8	2,9	1,6	1,3	-	0,8	1,6	1,5
limonène*	0,7	0,5	0,4	3,2	0,5	1,8	1,2	0,2	1,7	0,6	0,6	0,4	0,4	3,2	1,7	1,6	1,5	0,5	0,5	0,8	0,7	3,2	0,7	0,6	0,5	3,4	3,5
β-phellandrène*	0,6	0,3	0,7	0,3	0,3	0,2	0,4	0,2	0,3	0,6	0,6	tr	0,6	0,4	0,5	0,5	0,5	0,7	0,8	0,4	0,2	0,2	0,5	0,6	0,3	0,3	0,3
(Z)-β-ocimène	tr	-	-	tr	tr	tr	-	-	-	tr	tr	tr	-	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
(E)-β-ocimène	tr	0,2	tr	tr	tr	tr	tr	-	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,2	tr	tr	0,1	tr	0,2	0,2
γ-terpinène	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	tr	tr	tr	tr
terpinolène	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,6	0,2	0,3	0,3	0,5	0,7	0,4	0,3	0,2	0,2	0,3	0,5	0,3	1,1	0,6	0,3	0,3	0,4	0,3	1,4	1,2
linalol	0,1	0,2	0,2	0,1	tr	0,2	tr	tr	tr	0,2	0,1	0,3	-	tr	0,1	tr	0,1	tr	0,1	0,1	tr	0,3	0,3	0,1	0,1	tr	tr
terpinén-4-ol	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	-	0,1	tr	tr
α-terpinéol	0,3	0,7	0,6	0,3	1,2	0,5	1,3	0,3	0,7	0,4	0,2	0,9	0,5	0,3	0,7	0,6	0,3	0,3	0,5	0,3	1,3	0,5	1,3	1,6	1,0	0,6	0,6
acétate de bornyle	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	-	-	tr	0,1	tr	0,1	0,2	0,1	0,1	tr	tr	0,1	0,1						
acétate de geranyle	0,2	1,3	0,3	-	0,2	0,6	tr	0,2	0,2	0,2	0,2	tr	-	0,2	0,1	tr	tr	tr	tr	tr	-	0,3	tr	tr	-	0,1	0,1
méthyleugenol	tr	tr	tr	0,4	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	-	tr	-	0,1	tr	tr	-	tr	-	-	-	-	-
α-ylangene	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
α-copaène	0,4	0,2	0,4	0,9	tr	0,3	0,3	0,6	0,4	0,6	0,4	0,4	0,5	0,2	0,5	0,7	0,2	0,6	0,5	0,7	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4	0,2	0,2
β-bourbonène	tr	-	-	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	0,2	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr									
β-élémente	0,1	0,1	0,2	0,3	tr	0,3	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	tr	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	tr	tr	tr
longifolène	0,1	0,2	0,6	0,1	tr	0,3	0,5	0,1	0,6	0,7	0,3	tr	0,7	0,7	0,4	0,5	0,9	tr	0,2	0,1	0,7	1,4	0,4	0,2	0,1	tr	tr
(E)-β-caryophyllène	19,7	8,3	10,1	16,4	8,6	14,1	14,5	10,3	11,4	11,3	13,6	8,3	12,4	11,1	19,9	16,0	11,5	16,8	12,0	11,7	7,8	7,1	4,4	8,0	6,4	9,9	9,4
β-copaène	tr	tr	0,1	0,1	tr	0,2	0,9	0,2	0,2	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	0,2	tr	0,2	tr	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	-	tr	tr
β-gurjunène	tr	-	-	0,1	tr	tr	-	tr	-	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
α-humulène	2,9	1,2	1,6	2,5	0,4	2,2	2,2	1,7	1,8	1,8	2,2	1,3	1,8	1,7	3,0	2,3	1,7	2,5	1,9	1,7	1,2	1,1	0,7	1,3	0,9	1,4	1,3
2-méthylbutyrate de phényléthyle	0,3	0,6	0,9	0,5	1,0	0,5	0,5	0,4	0,4	0,7	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5	0,4	0,7	0,5	0,7	0,5	0,5
isovalérate de phényléthyl	0,5	1,2	2,3	1,1	0,5	1,5	0,6	1,2	0,6	1,9	0,2	0,2	0,6	0,4	0,3	1,4	0,4	0,5	0,6	1,5	0,9	1,4	1,4	1,3	2,4	0,7	0,7
γ-muuroène	0,5	0,3	0,9	0,8	tr	0,9	-	-	1,3	1,0	1,0	0,4	0,7	0,8	1,0	0,4	0,7	0,7	0,9	0,8	0,7	0,8	0,7	0,4	0,4	0,4	0,4

germacrène D	6,5	5,3	12,6	10,7	5,2	20,1	7,3	19,8	9,9	10,9	16,7	1,7	8,6	12,3	12,5	3,2	21,4	15,4	12,2	13,5	12,4	14,4	12,0	10,3	4,5	6,9	6,3
α-muuroloène	0,2	0,1	0,4		tr	tr	tr	0,1	0,6	0,4	0,1	tr	0,1	tr	0,1	tr	tr	0,2	tr	0,1	0,2	0,1	0,1	tr	tr	tr	0,1
γ-cadinène	0,4	0,2	0,8	0,7	0,3	0,9	0,3	0,8	0,8	0,9	0,6	0,3	0,5	0,5	0,6	0,2	0,4	0,4	0,6	0,5	0,4	0,5	0,4	0,3	0,2	0,2	0,2
δ-cadinène	1,1	0,7	2,1	2,0	1,0	1,8	1,0	2,1	2,3	2,4	1,7	0,9	1,3	1,3	1,7	0,9	1,0	1,3	1,6	1,4	1,5	1,5	1,3	0,9	0,8	0,6	0,6
cadina-1,4-diène	tr	tr	0,2	-	tr	-	tr	-	tr	0,1	0,1	-	-	tr	tr	tr	tr	-	tr	0,2							
α-cadinène	tr	tr	0,1	-	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	-	tr	0,1	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	-						
α-(E)-bisabolène	0,2	0,3	0,7	-	tr	1,3	0,2	0,5	0,5	1,1	0,2	0,2	0,9	0,6	0,5	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,7	0,3	tr	1,1	0,3	0,3
(E)-nérolidol	tr	tr	0,2	tr	-	0,1	tr	tr	tr	0,2	tr	tr	0,1	tr	0,1	0,1	tr	0,2	0,1	0,2	tr	0,2	0,1	0,1	-	tr	tr
oxyde de caryophyllène	0,3	0,1	0,3	0,5	0,7	0,5	0,5	0,3	tr	0,4	0,7	0,3	0,4	0,4	0,7	0,3	0,3	0,2	0,9	0,7	tr	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2
isovalérate de néryl	tr	tr	tr	tr	0,7	0,1	tr	0,8	tr	tr	0,2	tr	tr	0,1	0,1	tr	tr	tr	0,1	0,1	tr	0,3	tr	tr	tr	tr	-
isovalérate de géranyl	0,5	0,2	0,1	1,1	0,2	0,2	tr	tr	0,1	0,2	0,4	0,6	0,6	0,1	0,5	0,9	0,1	0,8	0,4	0,6	0,6	1,1	0,6	0,5	0,5	tr	tr
épi-cubenol	tr	tr	0,2	0,1	0,1	1,0	tr	0,1	0,1	0,2	tr	tr	tr	tr	0,7	tr	tr	0,4	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	tr	tr	tr	tr
γ-eudesmol	0,4	0,3	0,2	0,4	0,2	0,3	0,4	0,6	0,6	0,6	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3	0,3	0,8	0,6	0,5	0,3	0,4	0,2	0,1	-	0,3
τ-muurolool	0,1	tr	0,6	tr	0,4	0,5	-	0,1	0,1	0,1	0,3	tr	0,2	0,2	0,2	-	0,2	tr	0,2	0,2	0,1	-	0,1	tr	0,1	0,1	-
τ-cadinol	0,4	0,3	0,7	0,7	0,6	tr	-	-	0,1	0,1	0,6	0,3	0,3	-	-	-	-	0,3	0,3	0,3	0,6	0,5	0,5	0,3	0,2	-	0,2
α-vadinol	0,1	tr	-	0,3	0,3	0,9	0,4	0,6	0,8	0,7	0,1	0,2	0,2	0,5	0,4	0,2	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	-
bulnésol	tr	tr	-	-	tr	-	-	tr	-	tr	-	tr	0,1	tr													
farnésol (2E, 6E)	0,2	0,2	tr	0,2	0,1	0,3	0,2	0,1	tr	tr	0,9	0,1	0,1	-	0,7	0,3	tr	0,2	0,1	tr	0,2	3,4	0,5	0,1	0,3	0,1	0,2
acétate de 2Z, 6E farnésyle	0,3	1,2	0,3	0,5	0,5	0,9	0,2	0,4	0,3	0,2	0,4	tr	0,3	0,3	1,2	0,6	0,2	0,1	0,3	0,1	0,2	1,7	0,7	0,2	0,4	0,2	0,2
palustradiène	7,6	6,7	8,9	5,4	9,1	7,0	7,7	10,5	8,0	7,2	4,5	tr	6,5	9,5	5,1	10,9	6,4	5,9	5,3	2,4	8,2	5,1	12,2	6,3	10,7	9,5	9,0
lévopimaradiène	13,3	9,5	4,8	5,5	1,7	5,9	4,6	6,4	1,7	1,7	1,7	4,2	4,9	4,7	2,0	5,9	7,1	6,4	1,2	2,3	4,6	6,4	4,8	6,4	8,1	9,8	7,5
déhydroabietane	2,0	2,2	2,7	3,9	6,8	3,8	2,7	2,6	7,9	5,7	4,2	3,6	4,3	3,9	4,1	2,6	2,7	1,8	7,2	4,5	1,3	2,3	4,3	1,7	3,6	2,9	0,1
abietadiène	12,1	16,1	9,3	10,5	11,9	8,5	14,3	13,4	14,6	7,6	8,8	34,2	12,1	13,5	10,9	8,5	9,2	8,0	8,5	8,0	10,0	11,4	11,7	8,4	15,3	13,3	12,6
isoabiéanol	-	-	0,1	-	-	0,2	0,2	0,1	tr	tr	0,1	-	tr	0,1	tr	-	-	0,1	-	-	tr	tr	tr	-	tr	0,3	0,3
déhydroabietal	tr	0,2	tr	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	tr	tr	0,2	0,3	0,1	tr	tr	tr	0,2	tr	-	0,1	tr	tr	tr	0,1	-	0,2	0,2
néoabietadiène	3,1	3,5	1,6	1,9	0,8	1,4	2,1	1,6	tr	0,8	0,4	3,9	1,8	1,7	0,7	1,2	0,6	1,1	0,6	0,7	1,5	1,8	1,2	1,3	3,2	2,6	2,1
labda-8(17)-13(E)-dien-19-al	-	tr	0,5	tr	tr	tr	0,4	tr	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	tr	-	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr
labda-8(17)-13(Z)-dien-15-al	0,3	0,2	0,1	0,2	0,6	0,4	0,7	0,4	0,2	0,3	tr	1,6	0,6	tr	0,3	0,3	0,2	0,4	0,2	0,3	tr	tr	0,4	0,2	0,3	0,3	0,7
labda-8(17)-13(E)-dien-15-ol	0,3	0,7	0,7	0,6	0,8	tr	0,6	0,9	0,4	tr	1,3	-	0,8	0,3	0,7	0,3	0,5	0,6	0,0	1,0	0,4	0,6	0,1	-	0,4	0,4	-
labda-8(17)-13(E)-dien-15-al	0,1	0,2	0,5	0,9	0,7	0,5	0,7	0,4	0,2	tr	0,6	0,4	0,7	0,3	0,5	0,3	0,3	tr	0,8	0,9	tr	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,7
Total:	96,6	96,8	93,7	91,9	89,9	94,4	94,1	92,6	90,9	90,7	91,9	82,9	93,0	93,3	93,2	89,2	95,5	94,5	91,1	92,0	94,4	94,4	94,8	94,6	95,3	95,6	88,9
Rendement :	0,48	0,50	0,37	0,51	0,15	0,33	0,15	0,32	0,30	0,41	0,40	0,18	0,39	0,35	0,31	0,38	0,54	0,22	0,51	0,30	0,13	0,17	0,21	0,41	0,24	0,26	0,22

L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire sauf pour les composés suivis de * : pourcentage sur colonne polaire

Annexe F : Composition chimique des 46 échantillons d'huile essentielle de *Pinus pinaster* de Corse (suite)

Lieux de récolte	L'ospedale										Vizzavona								
	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
Composés																			
tricyclène	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
α-pinène	16,2	15,8	8,1	8,8	17,5	13,9	6,7	20,3	10,4	24,7	19,1	11,3	17,7	21,4	20,7	26,1	25,5	14,7	13,2
camphène	0,4	0,3	0,2	tr	0,3	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	0,4	0,2	0,4	0,2	0,4	0,3	0,2	0,3	0,2
β-pinène	1,0	0,9	0,4	7,6	8,2	3,2	3,3	6,0	0,8	4,8	0,9	0,5	0,9	0,8	1,1	0,9	5,3	0,9	0,5
myrcène	7,6	4,7	2,9	2,1	1,7	6,5	0,7	0,5	5,1	0,7	6,2	1,5	7,2	1,6	3,5	1,4	0,7	5,6	3,4
δ-3-carène	tr	tr	0,1	-	1,1	3,0	tr	0,4	-	tr	3,3	1,4	5,8	1,1	-	2,2	tr	4,0	4,0
limonène*	0,3	0,5	0,2	0,3	1,5	0,4	0,7	0,4	0,2	0,5	0,4	1,5	0,4	2,2	0,4	1,4	0,6	0,5	1,4
β-phellandrène*	0,5	0,3	0,3	0,5	0,4	0,4	0,2	0,2	0,3	1,1	0,2	0,3	0,2	0,2	0,3	1,0	0,4	0,3	0,2
(Z)-β-ocimène	tr	tr		tr	tr	-	-	tr	tr	tr	tr	-	0,6	tr	tr	tr	0,1	tr	tr
(E)-β-ocimène	tr	-	tr	-	tr	tr	tr	-	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr
γ-terpinène	tr	0,9	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	tr	tr	0,1	0,1
terpinolène	0,3	0,9	0,2	0,3	0,4	0,6	0,2	0,2	0,2	0,4	0,5	0,2	0,8	0,3	0,4	0,9	0,4	0,6	0,6
linalol	0,1	tr	tr	0,1	0,1	-	tr	tr	0,1	0,2	tr	tr	0,1	tr	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2
terpinén-4-ol	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,8	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	0,1
α-terpinéol	0,4	0,6	0,8	0,9	1,0	0,9	0,4	tr	0,4	0,7	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,4	1,4	0,5	0,5
acétate de bornyle	0,1	0,1	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	tr	tr	-	tr
acétate de geranyle	0,2	0,2	0,1	0,2	-	0,4	tr	-	0,3	tr	0,2	0,2	0,1	0,2	0,5	0,2	0,1	0,1	tr
méthyleugenol	tr	-	0,1	0,1	tr2	tr	tr5	-	tr	-	tr	-	tr	-	-	-	tr	-	tr
α-ylangene	tr	tr	0,3	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr						
α-copaène	0,7	0,6	0,4	0,6	0,3	0,5	0,4	0,5	0,7	0,9	0,2	0,7	0,6	0,6	0,5	0,3	0,3	0,3	0,4
β-bourbonène	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr						
β-élémente	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2
longifolène	0,8	1,8	0,2	0,4	0,2	tr	0,6	0,9	0,7	tr	0,2	0,4	0,5	tr	0,7	0,5	0,2	0,1	0,5
(E)-β-caryophyllène	11,4	7,8	5,4	9,7	14,2	9,4	8,6	14,1	13,8	13,6	6,6	11,1	14,1	8,9	6,1	14,0	8,1	9,3	7,1
β-copaène	tr	-	0,2	0,2	tr	tr	-	tr	0,1	-	-	tr	0,2	-	0,2	0,2	0,1	0,2	tr
β-gurjunène	tr	tr	0,2	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	-	tr	-	tr
α-humulène	1,7	1,2	0,9	1,5	2,1	1,4	1,3	2,1	2,0	2,0	1,1	1,6	2,0	1,3	0,9	2,1	1,2	1,4	1,1
2-méthylbutyrate de phényléthyle	0,6	0,3	0,3	0,5	0,2	0,6	0,3	0,2	0,3	0,9	0,2	0,3	0,3	0,2	0,5	0,2	0,3	0,3	0,5
isovalérate de phényléthyl	1,1	0,6	0,5	1,4	0,8	1,3	0,8	0,8	0,5	1,9	0,3	0,7	0,6	0,4	1,4	0,3	0,7	0,5	1,8
γ-murolène	1,2	0,6	1,3	1,7	1,1	0,3	0,4	0,5	0,9	0,7	0,9	0,4	0,8	0,6	0,7	0,9	1,0	0,9	1,0

germacrène D	13,9	10,5	6,9	14,8	16,1	4,8	5,7	5,2	12,4	9,1	18,2	6,0	16,3	9,8	17,8	14,2	9,4	15,0	14,7
α-muuroolène	0,2	0,2	0,6	0,1	tr	tr	tr	tr	0,2	0,1	0,3	0,3	0,3	tr	tr	tr	-	tr	-
γ-cadinène	0,8	0,3	0,8	1,1	0,6	0,5	-	0,3	0,7	0,5	0,5	0,2	0,5	0,4	0,4	0,6	0,5	tr	0,6
δ-cadinène	2,2	1,1	2,3	3,0	1,8	1,5	0,8	0,9	2,0	1,6	1,4	0,8	1,7	1,2	1,3	1,4	1,5	1,4	1,6
cadina-1,4-diène	-	tr	tr	0,1	tr	tr	-	-	tr	0,1	-	tr	tr	tr	-	-	-	tr	tr
α-cadinène	0,1	tr	0,1	0,1	tr	0,2	tr												
α-(E)-bisabolène	0,2	0,1	0,5	0,7	0,9	0,1	0,7	0,5	0,5	1,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,1	0,2
(E)-nérolidol	tr	tr	tr	0,1	tr	0,1	0,1	tr	0,1	0,2	0,1	0,2	tr	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	tr
oxyde de caryophyllène	0,1	0,1	tr	0,1	tr	tr	0,1	0,1	tr	0,2	0,2	0,2	tr	0,2	tr	0,3	0,2	0,2	0,2
isovalérate de néryl	0,1	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	0,1	1,2	0,2	tr	0,1	0,1	tr	0,1	tr	tr	tr
isovalérate de géranyl	1,0	0,8	0,6	0,7	tr	1,1	0,4	0,5	0,8	-	0,2	1,0	0,6	0,9	0,5	0,3	0,4	0,1	0,4
épi-cubenol	0,1	tr	0,1	0,2	tr	0,2	tr	tr	0,1	0,2	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	tr	0,1	tr
γ-eudesmol	0,5	0,3	0,4	0,7	0,2	0,8	0,2	tr	0,4	0,3	0,6	0,1	0,2	0,2	0,2	0,5	0,4	tr	0,5
τ-muurolol	tr	tr	tr	0,2	0,4	0,2	tr	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr
τ-cadinol	0,5	0,4	0,7	0,9	-	0,1	0,3	0,2	0,4	0,3	0,6	0,3	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4
α-vadinol	0,2	0,2		0,3	-	1,0	tr	0,2	0,2	0,4	-	0,3	tr	0,3	0,1	-	tr	tr	0,1
bulnésol	tr	tr	0,2	-	-	-	tr	tr	-	-	-	tr	-	-	tr	-	tr	-	-
farnésol (2E, 6E)	tr	0,2	0,1	0,9	0,4	0,3	0,3	0,2	1,0	0,1	0,3	2,2	0,3	0,5	tr	tr	0,5	tr	0,3
acétate de 2Z, 6E farnésyle	0,2	0,4	0,3	0,8	0,3	0,5	0,4	0,3	0,6	0,3	0,3	1,5	0,3	0,5	0,3	0,1	0,5	0,1	0,2
palustradiène	6,6	11,0	10,9	9,9	6,7	8,0	11,3	7,1	tr	6,3	8,4	9,1	6,2	12,8	7,4	6,4	4,5	9,2	7,6
lévopimaradiène	5,8	13,2	7,3	4,5	4,5	12,1	18,1	9,2	8,1	4,5	6,9	15,8	6,7	8,5	13,2	5,0	5,3	7,0	7,0
déhydroabietane	tr	tr	1,2	0,1	tr	1,5	3,5	1,2	tr	0,1	3,0	3,4	1,3	2,5	0,9	tr	1,9	3,3	2,4
abietadiène	13,2	13,5	32,3	15,0	8,8	13,3	22,2	17,5	14,3	9,4	8,6	17,3	6,8	13,5	11,2	8,8	18,5	11,5	15,7
isoabiéanol	0,2	0,1	0,3	-	-	-	0,5	0,1	0,2	-	-	0,2	-	-	tr	tr	tr	0,2	-
déhydroabietal	0,1	0,1	0,2	tr	tr	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	tr	tr	-	tr	tr	0,1
néoabietadiène	2,0	2,2	3,4	1,2	1,1	2,8	4,3	2,3	2,1	2,1	0,8	2,2	1,0	1,2	2,2	0,6	2,0	2,0	1,7
labda-8(17)-13(E)-dien-19-al	tr	-	-	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr							
labda-8(17)-13(Z)-dien-15-al	0,3	0,6	0,9	0,5	0,4	1,1	0,9	0,6	0,3	0,3	0,9	1,3	tr	0,5	0,4	0,4	0,5	1,2	1,0
labda-8(17)-13(E)-dien-15-ol	0,5	0,3	0,7	0,4	0,7	0,7	-	0,5	1,1	1,2	0,3	-	-	0,7	0,2	0,4	0,5	-	-
labda-8(17)-13(E)-dien-15-al	0,1	0,1	tr	-	tr	tr	0,2	0,1	0,1	tr	0,1	0,2	-	0,1	tr	0,1	0,1	0,2	0,3
Total:	93,9	93,9	93,8	93,5	94,3	93,7	94,7	95,2	82,9	93,2	93,0	95,6	97,0	94,9	95,5	93,3	94,1	92,7	91,5
Rendement :	0,22	0,14	0,09	0,23	0,28	0,14	0,31	0,33	0,28	0,20	0,13	0,21	0,14	0,20	0,31	0,19	0,10	0,14	0,09

*L'ordre d'éluion et les pourcentages sont donnés sur colonne apolaire sauf pour les composés suivis de * : pourcentage sur colonne polaire*

RESUME

Ce travail de thèse, financé par l'Agence de Développement Economique de la Corse de la Collectivité Territoriale de Corse, a pour objectif la caractérisation de diverses plantes poussant à l'état spontané en Corse (genévriers, pin maritime) à travers la composition de leurs huiles essentielles et résines. Pour cela, différentes techniques chromatographiques et spectroscopiques ont été mises œuvre, incluant la RMN ^{13}C des mélanges, méthode mise au point et développée au laboratoire.

Ainsi, nous avons montré différents aspects de l'application de la méthode d'analyse par RMN ^{13}C à travers i) l'étude d'huiles essentielles du genre *Cymbopogon*, ii) l'étude de la variabilité chimique des huiles essentielles d'hybrides entre la clémentine commune et la mandarine Willow Leaf et iii) la mise au point d'une méthode de quantification du dipropylène glycol.

Ensuite, pour chacune des espèces du genre *Juniperus* (*J. thurifera*, *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa*, *J. communis* var. *communis* et *J. communis* ssp. *alpina*), nous avons réalisé un échantillonnage aussi important que possible en fonction de la disponibilité de la plante. Les huiles essentielles, préparées par hydrodistillation, ont été analysées par combinaison de différentes techniques (CC, CPG(Ir), CPG-SM, RMN ^{13}C). Les résultats des analyses ont été soumis à un traitement statistique des données (ACP, *k*-means) quand le nombre d'échantillons était suffisant. Ainsi nous avons montré, dans deux cas, une variabilité chimique intraspécifique. Les échantillons de *J. communis* var. *communis* et de *J. communis* ssp. *alpina* se répartissent en deux groupes selon, dans le premier cas, leur teneur en α -pinène et en sabinène et dans le second cas, leur teneur en limonène et en sabinène. Pour ce qui est des deux autres espèces, *J. thurifera* et *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa*, leurs huiles essentielles présentent comme composé majoritaire, respectivement le limonène et par l' α -pinène, avec toutefois quelques compositions atypiques.

Enfin, nous avons caractérisé l'huile essentielle de pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.) de Corse, par l'analyse de 46 échantillons provenant d'aiguilles récoltées dans les différents massifs forestiers de l'île. Nous observons 3 types de compositions, dominées respectivement par des monoterpènes (α -pinène), des sesquiterpènes (germacrène D) ou par des diterpènes (abiétadiène), sans qu'il soit possible pour autant de dégager des groupes bien définis. Nous avons également décrit la composition chimique de la fraction acide de 23 échantillons d'oléorésines de pin maritime, provenant de trois forêts de Corse. Sur l'ensemble de l'échantillonnage, nous avons identifié 11 acides résiniques. L'analyse statistique (ACP, *K*-means) de ces résultats suggère l'existence de deux groupes, sur la base des teneurs des acides lévopimarique et déhydroabiétique. Par ailleurs, le pinorésinol, produit à forte valeur ajoutée de la famille des lignanes, a été mis en évidence, pour la première fois à notre connaissance, dans des résines de pins.

DISCIPLINE : Chimie Organique et Analytique

MOTS CLES : Analyse des mélanges complexes naturels, Huiles essentielles, Oléorésines, RMN ^{13}C , Dipropylène glycol, *Cymbopogon*, *Juniperus*, *Pinus pinaster*

ABSTRACT

The objective of this study was to characterize various plants growing wild in Corsica (juniper, maritime pine) through the composition of their essential oils and resins. For this, we used various chromatographic and spectroscopic techniques, including an analytical method for complex natural mixtures based on ^{13}C NMR spectroscopy, developed in our laboratory.

Thus, we showed various aspects of this method of analysis by ^{13}C NMR through i) the study of essential oils of the genus *Cymbopogon*, ii) the study of the chemical variability of essential oils of hybrids from *Citrus clementina* (Commun) x *Citrus deliciosa* (Willow Leaf) and iii) the development of a method of quantification of dipropylene glycol.

For each species of the genus *Juniperus* (*J. thurifera*, *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa*, *J. communis* var. *communis* and *J. communis* ssp. *alpina*), we carried out a sampling as large as possible, depending on the availability of the plant. Essential oils, prepared by hydrodistillation, were analyzed by combining different techniques (CC, GC(Ri), GC-MS, ^{13}C NMR). The results were submitted to chemometric analysis (PCA, *k*-means) when the number of samples was sufficient. Thus we showed in two cases, the occurrence of a chemical intraspecific variability. Samples of *J. communis* var. *communis* and *J. communis* ssp. *alpina* are divided into two groups, based on the content in α -pinene and sabinène in the first case, and on the content of limonene and sabinene in the second case. Regarding the two other species, *J. thurifera* and *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa*, their essential oils contain as main compound α -pinene and limonene respectively, however some composition are atypical.

Finally, we characterized the essential oil of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) from Corsica, by analyzing 46 samples from needles collected in various forests of the island. We observed 3 compositions, respectively dominated by monoterpenes (α -pinene), sesquiterpenes (germacrene D) or diterpenes (abietadiene). However, it was not possible to distinguish well-defined groups within these essential oil. We also described the chemical composition of the acid fraction of 23 samples of maritime pine oleoresin from three forests of Corsica. Eleven diterpène acids were identified and their contents calculated by ^{13}C NMR. Statistical analysis (PCA, *k*-means) suggested the existence of two groups, based on the content of levopimaric and dehydroabietic acids. Moreover, pinoresinol, a high value compound belonging to the family of lignans, was identified for the first time, to our knowledge, in pine resin.

DOMAIN : Analytical and Organic Chemistry

KEYWORDS : Natural complex mixtures, Essential oils, Oleoresines, ^{13}C NMR, Dipropylene glycol, *Cymbopogon*, *Juniperus*, *Pinus pinaster*
