



HAL
open science

Évaluation de l'approche métabolomique pour l'authentification des extraits naturels utilisés dans le secteur arômes et parfums

Laure Saint-Lary

► **To cite this version:**

Laure Saint-Lary. Évaluation de l'approche métabolomique pour l'authentification des extraits naturels utilisés dans le secteur arômes et parfums. Autre. Université Nice Sophia Antipolis, 2015. Français. NNT : 2015NICE4025 . tel-01189109

HAL Id: tel-01189109

<https://theses.hal.science/tel-01189109>

Submitted on 1 Sep 2015

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.

T H E S E

pour obtenir le titre de
Docteur en Sciences
de l'UNIVERSITE Nice Sophia-Antipolis

Discipline : Chimie

présentée et soutenue par
Laure SAINT-LARY

EVALUATION DE L'APPROCHE METABOLOMIQUE POUR
L'AUTHENTIFICATION DES EXTRAITS NATURELS UTILISES DANS LE
SECTEUR AROMES ET PARFUMS

soutenue le 10 Juin 2015

Jury :

M. Carlo BICCHI	Professeur Faculté de Pharmacie, Turin, Italie	Rapporteur
M. Laurent DEBRAUWER	Ingénieur de Recherche INRA, Toulouse	Rapporteur
M. Régis GOUGEON	Professeur Université de Bourgogne	Examineur
Mme Céline ROY	Responsable du Laboratoire ERINI, Grasse	Examineur
M. Jean-Philippe PARIS	Directeur du Laboratoire Payan Bertrand, Grasse	Membre Invité
M. Olivier THOMAS	Professeur Université Nice Sophia Antipolis	Co-directeur de thèse
M. Xavier FERNANDEZ	Professeur Université Nice Sophia Antipolis	Directeur de thèse

Remerciements

Je remercie le Professeur Carlo Bicchi de la Faculté de Pharmacie de Turin d'avoir accepté de juger ces travaux.

Je suis ravie que le Docteur Laurent Debrauwer, responsable de la plateforme Toxalim de l'Inra de Toulouse ait accepté d'être rapporteur de ce travail.

Je remercie également le Professeur Régis Gougeon de l'Université de Bourgogne d'avoir accepté d'examiner ces travaux de thèse.

Je suis reconnaissante envers l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie pour l'obtention de la bourse CIFRE pour ce projet de thèse.

J'exprime également ma gratitude envers la société WATERS pour son co-financement, ainsi que pour nos échanges scientifiques. J'en profite pour remercier mes principaux interlocuteurs : Freddy Delsenne, Oliver Burt et Nicolas Poveda pour les aspects plus techniques. Toute ma reconnaissance va envers le Docteur Anne Chartogne, présente du début à la fin de ce projet. Merci Anne !

J'adresse mes remerciements à la Direction de ERINI qui m'a permis de réaliser cette thèse au sein de son laboratoire.

Je remercie chaleureusement la société Payan Bertrand, le Président du Directoire Eric Proal et le Directeur Général Vincent Proal, de s'être impliqués dans ce partenariat multiple avec ERINI et l'Institut de Chimie de Nice. Mais aussi, et surtout, de m'accorder leur confiance et de m'offrir l'opportunité de rester au sein de leur société à l'issue de ce doctorat.

Je suis particulièrement reconnaissante envers le Professeur Xavier Fernandez, et à travers lui, envers l'Institut de Chimie de Nice ainsi que l'Université de Nice Sophia-Antipolis. Je le remercie pour avoir encadré ces travaux, pour ses précieux conseils et son partage de connaissances des extraits naturels. Je me souviendrai particulièrement d'une de tes phrases lors d'un de mes nombreux moments de désespoir face à une machine récalcitrante multi-récidiviste « Allez courage, la victoire n'en sera que meilleure ! ». Effectivement. Merci ! Je n'aurai qu'un seul regret, ton manque de compréhension concernant la cause féline...

Je remercie le Professeur Olivier Thomas pour avoir co-dirigé cette thèse, de m'avoir accompagnée au cours de plusieurs études dans son laboratoire, d'avoir partagé son expérience, son anglais et de m'avoir fait part de sa rigueur sans faille. Merci de ton entière confiance pour la prise de notes lors de nos réunions !

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Jean-Philippe Paris, directeur du laboratoire de Payan Bertrand, d'avoir soutenu et de s'être investi dans ce projet de thèse. Merci pour le partage de vos connaissances, nos nombreuses discussions, pour votre gentillesse et votre enthousiasme quotidien.

J'exprime ma gratitude envers le Docteur Céline Roy, responsable d'ERINI, mon laboratoire d'accueil. Merci Céline pour le partage de ton expérience, la confiance que tu m'as accordée, ainsi que ton aide.

Beaucoup de personnes ont été de passage, plus ou moins long, à ERINI, et je tiens à les remercier pour leur appui au quotidien : Maman Hélène, Bastien, Marionnette, Marina, Camille, Madame Laure, Elodie, Danielle, Yoann. Et bien sûr, je n'oublie pas Oriane Tascone. J'ai partagé avec toi ces trois années, les bons moments comme les moins bons. Merci pour ton humour à toute épreuve. On les voulait ces thèses, on les a eues et on les aura terminées. Je crois que je peux dire la fameuse phrase : sans toi, cette thèse n'aurait jamais vue le jour !

Je n'oublie pas de remercier chaleureusement l'équipe Payan Bertrand. Merci à toute l'équipe du laboratoire pour leur aide, leurs interactions nombreuses et constructives et leur sympathie ! Merci à l'équipe informatique, sans qui cette thèse n'aurait définitivement pas pu être écrite (crash de disque dur, crash d'ordinateur) ! Merci à l'ensemble des participants des panels d'analyse sensorielle ! Un merci tout particulier à Sophie Trestour, pour ses multiples coups de pouce (et conseils artistiques). Et puis... Merci à Anne-Sophie Beyls, pour nos aventures à Turrettes-sur-Loup et bien d'autres, pour tes conseils expérimentés sur la profession, et pour ton grand sourire !

Je remercie le Docteur Estelle Pujos, de m'avoir accueillie au sein de l'Unité de Nutrition Humaine à l'INRA de Clermont Ferrand et permis ainsi de rencontrer Jean-François Martin. Merci Jean-François, pour ta facilité à rendre les statistiques moins effrayantes auprès des chimistes, pour ton aide, ta sympathie, nos nombreux échanges, et ta participation aux articles. Sans toi, la partie statistique n'aurait jamais vu le jour !

Un autre grand merci à l'équipe de Qualité des Produits Alimentaires de l'INRA de Clermont Ferrand, et particulièrement au Docteur Jean-Louis Berdagué et au Docteur Pascal Tournayre pour leur hospitalité et leur collaboration.

Un merci particulier à Marcel Quentin, exploitant agricole de la violette à Turrettes-sur-Loup (06), pour son accueil chaleureux et son expérience historique et passionnante de cette culture.

La liste est loin d'être exhaustive, donc je tiens à remercier l'ensemble des personnes étant intervenues durant ces trois années, de près ou de loin, et qui m'ont permis d'avancer pas à pas.

Avant de terminer sur des notes plus personnelles, je remercie le Docteur Michael Moisseff et le Docteur Jean-François Blanco, qui resteront probablement les personnes à tenir pour responsables de mon choix de parcours professionnel. Alors, merci à vous deux !

Enfin, je remercie ma famille, mes parents, mon frère, pour leur soutien. Merci Thomas, Marie, Cécile, Boubou, Julien, Arnaud, d'être tous là, même parfois avec « un peu » de distance, mais pour ramener les pieds sur terre.

Et surtout, on ne pourrait l'oublier. Merci Lili !

Le 2 Avril 2015,
Laure Saint-Lary

Liste des abréviations

ACP: Analyse en Composantes Principales

AF : acide formique

APCI : Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique

APPI : Photo-Ionisation à Pression Atmosphérique, *Atmospheric Pressure Photoionization*

BHA: Butylatedhydroxyanisole

CAH : Classification Ascendante Hiérarchique

CAR : Carboxen

CP : Composante Principale

CV: Coefficient de Variation

DAD: Détecteur à Barettes de Diodes, *Diode Array Detector*

DEDL: Détecteur Evaporatif à Diffusion de Lumière

DHS: Espace de tête dynamique, *Dynamic Headspace*

DVB : DiVinylBenzene

ESI: Ionisation par électrospray, *Electrospray Ionization*

ET: écart type

FID : Détecteur à Ionisation de Flamme, *Flame Ionization Detector*

FT-ICR : Spectrométrie de Masse à Résonance Cyclotronique Ionique, *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*

FT-IR: Infrarouge à Transformée de Fourier, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

FWHM : Largeur du pic à mi-hauteur, *Full Width at Half Maximum*

GC : Chromatographie en phase Gazeuse, *Gas Chromatography*

GC/MS/MS : Chromatographie en phase Gazeuse couplée à un spectromètre de masse triple quadripôle, *Gas Chromatography triple quadrupole*

GC-GC : Chromatographie en phase Gazeuse à deux dimensions par prélèvement au cœur, *Two-dimensional gas chromatography*

GC/O: Chromatographie Gazeuse couplée à un Olfactomètre, *Gas Chromatography-Olfactometry*

GCxGC: Chromatographie en phase Gazeuse intégrale, *Comprehensive two-dimensional gas chromatography*

HEPT : Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique

HPLC: Chromatographie en phase Liquide Haute Performance, *High Performance Liquid Chromatography*

HPTLC : Chromatographie sur Couche Mince Haute Performance, *High Performance Thin Layer Chromatography*

HRMS : Spectrométrie de Masse Haute Résolution, *High Resolution Mass Spectrometry*

HS: Espace de Tête, *Headspace*

HSSE: Extraction par Sorption en Espace de Tête, *Headspace sorptive extraction*

IR: Infrarouge

IR: Indice de rétention

IRMS : Spectrométrie de Masse des Rapports Isotopiques, *Isotope-Ratio Mass Spectrometry*

LC : Chromatographie en phase Liquide, *Liquid Chromatography*

ML : Méthyl linoléate

MS: Spectrométrie de masse, *Mass Spectrometry*

MSD: Détecteur de masse, *Mass Selective Detector*

m/z: rapport masse/charge

NPD: Détecteur Azote-Phosphore, *Nitrogen-Phosphorus Detector*

OPLS-DA : Régression Partielle des Moindres Carrés Orthogonale en Analyse Discriminante, *Orthogonal Partial Least Square – Discriminant Analysis*

PA : PolyAcrylate

PDMS : PolyDiMethylSiloxane

PFPD : Détecteur à Photométrie de Flamme Pulsée, *Pulsed Flame Photometric Detector*

PLS : Régression Partielle des Moindres Carrés, *Partial Least Square Analysis*

PLS-DA : Régression Partielle des Moindres Carrés en Analyse Discriminante, *Partial Least Square-Discriminant Analysis*

PRESS : Somme des carrés des résidus prédite, *Predicted Residual Sum of Squares*

Q² : Erreur de prédiction

RESS : Somme des carrés des résidus, *Residual Sum of Squares*

R²Y : Explication de la variabilité

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

RRF: Facteur de réponse relatif

Rs : Résolution de pics chromatographiques

SBSE: Extraction par Sorption sur Barreau Magnétique, *Stir Bar Sorptive Extraction*

SDE: Extraction Distillation Simultanée, *Simultaneous Distillation-Extraction*

SFCxGC : Chromatographie en Fluide Supercritique et Gazeuse intégrale, *Supercritical Fluid and Gas Chromatography*

SIM : Mode de détection d'ions spécifiques, *Single Ion Monitoring*

SIMCA: Logiciel de traitement de données multivariées, *Standard In Multivariate data Analysis*

SNIF-NMR : Fractionnement isotopique naturel spécifique par résonance magnétique nucléaire, *Site-specific Natural Isotope Fractionation Nuclear Magnetic Resonance*

SPE: Extraction en Phase Solide, *Solid Phase Extraction*

SPME: Micro-Extraction en Phase Solide, *Solid Phase Micro-extraction*

ToFMS : Spectromètre de Masse à Temps de Vol, *Time of Flight Mass Spectrometer*

TR : Temps de Rétenion

UHPLC : Chromatographie en phase Liquide Ultra Haute Performance

UV : Variance Unitaire, *Unit Variance*

UV : Ultra Violet

VIDEO-Sniff : *Vocabulary-Intensity-Duration of Elementary Odours by Sniffing*

VIP: Importance des Variables pour la Projection, *Variable Importance for Projection*

Glossaire

Absolue : extrait obtenu à partir de la concrète ou du résinoïde ; lavage à l'alcool, glaçage (précipitation des cires à basse température), filtration, évaporation ; produit final visqueux à très visqueux.

Adultération : falsification d'un produit

Allozymique : Chaque allèle du gène d'une enzyme donne une allozyme de cette enzyme. Les marqueurs allozymiques permettent de discriminer des sous-espèces, variétés, origines géographiques. Ces marqueurs sont étudiés à un niveau intraspécifique (au sein d'une même espèce).

Aromagramme (ou olfactogramme) : traitement des données obtenues par GC/O donnant lieu à une représentation graphique assimilable à un chromatogramme

Concrète : extrait obtenu par macération de matière fraîche dans un solvant volatil (type apolaire) puis filtration et évaporation du solvant ou mélange de solvants ; produit final pâteux et dur.

Courtier : personne intermédiaire permettant les transactions entre l'agriculteur et les fabricants d'ingrédients naturels.

Huile essentielle : extrait obtenu par hydro-distillation, distillation à la vapeur d'eau, distillation sèche ou expression.

Métabolite : molécule de faible poids moléculaire (inférieur à 1500 Da) participant au fonctionnement de la cellule.

Métabolome : ensemble des métabolites d'un système vivant.

Métabolomique : analyse du métabolome.

Notes de tête : premières effluves odorantes perçues lors de l'application d'un ingrédient parfumé.

Notes de cœur : secondes effluves perçues, de quelques minutes à quelques heures après l'application d'un ingrédient parfumé.

Notes de fond : effluves persistantes après application au bout de plusieurs heures.

Table des matières

Introduction générale.....	11
Chapitre 1 : Bibliographie	14
1.1. Les extraits naturels utilisés en parfumerie	15
1.1.1. Généralités sur les extraits naturels	15
1.1.1.1. Les huiles essentielles.....	16
1.1.1.2. Les extraits par fluide supercritique	16
1.1.1.3. Les résinoïdes et concrètes	16
1.1.1.4. L'authentification des extraits naturels.....	17
1.1.2. L'absolue de feuilles de Viola odorata	18
1.1.2.1. Botanique et culture.....	18
a) Espèces botaniques et variétés.....	18
b) Culture	19
1.1.2.2. Les extraits.....	22
a) Rendements d'extraction de Viola odorata	22
b) Composition des extraits de Viola odorata.....	22
1.1.3. L'absolue de Rosa damascena et Rosa centifolia (Rose de Mai)	26
1.1.3.1. Rosa damascena.....	27
a) Culture	27
b) Cueillette.....	28
1.1.3.2. Rosa centifolia ou Rose de Mai	28
a) Culture	28
b) Cueillette.....	28
1.1.3.3. Composition des extraits	28
1.2. Etude d'un extrait naturel odorant.....	32
1.3.1. Evaluation de l'odeur d'un extrait par un panel : apports de l'analyse sensorielle ...	32
1.3.2. Les techniques d'analyses d'un extrait.....	33
1.3. La métabolomique appliquée aux extraits de plantes.....	38
1.3.1. Historique et définitions	38
1.3.2. Techniques analytiques et traitement statistique pour une étude métabolomique.....	39
1.3.2.1. Préparation des échantillons	39
1.3.2.2. Techniques analytiques.....	41
1.3.2.2.1. Un large choix de techniques.....	41
1.3.2.2.2. Le couplage UHPLC-HRMS.....	42
1.3.2.3. Une approche évolutive	51
1.3.3. Traitements statistiques	51
1.3.3.1. Analyses non supervisées	52
1.3.3.2. Analyses supervisées type PLS (Partial Least Square – Régression des moindres carrés partiels)	56
1.3.3.3. Prétraitement des données	57
1.3.4. Applications aux plantes et à leurs extraits	57
1.3.5. Chronologie d'une étude métabolomique.....	63
Chapitre 2 : Résultats et discussions	64
2.1. Introduction	65
2.2. Approches métabolomiques appliquées à l'absolue de feuilles de Viola odorata	65
2.2.1. Informations recueillies sur les absolues de feuilles de violette étudiées.....	65
2.2.2. Etude de la fraction volatile.....	72
2.2.2.1. Profils olfactifs des absolues de feuilles de violette France et Egypte.....	72

2.2.2.2.	Etude de la fraction volatile de l'absolue de feuilles de violette par HS-SPME-GC/MS	74
2.2.2.3.	Analyse par DHS-GC-O/MS des absolues de feuilles de violette.....	83
2.2.3.	Etude de la fraction non volatile.....	95
2.2.3.1.	Développement de la méthode d'analyse	95
2.2.3.2.	Traitement des données	100
2.2.3.3.	Discussion sur la validation d'un modèle statistique PLS-DA.....	107
2.2.3.4.	Résultats des études métabolomiques et interprétations.....	108
2.2.3.5.	Stratégies mises en place pour l'identification des marqueurs.....	115
2.2.	Application aux absolues de Rosa damascena et centifolia	125
2.2.4.	Recherche d'authentification d'espèces botaniques, d'origines géographiques et de mise en évidence d'adultérations	125
2.2.4.1.	Les espèces botaniques : Rosa damascena versus Rosa centifolia.....	128
2.2.4.2.	Origines géographiques de Rosa damascena : Maroc versus Turquie	135
2.2.4.3.	Adultération avec des composés synthétiques : nonadécane et alcool phénylethylique	137
2.2.5.	Discussion sur la possibilité et les limites de la réutilisation de données archivées	139
2.2.5.1.	Etude des données brutes.....	140
2.2.5.2.	Etude de nouveaux modèles	141
2.3.	Discussion et conclusion : apport de l'approche métabolomique dans le secteur arômes et parfums	146
Chapitre 3 : Matériels et méthodes analytiques		152
3.1.	Echantillons et produits chimiques	153
3.1.1.	Echantillons	153
3.1.1.1.	Absolues de violette : analyse sensorielle, HS-SPME-GC/MS.....	155
3.1.1.2.	Absolues de violette et absolues de rose : analyses GC-O et GC-FID.....	155
3.1.1.3.	Absolues de violette et absolue de rose : analyses UHPLC-QToFMS.....	156
3.1.1.4.	Fractionnement et extraction des composés azotés basiques de l'absolue de violette	156
3.1.1.5.	Feuilles de violettes	156
3.1.2.	Solvants et standards	156
3.1.2.1.	Standards utilisés pour les analyses HS-SPME-GC/MS	156
3.1.2.2.	Standards utilisés pour les analyses GC-FID et analyses sensorielles	157
3.1.2.3.	Standards utilisés pour l'étude métabolomique en UHPLC-QToFMS	157
3.1.2.4.	Standards utilisés pour l'identification des marqueurs de la rose.....	157
3.1.2.5.	Solvant de dilution des échantillons pour les analyses GC-FID et analyses sensorielles.....	157
3.1.2.6.	Solvant de dilution des échantillons pour les analyses UHPLC-QToFMS ..	157
3.1.2.7.	Solvants de phases mobiles pour UHPLC-QToFMS	157
3.1.2.8.	Solvants utilisés pour l'isolement des marqueurs de la violette.....	157
3.1.2.9.	Synthèse.....	158
3.1.3.	Préparation des échantillons	158
3.1.3.1.	Analyse sensorielle	158
3.1.3.2.	HS-SPME-GC/MS.....	158
3.1.3.3.	GC-FID	158
3.1.3.4.	UHPLC-ToFMS	159
3.1.3.4.1.	Etude sur l'absolue de feuilles de violette	159
3.1.3.4.2.	Etude sur l'absolue de pétales de rose	160
3.1.3.4.3.	Etude complémentaire sur l'absolue de pétales de rose	161
3.2.	Analyses sensorielles.....	161
3.2.1.	Etudes olfactives du profil odorant de l'absolue de feuilles de violette France et Egypte	161

3.2.2.	Etude de l'impact olfactif du (E,Z)-2,6-nonadiénal dans le profil olfactif de l'absolue	161
3.3.	Chromatographie en phase gazeuse	162
3.3.1.	HS-SPME-GC/MS.....	162
3.3.1.1.	Passeur d'échantillons et extraction	162
3.3.1.2.	Méthode GC/MS.....	162
3.3.1.3.	Identifications des constituants.....	163
3.3.2.	GC-FID	163
3.3.3.	DHS-GC-O/MS à huit voies (8W-GC-O) selon la méthode VIDEO-Sniff	163
3.3.3.1.	Extraction, concentration et injection.....	164
3.3.3.2.	Séparation chromatographique, division et transfert des effluents vers les postes d'évaluation olfactive.....	164
3.3.3.3.	Identification des composés odorants.....	164
3.3.3.4.	Acquisition et analyse des données olfactométriques	165
3.3.4.	HS-SPME-GC×GC/ToFMS	166
3.4.	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution	167
3.4.1.	Paramètres d'analyse.....	167
3.4.2.	Construction d'une séquence d'analyse pour l'approche métabolomique.....	168
3.5.	Outils statistiques	169
3.5.1.	Markerlynx XS : paramètres d'extraction des ions	169
3.5.1.1.	Paramètres d'extraction pour l'étude sur la violette.....	169
3.5.1.2.	Paramètres d'extraction pour l'étude sur la rose	169
3.5.2.	Prétraitement de la matrice de données sur tableur EXCEL	170
3.5.3.	Calcul des modèles statistiques	170
3.6.	Stratégies d'isolement des marqueurs France d'absolue de violette.....	172
3.6.1.	Première stratégie : chromatographie préparative guidée par la masse et chromatographie semi-préparative	172
3.6.2.	Seconde stratégie: purification des alcaloïdes	173
3.7.	Synthèse	173
3.7.1.	Synthèse de l'acétate de dihydrocitronellylphényle et du propionate de farnésyle.	173
3.7.2.	Synthèse du propionate de nérolidyle.....	175
	Annexes.....	176
	Annexe 1 : Le métabolisme des plantes	177
	Annexe 2: Questionnaire fournisseurs.....	183
	Annexe 3 : Acide 12-oxo-phytodiénoïque.....	185
	Références	186



Introduction générale

A Grasse, l'industrie de la parfumerie connaît ses débuts au XIV^{ème} siècle. Diverses plantes aromatiques sauvages telles que le lentisque, le myrte et la lavande furent à l'origine des premières activités destinées à parfumer les cuirs, donnant naissance à une profession spécifique : les Maîtres Gantiers et Parfumeurs [1]. Il faudra quatre siècles et une révolution industrielle pour faire évoluer cet artisanat vers une intensification des cultures de plantes à parfums et l'ouverture des marchés internationaux. Sous un remarquable micro-climat, la rose (*Rosa centifolia*), le jasmin (*Jasmin grandiflorum*), la tubéreuse (*Polianthes tuberosa*) et la violette (*Viola odorata*) s'épanouissent et deviennent de véritables symboles de la région. D'autres plantes sont importées : le santal des Indes (*Santalum album*), l'osmanthus de Chine (*Osmanthus fragrans*), la vanille (*Vanilla planifolia*) et l'ylang ylang (*Cananga odorata*) des îles de l'océan indien, le vétiver (*Vetiver zizanoide*), et le patchouli d'Indonésie (*Pogostemon cablin Benth*), la fève tonka d'Amazonie (*Dipteryx odorata*) [2] etc. Les fabricants développent des procédés d'extraction aux solvants volatils, élargissant ainsi la palette des matières premières avec de nouvelles notes et propriétés (fixatrices avec par exemple le benjoin, la vanille). L'industrie grasse prend alors un nouvel essor. La découverte de la synthèse de molécules naturelles comme la coumarine (1868), l'héliotropine (1869), la vanilline (1874), les ionones (1898) [2] permet l'entrée de nouveaux acteurs dans cette filière, et ouvre notamment le champ des possibilités pour les parfumeurs. La transposition de la synthèse à l'échelle industrielle marque la disparition progressive des manufactures. Par ailleurs, la compétition avec des pays à plus bas coûts de main d'œuvre provoque le recul des cultures de plantes à parfums dans le bassin grassois. Grasse reste néanmoins la capitale mondiale de la parfumerie, et le lieu incontournable dans le marché des ingrédients naturels de par son expertise et sa connaissance de ces matières. Une projection vers l'avenir par l'innovation est aujourd'hui une des priorités.

Les fabricants de matières premières se retrouvent confrontés à plusieurs problématiques : la qualité olfactive de leurs produits due à la plante fraîche et aux différentes étapes de production, les risques sur la santé publique par l'utilisation de produits phytosanitaires ou de contaminations, et la falsification intentionnelle de produits nobles (adultération). Aujourd'hui la qualité olfactive d'un extrait est maîtrisée par la connaissance analytique de la fraction volatile grâce à l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse associée à une évaluation olfactive. En revanche les contaminations et les adultérations sont de plus en plus complexes à identifier. La contamination soulève une difficulté technologique majeure : les composés sont souvent présents à l'état de traces dans les extraits et leurs sources peuvent être multiples (traitement phytosanitaires des cultures, contamination des extracteurs par de précédentes campagnes d'extraction de différentes plantes, etc.).

L'adultération peut, elle aussi, être de nature très diverse : le mélange avec des extraits issus d'origines botaniques apparentées, d'origines géographiques différentes, l'ajout volontaire de composés synthétiques ou d'un extrait végétal étranger.

Afin de répondre à ces enjeux majeurs d'authentification, nous avons proposé dans ces travaux une approche originale basée sur l'utilisation de la métabolomique appliquée à la fraction non volatile des absolues. La stratégie choisie est celle d'une approche globale à empreinte métabolomique des extraits. La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (UHPLC-ToFMS) est un instrument adapté pour cette application, combinant la haute résolution et la vitesse d'analyse [3].

Deux extraits de plantes à parfums symboliques de la parfumerie fine ont été sélectionnés : l'absolue de feuilles de violette de l'espèce *Viola odorata* et les absolues de pétales de rose des espèces *Rosa damascena* et *Rosa centifolia*.

Le premier chapitre est composé d'une étude bibliographique des différents types d'extraits naturels utilisés en parfumerie. Les extraits de feuilles de violette et de roses sont plus particulièrement décrits. Les différentes techniques de caractérisation sont ensuite décrites, mettant notamment en lumière les difficultés existantes pour l'authentification d'un extrait naturel. Enfin, un état de l'art est réalisé sur l'utilisation de l'approche métabolomique dans diverses problématiques relatives aux plantes, ainsi que sur les techniques analytiques dédiées à ce type de méthodologie.

Le second chapitre, « Résultats et discussions », est divisé en deux parties : l'une traitant d'une étude menée sur l'absolue de feuilles de violette, de la collecte d'informations auprès des acteurs de la filière jusqu'à des tentatives d'identification de marqueurs d'origines géographiques. La seconde partie consiste en une validation de la méthodologie développée sur l'absolue de pétales de rose incluant l'identification de marqueurs d'espèces botaniques. Une discussion est ensuite menée sur les avantages et les inconvénients de l'utilisation de l'approche métabolomique pour la filière des ingrédients naturels arômes et parfums.

Enfin, les conditions expérimentales sont réunies dans le dernier chapitre de ces travaux.

Ces travaux de thèse ont été menés au sein de la plateforme ERINI dans le cadre d'une convention CIFRE financée par la société Payan Bertrand et soutenue par la société Waters. Par ce fait, le choix de l'instrumentation analytique s'est porté vers un UHPLC-QToFMS (XEVO-G2-QToF).



Chapitre 1 : Bibliographie

Les applications des ingrédients naturels sont nombreuses : pharmacie, agroalimentaire, nutraceutique, biocides, cosmétique, arômes et parfums etc. La population entière est ainsi concernée. Le retour au naturel et la tendance du bio favorisent l'insertion d'ingrédients naturels au sein de ces très nombreux produits de consommation. Leurs fabrications doivent répondre à des réglementations propres à chaque type d'application. L'authentification de l'extrait est ainsi indispensable. Dans ces travaux, nous nous sommes concentrés sur le secteur de la parfumerie haut de gamme, dite parfumerie fine ou alcoolique, qui a généré un chiffre d'affaire de 1,88 milliards de dollars en France en 2012¹.

1.1. Les extraits naturels utilisés en parfumerie

Des centaines d'ingrédients constituent l'orgue du parfumeur. Une centaine est ensuite sélectionnée pour la composition d'un parfum. Ils sont de plusieurs natures :

- 1) Naturels : il s'agit d'huiles essentielles, d'extraits aux solvants, d'isolats (fractions d'un extrait ou composés simples isolés) etc.
- 2) Synthétiques : d'une part les molécules de synthèse nature-identiques (vanilline, coumarine, linalol), d'autre part les molécules artificielles, inexistantes dans la nature (éthyl vanilline, calone, éthyl maltol).

Les parfums alcooliques proposés sur le marché contiennent moins de 25 % d'ingrédients naturels, et le plus fréquemment entre 0,5 et 5 % (ce pourcentage était encore de 75 % dans les années 1960) [4].

1.1.1. Généralités sur les extraits naturels

Le choix des procédés d'extraction des matières premières naturelles est réalisé selon plusieurs critères. Il va dépendre de sa fragilité, mais aussi des propriétés de l'extrait désirées : odeur, texture, densité, rendement, coût, composition chimique, stabilité etc.

Les différents types d'extraits naturels utilisés en parfumerie fine sont ici présentés selon leur nature et en se limitant aux procédés industriels traditionnels.

¹ Source : NPD Group, panel beauty trends, consulté le: 04/03/2013

1.1.1.1. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont issues de l'extraction de graines, de racines, de rhizomes, de bois, de gommes-résines, de feuilles, de fruits, de fleurs etc. Mises à part celles obtenues par expression à froid, elles sont principalement constituées de composés volatils. Plusieurs procédés d'extraction permettent de les obtenir [5] :

- l'hydrodistillation (matière immergée dans l'eau portée à ébullition)
- l'entraînement à la vapeur (employé pour les matières premières plus fragiles : plante en contact direct avec la vapeur d'eau)
- l'expression à froid (pour les agrumes)
- la distillation sèche (cade, bouleau)

1.1.1.2. Les extraits par fluide supercritique

Un fluide à l'état supercritique réunit les propriétés de faible viscosité, de diffusivité d'un gaz et de densité d'un liquide. Il favorise ainsi le transfert de matière et la pénétration simplifiée du fluide dans les pores d'une matière solide. L'ensemble des fluides possèdent un état supercritique, mais seul le CO₂ est actuellement employé en parfumerie. En effet, il est abondant et les conditions supercritiques sont facilement accessibles (31,1 °C, 74 bars). Les matières premières fragiles peuvent alors être traitées sans risque de dénaturation. De plus, il s'agit d'un fluide non toxique, peu coûteux, inerte dans les conditions d'extraction, qui est un bon solubilisant des composés apolaires. Selon les conditions de pression et de température appliquées, l'extrait obtenu se rapprochera soit de la composition d'une huile essentielle, soit de celle d'une concrète (au voisinage du point critique, une élévation de la pression entraîne une augmentation du pouvoir solubilisant du fluide) [6].

1.1.1.3. Les résinoïdes et concrètes

Les résinoïdes sont issus de l'extraction de matières sèches : racines, feuilles ... ; riches en résines. Les concrètes sont issues de matières fraîches : feuilles, fleurs ... Concrètes et résinoïdes sont obtenus par un même procédé. Il s'agit d'une macération dans un solvant volatil. L'hexane et les solvants apolaires sont principalement utilisés pour leur apolarité, permettant ainsi d'extraire les composés volatils des différentes familles chimiques : aldéhydes, esters, hydrocarbures, terpènes, acides gras, etc. Le produit final pâteux et dur est obtenu après filtration et évaporation du solvant ou mélange de solvants.

Les extraits étudiés dans ces travaux sont obtenus à partir de concrètes. En effet, ces ingrédients étant destinés à la formulation de parfums alcooliques, ils doivent alors être parfaitement solubles dans l'alcool. Ils sont lavés à l'alcool au moyen d'une batteuse. Le

mélange est ensuite refroidi (glaçage) pour faire précipiter les composés peu solubles dans l'éthanol, puis filtré. Après évaporation de l'alcool, le produit très visqueux obtenu est appelé absolue [5].

1.1.1.4. *L'authentification des extraits naturels*

Les extraits naturels sont souvent issus de longs et contraignants processus de fabrication : la culture de la plante, l'ajout d'intrants, l'exposition climatique, les conditions et le soin apportés lors de la récolte, le transport de la matière fraîche, le procédé d'extraction, les conditions de stockage, etc. Il appartient alors à chaque intermédiaire de respecter un cahier des charges précis. Au cours de ces différentes étapes, des modifications désirées ou non peuvent intervenir. L'agriculteur peut choisir d'appliquer des produits phytosanitaires sur sa culture ou cette dernière peut subir malencontreusement les traitements appliqués sur des cultures géographiquement proches des siennes. Lors de l'étape suivante, l'extraction, des composés synthétiques peuvent être ajoutés pour apporter de la masse à l'extrait final ; des résidus d'extractions précédentes (notamment d'autres espèces de plantes) peuvent aussi contaminer involontairement le nouvel extrait produit si l'équipement de production n'est pas correctement nettoyé ; la qualité des solvants utilisés apporte aussi des contaminants supplémentaires (notamment lorsqu'il s'agit de solvants recyclés). D'autres types d'adultération sont envisageables, tels que des mélanges d'extraits de la même plante, mais de différents cultivars, d'espèces différentes ; ou encore des mélanges avec des extraits possédant des propriétés physico-chimiques et des similitudes olfactives. Les sources d'adultérations et de contaminations des extraits sont donc multiples et complexes à déterminer.

Viola odorata, *Rosa centifolia* et *Rosa damascena* sont les plantes modèles choisies pour réaliser cette étude. Leurs cultures ainsi que les compositions de leurs extraits sont décrites dans les paragraphes suivants.

1.1.2. L'absolue de feuilles de *Viola odorata*

1.1.2.1. Botanique et culture



Figure 1: *Viola odorata*, Tourrettes-sur-Loup, France

a) Espèces botaniques et variétés

On distingue deux variétés de *Viola odorata* (Figure 1) : la violette de Parme et la violette Victoria. Importée de Sicile en 1755 [7], la violette de Parme est la première cultivée dans les Alpes Maritimes (Vence, Tourrettes-sur-Loup, Cabris...) entre 1860 et 1870. La violette Victoria, moins précieuse olfactivement, est plus résistante et supplante la violette de Parme suite à une grave maladie en 1935 [8]. De plus, quatre ans sont nécessaires à la violette de Parme avant de pouvoir produire. Une seule floraison a lieu de janvier à mars alors que, dès la seconde année, la violette Victoria peut produire avec une floraison étalée d'octobre à mars. La violette de Toulouse est uniquement utilisée en confiserie et en bouquets, elle est peu odorante. Il s'agit de la violette de Parme, à fleur fertile, sans valeur pour l'industrie de la parfumerie [8].

Des études génétiques sur la *Viola odorata* ont été menées sur 165 plantes de 52 sites de collection, cultivées en serre à l'université de Oslo. Les sites ont été divisés en 11 zones géographiques : Azerbaïdjan, îles Canaries, Crète, Chypre, Angleterre, France, Grèce, Italie, Scandinavie, Sicile et Turquie. 28 marqueurs allozymiques² ont été obtenus, dont 25 varieraient selon l'origine géographique [9].

Certaines cultures de violettes odorantes sont faussement associées à la *Viola odorata*. *Viola alba*, *Viola suavis* et *Viola sintenisiis* sont couramment confondues avec la *Viola odorata*. *Viola odorata* a $2n = 20$ chromosomes. Des évidences morphologiques et allozymiques montrent que les espèces les plus proches seraient *Viola pyrenaica* ($2n = 20$),

² Chaque allèle du gène d'une enzyme donne une allozyme de cette enzyme. Les marqueurs allozymiques permettent de discriminer des sous-espèces, variétés, origines géographiques. Ces marqueurs sont étudiés à un niveau intraspécifique (au sein d'une même espèce).

Viola suavis ($2n = 40$) et *Viola alba* ($2n = 20$) [9]. La violette de Parme, historiquement cultivée pendant plusieurs siècles en Europe serait en réalité descendante de *Viola alba* [10].

b) Culture

Viola odorata pousse en Europe du nord, en plaine méridionale et en moyenne montagne. Cette variété serait originaire du sud de l'Europe, du nord-ouest africain et de l'Asie de l'ouest. Elle s'est répandue bien au-delà de son lieu d'origine du fait de cultures intensives [9]. Aujourd'hui, on trouve des cultures de *Viola odorata* essentiellement en Egypte, dans le sud de la France et en Italie ; il s'agit de la violette Victoria [8].

La violette Victoria de Tourrettes-sur-Loup pousse dans un sol peu profond, une terre argilo-calcaire avec incorporation de fumure de fond minéral et organique. Elle peut aussi pousser dans des cultures type « boudin » (Figure 2), hors sol et sous abris (mode de culture utilisé uniquement pour la valorisation de la fleur), technique développée en 1975 [7]. Les pieds de violette poussent dans des tuyaux en plastiques de 30 cm de diamètre et 2 m de long, remplis de tourbe.



Figure 2: Cultures en boudin, Tourrettes-sur-Loup, France

La violette doit survivre au climat hivernal et notamment à l'humidité importante. Elle aime les étés secs, les automnes doux et pluvieux. Les feuilles et les fleurs poussent entre septembre et mars. Toutes les fleurs sont ramassées en mars, ce qui déclenche une forte montée de sève pour la croissance des feuilles. A la fin mai, les feuilles sont fauchées, et transportées le jour même pour être extraites. Un arrosage abondant des champs permet une seconde pousse des feuilles, et donc une seconde coupe aux alentours du mois de juillet [8], voire même en septembre (Figure 3).

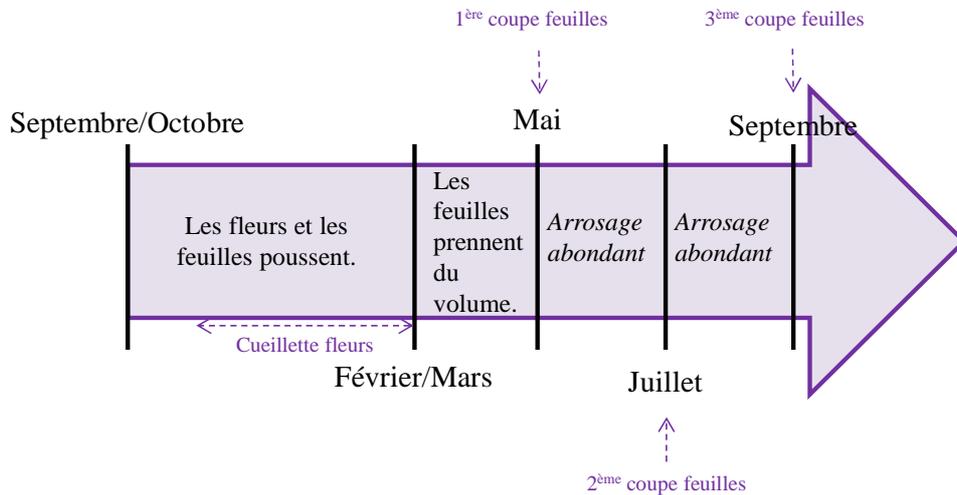


Figure 3: Cycle de vie de la culture de la violette

Près de 30 tonnes de feuilles et 2 tonnes de fleurs peuvent être produites par hectare [5].

La culture de la violette est menacée par plusieurs ravageurs : l'acarien, l'aleurode, le puceron, le thrips et la cécidomyie (Figure 4).



Figure 4: De gauche à droite : l'acarien, l'aleurode, le puceron, le thrips et la cécidomyie

Une protection biologique peut être mise en œuvre [7] : à chaque ravageur il est possible de faire correspondre un prédateur ou un parasite. Ils doivent être répandus méthodiquement. Cette protection biologique est appliquée à Tourrettes-sur-Loup (Tableau 1).

Tableau 1: Récapitulatif des ravageurs et de leurs prédateurs et/ou parasites

Ravageurs	Prédateurs	Parasites
Acariens (tétranyque)	Larve de Feltiella (cécidomyie), <i>Phytoseiulus Persimilis</i> (acarien)	
Aleurodes (diptère)	Macrolophus (punaise)	<i>Encarsia formosa</i> (hyménoptère)
Pucerons	Larves d'aphidoletes (cécidomyie)	<i>Aphidius ervi</i> , <i>aphidius colemani</i> (hyménoptère)
Thrips (thysanoptère)	<i>Amblyseius Cucumeris</i> (acarien)	

La protection phytosanitaire reste très répandue [8]. Les insecticides utilisés sont nombreux (Figure 5) :

- traitement contre cécidomyie des feuilles : endosulfan (non autorisé en Europe)-
- traitement contre les pucerons : pyrimicarbe (autorisé)
- traitement contre les acariens : acaricide (Vertimec® ; autorisé)
- traitement des nématodes : fumigant nématocide (provenant de trois familles chimiques : carbamates, hydrocarbures halogénés, organophosphorés) ou champignon nématophage
- traitement des champignons : mancozèbe ou fongicide organocuprique, bromure de méthyle (interdit en France) ou métham sodium (interdit en Europe)

Il n'y a pas de traitement chimique contre les virus.

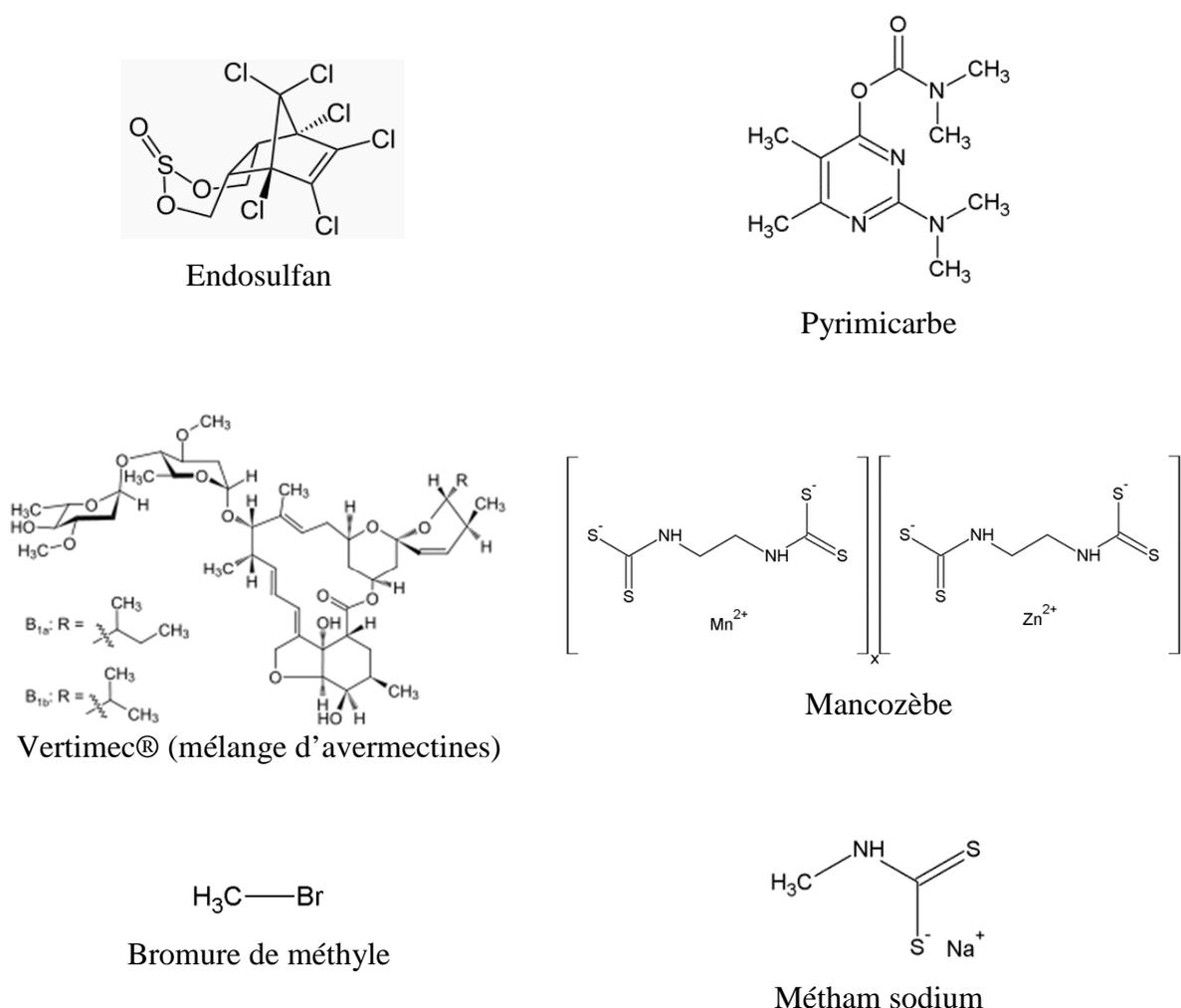


Figure 5: Insecticides employés dans la culture de la violette

1.1.2.2. Les extraits

a) Rendements d'extraction de *Viola odorata*

Aucun intérêt économique n'est porté sur l'extraction de la fleur en parfumerie : d'une part à cause de sa faible production à l'hectare et d'autre part du faible rendement d'extraction. Les ionones, caractéristiques de l'odeur sucrée de la fleur, sont synthétisées à l'échelle industrielle. Il est par ailleurs possible d'extraire les ionones, des molécules naturelles ayant la même caractéristique olfactive, à partir du rhizome d'iris. La fleur est utilisée par les confiseurs, mais aussi pour la composition de bouquets ornementaux.

Les rendements en concrète et absolue de fleurs et de feuilles de violette pour la violette de Parme et la violette Victoria sont décrits dans le Tableau 2. Les absolues de feuilles ont une odeur verte intense avec des nuances poivrées et fleuries délicates [11].

Tableau 2: Rendement en concrète et absolue pour la violette de Parme et la violette Victoria [5]

rendement	Fleurs		Feuilles	
	concrète	Absolue	Concrète	Absolue
V. Parme	0,09 à 0,12%	30 à 40%	-	-
V. Victoria	0,07 à 0,13%	30 à 40%	0,055 à 0,13%	45 à 60%

Le Tableau 3 donne les rendements en concrète de feuilles de violette du pays de Grasse chez Payan Bertrand.

Tableau 3: Rendement de la concrète de violette de pays de Grasse chez Payan Bertrand

Année	2013	2008	2006	2004
Rendement (%)	0,100	0,123	0,118	0,109

En 2012, le kilogramme d'absolue de violette du pays de Grasse s'est vendu 9000 € et le kilogramme d'absolue de violette d'Egypte, autre producteur majeur de l'absolue, près de 1000 €³.

b) Composition des extraits de *Viola odorata*

i) La fleur

En 1930, Ruzicka et Schinz ont caractérisé trois constituants de l'odeur de la violette : l' α -ionone (note violette), le (2E,6Z)-nona-2,6-diényl et (2E,6Z)-nona-2,6-diényl caractéristiques d'odeurs vertes et grasses. La technique de l'espace de tête sous vide a été utilisée par Brünke et coll. en 1996 pour compléter la liste de ces molécules caractéristiques :

³ Source : Payan Bertrand

la β -ionone (note violette), la dihydro- β -ionone (note boisée, florale), le linalol, le *p*-diméthoxybenzène, l'octanal, le nonanal, le décanal, le (3*Z*)-hexéanal, l'acétate de (3*Z*)-hexenyle, le (2*E*,6*Z*)-nona-2,6-diéanal, le (2*E*,6*Z*)-nona-2,6-diéanol, la 3-isopropyl-2-méthoxy pyrazine, la 3-sec-butyl-2-méthoxy pyrazine. Tsuji et Yomogida ont comparé le profil de l'extrait hexanique de la fleur avec le profil d'espace de tête en 1997 (Tableau 4). L' α -ionone, la β -ionone, la dihydro- β -ionone et le 1,4-diméthoxybenzène sont décrites dans les deux profils et sont les espèces majoritairement présentes [7].

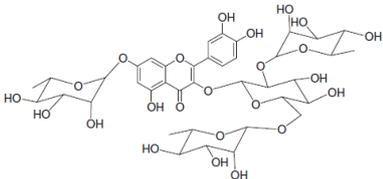
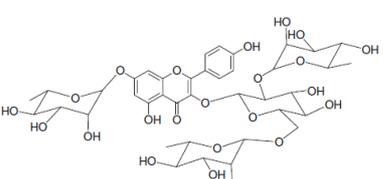
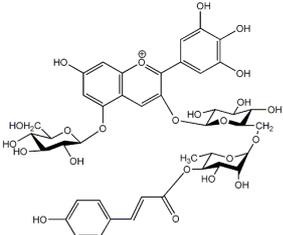
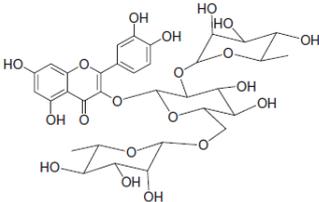
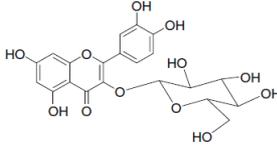
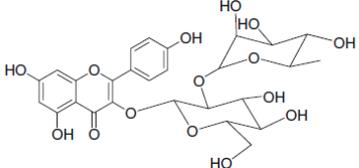
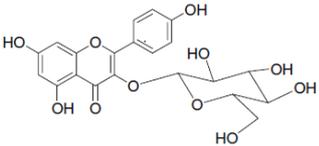
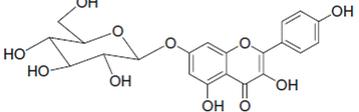
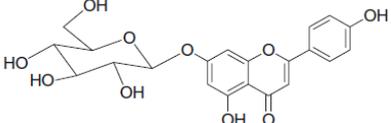
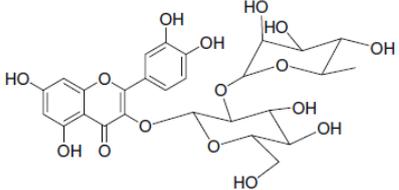
Tableau 4: Composition de l'extrait hexanique de fleurs de violettes par HS-SPME-GC/MS par Tsuji et Yomogida

octacosane	2-phényléthanol
nonacosane	béta-ionone
acide palmitique	<i>cis</i> -jasmone
docosanol	dodécanol
acide stéarique	eicosane
undécane	acide octanoïque
limonène	<i>p</i> -crésol
acétate d'hexyle	1,2,4-triméthoxybenzène
(2 <i>E</i>)-hexénal	heneicosane
dodécane	acide (4 <i>E</i>)-octenoïque
acétate de (3 <i>Z</i>)-hexényle	6,10,14-triméthyl-2-pentadécanone
tridécane	benzoate de (3 <i>Z</i>)-hexényle
acétate de (2 <i>E</i>)-hexényle	acide nonanoïque
hexanol	dehydrovomifoliol
<i>p</i> -cymène	tétradécanol
(3 <i>Z</i>)-hexénol	eugénol
tétradécane	2,3-dihydrofarnésol
nonanal	docosane
(2 <i>E</i>)-hexénol	Palmitate d'éthyle
oct-1-én-3-ol	acide décanoïque
pentadécane	tricosane
hexanol de 2-éthyle	jasmonate de méthyle
(2 <i>E</i>)-nonénal	épi-jasmonate de méthyle
linalol	tétracosane
octanol	hexadécanol
(2 <i>E</i>)-nonadiénal	acide dodecanoïque
hexadécane	pentacosane
heptadécane	3-oxo- α -ionone
oxophorone	acide 11-dodécanoïque
1,4-dimethoxy benzène	hexacosane
(3 <i>Z</i> ,6 <i>Z</i>)-nonadiénol	géranyllinalol
(2 <i>E</i> -,6 <i>Z</i>)-nonadiénol	phytol
salicylate de méthyle	benzoate de benzyle
octadécane	3-oxo- α -ionol
acétate de (2 <i>E</i>)-phényléthyle	heptacosane
nérylacétone	acide myristique
dihydro- β -ionone	acide pentadécanoïque
géranylacétone	salicylate de benzyle
α -ionone	nonadécane
α -ionol	

En 1999, les cires issues de la transformation de la concrète en absolue ont été étudiées par chromatographie sur couche mince après fractionnement par chromatographie sur colonne. Elles sont principalement composées de phytostérols, mais aussi d'hydrocarbures, d'esters d'acides gras, d'alcools aliphatiques et cycliques [7].

En 2011, les constituants d'extraits aqueux de fleurs sont analysés par HPLC-DAD et HPLC-ESI-MS [12]. Ces analyses ont révélé une prédominance de glycosides flavonols complexes (Tableau 5).

Tableau 5: Constituants retrouvés dans les extraits aqueux de la fleur de *Viola odorata* [12]

<p>quercetin-3-O-α-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow2)- [α-rhamnopyranosyl (1\rightarrow6)]-β-glucopyranoside-7-O- α-rhamnopyranoside</p> 	<p>kaempferol 3-O-α-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow2)-[α-rhamnopyranosyl(1\rightarrow6)]-β-glucopyranoside-7-O-α- rhamnopyranoside</p> 
<p>Violanin</p> 	<p>quercetin-3-O-α-rhamnopyranosyl(1\rightarrow2)- [α-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow6)]-β-glucopyranoside</p> 
<p>quercetin-3-O-glucopyranoside</p> 	<p>nikotiflorin</p> 
<p>kaempferol-3-Oglucopyranoside/astragaline</p> 	<p>kaempferol-7-O-glucopyranoside</p> 
<p>apigenin-7-O-glucopyranoside</p> 	<p>Rutin</p> 

ii) La feuille

En 1992, les composés volatils d'un extrait de feuilles de violette par le trichlorotrifluoro éthane (TTE) [13] et par l'hexane ont été étudiés. Onze composés volatils ont été identifiés dans l'extrait hexanique : le hex-2-éanal (1,3 % du total des composés volatils), le (*E*)-hex-2-én-1-ol (1,4 %), l'oct-7-én-4-ol (2,9 %), le nona-2,6-diéanal (13 %), l'hepta-2,5-diéanol (2,9 %), le nona-2,6-diéanol (4,8 %), le dodécanol (3,6 %), l'hexadécane (12,9 %), le pentadéc-3-éanal (15,9 %), l'octadécène (10,6 %) et l'icosène (3,3 %). Dix composés ont été identifiés dans les extraits TTE et non dans l'hexane : le (*Z*)-hex-3-énol, l'acétate de butyle, le 3,4-diméthylheptane, le 3,7-diméthylnonane, le 2,4-diméthylododécane, le 2,6,11-triméthylododécane, le 2,7,11-triméthylododécane, le (*Z*)-hex-3-ényl formate, l'alcool benzylique et le pentadéca-5,10-diéanol.

Les acides (3*Z*)-hexénoïque, (2*E*,6*Z*)-nonadiénoïque, le dihydroactinidiolide, l'oct-1-én-3-ol, les acides gras et leurs esters éthyliques associés sont aussi décrits. Les composés retrouvés dans la fleur sont présents à l'état de trace dans les feuilles de violettes. [7]

1.1.3. L'absolue de *Rosa damascena* et *Rosa centifolia* (Rose de Mai)

Le genre *Rosa* comprend 126 espèces. Il est divisé en 10 sections dont la *Gallicanae* caractéristique de buissons dressés, pas très élevés, ayant des aiguillons recourbés de taille variable, mêlés de cils et de grandes fleurs roses. La *Rosa damascena* Linné et la *Rosa centifolia* Miller (rosier cent feuilles) sont issues de cette section [14] (Figure 6). Les principaux pays producteurs de roses pour la parfumerie sont la Turquie, le Maroc, la Bulgarie, la France et la Chine. La région de Grasse produit seulement *Rosa centifolia*, appelée aussi rose de Mai (Figure 7) ou rose de Grasse. *Rosa damascena* est la seule à partir de laquelle une production d'huile essentielle est économiquement viable. *Rosa alba* ou *Rosa damascena* var. *Alba* est une rose blanche contenant une huile essentielle de qualité inférieure. Elle est présente en Bulgarie et notamment à une haute altitude où la culture des roses *damascena* n'est plus possible [15]. La Figure 6 illustre la généalogie des roses à parfum. *Rosa damascena* est issue d'une hybridation entre *Rosa gallica* et *Rosa phoenicia* ; *Rosa centifolia* est elle-même issue d'une hybridation entre *Rosa damascena* et *Rosa alba*.

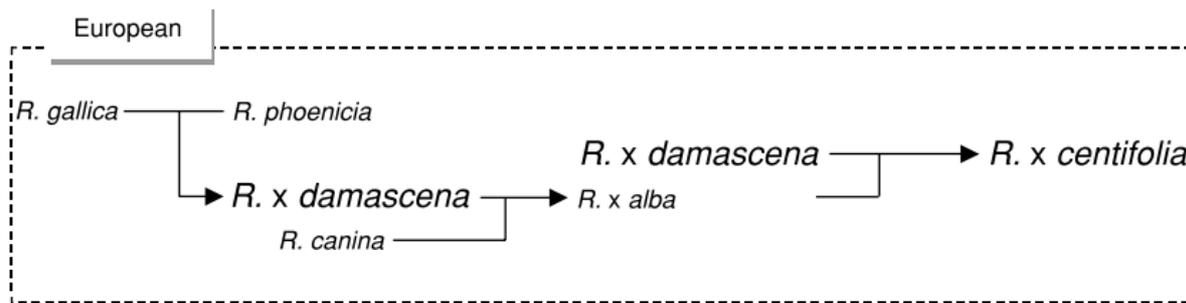


Figure 6: Généalogie des roses à parfum [16]



Figure 7: Rose de Mai

1.1.3.1. *Rosa damascena*

a) Culture

Rosa damascena, aussi appelée « Rose rouge de Damas » est la plus utilisée en parfumerie [15]. Elle est cultivée en Bulgarie, en Turquie à moins grande échelle, aux Indes, au Maroc, en Iran, en Moldavie etc. [5,15]. Il s'agirait d'un hybride de *Rosa gallica* L. et *Rosa phoenicia* B. [5]. En Turquie, cette rose est cultivée dans des vallées situées à 1000 m d'altitude, entourées de hautes montagnes [17]. Le rosier aime les hivers rudes (-15 °C) et les mois de mai et juin chauds et ensoleillés ; il est adapté au climat continental. La floraison a lieu à des températures comprises entre 15 et 30 °C. Pendant la floraison, les journées trop chaudes entraînent une sécheresse qui fait perdre le parfum aux fleurs épanouies et fait souffrir les boutons prêts à éclore. Elle est aussi trouvée à l'état sauvage dans le Caucase, en Syrie, au Maroc et en Andalousie [15].

La culture est pratiquée en plein champ, au bord des rivières et ruisseaux. Les rosiers de montagne ne bénéficiant pas du même arrosage produisent moins mais sont plus résistants à la sécheresse en été ; ils fournissent un rendement en huile essentielle plus élevé. Le terrain doit être mi-argileux ou argilo-calcaire, mi-sablonneux/caillouteux, riche en humus. Le terrain doit être aéré et pauvre en sels de calcium [15]. Le buisson peut atteindre 1,5 m de hauteur au

bout de 2 ans. Tous les 5 ans ces buissons sont coupés au pied et produisent à nouveau dès la 2^{ème} année. Une plantation peut produire jusqu'à 30 ans. Les champs de roses fournissent entre 3500 et 5000 kg de fleurs à l'hectare [17].

b) Cueillette

La cueillette commence au début de la floraison (Mai). La floraison dure entre 30 et 40 jours. Le travail commence au lever du soleil, vers 4 h du matin jusqu'à 10 h. La rose est pincée et détachée de la tige juste au ras du calice. Elle est recueillie dans un panier en osier ou un sac de toile. Les roses récoltées sont ensuite transportées pour être transformées [17]. Une bonne cueilleuse peut récolter jusqu'à 500 g de pétales à l'heure [5]. La fleur, une fois à l'usine, est déchargée et étendue sur le sol à l'abri de la chaleur et du soleil sur une épaisseur de 20 à 30 cm. Il peut arriver que la rose fermente car elle s'échauffe très rapidement dans les sacs dans lesquels les températures peuvent s'élever jusqu'à 35-40 °C en 4 h [17].

1.1.3.2. Rosa centifolia ou Rose de Mai

a) Culture

Rosa centifolia est cultivée en France, en Italie et au Maroc. La variété française, appelée Rose de Mai serait en fait un hybride entre la *Rosa gallica* L et la *Rosa centifolia* L [5]. Il existe deux variantes : la simple et la double. La fleur double est moins appréciée par les parfumeurs. Elle serait pourtant plus résistante que la simple [8]. Le rosier de Grasse est taillé au printemps limitant sa hauteur à 80 cm. Il craint les gelées tardives qui provoquent la chute des boutons floraux [8]. La plantation perdure une quinzaine d'années [17]. Il est possible de greffer la *Rosa centifolia* sur une *Rosa indica major*, augmentant ainsi le rendement à l'hectare : il est alors de 2000 à 2500 kg de fleurs et non plus de 1200 à 1500 kg sur plant non greffé [5].

b) Cueillette

La floraison est plus précoce qu'en Turquie pour *Rosa damascena*. Elle a lieu en mai mais peut parfois commencer en avril [5,17]. Même si cette rose n'est pas cultivée pour la production d'huile essentielle, des quantités réduites sont distillées pour la production d'eau de rose [15].

1.1.3.3. Composition des extraits

La concrète de *R. damascena* est jaune orangée à orangée olive avec une odeur plus miellée et épicée que la Rose de Mai. La concrète de Rose de Mai est jaune brun à jaune orangé, cireuse, compacte [5]. L'absolue vire à une couleur jaune/vert par vieillissement [17].

Le Tableau 6 donne les rendements en concrète et en absolue de la *Rosa damascena*. Lorsque la floraison est courte (environ 1 mois), les rendements en fleurs et en concrètes seraient plus élevés [15].

Tableau 6: Rendement en concrètes et absolues de *Rosa damascena*

Pays	Turquie[17]	Bulgarie[5]	Maroc[5]	France [18]
Concrète	0,25%	0,22-0,25%	0,20-0,25%	0,24-0,27%
Absolute	-	50-60%	50-65%	55-65%

La partie volatile de l'absolue de *Rosa damascena* est majoritairement composée d'alcool phényléthylique, de citronellol, géraniol, nérol, eugénol, méthyleugénol, acétate de géranyle, alcool benzylique, nonadécane, nonadécène et farnésol. Une étude sur la fraction volatile de trois absolues de roses de Turquie provenant de trois fournisseurs différents de 2005 [19] a donné les compositions reportées dans le Tableau 7 (en pourcentages relatifs) :

Tableau 7: Composition de la fraction volatile de l'absolue de *Rosa damascena* turque [19]

Composés	Pourcentage
α -terpinéol	0,08-0,25
n-heptadécane	0,08-0,22
acétate de néryle	0,02-0,11
acétate de géranyle	0,39-0,51
citronellol	9,30-13,65
nérol	2,10-2,51
n-octadécane	0,17-0,35
géraniol	5,05-6,19
alcool benzylique	0,47-0,57
nonadécane + 1-nonadécène	0,33-0,43
alcool phényléthylique	63,19-71,80
méthyleugénol	0,80-1,16
eugénol	1,06-1,26
farnésol	0,21-0,36
<i>total</i>	88,85-93,86
<i>Rendement absolue</i>	49-55

Une étude de 2009 [20] a montré des résultats similaires avec une composition supérieure en nonadécane (4,35%). Dans des études antérieures [19,21,22] sur des absolues de rose Maroc et Turquie, d'autres composés ont été retrouvés : le linalol, le néral, l'acétate de citronellyle, la trans- β -damascénone, le décanal, le terpinèn-4-ol, l'hexadécane, le germacrène D, l'heneicosane, le (*E*)-2-hexèn-1-ol et l'hexadécyloctanoate.

L' α -Tocophérol, le γ -tocophérol, le δ -tocophérol et le β -carotène ont été trouvés dans les absolues de rose *damascena* [20].

Dans la concrète de rose ont été retrouvés d'autres hydrocarbures : le n-heicosane, le n-heneicosane, le n-docosane, le n-tricosane, le n-tetracosane, le n-pentacosane, le n-hexacosane, le n-heptacosane, le n-nonacosane et le n-hentriacontane [23].

En 1995, le prix de la concrète de rose *damascena* turque était de 400-800 €/kg [5]. En 2013, le prix d'achat de l'absolue de rose *damascena* marocaine était de 2500-3000 €/kg⁴.

Le rendement d'obtention en huile essentielle de *Rosa damascena* est de l'ordre de 0,03% [5]. Elle contient majoritairement du citronellool, du nérol, du géraniool, du nonadécane, et de l'alcool phényléthylique (Tableau 8) [24].

⁴ Source : Payan Bertrand

Tableau 8: Composition relative de l'huile essentielle de *Rosa damascena* distillée à 96 °C par GC-FID [24]

Composés	Pourcentage	Composés	Pourcentage
α -pinène	1,15 \pm 0,13	acétate de géranyle	3,22 \pm 0,63
sabinène	0,11 \pm 0,03	β -ionone	0,20 \pm 0,09
myrcène	0,25 \pm 0,25	eugénol de méthyle	0,72 \pm 0,08
α -pinène	0,63 \pm 0,15	β -bourbinène	1,05 \pm 0,22
alcool phéyléthylrique	4,32 \pm 0,69	β -élémente	0,56 \pm 0,11
linalol	0,81 \pm 0,20	β -caryophyllène	0,58 \pm 0,13
<i>cis</i> oxyde de rose	0,19 \pm 0,02	α -humulène	1,00 \pm 0,29
<i>trans</i> oxyde de rose	0,10 \pm 0,02	α -cadinène	0,39 \pm 0,08
terpinèn-4-ol	0,19 \pm 0,03	docosane	0,40 \pm 0,21
α -terpinéol	0,86 \pm 0,36	heptadécane	3,31 \pm 1,83
citronellol + nérol	35,14 \pm 1,75	farnésol	2,72 \pm 1,23
géraniol	21,33 \pm 2,00	9-eicosène	2,10 \pm 0,32
eugénol	2,04 \pm 0,20	nonadécane	15,42 \pm 0,92
damascone	0,29 \pm 0,32		

Des extraits méthanoliques de fleurs fraîches de rose *damascena* ont montré la présence de composés phénoliques [25] : acide gallique, rutin, quercitrin, myricetin, quercetin et kaempferol.

La connaissance des extraits naturels se révèle indispensable pour une meilleure maîtrise de leur utilisation. La première évaluation d'un extrait est olfactive et visuelle. L'industrie de la parfumerie se focalise dans un premier temps sur la première fraction d'intérêt de ses matières premières : la fraction volatile et odorante.

1.2. Etude d'un extrait naturel odorant

Un extrait naturel est évalué par des contrôles sensoriels : visuels, olfactifs ; puis des contrôles physico-chimiques (densité, viscosité, colorimétrie, indice de réfraction, pouvoir rotatoire, solubilité, point éclair, etc.) [26] et enfin des analyses plus poussées de caractérisation et de quantification de composés spécifiques.

1.2.1. Evaluation de l'odeur d'un extrait par un panel : apports de l'analyse sensorielle

La description des caractéristiques olfactives d'un extrait est un élément de choix essentiel pour orienter l'achat et l'utilisation de matières premières (plantes fraîches ou extraits), pour optimiser des procédés d'extraction, pour orienter l'utilisation du produit à des applications spécifiques ou encore simplement pour contrôler sa conformité.

L'analyse sensorielle nécessite un large panel de testeurs, partant du novice, consommateur, à l'expert, formé à la description des produits [27]. Le traitement des résultats repose sur les lois statistiques : ainsi, plus large est le panel (tant en nombre qu'en compétence, âge, sexe, fumeurs, non-fumeurs etc.) plus l'étude sera pertinente et proposera des résultats robustes. Pour une meilleure interprétation des résultats, chaque membre du panel doit sentir les produits dans les mêmes conditions, notamment au même moment de la journée.

Plusieurs types de tests sensoriels existent [28]. Seuls les tests utilisés au cours de cette étude seront présentés. Les tests descriptifs et triangulaires sont les plus couramment employés :

- Méthode descriptive [28]

Plusieurs descriptifs olfactifs, précis, discriminants, indépendants et caractéristiques de l'extrait sont étudiés simultanément. « Le champ des odeurs ® » de Jean-Noël Jaubert [29] propose une structuration de différents pôles olfactifs (amine, hespéridé, terpénique, soufré, pyrogène, doux, fruité, grasse). Cette classification n'est pas systématiquement utilisée. Des bases de vocabulaires propres à une étude donnée peuvent aussi être proposées. Des sociétés possèdent aussi leurs propres classifications.

En parfumerie, on distingue les notes de tête, les notes de cœur et les notes de fond [30]. Les notes de tête correspondent aux effluves du produit, senties juste après application. Les notes de cœur se révèlent ensuite, après diminution des notes de tête. Les notes de fonds sont les notes persistantes sur la peau au cours d'une journée. Le produit est testé sur support (mouillette, espace de tête d'un flacon, etc.).

- Méthode discriminative : test triangulaire [28,31]

Ce test permet de comparer deux produits et conclure s'il est possible de les discriminer. Pour chaque essai, le paneliste est en présence de 3 échantillons ; deux échantillons proviennent du même produit, un troisième échantillon du deuxième produit sous les combinaisons aléatoires de type AAB, ABA, BAA, BAB, BBA, ABB. Il lui faut déterminer quels échantillons sont identiques et il doit obligatoirement fournir une réponse, même au hasard. Les résultats sont ensuite traités selon le test de la loi binomiale avec $p = 1/3$ (Norme ISO 4120, 1983). Il n'est pas indispensable que les panélistes aient une connaissance du secteur pour répondre à ce type de test. D'autres types de tests existent : le test de conformité A – non A (Norme ISO, 8588, 1987) (le jury doit indiquer les échantillons conformes à une référence donnée), l'épreuve du duo-trio (trois échantillons proviennent de deux lots, l'un des trois est l'échantillon de référence, le jury doit déterminer lequel des deux autres est conforme à la référence) et l'épreuve p sur n (p échantillons identiques, et x échantillons différents sont présentés au jury : il doit alors identifier les p semblables et les x différents).

1.2.2. Les techniques d'analyses d'un extrait

Cette partie a pour objectif de proposer un rapide inventaire des techniques analytiques employées pour l'analyse des extraits naturels. De nombreux ouvrages ont été publiés sur ce sujet, décrivant ces techniques de façon exhaustives [32-35].

La chromatographie est la technique de choix pour la séparation de mélanges complexes, et notamment des extraits naturels. Il s'agit d'une technique séparative reposant sur l'interaction entre une phase mobile (liquide, gaz, fluide supercritique), une phase stationnaire (solide ou liquide dans une colonne ou sur une plaque) et l'échantillon. Les composés de l'échantillon ont plus ou moins d'affinité avec la phase mobile et la phase stationnaire selon leur nature. Le débit de phase mobile ainsi que ses paramètres (température, composition, propriétés intrinsèques) vont donner la dynamique nécessaire à la migration progressive des différentes espèces le long de la phase stationnaire.

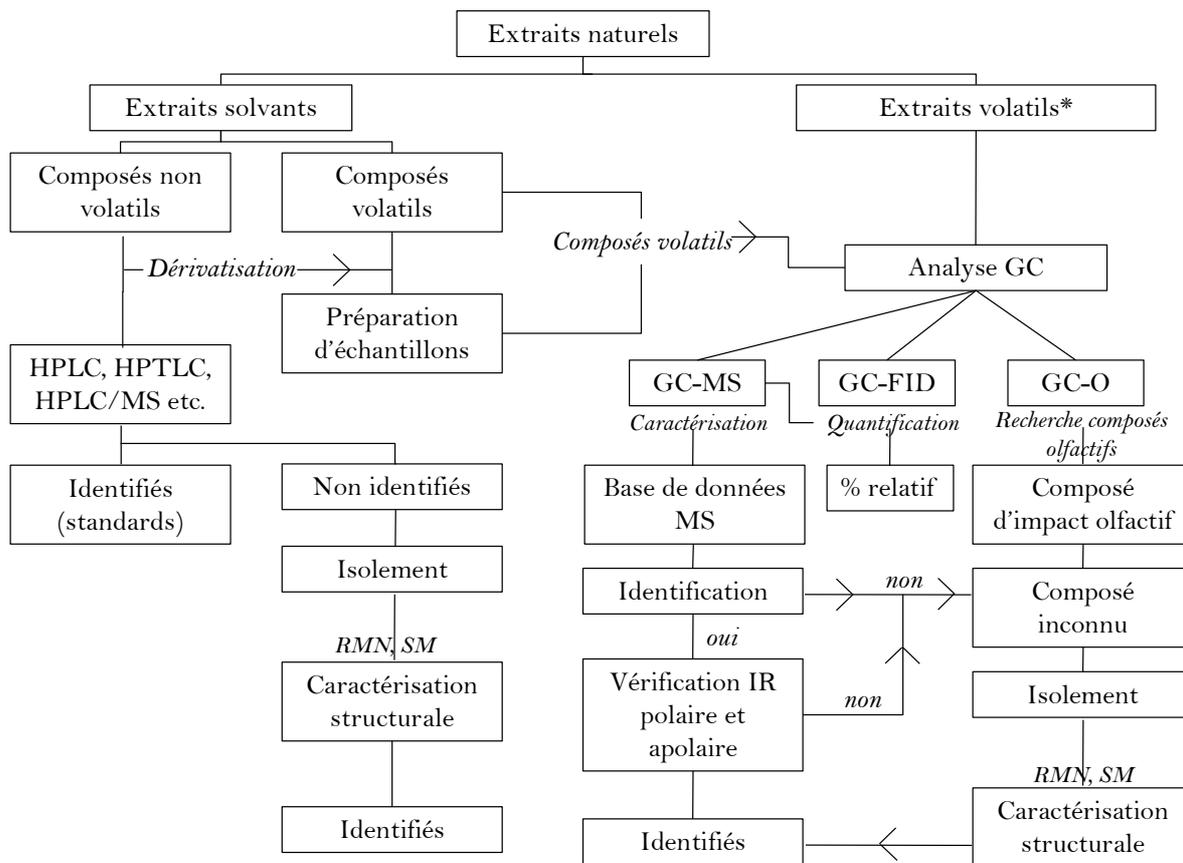
La technique universellement employée pour l'analyse de la fraction volatile d'un extrait est la chromatographie en phase gazeuse. La séparation est basée sur la volatilité des composés, leur polarité et leur chiralité pour certaines colonnes. [36]

Pour l'étude de la fraction non volatile, la technique séparative la plus employée est la chromatographie en phase liquide. La phase stationnaire est une colonne pour l'HPLC et une plaque pour l'HPTLC. La séparation est principalement basée sur la polarité des constituants

de l'échantillon et des différentes phases. La chromatographie en phase inverse est classiquement utilisée : une phase stationnaire de nature apolaire et une phase mobile plus polaire (avec un gradient de polarité allant du plus polaire au moins polaire au cours de l'analyse). [37]

Chacune de ces techniques séparatives est équipée d'un (ou plusieurs) détecteur(s) donnant des informations sur les analytes séparés. Ces détecteurs peuvent être universels comme le DEDL (détecteur évaporatif à diffusion de lumière) pour la chromatographie liquide (LC), le FID (détecteur à ionisation de flamme) pour la chromatographie gazeuse (GC); ou spécifiques comme le DAD (détecteur à barrettes de diodes) pour la LC ou le PFPD (détecteur à photométrie de flamme pulsée) et NPD (détecteur azote-phosphore) pour la GC. Les informations obtenues peuvent aussi être structurales avec les différentes technologies de spectromètres de masse pouvant être couplées à la GC et à la LC (simple quadripôle, triple quadripôle, trappe d'ions, Orbitrap, temps de vol) [36-39]. Enfin, l'olfactomètre est un détecteur sensoriel pour la GC.

La Figure 8 décrit des grandes stratégies d'analyse d'un extrait naturel.



*huile essentielle (hydrodistillation, entraînement à la vapeur) et extraits CO₂ à basse pression
IR: Indice de rétention

Figure 8: Techniques d'analyses pour l'étude des extraits naturels

Les extraits volatils⁵ sont analysés en GC sans technique de préparation des échantillons particulière (à l'exception de l'étude de composés co-élués ou présents dans de faibles concentrations). En revanche la fraction volatile des extraits aux solvants⁶ nécessite une préparation pour la compatibilité avec le système d'analyse (éviter l'injection de composés non volatils en chromatographie en phase gazeuse par exemple) : il peut s'agir d'une dilution dans un solvant adapté (compatible avec la nature des constituants du mélange et la polarité de la colonne), ou par exemple d'une extraction en espace de tête statique ou dynamique (HS), d'une micro-extraction en phase solide par espace de tête (HS-SPME) [40], d'une extraction de composés volatils et semi-volatils par SDE (Extraction Distillation Simultanée ou extraction à l'aide d'un montage de Likens-Nickerson), d'une extraction par sorption en espace de tête (HSSE), d'une extraction par sorption sur barreau magnétique (SBSE), d'une extraction en phase solide (SPE – nombreuses natures de phases commerciales disponibles) [41] ou encore d'une partition liquide-liquide [42] etc.

L'identification d'un composé en GC/MS est réalisée par son spectre de masse (base de données) et la confirmation de cette information par l'indice de rétention (dédit du temps de rétention) [43] sur colonne apolaire et polaire ou par injection du standard du composé identifié. L'isolement des composés reste nécessaire dans certains cas pour une caractérisation par RMN.

La quantification d'un composé est généralement faite par GC-FID ou GC/MS par étalonnage (externe, interne, ajout dosé). La GC/MS est particulièrement intéressante dans le cas des co-élutions, en mode SIM (Single Ion Monitoring).

La GC/Olfactométrie est choisie pour détecter les composés à impact olfactif (cette technique est souvent couplée à la spectrométrie de masse). Elle peut notamment être complémentaire des autres techniques pour mettre en évidence des composés souvent à l'état de trace mais ayant un pouvoir olfactif très important : le nez humain est généralement le détecteur le plus sensible pour les composés odorants [44]. La GC/MS/MS est une autre configuration permettant la quantification de composés à l'état de traces [45,46]. La GCxGC et la GC-GC sont des techniques séparatives à deux dimensions employées pour augmenter l'efficacité de la séparation du fait de l'utilisation simultanée/alternative (pour la GCxGC) ou d'une utilisation en mode « heartcut » de deux polarités de colonnes (polaire et apolaire) [47,48].

⁵ Extraits volatils : huiles essentielles, extraits CO₂ supercritique sous conditions de pressions et températures spécifiques

⁶ Extraits aux solvants : concrètes, résinoïdes, absolues, extraits, CO₂ supercritique sous conditions de pressions et températures spécifiques

La caractérisation des composés non volatils peut s'avérer plus complexe. A l'inverse des composés volatils, peu de banques de données de spectres de masse existent. Les sources d'ionisation sont plus nombreuses et soumises à davantage de facteurs que celles employées en GC (ionisation électronique) comme la température, la nature des éluants, les additifs, etc : l'ionisation et la fragmentation des composés sont donc variables. La fragmentation étant variable, les données obtenues ne permettent pas de construire une banque de données utilisable par l'ensemble des laboratoires. Chacun d'entre eux doit alors construire sa propre banque de données dans des conditions contrôlées pour un instrument spécifique. Des instruments tels que la spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) permettent d'obtenir une information sur la masse exacte de l'analyte ionisé (molécule protonée, molécule déprotonée, radical cation, radical anion, adduits selon la source de ionisation, et le mode sélectionné –positif ou négatif). Des propositions de formules brutes peuvent alors être proposées, notamment grâce aux distributions isotopiques, aux rapports hydrogènes/carbones etc [49]. L'étude de la fragmentation de l'analyte peut aussi être riche en informations (grâce au mode MS/MS). Si la littérature ne fournit pas de données pouvant être corrélées aux ions ou fragments obtenus, les études peuvent alors être orientées vers des techniques d'isolement par chromatographie préparative par exemple [50]. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) devient alors indispensable à l'élucidation structurale du composé isolé, sous réserve de l'obtention d'une quantité suffisante (environ 1 mg pour un instrument de fréquence 500 MHz par exemple) [51].

Dans une démarche de contrôle qualité, il n'est pas envisageable d'effectuer systématiquement la caractérisation totale d'un extrait. Des techniques analytiques diverses sont alors utilisées pour rechercher des données précises corrélées à la littérature mettant en exergue de potentielles malfaçons. La problématique introduite est ici celle de l'authenticité d'un extrait. Sa qualité est dépendante de la variété botanique de la plante, de l'origine géographique, des conditions environnementales de culture, mais aussi des conditions de stockage, des différents procédés d'extraction, etc.

Les techniques analytiques couramment employées pour l'authentification de ces matières premières sont répertoriées dans le Tableau 9.

Tableau 9: Techniques analytiques d'authentification employées dans le secteur de la parfumerie

	Composés volatils	Composés non volatils
GC-FID et GC/MS [52] [53] [19]	X	X (dérivatisation)
IRMS [54]	X	X
Chromatographie chirale [55,56]	X	X
Infrarouge [57]	X	X
SNIF-NMR [58]	X	X
Comptage par scintillation liquide du ¹⁴ C [59]	X	X
HPTLC [60]	X	X
HPLC et UPLC [61] – (UV –ELSD – MS)		X

Ces approches apportent une variété d'informations, mais restent incomplètes.

La spectroscopie infrarouge [57] fournit des informations sur la nature des liaisons moléculaires des composés présents dans l'extrait, et conduit ainsi à des propositions de familles de composés. Sauf dans le cas d'étude d'un composé pur, l'identification d'un composé est difficile. Couplée à des outils chimiométriques, elle permet de mettre en évidence des problèmes d'adultération. La chromatographie chirale [55,56] présente un intérêt uniquement en présence de composés optiquement actifs, leurs excès énantiomériques pouvant être caractéristiques de leur provenance (naturelle, synthétique, botanique, géographique, etc).

La SNIF-NMR [58] (Site-specific Natural Isotope Fractionation Nuclear Magnetic Resonance) est basée sur la spectroscopie RMN du ²H et donc sur la mesure du rapport ²H/¹H, caractéristique d'une origine géographique, d'une origine synthétique etc. Le comptage par scintillation liquide du ¹⁴C permet de distinguer des composés naturels de composés synthétiques [59]. L'IRMS [54] permet de mesurer les rapports des isotopes stables, caractéristiques d'un produit spécifique d'une source donnée. L'HPTLC [60] présente l'avantage de pouvoir analyser un grand nombre d'échantillons en simultanée facilitant ainsi leur comparaison à une référence. Cette technique est largement utilisée pour l'authentification botanique.

Les techniques présentées donnent une vision partielle des échantillons. Une approche plus globale est alors à envisager. L'approche métabolomique répondrait à ce besoin de profil global de l'échantillon [62,63].

1.3. La métabolomique appliquée aux extraits de plantes

La métabolomique est utilisée dans de multiples domaines : médical [64,65], alimentaire [66-68], nutritionnel [69], pour l'étude des plantes [70-76] etc. A notre connaissance cependant, aucune étude métabolomique sur les ingrédients naturels de parfumerie obtenus par extraction aux solvants volatils (type concrète, absolue, résinoïde) n'est à ce jour répertoriée dans la littérature. Cette étude bibliographique fait donc référence à des travaux sur des matrices d'origine végétale au sens large, à savoir des études sur les plantes et des extraits végétaux d'origines variées.

1.3.1. Historique et définitions

Le terme « métabolome » est introduit en 1998 par Oliver et collaborateurs [77]. Un organisme vivant contient des gènes, qui sont transcrits en ARNm, permettant la production de protéines, qui elles-mêmes participent à la synthèse des métabolites composant le métabolome. Il s'agit de molécules de faible poids moléculaire (inférieur à 1500 Da), participant au fonctionnement de la cellule (croissance, maintenance, défense, reproduction...). La métabolomique, qui permet l'étude du métabolome se trouve au bout de la chaîne « Omique » [78] (Figure 9).

La métabolomique consiste en la mesure non sélective du plus grand nombre de métabolites d'un système biologique donné dans des conditions bien définies [79]. Il existe deux approches, l'approche globale et l'approche dite ciblée.

- l'approche globale : étude non ciblée du métabolome (empreinte) à un instant donné, dans des conditions spécifiques, sans notion de caractérisation ou de quantification. L'ensemble des métabolites est alors détecté afin de rechercher par la suite les métabolites discriminants et témoins de perturbations métaboliques.

- le profilage métabolomique est une variante de l'approche globale : il consiste à étudier quantitativement un groupe de métabolites issus d'une même famille ou d'une même voie de biosynthèse [79,80].

- l'approche ciblée permet d'étudier des métabolites préalablement sélectionnés (résultats d'études antérieures, parfois menées selon l'approche métabolomique globale).

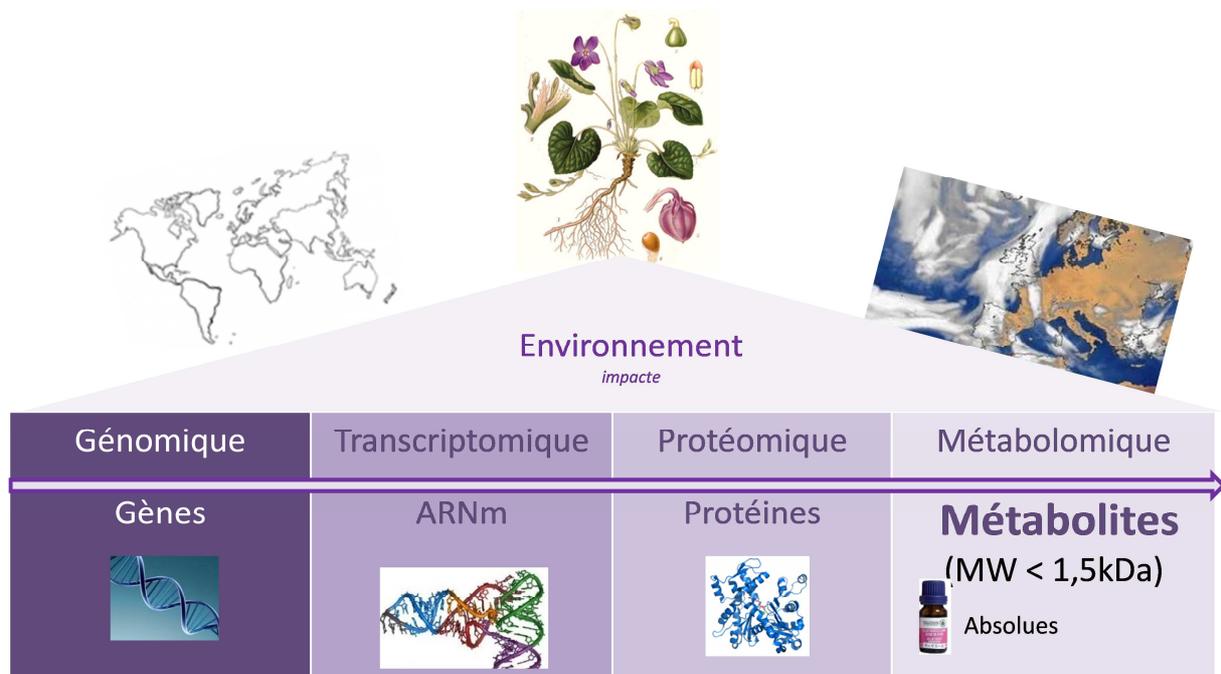


Figure 9: Chaîne Omique

1.3.2. Techniques analytiques et traitement statistique pour une étude métabolomique

Les techniques analytiques pouvant être envisagées pour réaliser des études métabolomiques sont multiples. Il s'agit le plus souvent de techniques chromatographiques (liquide ou gazeuse) ou spectroscopiques (RMN, FT-IR etc.), mais bien d'autres techniques peuvent aussi être employées. Néanmoins diverses contraintes sont à prendre en compte. La méthode analytique développée doit être répétable, robuste, de mise en œuvre rapide et être rigoureusement optimisée avant d'être automatisée pour l'acquisition d'un grand nombre de mesures nécessaires à l'étude métabolomique. Plus adaptée sera la méthodologie analytique, plus simple sera le traitement des données. Les différents filtres statistiques, s'ils sont mal employés, peuvent induire des biais importants dans l'interprétation des données. Il est donc pertinent de limiter leur utilisation en adoptant une méthodologie analytique rigoureuse et maîtrisée dès les premières étapes de l'étude.

1.3.2.1. Préparation des échantillons

La préparation de l'échantillon avant analyse est une étape critique. Idéalement, elle doit être d'une part, la plus simple possible pour limiter les biais entre les échantillons lors de la préparation, et d'autre part conserver au maximum l'exhaustivité de l'échantillon afin d'obtenir une meilleure représentativité du métabolome étudié (ceci est particulièrement vrai dans le cadre d'une approche globale). Elle doit être adaptée à la nature de l'échantillon initial et à la technique d'analyse choisie comme schématisé Figure 10. Elle s'avère souvent

indispensable dans le cas de matrices complexes ou de métabolites ciblés en faible abondance : dans ce dernier cas, une étape de pré-concentration peut être mise en place. En chromatographie en phase gazeuse, l'injection liquide peut requérir une préparation simple (dilution) ou une préparation plus complexe selon la nature de l'échantillon. Dans certains cas, comme pour l'analyse des composés volatils des extraits au solvant (concrètes, absolues, résinoïdes), une technique d'extraction est nécessaire. L'espace de tête dynamique ou statique, couplé ou non, par exemple à la microextraction sur phase solide (HS-SPME), peut nécessiter une préparation simple : peser du produit pur, avec ajout d'un étalon interne.

Il en est de même pour la chromatographie en phase liquide. Une simple dilution peut être réalisée à condition de trouver le « bon » solvant qui assurera une bonne solubilisation de l'échantillon sans le contaminer (solvant de qualité adaptée), tout en restant compatible avec les équipements et les conditions analytiques utilisés (colonne, phase mobile, mode de détection...). Dans les cas des extraits naturels, un compromis est généralement à trouver dans la mesure où certains solvants ayant un fort pouvoir de solubilisation des extraits naturels (hexane, dichlorométhane etc.) sont prohibés pour certains instruments analytiques.

La partition liquide et la SPE sont deux modes de préparation d'échantillons sélectifs.

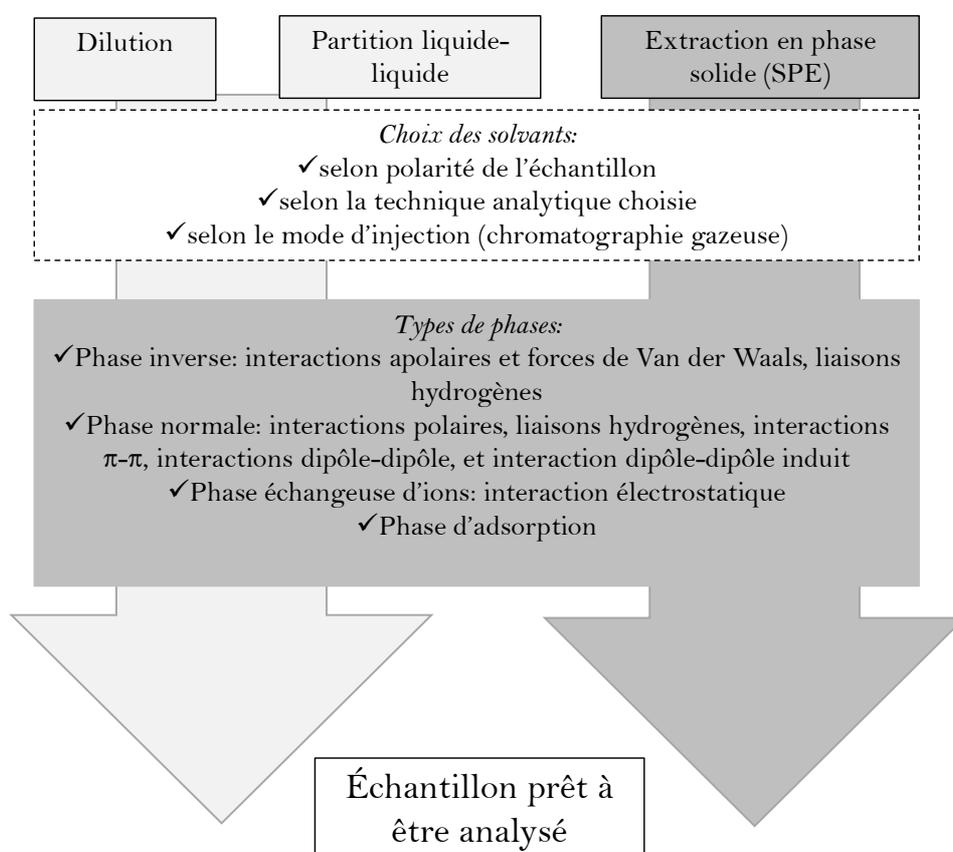


Figure 10: Techniques de préparation d'échantillons [41]

1.3.2.2. Techniques analytiques

1.3.2.2.1. Un large choix de techniques

Plusieurs techniques sont utilisées en métabolomique. La spectrométrie de masse (très souvent en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse ou en phase liquide) la RMN, et l'infrarouge sont les principales. La RMN, tient une place importante dans ce domaine scientifique : elle permet notamment une quantification absolue, l'analyse non destructive des échantillons avec une information structurale très riche [81] sans conditions d'analyses particulières mais avec une faible sensibilité et une limite de détection haute. La spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FT-IR) est une méthode rapide, robuste, reproductible, non destructive, qui peut être utilisée en amont pour un premier screening. Elle permet de détecter les différents groupes fonctionnels d'une molécule selon la vibration de ses liaisons suite à un rayonnement infra-rouge. L'avantage de cette méthode est d'être portable, miniaturisée, permettant des analyses *in situ*, dans des serres ou dans des champs [82]. La préparation de l'échantillon peut cependant poser des problèmes de répétabilité. Enfin, la spectrométrie de masse est principalement utilisée en couplage avec les techniques séparatives lors d'une étude métabolomique. La chromatographie en phase gazeuse est adaptée à l'analyse des composés volatils et semi-volatils, et la chromatographie en phase liquide à celle des composés peu ou pas volatils. Le retraitement d'analyses issues du couplage chromatographie/spectrométrie de masse permet la déconvolution de composés éluant simultanément. En couplage avec la chromatographie en phase gazeuse uniquement (GC/MS), il offre la possibilité d'une identification rapide des composés de par la disponibilité d'un grand nombre de bases de données [79].

L'ensemble de ces méthodes sont ainsi complémentaires et indispensables pour une étude métabolomique la plus exhaustive possible sur un échantillon donné. Le Tableau 10 récapitule les avantages et inconvénients de ces principales techniques.

Tableau 10: Avantages et inconvénients des techniques spectroscopiques et des couplages avec la spectrométrie de masse [14]

	Avantages	Inconvénients
RMN	<ul style="list-style-type: none"> -Non sélective -Elucidation structurale -Quantification -Reproductibilité -Préparation minimale des échantillons (pas de séparation préalable des analytes) -Non destructive -Temps d'acquisitions courts 	<ul style="list-style-type: none"> -Faible sensibilité -Volume d'échantillon nécessaire élevé (500 µL) -Coût élevé de l'appareillage -Complexité des spectres
Infrarouge	<ul style="list-style-type: none"> -Non sélective -Reproductible -Robuste -Méthode simple de mise en œuvre -Non destructive -Temps d'acquisition courts 	<ul style="list-style-type: none"> -Problème de répétabilité pour la préparation de l'échantillon -Identification des marqueurs complexe -Faible sensibilité
GC/MS	<ul style="list-style-type: none"> -Résolution chromatographique élevée -Reproductibilité -Sensibilité élevée -Disponibilité de nombreuses bases de données 	<ul style="list-style-type: none"> -Difficulté d'analyse des composés de poids moléculaires élevés et polaires, et des composés thermosensibles -Absence fréquente du pic moléculaire (en ionisation électronique)
LC/MS	<ul style="list-style-type: none"> -Permet l'analyse de très nombreux analytes, notamment les thermolabiles -Préparation de l'échantillon plus simple qu'en GC/MS -Reproductible dans des conditions parfaitement définies -Sensibilité élevée 	<ul style="list-style-type: none"> -Modèles de fragmentation faiblement reproductibles : pas de bases de données robustes -Ionisation différente selon la nature des composés -Production d'adduits

L'HRMS (spectrométrie de masse haute résolution) est de plus en plus répandue pour les études métabolomiques. Elle donne une mesure de la masse exacte de l'espèce moléculaire détectée, et permet d'accéder à l'ion moléculaire de l'analyte, sous forme protonée, déprotonée ou d'adduit (selon la source, le mode d'ionisation, etc.). Elle se caractérise également par sa sensibilité, très élevée (de l'ordre du ppb).

1.3.2.2.2. Le couplage UHPLC-HRMS

a) Comparaison des analyseurs haute résolution

La FT-ICR (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance), l'Orbitrap et le ToF (Time of Flight) sont les principaux analyseurs retrouvés dans la littérature pour la spectrométrie de masse haute résolution [79].

Dans un FT-ICR, les ions sont placés dans un champ magnétique qui leur impose un mouvement circulaire et dont la fréquence de rotation va dépendre du rapport masse sur charge de l'ion. Il présente une très haute résolution de masse, entre 200 et 1000 Da ($\frac{m}{\Delta m_{50\%}} = 300\,000$ à 9,4 T [83]), et une très bonne précision de mesure de la masse exacte (1-2 ppm). En revanche, le temps d'acquisition est long (les ions doivent rester confinés environ 1 s afin d'obtenir la fréquence avec la plus haute précision [83]), ce qui rend ainsi cette technique plus adaptée à une injection directe qu'à un couplage LC-MS.

Dans l'Orbitrap les ions ont une trajectoire elliptique autour de l'électrode centrale soumise à une tension élevée. Chaque population m/z se répartit pour former un anneau autour de l'électrode. Cet anneau subit alors une oscillation le long de l'axe de cette électrode. La période d'oscillation est proportionnelle à $(m/z)^{1/2}$. L'Orbitrap permet de faire de la MSⁿ (fragmentations successives). Sa résolution de masse est de 100 000 pour un ion $m/z = 400$, avec un temps d'acquisition de 1-1,5 s [84]. Il présente la même précision de mesure de masse que le FT-ICR.

L'analyseur à temps de vol (ToF) resterait néanmoins le plus adapté à une étude métabolomique sur des mélanges complexes tels les extraits naturels, qui nécessitent une séparation préalable de ses constituants par chromatographie. Sa vitesse d'acquisition (30 spectres par seconde) permet l'accumulation d'un grand nombre de données simultanées pour une très haute résolution des pics chromatographiques. La résolution de masse est de 22 500 pour un ion $m/z = 956$. L'exactitude est de 1 ppm [85].

Dans nos travaux, la fraction non volatile des extraits étudiés est analysée avec un couplage chromatographie liquide et spectrométrie de masse haute résolution de typeToFMS.

b) Le couplage UHPLC-ToFMS

L'UHPLC-ToFMS est un couplage entre la chromatographie liquide ultra haute performance et un spectromètre de masse haute résolution à temps de vol (Time of Flight).

i) La chromatographie liquide ultra haute performance : UHPLC

L'UHPLC se présente comme une évolution technologique de l'HPLC. Les particules poreuses des colonnes sont plus petites (1,7 μm) et augmentent ainsi l'efficacité de la séparation (avec une pression plus importante) et la résolution chromatographique (une largeur de pic à mi-hauteur de moins d'une seconde peut être obtenue [86]). La gamme de débits utilisable pour la même efficacité est plus large qu'en HPLC d'après l'équation de Van Deemter en mode isocratique (Équation 1 et Figure 11).

$$HEPT = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

Équation 1: Equation de Van Deemter

HEPT : Hauteur équivalente à un plateau théorique

u : vitesse linéaire

A : paramètre de diffusion turbulente

B : coefficient de diffusion longitudinale

C : coefficient de résistance au transfert de masse

Les temps d'analyse sont diminués par un facteur quatre au minimum lors de la transposition d'une méthode HPLC en UHPLC. Le décalage des temps de rétention est réduit. Les volumes d'injection sont plus faibles (divisés par 10) (Tableau 11, Figure 12 et Figure 12). L'utilisation de l'UHPLC minimiserait les effets matrices [81] : l'effet de suppression d'ions par compétition peut être diminué du fait de la meilleure séparation (résolution) des pics.

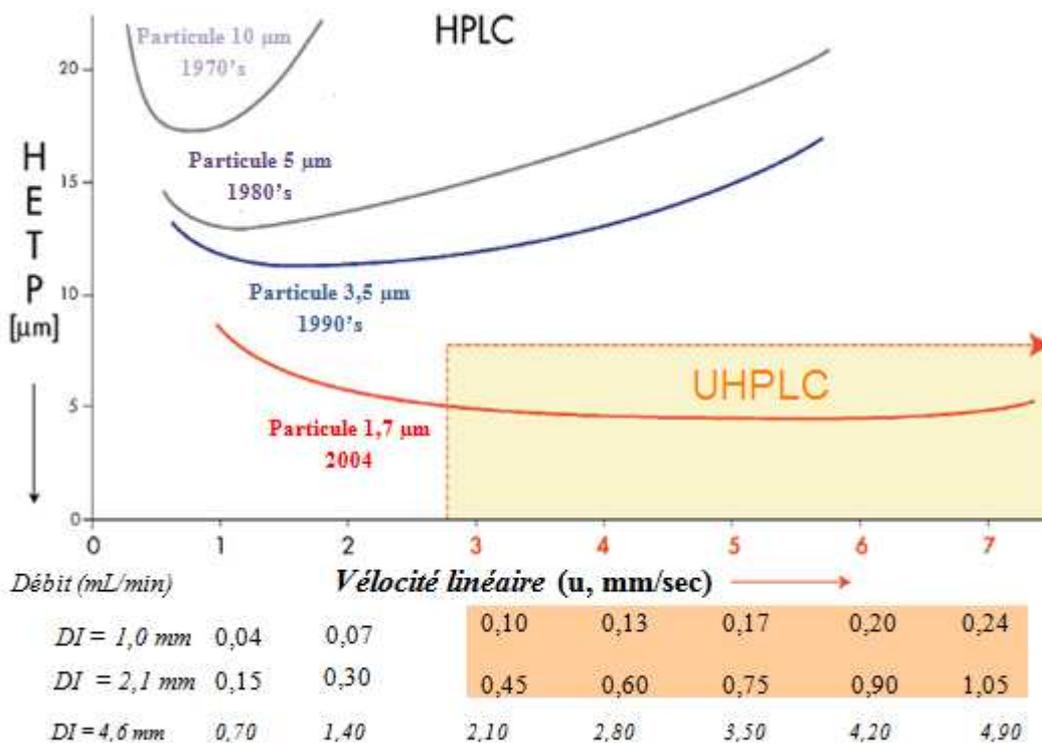


Figure 11: Courbe de Van Deemter pour HPLC et UHPLC [87]

Tableau 11: Evolution de la chromatographie liquide sur la gamme Waters avec l'exemple de l'analyse de la simvastatin [88]

	HPLC	UPLC®
Année d'introduction sur le marché	1970	2004
Colonnes	4,6 x 250 mm, 5 µm	2,1 x 100 mm, 1,7 µm
Débit d'analyse	1,5 mL/min	0,56 mL/min
Temps de rétention	9,3 min	1,4 min
Volume mort	900 µL	350 µL
Volume d'injection	10 µL	0,8 µL
Pression maximale	6 000 psi	15 000 psi

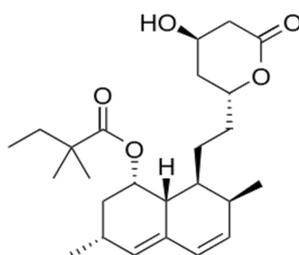


Figure 12: Simvastatin

L'analyseur couplé à l'UHPLC doit avoir une vitesse d'acquisition importante pour fournir suffisamment de points nécessaires à l'intégration la plus exacte du pic [86]. Le spectromètre de masse haute résolution à temps de vol présente cette caractéristique.

ii) Analyseur à temps de vol : Time of Flight (ToF)

Comme mentionné plus haut, l'intérêt d'un analyseur à temps de vol (ToF) est sa capacité à pouvoir fournir la mesure de la masse exacte d'un composé ionisé. Une ionisation peu énergétique (couramment dite « douce ») en amont est nécessaire pour identifier l'ion moléculaire du composé d'intérêt. Plusieurs sources d'ionisation permettent le couplage entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse. L'ionisation par électrospray est détaillée ci-après dans la mesure où ces travaux ont été réalisés avec cette source. D'autres types de sources d'ionisation (APCI, ionisation chimique à pression atmosphérique et APPI, photo-ionisation à pression atmosphérique) sont rapidement présentés en fin de paragraphe.

➤ *Source d'ionisation : l'électrospray*

Le principe d'ionisation par source électrospray repose sur le transfert d'analytes ionisés en phase liquide vers une phase aqueuse [89]. Les analytes répondant le mieux en électrospray sont ceux ayant des groupes fonctionnels polaires acides ou basiques.

Le processus d'ionisation peut être divisé en trois étapes : la formation d'une gouttelette, sa division, et la formation d'ions à l'état gazeux.

La source électrospray (Figure 13) est maintenue à haute température : entre 60 et 120 °C classiquement afin de réduire la formation d'amas de solvants dans cette zone. Cette température dépend à la fois du débit d'arrivée de l'effluent dans la source mais aussi de la nature de l'analyte (pouvant être dégradé à température trop élevée, ou bien fragmenté). Les analytes et l'effluent entrent dans la source à travers un capillaire métallique soumis à un fort potentiel positif (de 0,5 à 3,2 kV) ou négatif (de 0,5 à 2,6 kV). Ils ressortent du capillaire dans le « cône de Taylor » (cône formé par un liquide électroconducteur sous l'effet d'un champ électrique). Lorsque les gouttelettes à l'extrémité du capillaire atteignent la limite de Rayleigh, point auquel la répulsion coulombienne de la charge de surface est égale à la tension superficielle de la goutte, un spray de gouttelettes fortement chargé est libéré [90]. Un flux de gaz (N₂) coaxial au capillaire améliore la nébulisation, le solvant s'évapore progressivement des gouttelettes chargées (300 à 1000 L/h chauffé à 150-650 °C) produisant ainsi des gouttelettes de plus en plus fines. Les analytes chargés sont peu à peu libérés et transférés vers l'analyseur à travers un cône d'échantillonnage soumis à un potentiel compris

entre 25 et 100 V (à optimiser pour limiter les fragmentations) mais aussi à un flux d'azote permettant de limiter la formation de clusters à l'entrée de l'analyseur. Un cône d'extraction soumis à un potentiel de 1 à 5 V permet ensuite de focaliser les ions vers l'hexapôle servant de guide d'ions vers l'analyseur. La source est maintenue à pression atmosphérique : un gradient de pression et de potentiel permettent le transfert des ions de la source vers l'analyseur puis le détecteur. Du fait de la très forte réactivité de ces espèces et de leur durée de vie très courte, l'analyseur est soumis à un vide très important (10^{-3} torr à 10^{-6} torr). [91,92]

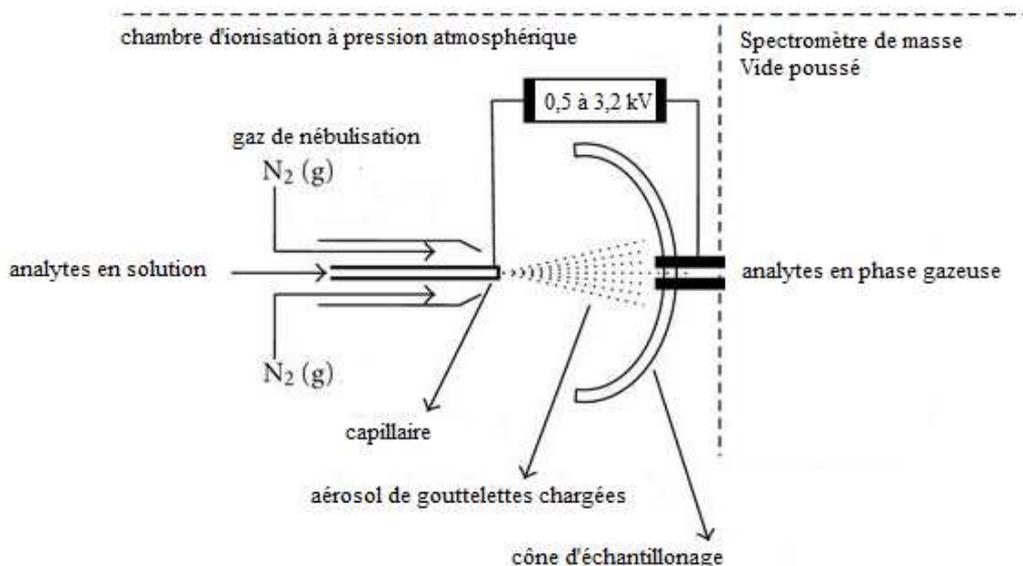


Figure 13: Source électrospray [91]

L'ionisation par électrospray forme principalement des ions $[M+H]^+$ ou $[M+\text{adduit}]^+$ en mode positif, et $[M-H]^-$ en mode négatif.

Plusieurs phénomènes expliquent les limites de ce type d'ionisation [79] :

1) La suppression d'ions due à des co-élutions : selon une hypothèse répandue, la matrice co-éluee aux analytes étudiés peut influencer l'intensité du signal du fait d'une compétition pour les charges disponibles et pour l'accès aux surfaces des gouttes entre l'analyte et les composés de la matrice lors de l'émission en phase gazeuse. Les mécanismes de suppression en phase liquide semblent être prépondérants sur les mécanismes survenant en phase gazeuse [93].

A forte concentration en analytes ($>10^{-5}$ M), la linéarité de la réponse ESI est souvent perdue. Cette perte peut être due à une quantité limitée de charges en excès disponibles sur les gouttelettes ou à la saturation des gouttelettes avec l'analyte à leurs surfaces et ainsi empêcher l'éjection d'un ion piégé dans les gouttelettes.

La présence de composés interférents à forte concentration peut augmenter la viscosité et la tension de surface des gouttelettes pour changer l'efficacité de leur formation et de leur

évaporation, qui ainsi, affecte la quantité d'ions chargés dans la phase gazeuse qui atteint l'analyseur.

Les additifs non volatils comme le sulfate d'ammonium peuvent être responsables de la suppression du signal par la formation de particules d'inclusion d'analytes solides.

Les composés de la matrice ou les additifs de la phase mobile peuvent agir comme des ions pouvant se lier aux analytes ionisés pré-formés (adduits).

Plusieurs types d'actions peuvent alors être mis en place : la préparation d'échantillons (qui peut induire la perte d'analytes) et des séparations chromatographiques plus efficaces (qui peuvent augmenter les temps d'analyse considérablement) [93].

2) L'absence de protonation totale du fait de la disposition spatiale des atomes présentant une paire d'électrons libres : leur conformation peut provoquer des préférences de coordination pour de nombreux adduits comme cela peut se produire dans certains polyethers naturels ; ceux-ci peuvent aussi montrer une conformation presque cyclique dans laquelle des éléments tels que le sodium peuvent se coordonner avec les atomes d'oxygènes des anneaux type THF (Figure 14).

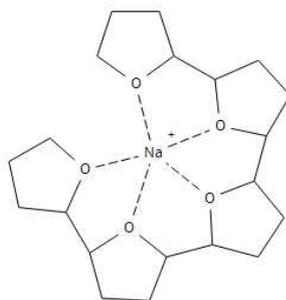


Figure 14: Coordination entre une structure polyéther et un atome de sodium

3) La possibilité de former des radicaux cations par la perte d'un électron en mode positif et la formation de radicaux anions par la capture d'un électron en mode négatif. Des études montrent qu'une source ESI peut provoquer la formation d'espèces oxydées ou réduites, surtout sur les composés de faible poids moléculaire (alcaloïdes, quinones, caroténoïdes..). Ce phénomène peut alors conduire à de mauvaises interprétations car cela mènerait à la formation d'ions moléculaires (radicaux cations) au lieu de $[M+H]^+$ ou $[M+Na]^+$; et ainsi une espèce avec un nombre impair d'électrons au lieu de pair.

4) Les espèces anioniques sont plus réactives que les cationiques et peuvent donc conduire à des réactions additionnelles avec le solvant, notamment à une extension de chaîne par la formation de liaisons carbone/carbone.

L'électrospray est le type de source d'ionisation le plus utilisé dans les études métabolomiques. D'autres types de sources sont aussi utilisés en couplage avec la chromatographie en phase liquide, par exemple :

- L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) est une autre alternative d'ionisation pour les couplages en chromatographie liquide [94]. Une décharge corona provoque l'ionisation de composés à l'état gazeux à pression atmosphérique. Les molécules d'éluant, en large excès, étant les premières ionisées, elles provoquent ensuite l'ionisation des analytes. Ce mode d'ionisation est à différencier de l'électrospray où l'ionisation se produit lorsque les composés sont encore à l'état liquide. En mode APCI, il est ainsi possible de travailler avec des phases mobiles apolaires du fait que l'ionisation s'établisse en phase gazeuse. Il y a moins de risques d'interférences avec l'APCI qu'avec l'ESI. Les gammes de débits optimales des phases mobiles pour ces deux sources sont également différentes : de l'ordre de 1 mL/min pour l'APCI, et de 0,02 mL/min pour l'ESI [95]. L'APCI a un intérêt particulier pour l'analyse des composés moins polaires et avec des poids moléculaires plus faibles que ceux analysables en ESI [94].

- La photoionisation à pression atmosphérique [93] est un troisième mode d'ionisation. L'ionisation des analytes en phase gazeuse est induite par une lampe au krypton émettant des photons à haut niveau d'énergie (10 et 10,6 eV) [96] tout en minimisant l'ionisation de l'air et des molécules des éluants. Cette source permet l'ionisation de composés non ionisables avec d'autres sources à pression atmosphérique (surtout en analyse environnementale avec par exemple les HAPs) [95].

➤ *Configuration et principe de l'analyseur à temps de vol*

Le principe de base d'un analyseur à temps de vol est simple (Figure 15). Les ions sont formés par la source électrospray : ceux possédant la même énergie cinétique traversent simultanément une région sans champs électrique ou magnétique appelée tube de vol. Le temps de parcours de l'ion jusqu'au détecteur est proportionnel à la racine carrée du rapport masse/charge. [38,97]

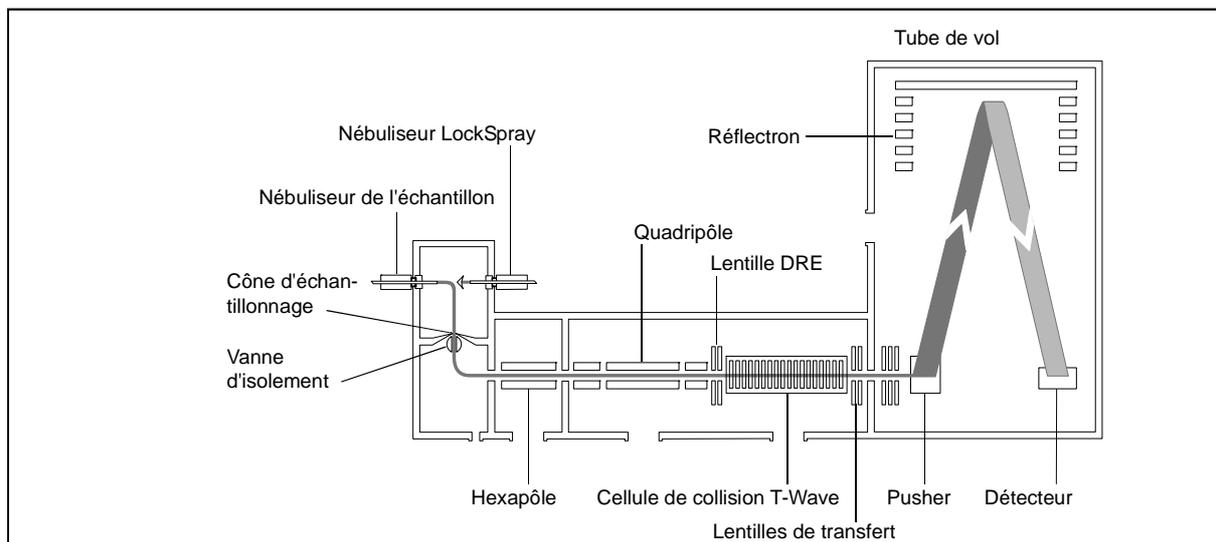


Figure 15: Configuration de l'analyseur à temps de vol XEVO G2 QToF Waters

En sortie de source, les ions sont focalisés par un hexapôle et entrent dans le quadripôle. Les ions sélectionnés pénètrent ensuite dans la cellule de collision (T-WaveTM) et peuvent subir une dissociation induite par collision (CID). Si aucune énergie de collision n'est induite, l'ensemble « hexapôle, quadripôle et T-Wave » sert seulement à acheminer les ions jusqu'au tube de vol de longueur L (de l'ordre du mètre).

Une impulsion est indispensable à une séparation par temps de vol (de l'ordre de la nanoseconde) pour avoir une bonne résolution. Les ions (même m/z) doivent avoir un même point de départ et être ainsi regroupés sur une faible largeur spatiale et temporelle.

Les ions (masse m et charge z) sont accélérés par une différence de potentiel V et acquièrent une énergie cinétique : $(1/2) m v^2 = zV$. Leur vitesse de déplacement v est considérée constante. Mais un temps t' et une longueur l (de l'ordre du millimètre) du tube sont nécessaires à l'accélération (impulsion) des ions par le potentiel V . Ainsi le temps de vol total de l'ion est donné par l'équation suivante :

$$t = (L + 2l) \left[\frac{m}{2 \cdot zV} \right]^{1/2}$$

Équation 2: Temps de vol de l'ion

La dispersion en énergie cinétique initiale de ces ions doit aussi être la plus faible possible. Pour cela, un tube de vol muni d'un réflecteur électrostatique permet de corriger l'effet de dispersion énergétique initiale des ions. Ce réflecteur a un rôle de miroir : un ensemble d'électrodes applique un champ électrostatique s'opposant à la pénétration des ions. Les ions de plus forte énergie pénètrent plus profondément dans le réflecteur et parcourent

ainsi un trajet plus long que les ions moins énergétiques. Les ions de même m/z peuvent ainsi être ensuite « réfléchis » simultanément vers le détecteur, garantissant ainsi une très haute résolution. Des ions de m/z différents atteignent le détecteur à des instants différents, permettant ainsi la constitution d'un spectre de masse. L'analyse par temps de vol, contrairement au quadripôle, n'effectue aucun balayage de masses. Ainsi, grâce à une très bonne transmission de l'analyseur, tous les ions produits par la source peuvent être détectés et offrir une très bonne sensibilité.

1.3.2.3. Une approche évolutive

Des études comparatives d'analyses en chromatographie gazeuse, liquide ou encore en RMN ont déjà été réalisées avant l'introduction du terme métabolomique [98-102]. Le retraitement se faisait alors essentiellement manuellement, sur des jeux de données plus faibles. Aujourd'hui, des outils facilitent le retraitement des données et la méthodologie nécessaire à la bonne conduite d'une étude métabolomique s'est développée. De nombreux outils d'extraction des données ainsi que de retraitement et d'interprétation ont vu le jour, notamment par des interfaces gratuites et accessibles (XC-MS [103], MetAlign [104]). D'autres techniques analytiques de pointes telles que la GC [105] ou la LC [106] en deux dimensions, ainsi que la SFCxGC [107] peuvent aussi être appréhendées pour des études métabolomiques. Cependant la grande complexité d'utilisation des logiciels de retraitement et de l'interprétation des données rend leur développement plus difficile.

Des approches multi-blocs sont réalisées. Elles permettent d'évaluer des données d'entrée de natures différentes dans un même modèle. Elles font appel à des interfaces statistiques récemment développées. Elles permettent d'élargir la gamme de métabolites étudiée grâce à l'association de données acquises avec différentes techniques analytiques : RMN, Infrarouge, UHPLC-TofMS et GC-MS par exemple [62].

1.3.3. Traitements statistiques

Quatre étapes sont indispensables à la bonne conduite d'une étude métabolomique : la préparation d'échantillon, l'analyse chimique, l'extraction des données et enfin les traitements statistiques et leur interprétation. La préparation d'échantillon pour l'analyse des absolues n'a pas été développée dans ces travaux : une simple dilution de l'échantillon ayant été mise en place. L'analyse a été traitée dans la partie précédente et l'extraction des données est expliquée dans le Chapitre 3. Ce paragraphe permet d'introduire la théorie des modèles statistiques employés tout au long de ces travaux.

Il existe deux approches : les analyses non supervisées, qui observent la variabilité générale des données, et les analyses supervisées qui permettent d'étudier les relations entre des variables prédictives et des variables dépendantes. Ces deux approches sont utilisées pour des objectifs différents. La première va être utilisée dans le cadre d'une analyse globale des données brutes, tandis que la seconde va être utilisée après retraitement et normalisation des données, dans la recherche de modèles prédictifs conduisant à la mise en évidence de marqueurs.

1.3.3.1. Analyses non supervisées

- 1) L'ACP (Analyse en Composantes Principales) est le premier modèle statistique mis en œuvre afin d'observer la variabilité générale des données. Il peut mettre en valeur des tendances ou des comportements inhabituels (Figure 16).

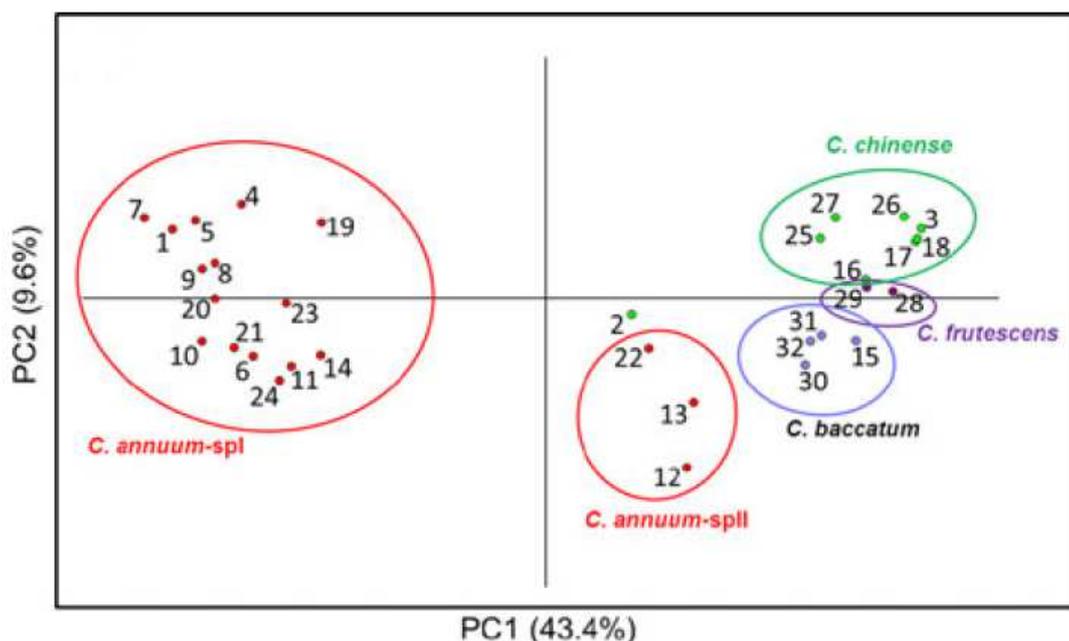


Figure 16: Analyse en composantes principales : étude de quatre espèces de piment [108]

Prenons l'exemple simplifié d'un échantillon défini par 3 variables (soit 3 ions dans le cas particulier de cette étude, définis chacun par leur temps de rétention et leur rapport m/z). Un repère à 3 dimensions est tracé (Figure 17), chaque dimension correspondant à une des 3 variables. La position de l'échantillon dans le repère est alors déterminée par l'intensité de ces 3 ions dans l'échantillon.

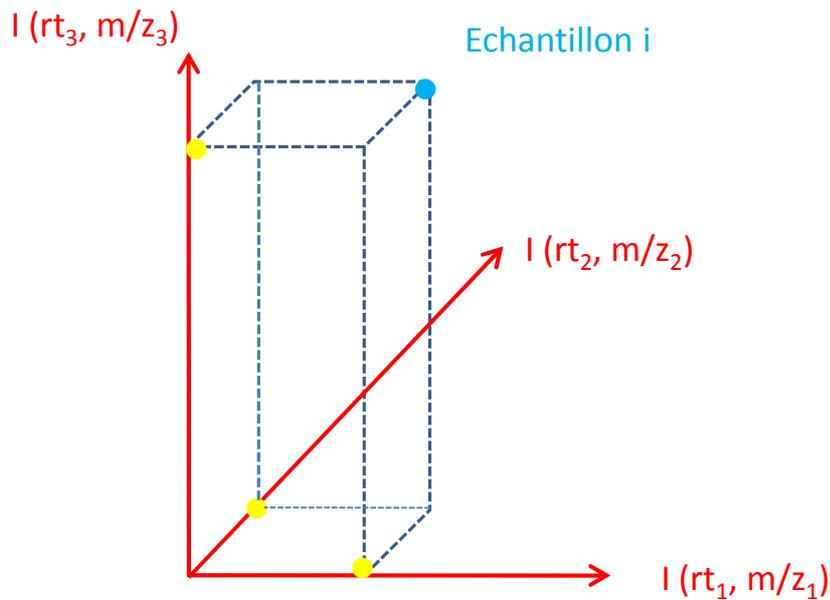


Figure 17: Repère à 3 variables

Un nuage de points se dessine lorsque la position de chaque échantillon est définie. Le centre géométrique de ce nuage devient alors l'origine du nouveau repère. Des composantes principales (CP) sont ensuite tracées : elles décrivent le maximum de la variance du nuage de points. Les points appelés « scores » sont les échantillons dans le nouveau repère centré. La valeur appelée « t_{i1} » pour l'échantillon i ; est la distance à l'origine de la projection du point i sur la première composante CP1. CP2 est tracée de la même manière, en étant orthogonale à CP1, et la valeur « t_{i2} » est donnée pour l'échantillon i . Un nouveau repère apparaît alors avec les axes en composantes principales (Figure 18). Les projections des échantillons sur ces nouveaux axes deviennent alors les coordonnées de l'échantillon dans le nouveau repère. Ces nouveaux points sont alors définis comme des « scores plot » ayant pour coordonnées $[t_{i1}, t_{i2}, \dots]$.

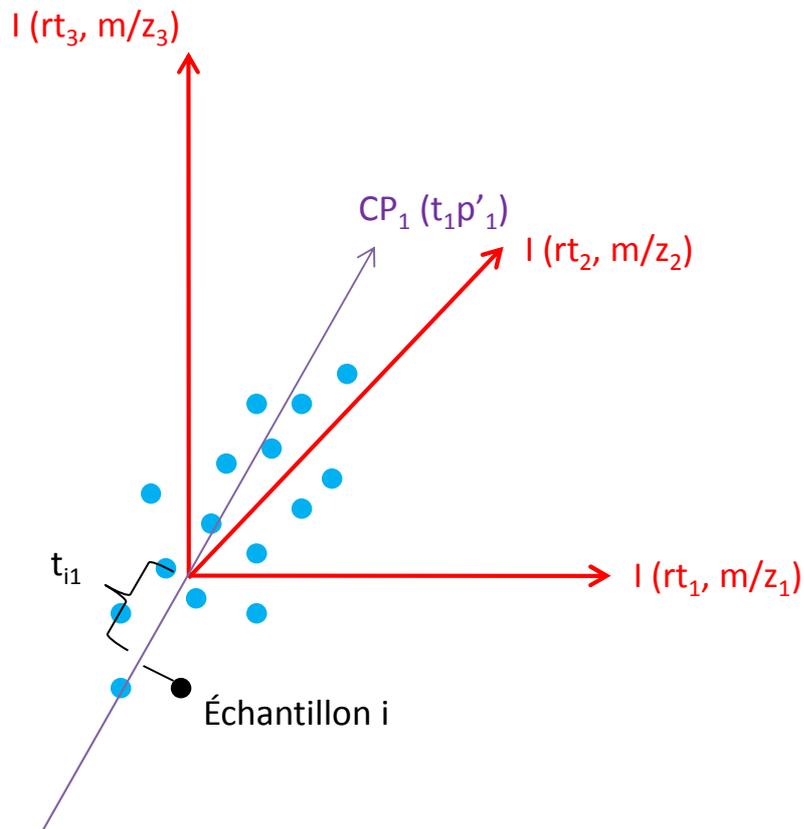


Figure 18: Scores plot : Centrage du repère et nouveaux axes avec les composantes principales

Le « loadings plot » (Figure 19) décrit ensuite l'importance des variables originelles selon les composantes principales. Les coordonnées du loadings plot sont obtenues par le cosinus de l'angle entre la variable originelle et la composante principale.

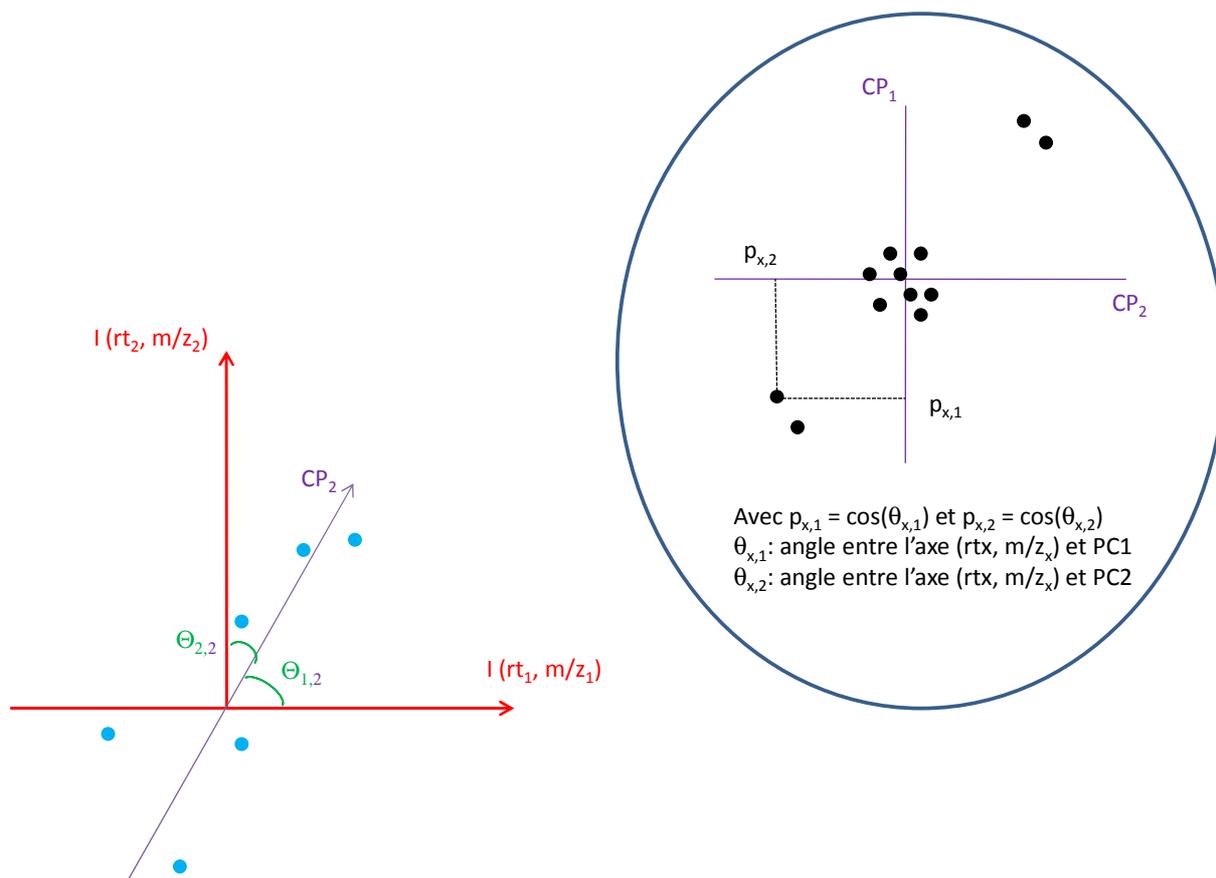


Figure 19: Définition des loadings plot

Dans un cas réel, les échantillons sont constitués de K ions, la représentation se fait alors dans K dimensions. [109,110]

La combinaison du « Scores Plot » et du « Loadings Plot » indique les variables responsables des déviations.

R^2 correspond au coefficient « explicatif » de la composante principale (aussi appelé coefficient de corrélation). Il s'agit du rapport de la variance de l'information modélisée sur la variance de l'information totale (ou réelle).

Il est important de noter qu'avec un très grand nombre de variables (d'ions dans notre cas) et peu de groupes, R^2 aura toujours une valeur correcte, alors que le modèle présentant le meilleur R^2 n'est pas obligatoirement le meilleur modèle. Il est alors intéressant de passer au type d'analyse en mode supervisé : PLS (Partial Least Square – régression des moindres carrés partiels), décrit plus loin.

2) La Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) est une autre méthode d'analyse non supervisée. Elle se base sur un critère de distance (distance euclidienne par exemple) : en début d'analyse, il y a autant de groupes que d'observations. Puis les

groupes les plus proches sont fusionnés, jusqu'à ce qu'il n'en reste qu'un seul. La CAH est alors représentée sous la forme d'un dendrogramme (Figure 20). [110]

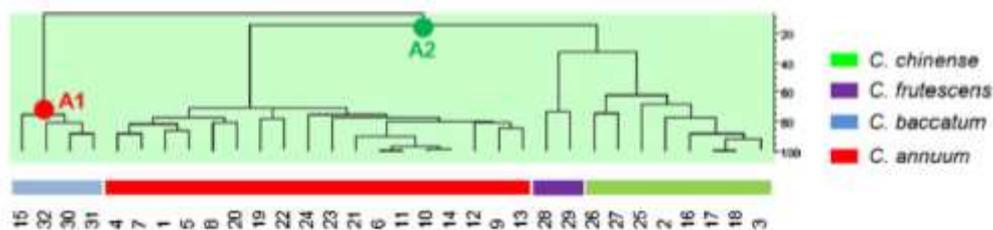


Figure 20: Classification Ascendante Hiérarchique, étude de quatre espèces de piment [108]

1.3.3.2. Analyses supervisées type PLS (Partial Least Square – Régression des moindres carrés partiels)

La PLS est une analyse supervisée basée sur les régressions linéaires. Elle est utilisée dans les situations présentant un grand nombre de données d'entrées, qui sont souvent corrélées. Ce modèle recherche la relation entre des variables prédictives (X) et des variables dépendantes (Y). Y peut être constituée de variables quantitatives ou qualitatives. Lorsqu'il s'agit de variables qualitatives, on se retrouvera dans un cas de PLS-DA (Y est alors une matrice numérique binaire –contenant seulement des 0 et des 1).

Ce modèle cherche à trouver une direction multidimensionnelle dans l'espace X qui explique la direction du maximum de la variance multidimensionnelle dans l'espace Y. Dans ce modèle, on s'intéresse à deux paramètres : R^2Y et Q^2 (R^2X correspondant à la définition du R^2 de l'ACP). Les valeurs de ces deux paramètres doivent être proches de 1 ; Q^2 étant toujours plus petit que R^2Y . Q^2 représente l'erreur de prédiction alors que R^2Y explique l'appartenance aux différentes classes (valeurs de Y). Avec $R^2Y > 0,5$ et $Q^2 > 0,5$, on peut considérer que le modèle est bon.

Le calcul de Q^2 se fait par le biais de validations croisées : 1/7 des données sont utilisées pour cette validation (elle est automatique dans SIMCA-P ; et est réalisée en boucle sur la totalité des données). Un test de permutation doit aussi être mis en œuvre : les échantillons sont réaffectés à des groupes au hasard. La dernière étape consiste à utiliser un ou plusieurs échantillons non utilisés précédemment afin de valider le modèle. [109,110]

La PLS-DA (Partial Least Square Discriminal Analysis) est une variante de la PLS. Il s'agit du modèle adapté à notre cas d'étude car notre matrice Y est une matrice qualitative : constituée de noms de groupes [111]. Le principe reste le même.

1.3.3.3. Prétraitement des données

Plusieurs types de prétraitement des données peuvent être appliqués avant le lancement du calcul du modèle. La normalisation UV (Unit Variance) est le paramétrage utilisé par défaut dans chaque modèle. Avec « y_i », intensité de l'ion i , « y_{imoy} » l'intensité moyenne des ions i dans l'ensemble des échantillons, σ_i l'écart type des ions i dans l'ensemble des échantillons [109] :

- UV : centrage réduction $\frac{(y_i - y_{imoy})}{\sigma_i}$ permet de donner le même poids aux ions. L'inconvénient majeur de ce prétraitement est de donner le même poids aux ions d'intérêts et au bruit. Ce mode de traitement peut être intéressant lorsqu'on traite des variables qui ont des unités différentes.
- Logarithme : il se rapproche de l'UV, le bruit reprend un peu de poids.
- Centrage : donne du poids aux ions intenses ($y_i - y_{imoy}$) ainsi, les ions ayant une faible amplitude n'ont aucune influence sur la construction du modèle.
- Pareto : $\frac{(y_i - y_{imoy})}{\sqrt{\sigma_i}}$, il s'agit d'un bon compromis entre le centrage et l'UV. Les régions des moyennes amplitudes ont plus de chance d'influer sur le modèle (mais seulement si elles représentent une variation systématique).

Les deux modes précédents, centrage et Pareto, sont les plus employés pour le traitement de données spectrales.

Lors d'une étude métabolomique, il peut être intéressant d'étudier l'évolution de R^2Y et Q^2 selon le mode de prétraitement des données.

1.3.4. Applications aux plantes et à leurs extraits

La métabolomique est un outil de choix pour répondre à des questions importantes dans le cas des extraits naturels : origines géographiques, espèces botaniques et pour l'étude de l'impact climatique et saisonnier. Ces différents points rejoignent la notion d'authentification nous préoccupant dans ces travaux.

Nous nous sommes particulièrement intéressés à neuf études réalisées entre 2008 et 2014 sur différentes matrices (Tableau 12) : plantes médicinales (Panax), fruits (pomme, pêche, orange), thés (thé noir), épices (poivre), plante à parfum (iris) et huiles essentielles (curcuma, citron). Ces études avaient pour objectif la mise en évidence d'origines géographiques ou d'espèces botaniques, par l'analyse des composés volatils et/ou non volatils.

- Etude de cinq variétés de Panax [112]
- Etude des composés volatils des extraits de quatre variétés de pommes cultivées en Italie [113]
- Etude de marqueurs d'authentification d'oranges de Valence [114]
- Etude des composés volatils de cultivars de pêches [115]
- Discrimination entre des thés noirs de grande qualité et de première qualité [116]
- Etude de quatre espèces de piment (*Capsicum*) [108]
- Mise en évidence de marqueurs de variété de curcuma dans des huiles essentielles [117]
- Etude de l'origine de production et des procédés d'extraction de l'huile essentielle de citron [62]
- Etude sur l'authentification géographique et botanique des rhizomes d'iris [118].

Nous nous sommes particulièrement intéressés aux aspects méthodologiques de ces travaux. Les résultats spécifiques de ces études ne sont pas reportés dans ce paragraphe.

Le premier critère important pour ce type de travaux est la collecte d'échantillons, et la certification de leur nature. Pratiquement l'ensemble des échantillons utilisés pour ces études sont d'une origine contrôlée : soit l'origine est certifiée par un spécialiste, ou par des analyses génotypiques, soit les échantillons sont récoltés localement par les auteurs. En provenance d'une industrie ou d'un marché, même local, l'origine est tout de même à prendre avec précaution.

Le nombre d'échantillons de chaque origine, géographique ou botanique, doit être suffisamment conséquent pour proposer une variabilité biologique représentative du groupe. Les études portant sur le Panax et le thé noir peuvent être critiquables sur cet aspect.

Les matrices fraîches ont toutes bénéficié d'une préparation d'échantillon spécifique. Seule l'étude sur l'huile essentielle de citron a permis de travailler sur l'échantillon de base (l'approvisionnement ayant été organisé directement sur l'huile essentielle).

La construction de la séquence d'analyse n'est pas systématiquement décrite. Le protocole peut être très simple : analyse en duplicat ou triplicat des échantillons répartis de façon aléatoire dans la séquence, ou plus élaboré, avec le conditionnement du système par 10 injections d'un échantillon pool (mélange de l'ensemble des échantillons du set d'analyse),

ainsi que l'injection d'un échantillon pool toutes les 5 analyses pour une étude en LC. L'ajout d'un étalon interne pour les analyses HS-SPME-GC/MS est classiquement utilisé afin de corriger les données avant l'utilisation des statistiques.

L'UHPLC-ToFMS reste la technique la plus couramment employée pour l'analyse des composés non volatils, et la HS-SPME-GC/MS pour l'analyse des composés volatils. Dans le cas de l'UHPLC-ToFMS, l'electrospray en mode positif est souvent présenté comme le mode fournissant le plus grand nombre d'informations. Cette constatation est tout de même à prendre avec prudence du fait du nombre d'adduits conséquents pouvant se former dans ce mode.

Pour l'UHPLC-ToFMS et la GC-ToFMS, les logiciels d'extraction des données sont nombreux (Markerlynx, XC-MS, MetAlign par exemple). Dans le cas de la HS-SPME-GC/MS (l'analyseur simple quadrupole étant le plus fréquent), les données sont généralement traitées dans un premier temps manuellement (aires des pics corrigées avec l'étalon interne, puis calcul de l'abondance relative) ; avant d'être simulées dans les logiciels statistiques.

L'ACP et la CAH sont les modèles statistiques non supervisés les plus couramment utilisés pour une première observation des données. Ils ne proposent pas toujours des résultats directement interprétables. Lorsque c'est le cas, les variables sont très discriminantes. Les modèles supervisés PLS-DA et l'OPLS-DA (Régression Partielle des Moindres Carrés Orthogonale en Analyse Discriminante) interviennent presque toujours dans un second temps. Ils permettent de mettre en évidence les variables responsables de la discrimination des origines ; mais aussi d'intégrer une notion de validation des résultats. La validation des modèles n'est pas abordée dans chaque publication. Elle reste fragile avec dans le meilleur des cas la validation croisée (valeur du Q^2), mais est renforcée dans certaines études avec la notion des tests de permutation.

Tableau 12: Synthèse bibliographique de 9 études métabolomiques sur les origines géographiques et botaniques

Matrice	Certification des échantillons	Nombre d'échantillons	Préparation d'échantillon	Construction séquence analytique	Technique analytique	Logiciel extraction des données / normalisation	Outils statistiques	Validation des modèles
Panax [112]	Certifiées par un docteur en pharmacognosie.	5 variétés, cultivées en Chine et en dehors : 2 extractions par plante.	Racines séchées réduites en poudre et extraites au méthanol/eau (50/50).	Test de la reproductibilité du système analytique (6 injections de standards, échantillons injectés 3 fois).	UHPLC-TofMS (ESI+ et ESI-) Plus d'informations en ESI+.	Markerlynx 4.1 / Pareto	ACP PLS-DA (SIMCA-P)	Validation croisée (k-fold cross validation) (Q ²)
Pomme [113]	Achetées dans un marché local à Trento en Italie.	40 échantillons de 4 variétés différentes (10 de chaque).	Dés de pommes, eau, chlorure de sodium, acide ascorbique, acide citrique.	1 séquence d'analyse, ordre aléatoire. Etude de la variabilité au cours d'une journée, et sur plusieurs jours avec un échantillon aliquoté dans plusieurs vials	HS-SPME-GC/ToFMS	Markerlynx 4.1 / UV et log	ACP PLS-DA (SIMCA-P)	Validation croisée (k-fold cross validation) (Q ²) et tests de permutation
Pêche [115]	Récoltées dans le verger, seule une variété obtenue par un producteur local.	4 cultivars de pêches d'Espagne. Entre 17 et 23 échantillons par cultivar.	Pulpe écrasée, solution aqueuse de chlorure de sodium.	Une solution de standards est injectée toutes les 6 analyses ; ce qui a conduit à l'utilisation de 5 fibres pour l'ensemble de l'étude.	HS-SPME-GC/MS	Normalisation des aires de pics par l'étalon interne, puis mesure de l'abondance relative par rapport à l'aire totale	ACP (Unscrambler 9.1) Analyse en composantes discriminantes canoniques (SPSS 13.0)	Modèles validés par la méthode « leave one out ».
Orange [114]	Obtenues par un industriel de Valence.	42 échantillons (6 oranges pour chaque), dont 24 de Valence (variété de Valence et 3 autres variétés), et 18 d'Argentine, Brésil, Afrique du Sud (variété de Valence).	Fruit extrait par un mélange méthanol/eau (50/50).	10 injections de pool (mélange de l'ensemble des échantillons du set d'analyse) en début de série puis 1 pool toutes les 5 analyses. Ordre aléatoire. / Pas d'injection de pools dans la 2ème étude après avoir démontré que le système ne saturait pas dans la 1ère.	UHPLC-TofMS (ESI+ et ESI-) Les marqueurs relevés en ESI- sont moins pertinents.	XC-MS / Normalisation considérée inutile dans cette étude	PLS-DA OPLS-DA (SIMCA-P)	Validation croisée (k-fold cross validation) (Q ²)
Thé noir [116]	Echantillons commerciaux.	1 échantillon de basse qualité, 3 échantillons de grande qualité.	Infusion de thé.	Analyses dupliquées.	UHPLC-TofMS (ESI+ et ESI-)	Markerlynx XS / Pas d'information	ACP PLS-DA (Markerlynx XS)	Pas mentionné.
Curcuma [117]	Certifiées par un professeur de l'école des sciences pharmaceutiques.	62 échantillons de 3 espèces botaniques (43 échantillons authentiques – de leur provenance originelle), 14 commerciaux, 5 d'introduction (espèces cultivées au même endroit).	Rhizomes frais, bouillis, séchés, puis réduits en poudre, distillés : huile essentielle.	Pas mentionné.	GC-MS	Extraction manuelle. Normalisation par abondance relative.	ACP PLS-DA (MATLAB 6.5)	Pas mentionné.
Piment [108]	Analyses génotypiques qui confirment les 4 variétés.	32 échantillons de 4 espèces (avec 2 réplicats biologiques)	Feuilles et péricarpes du fruit gelés à l'azote liquide, broyés, conservés à -18°C. Extraits au méthanol acidifié pour les non volatils. Ajout d'une solution aqueuse EDTA-NaOH à l'échantillon broyé	Echantillons pools injectés tous les 16 échantillons pour la LC, et tous les 5 échantillons pour la GC.	LC-QToFMS (ESI-) SPME-HS-GC/MS	MetAlign / Log2, moyenne centrée	ACP CAH (MSClust)	Pas mentionné.

			après incubation dans un bain d'eau ; et ajout de CaCl ₂ .					
Huile essentielle de citron [62]	Fournis par différents industriels.	64 échantillons dont 13 d'Argentine, 5 d'Espagne, et 46 d'Italie, qui sont issus des 4 procédés d'extraction – mix de cultivars pour chaque origine.	4 procédés d'extraction différents : BOE (Brown Oil Extractor), Sfumatrice, Pelatrice, FMC.	Pas mentionné.	UHPLC-TofMS (ESI+ et ESI-) Plus d'informations avec ESI+. 1H-RMN FT-MIR GC-FID/MS	Markerlynx 4.1 / UV et Pareto	ACP CAH OPLS-DA (SIMCA-P)	Validation croisée (k-fold cross validation) (Q ²)
Rhizomes d'iris [118]	Echantillons certifiés par une société de fabrication d'ingrédients naturels.	24 échantillons dont 3 <i>Iris germanica</i> du Maroc, 4 <i>Iris albicans</i> du Maroc, 3 <i>Iris pallida</i> du Maroc, 7 <i>Iris pallida</i> de Chine, 5 <i>Iris pallida</i> d'Italie, 2 échantillons inconnus	Echantillons broyés et extraits dans un système Soxtec au méthanol/dichlorométhane (70/30), à la température d'ébullition.	Tous les échantillons analysés dans la même séquence, avec l'injection d'un échantillon référence toutes les 10 injections	UHPLC-TofMS (ESI+ et ESI-)	Markerlynx / Pareto	ACP, PLS-DA, OPLS-DA (Markerlynx)	« Leave one out method », calcul de la sensibilité et de la spécificité (validation de l'OPLS-DA)

Les études portant sur l'impact climatique et saisonnier, non présentées dans le tableau précédent sont aussi très représentées dans la littérature. Les conditions environnementales ont aussi été évaluées comme l'expose l'étude sur les réponses au stress de l'eau chez deux espèces d'Eucalyptus [119]. 30 à 40 % des métabolites mis en évidence chez l'*E. dumosa* ont été affectés contre 10 à 15 % chez l'*E. pauciflora*. Même au sein de ces deux espèces, les métabolites communs n'avaient pas tous la même réponse face au stress de l'eau. Une autre étude fait état des modifications métaboliques subies par des cultures de thé selon si l'exposition était ou non ombragée, ainsi que selon les saisons [120]. Des fruits de Ligustrum (arbuste de la famille des Oleaceae) montrent des effets de variations saisonnières sur leur profil métabolique [121]. Enfin, des études sont aussi conduites afin de mettre en évidence l'utilisation de procédés d'extraction spécifiques, telle que le montre l'étude sur des huiles essentielles de citron, déjà citée précédemment [62].

Ce dernier paragraphe témoigne ainsi l'importance d'avoir une connaissance poussée des échantillons récoltés, le moindre facteur externe, autre que l'origine géographique ou botanique pouvant impacter les profils de métabolites.

A ce jour, aucune étude ne porte sur les extraits aux solvants volatils (type hexane) d'ingrédients naturels spécifiques au secteur de la parfumerie.

1.3.5. Chronologie d'une étude métabolomique

Les principales étapes d'une étude métabolomique sont présentées dans la Figure 21.

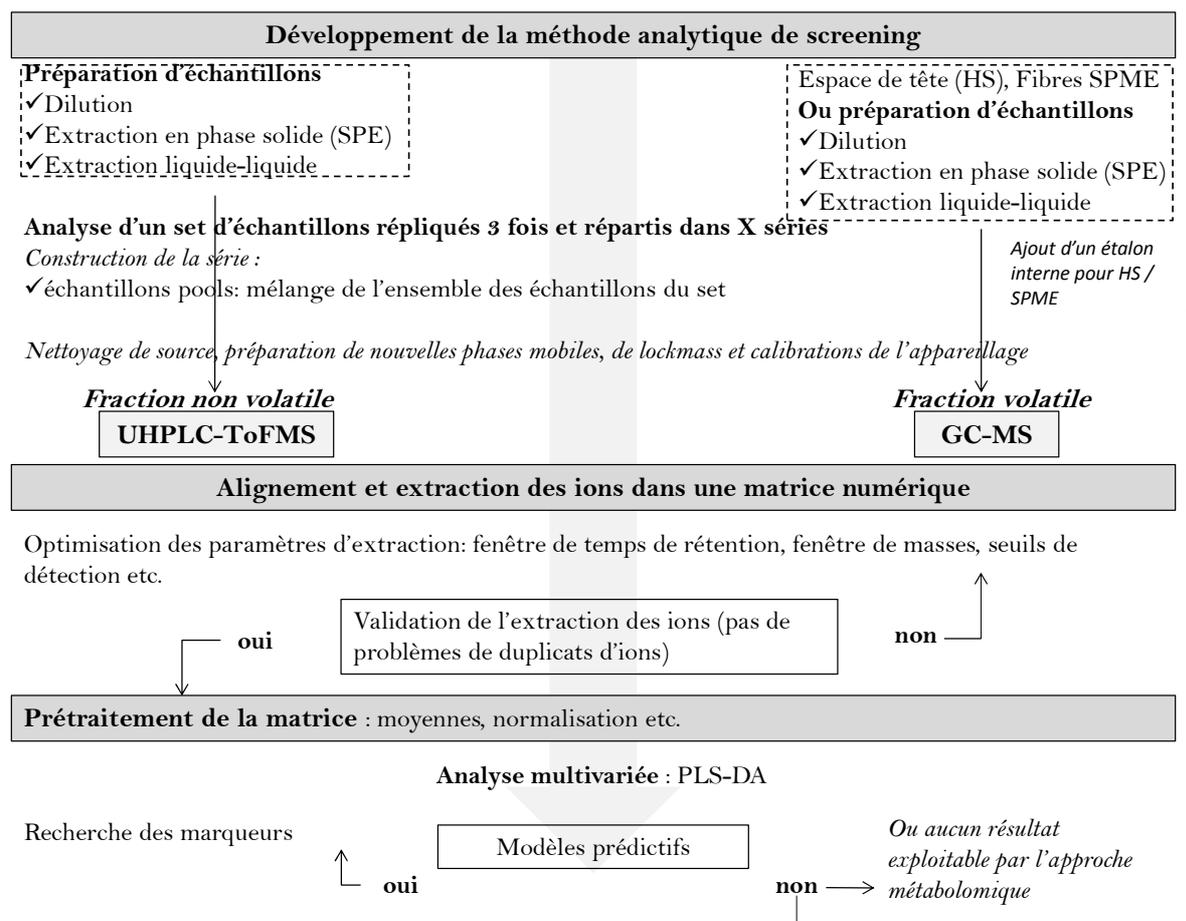


Figure 21: Etapes d'une étude métabolomique en LC-HRMS et GC-MS

Comme il a été montré dans cette partie bibliographique, les extraits naturels utilisés en parfumerie sont des produits issus d'un savoir-faire, à forte valeur ajoutée. Ils sont alors sujets à de nombreux types de fraudes ou de malfaçons. Les données disponibles sur la composition des fractions non volatiles des absolues sont quasi-inexistantes ; ceci rendant alors le contrôle de ces extraits beaucoup plus complexe. L'objectif de cette thèse est de proposer un outil d'authentification non ciblé, permettant notamment d'apporter des informations sur les composés inconnus de ces extraits très spécifiques. L'approche métabolomique a alors été appréhendée pour la première fois sur les absolues.



Chapitre 2 : Résultats et discussions

2.1. Introduction

L'objectif de ces travaux de thèse est d'évaluer l'apport de la métabolomique dans le secteur arômes et parfums. Pour cela, deux plantes emblématiques de la parfumerie ont été choisies pour cette étude. La violette et la rose sont deux plantes historiquement cultivées à Grasse, « capitale mondiale de la parfumerie ». Les absolues de ces plantes sont précieuses, attractives, et produites dans différentes régions du monde. Leurs prix peuvent atteindre, selon l'année, des dizaines de milliers d'euros le kilogramme (exemple de *Rosa centifolia* en 2013). Ces extraits sont issus d'un savoir-faire ancestral et d'un terroir spécifique pour lesquels des moyens importants doivent être mis en œuvre afin de protéger ces produits uniques. De plus, ces ingrédients sont destinés à des formulations de parfums, produits cosmétiques, ou alimentaires, ayant ainsi un impact direct sur la santé du consommateur. Les mélanges de différentes qualités d'absolues (origines géographiques, origines botaniques, absolues de plantes présentant des similitudes olfactives et physico-chimiques) et les ajouts de composés (synthétiques ou naturels) volatils/odorants ou non volatils, naturellement présents dans l'extrait, représentent donc des fraudes pouvant conduire à des problèmes de santé humaine ou des échanges commerciaux déloyaux. L'ensemble de ces pratiques est défini par un terme spécifique à la profession : l'adultération.

Nous allons étudier les développements technologiques liés à la métabolomique en vue de mettre en évidence des problèmes d'authenticité : adultérations ou substitutions de qualités (botaniques, géographiques). Ce travail est réalisé au travers de deux études de cas : la violette et la rose.

2.2. Approches métabolomiques appliquées à l'absolue de feuilles de *Viola odorata*

2.2.1. Informations recueillies sur les absolues de feuilles de violette étudiées

L'absolue de feuilles de violette a été choisie comme première matrice modèle pour les extraits aux solvants non volatils. Des informations peuvent être obtenues à différents niveaux de la filière : auprès des fabricants d'extraits et auprès des agriculteurs.

Une seule variété botanique est exploitée pour la parfumerie : *Viola odorata*. Dans les Alpes Maritimes, nous avons identifié trois cultivateurs de feuilles de violette à Tournettes-sur-Loup (06). En Egypte, les cultivateurs et les industries productrices de l'extrait sont regroupés dans la région du delta du Nil (Figure 22).



Figure 22: Localisation des champs de feuilles de violette en Egypte (Zagazig : fournisseur 1 ; Tanta : fournisseur 2, Tanta et Qalyoubeya pour le fournisseur 3) (Google Map)

a) Les fournisseurs d'absolues

Le premier intermédiaire auquel nous avons accès est le fournisseur de l'extrait. Les deux principaux pays fournisseurs sont la France et l'Egypte. L'entreprise Payan Bertrand traite la feuille française jusqu'à obtention de l'absolue et se procure l'absolue Egypte auprès de plusieurs fournisseurs locaux. Dans un premier temps, nous avons élaboré un questionnaire complet (Annexe 2) sur l'environnement géographique et climatique des cultures (coordonnées GPS, exposition du terrain, pluviométrie, composition du sol, présence d'usines ou d'autres cultures à proximité etc.), sur les pratiques culturales (âge des pieds, arrosage, traitement phytosanitaire), sur les pratiques de récolte (outil du cueilleur, conditions de stockage de la récolte, nombre de coupes et à quelle période, heure de récolte etc.), sur les extractions (nature des solvants utilisés, temps d'extraction, températures d'extraction, rendement en concrète, rendement en absolue, conditions de stockage des extraits etc.) et sur les adultérations connues de l'extrait. Les réponses à ces questionnaires ont été très partielles : soit par manque de précisions, par manque d'informations disponibles (ex : composition des sols), ou encore par soucis de protection des savoir-faire. Il n'a pas été possible d'extraire des données utiles pour notre étude.

Finalement, la seule donnée fiable qu'il nous a été possible d'identifier avec certitude, était l'origine géographique : France et Egypte. Il est évident que sous ce critère « d'origine géographique », nous regroupons finalement l'ensemble des étapes liées à l'obtention de l'extrait : depuis la culture jusqu'au stockage et transport de l'absolue.

Nous nous sommes malgré tout intéressés au procédé industriel appliqué chez Payan Bertrand pour l'extraction de feuilles afin de mettre en évidence la multitude des paramètres pouvant influencer sur l'extrait final.

Fabrication de l'absolue de feuilles de violette chez Payan Bertrand

Réception de la matière fraîche :

Après déchargement du camion, les feuilles sont entreposées dans un hangar, étalées et retournées afin d'éviter leur échauffement. L'extraction est faite avec le végétal frais, reçu tous les soirs à 18 h.

Fabrication de la concrète :

Trois extractions à l'hexane (macérations à 45°C) successifs de différentes durées sont réalisées sur une même quantité de matière fraîche: 1 h 30, 1 h et 45 min. Deux extracteurs sont utilisés en simultanément, reliés à un seul évaporateur. L'extraction est statique. Pour chacun des extracteurs, les volumes d'hexane (2000 L) utilisés lors des 1^{er} lavages sont évaporés (très chargés en molécules odorantes) directement dans l'évaporateur de 2000 L (évaporation entre 60 et 66 °C) puis successivement dans les évaporateurs de 250 L et de 25 L (Figure 23). Une étape de décantation préalable à l'évaporation permet de séparer la phase aqueuse de la phase organique (environ 2 kg d'eau sont récupérés pour 330 Kg de matière fraîche). Le solvant évaporé de la 1^{ère} extraction sera alors utilisé pour la 3^{ème} extraction du même extracteur. L'hexane utilisé pour la 2^{ème} extraction est stocké pour être utilisé lors de la 1^{er} extraction du 2^{ème} extracteur. Entre chaque extraction, les feuilles sont égouttées une trentaine de minutes pour limiter la présence d'hexane résiduel. En fin d'extraction, avant le déchargement, les feuilles sont de nouveau égouttées puis de la vapeur d'eau est injectée pendant 2 à 3 heures. Cette dernière étape permet de laver les feuilles de toute trace d'hexane (contrôle des teneurs en solvants des drèches). La vapeur chargée de solvant est ensuite envoyée dans un décanteur afin de récupérer l'hexane résiduel surnageant.

Trois chargements par jour peuvent être réalisés. Le rendement en concrète est d'environ 0,1%.

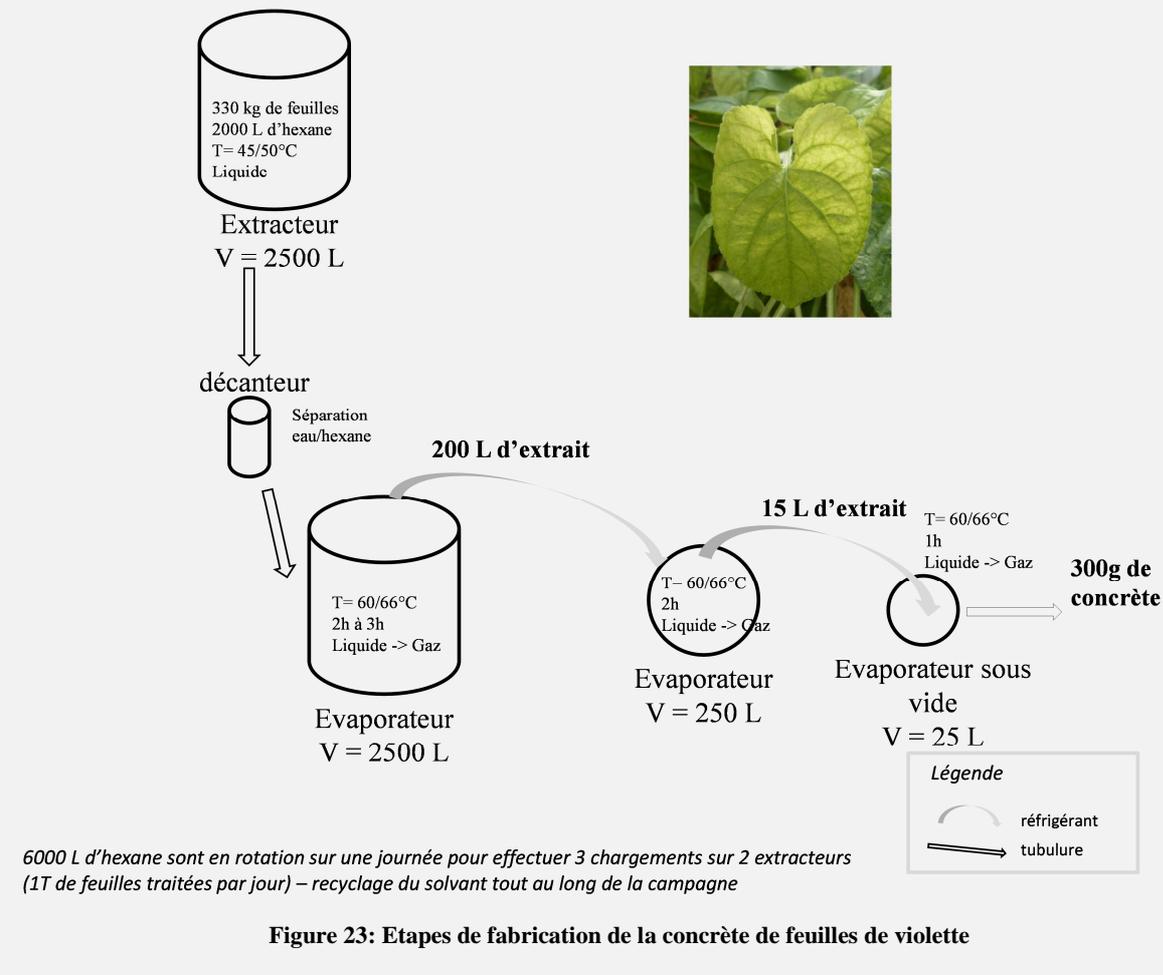


Figure 23: Etapes de fabrication de la concrète de feuilles de violette

Transformation de la concrète en absolue :

Le stockage se fait principalement sous forme de concrète pour préserver la qualité des produits. La fabrication de l'absolue est réalisée au fur et à mesure en fonction des besoins. L'alcool est ajouté à la concrète (10 volumes d'alcool pour 1 volume de concrète) et est homogénéisé pendant 2 heures à l'aide d'une batteuse à pales thermostatée à 30°C. Le mélange est ensuite glacé à -15°C toute la nuit. Le lendemain, le produit est filtré sous vide afin d'éliminer les cires surnageantes (système Büchner). L'alcool est ensuite évaporé. Le rendement en absolue est d'environ 59 %.

Nettoyage du procédé :

Un premier nettoyage de l'extracteur est effectué avec de la lessive de soude (30 %) qui est ensuite évacuée vers la station d'épuration. Un second nettoyage intervient de nouveau dans l'extracteur et remonte jusqu'à l'évaporateur. Le dernier lavage circule ensuite jusqu'aux cuves de stockage. Pour terminer, de la vapeur d'eau est envoyée dans l'ensemble du système. Le nettoyage est ensuite contrôlé visuellement et olfactivement. Une semaine de nettoyage est nécessaire.

Suivi de la fabrication :

Pour une campagne d'une durée de 10 jours : un échantillon de concrète est envoyé au laboratoire (contrôle visuel et olfactif) à chaque passée les quatre premiers jours, et est donc représentatif d'environ 0,33 kg de concrète. Ensuite un échantillon par jour est contrôlé, représentatif de 1 kg de concrète.

b) Les agriculteurs

Notre deuxième source d'informations accessible a été un agriculteur de la région grasseoise.

Exploitation agricole de feuilles de violettes à Tournettes-sur-Loup (06), France

Situation :



Figure 24: Situation de Tournettes-sur-Loup en France (Google Map)

Marcel Quentin, exploitant de violettes (Tournettes-sur-Loup, Figure 24) pour la parfumerie a partagé de nombreuses informations sur cette culture française en déclin. L'histoire de cette exploitation familiale (Figure 25) commence il y a 60 ans, avec le père de Mr Quentin. Il y a encore une dizaine d'années, elle produisait jusqu'à 200 tonnes de feuilles de violettes. En 2012, les demandes chutaient à 50 tonnes. L'exploitation s'étend sur 3,5 ha, dont 1 ha sous serre, sans aucun autre type de culture à 2 km à la ronde.



Figure 25: La culture en plein champs

La culture :

Les pieds sont arrachés de leur sol, puis divisés, et replantés tous les 4 ans en moyenne (cela peut varier de 3 à 6 ans). Il est en effet très difficile de trouver des plants ou même des graines. Un pied est divisé et sera transplanté avec des densités différentes suivant le mode de culture choisi :

- La culture sous serre : elle est essentielle pour les fleurs de violettes : elle offre une protection contre le froid (moins indispensable pour les feuilles). La méthode de plantation utilisée est celle par touffe (plants de 25 cm de diamètre, espacés de 10 cm des plants autour) (Figure 26).



Figure 26: Plantation par touffe (sous serre)

- La culture en plein champ : les pieds sont placés linéairement sans intervalle sur la ligne. Les plants sont divisés en plus petits plants que pour la plantation par touffe (Figure 25).

- La culture en boudin : elle n'est pas utilisée au sein de l'exploitation. Les rendements ne sont pas intéressants pour une culture destinée à la production de feuilles : longs « fils » -tiges, mais peu de feuilles. Ce type de culture est seulement rentable pour la fleur. La récolte doit se faire aux ciseaux.

Après une nouvelle plantation il faut attendre 1 an avant la première récolte. 100 m³ d'eau sont nécessaires par jour pour cette exploitation.

La récolte :

Pour la récolte de feuilles, destinées à la parfumerie, il y a deux coupes de feuilles par an : en mai et en septembre. Elle se déroule manuellement au taille haie (2 personnes coupent, 3 ramassent). Entre 2 et 2,5 tonnes de feuilles sont coupées par jour. Les feuilles sous serre et les feuilles en champs sont mélangées. La 2^{ème} coupe ne doit pas être effectuée trop tardivement, sinon la récolte risquerait d'être perdue à cause du gel. Pour la récolte des fleurs, la floraison s'étend de la Toussaint à Mars : mais de Toussaint à Janvier cela reste très clairsemé. Une personne peut alors récolter jusqu'à 4 kg par jour.



Figure 27: Chargement de la récolte

Traitements de la culture :

Les araignées et leurs œufs sont les principaux ravageurs de la violette. La réglementation européenne autorise l'utilisation du Vertimec® contre les araignées, et du Nissorun® contre leurs œufs. Ces insecticides sont utilisés 1 à 1 mois et demi avant la récolte afin de limiter la possibilité de leur présence dans les produits vendus et même transformés (concrètes, absolues). En Egypte beaucoup plus de pesticides sont retrouvés. Il n'est pas rare de retrouver du DDT (DichloroDiphenylTrichloroéthane), interdit en France depuis une vingtaine d'années.

Données économiques :

Actuellement, le coût des intrants (engrais, désherbant) est d'environ 0,5€/kg. 1kg de feuilles pays coûte 45 €, 1kg de feuilles Egypte coûte 30 \$.

L'exploitation familiale est viable économiquement car le coût de la main d'œuvre n'est pas comptabilisé dans le prix de vente de la feuille. L'exploitation ne survivrait pas avec des employés salariés.

c) L'authentification botanique du végétal

Un dernier élément essentiel est l'authentification botanique du végétal utilisé pour produire les extraits. Un contact fournisseur privilégié doit alors être établi. Cette certification botanique a été réalisée par le Dr. Thomas Marcussen [9], expert botanique du genre *Viola*. Des photos des feuilles/tiges/racines ont été prises dans les champs de Tourrettes-sur-Loup et dans les champs de deux fournisseurs d'Egypte (cf. Partie expérimentale). L'authentification de *Viola odorata* a été faite par une étude morphologique de la plante. Ces échantillons ont ensuite été séchés, et un Voucher déposé dans l'herbier du jardin botanique de Nice (référéncé internationalement sous le nom JBVN) avec les numéros d'enregistrement suivants : C-3752 pour le spécimen de Tourrettes-sur-Loup, C-3753 pour le fournisseur Egypte 2 et C-3754 pour le fournisseur Egypte 1.

En conclusion, avec les différentes informations obtenues, il apparaît intéressant d'étudier la distinction d'origines géographiques France et Egypte, sur l'espèce botanique *Viola odorata*.

Une première étude bibliographique sur l'absolue de violette a montré des connaissances restreintes sur la composition de sa fraction volatile, fraction de premier intérêt

en parfumerie. Pour commencer, nous avons alors essayé d'étoffer les données sur cette matière première historique de la parfumerie. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la fraction non volatile de cet extrait par une approche métabolomique non ciblée, pour laquelle les données de la littérature sont encore moins conséquentes. La capacité à mettre en évidence des adultérations d'un échantillon étant déterminante, nous avons choisi de créer de nouveaux échantillons représentant différentes catégories d'adultération pour compléter cette étude. Ces échantillons présentent un intérêt économique pour de potentielles fraudes:

- des mélanges d'absolues de différentes origines géographiques
- des mélanges d'absolues de différents fournisseurs d'Egypte
- des ajouts d'absolue d'épinard, identifiée comme une adultération classique il y a quelques années d'après les informations recueillies auprès de l'exploitant de Tourrettes-sur-Loup
- des absolues additionnées de composés synthétiques naturellement présents dans l'absolue de feuilles de violette : i) volatil, avec le (*E,Z*)-nona-2,6-diéna, caractéristique de l'odeur verte/concombre de l'absolue de violette et, ii) non volatil, avec le linoléate de méthyle pour ajouter de la masse au produit.

L'utilisation de ces échantillons nous a permis de mettre en place une étude aussi robuste que possible pour évaluer l'intérêt de l'approche métabolomique dans le secteur des ingrédients naturels utilisés dans les secteurs des arômes et parfums.

2.2.2. Etude de la fraction volatile

La fraction volatile de l'absolue de feuilles de violette a été étudiée en trois étapes. Un premier profil du produit a été établi par une analyse olfactive. La composition chimique de l'absolue a ensuite été étudiée en détail par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) après extraction en espace de tête par microextraction sur phase solide (HS-SPME) pour l'étude qualitative ; et par chromatographie gazeuse muni d'un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) pour l'étude quantitative. Nous avons ensuite complété ces résultats, en recherchant les composés d'impact olfactif de l'absolue de feuilles de violette. Une dernière étude a donc été réalisée en chromatographie gazeuse équipée d'un olfactomètre et couplée à un spectromètre de masse (GC/O/MS).

2.2.2.1. Profils olfactifs des absolues de feuilles de violette France et Egypte

Dans le cadre de ce travail, trois échantillons ont été étudiés : un échantillon d'origine France et deux échantillons d'origine Egypte (deux fournisseurs). Deux types de tests ont été mis en œuvre :

- Le test triangulaire, discriminant, permet de déterminer s'il y a une distinction olfactive entre deux échantillons (Figure 28). Les échantillons de l'origine France comparés à ceux de l'origine Egypte fournisseur 1, puis à l'origine Egypte fournisseur 2, ont respectivement été distingués avec plus de 95 % de confiance (une des six combinaisons étant à 79 %), et avec 99 % de confiance (une des six combinaisons étant à 79 %). Les différences établies entre les deux fournisseurs Egypte sont moins catégoriques avec plus de 79 % de confiance (une des six combinaisons étant à 46 %).

France /Egypte 2	AAB	ABA	ABB	BAB	BAA	BBA
P	99%	99%	99%	79%	99%	99%
France / Egypte 1	CCA	AAC	ACA	CAC	CCA	CAA
P	79%	99%	99%	99%	95%	95%
Egypte 1 / Egypte 2	BCB	BBC	CCB	CBC	BBC	CBB
P	46%	95%	79%	79%	95%	95%

Figure 28: Résultats du test triangulaire (A: France, B: Egypte 2, C: Egypte 1)

- Un test descriptif a été élaboré pour l'étude des notes de tête (Figure 29) et l'étude des notes de cœur (Figure 30). Les notes de tête correspondent aux effluves du produit, senties juste après application. Les notes de cœur se révèlent ensuite, après volatilisation des notes de tête. Quatre échantillons ont été présentés aux panélistes : un échantillon d'origine France, deux échantillons d'origine Egypte (Fournisseurs 1 et 2), et un échantillon « Mix », représentant un mélange équivolumique des trois premiers échantillons (chaque échantillon étant présenté comme pur aux panélistes, sans origine apparentée). L'ajout de ce quatrième échantillon a permis d'évaluer la contribution olfactive de chaque extrait en mélange, et de mettre en évidence l'intérêt olfactif à réaliser un mélange pour bonifier la qualité olfactive d'un extrait. Les notes olfactives ont été établies avec l'aide d'experts de l'analyse olfactive de ces extraits (parfumeurs) : vertes, florales, marines, terreuses, grasses/huileuses ainsi que la puissance olfactive du produit. Les notes de tête de l'échantillon d'origine France et de l'échantillon « Mix » sont plus vertes et plus puissantes que celles des échantillons des deux fournisseurs d'Egypte, ces deux aspects faisant partie des critères recherchés dans les absolues de feuilles de violette. Le « Mix » présente un caractère terreux moins prononcé que les échantillons d'Egypte, et la note grasse/huileuse est moins importante que pour l'échantillon France. Selon les caractéristiques attendues par les parfumeurs, le « Mix » présenterait donc la qualité la plus intéressante en notes de tête, suivi par l'échantillon France, Egypte fournisseur 1 puis Egypte fournisseur 2. Dans les notes de cœur, les caractères floral et vert sont plus importants dans l'échantillon France que dans l'échantillon « Mix ». L'ordre préférentiel est

alors modifié avec l'échantillon France en première place, le « Mix », Egypte fournisseur 1 et Egypte fournisseur 2.

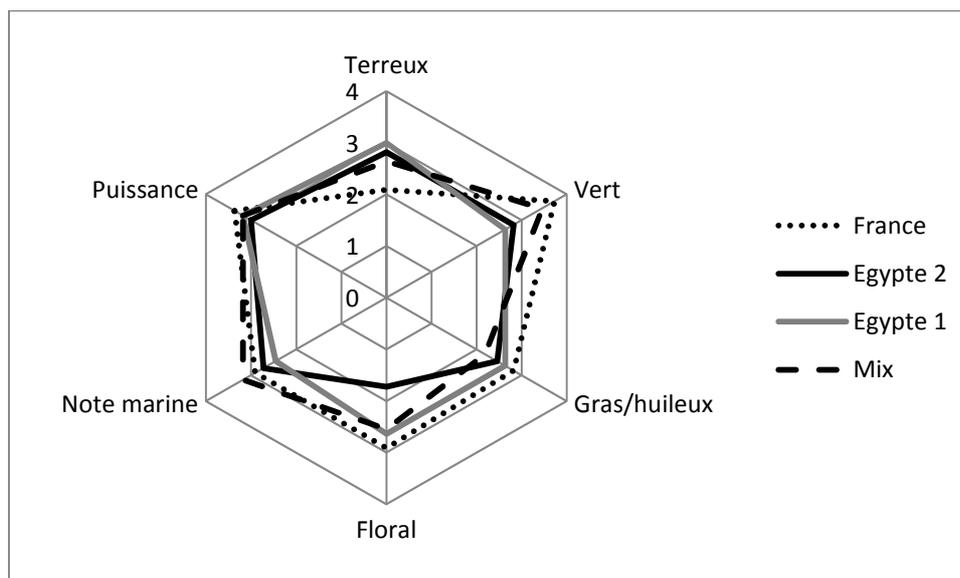


Figure 29: Etude olfactive des notes de tête de l'absolue de feuille de violette

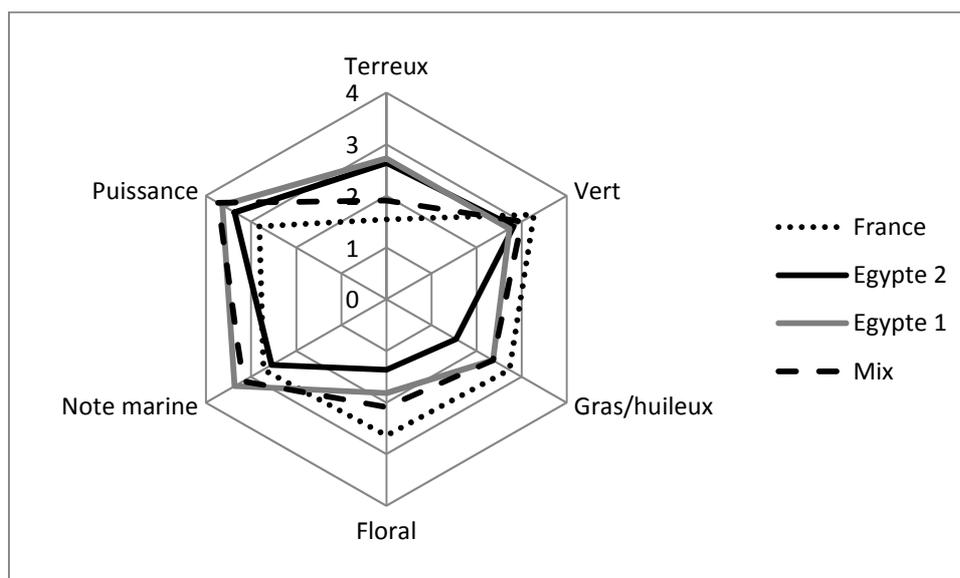


Figure 30: Etude olfactive des notes de cœur de l'absolue de feuille de violette

2.2.2.2. Etude de la fraction volatile de l'absolue de feuilles de violette par HS-SPME-GC/MS

L'objectif de cette étude était de déterminer les composés volatils de l'absolue. Pour cela, nous avons travaillé avec une technique d'extraction d'échantillon en espèce de tête statique (avec micro extraction sur phase solide). Les avantages de cette technique sont d'une part la possibilité de travailler sur échantillon pur et ainsi de s'affranchir de l'effet solvant lors de l'analyse GC-MS (des résidus d'éthanol dans l'absolue étant cependant toujours présents) ;

et d'autre part, la pré-concentration des composés d'intérêts par des mécanismes d'absorption/adsorption sur phase solide dans l'espace de tête. Les effets mémoires, bleeding de l'adsorbant et adsorptions irréversibles sont les principaux défauts de cette technique et doivent alors être contrôlés. 1 g d'absolue de violette a été échantillonné pur avec ajout de 100 μL d'étalon interne à 10 mg.mL^{-1} .

Les conditions de la micro-extraction sur phase solide par espace de tête ont été optimisées: la nature de la phase de la fibre, jouant un rôle sur la sélectivité des composés ; la température et le temps d'extraction.

a) Choix de la fibre

Quatre fibres ont été sélectionnées pour répondre à la problématique de l'étude :

- Deux fibres d'absorption : PolyDimethylSiloxane (PDMS 100 μm), PolyAcrylate (PA 85 μm) spécifiques respectivement aux composés volatils non polaires et aux composés semi-volatils polaires,

- Deux fibres composées d'une phase d'absorption et d'adsorption : PDMS-DiVinylBenzene (PDMS-DVB 65 μm) et DVB-Carboxen-PDMS (DVB-CAR-PDMS 50/30 μm) spécifiques aux composés volatils et volatils/semi-volatils respectivement de polarités variées.

Les analyses ont été menées dans les conditions d'extraction suivantes : une température de 50 °C a été choisie, afin d'éviter la dégradation des composés ; et un temps d'extraction de 600 s.

La sélection d'une fibre est dépendante de quatre paramètres : le poids moléculaire des composés d'intérêt, leur polarité, leur niveau de concentration dans l'échantillon, ainsi que la complexité de la matrice échantillon [40]. Dans le cas des fibres d'absorption, les molécules pénètrent dans l'ensemble du volume de la phase, dans un temps court, si l'épaisseur de la phase est fine. Dans le cas des fibres d'adsorption, la phase a une structure dite cristalline, qui, si elle est dense, va réduire la capacité de diffusion des molécules dans la phase. Ainsi, après un temps d'extraction long, les composés présentant une affinité plus faible avec la phase peuvent être déplacés par des composés ayant une affinité plus importante, ou par les composés en fortes concentrations. Ces phénomènes de compétitions apparaissent dans le cas de matrices complexes, c'est-à-dire de matrices comportant des analytes issues de diverses familles phytochimiques, présentant ainsi des affinités différentes avec une phase donnée, et des niveaux de concentrations hétérogènes. Pour limiter ces phénomènes inhérents aux fibres

d'adsorption, un temps d'extraction plus court que le temps d'équilibre de l'espace de tête permettrait ainsi aux analytes d'être adsorbés au-dessous de leur taux de saturation sur la fibre, évitant ainsi ce phénomène de déplacement de composés non désiré, et donc de mauvaise représentativité de la composition de l'échantillon (déjà préalablement ciblée par le choix de la nature de la fibre).

Les fibres d'absorption sont ainsi plus adaptées aux matrices complexes pour des analyses qualitatives comparatives d'échantillons et pour les analyses quantitatives. Chaque analyte parvenant à son point d'équilibre indépendamment des autres, la présence de différents niveaux de concentration dans l'échantillon n'est pas un facteur limitant. Des couches plus épaisses sont adaptées aux petites molécules malgré le risque d'une désorption incomplète. L'équilibre est atteint moins rapidement que pour les couches les plus fines.

La fibre DVB-CAR-PDMS est ainsi un bon compromis pour les extraits naturels odorants et complexes grâce à sa sélectivité adaptée à la nature chimique de ces échantillons et aux faibles concentrations des composés les constituant.

Afin de déterminer la fibre la plus adaptée à notre application, les critères étudiés ont été : le nombre de composés détectés et la répétabilité des analyses. Huit composés, choisis pour leur diversité chimique, ont été suivis : le (*E*)-hex-2-éнал, le benzaldéhyde, l'alcool phényl éthylique, le (*E,Z*)-nona-2,6-diéнал, le (*E,Z*)-nona-2,6-diéнол, l'eucalyptol, le linalol, et l'eugéнол (poids moléculaires compris entre 98 et 164 g.mol⁻¹ et une pression de vapeur saturante allant de 32,6 à 0,191 mmHg). La répétabilité a été évaluée sur 10 analyses successives réalisées sur un même vial (Tableau 13).

Tableau 13: Etude des quatre types de fibres (température d'extraction : 50 °C, temps d'extraction : 600 s, analyse par GC/MS, température d'injection : 250 °C, colonne 100 % diméthylsiloxane 20 m x 150 µm x 0.150 µm, de 37 °C à 5 °C.min⁻¹ jusqu'à 250 °C (11 minutes))

Fibre	DVB/CAR/PDMS	PDMS	DVB/PDMS	PA
Nombre de pics intégrés	180	168	151	122
Etendue des écarts types des aires intégrées pour les 8 composés pour 10 analyses successives, relativement à la réponse du composé à la première injection (%)	[1,76-8,52]	[1,54-4,85]	[1,96-3,85]	[1,74-5,27]

Les fibres DVB-CAR-PDMS et PDMS sont les plus efficaces d'après le nombre de composés détectés. La fibre DVB-CAR-PDMS atteint la valeur d'écart type la plus élevée à cause du (*E*)-hex-2-éнал (8,52%). Ce composé a la valeur de pression saturante la plus haute

(32,6 mmHg à 60 °C d'après le calcul effectué avec EPI Suite⁷) et pourrait ainsi être prioritairement adsorbé lors de l'exposition de la fibre avec l'espace de tête. Les analyses étant répétées successivement sur le même vial, l'épuisement de la matrice en (*E*)-hex-2-éanal serait ainsi accentué plus rapidement que pour les autres composés. Dans le cas de la fibre d'absorption PDMS, il n'y a pas de sélectivité préférentielle : chaque composé est extrait selon le temps d'exposition de la fibre. L'épuisement de la matrice est alors proportionnel pour les 10 analyses.

Excepté pour le (*E*)-hex-2-éanal, la gamme d'écart type reste comparable pour les quatre fibres. L'optimisation de la méthode a ensuite été poursuivie avec la fibre DVB-CAR-PDMS car elle présentait le plus grand nombre de composés détectés. La fibre PA n'a pas été conservée pour la suite de ce travail du fait de la nature plus apolaire des composés présents dans les échantillons étudiés.

b) Optimisation de la température d'extraction

Ce paramètre a été déterminé avec un temps d'extraction de 600 s. Les cinq composés présentant les aires les plus importantes ont été étudiés : le salicylate de méthyle, le (*E,Z*)-nona-2,6-diéanal, l'alcool benzylique, l'oct-1-én-3-ol et le benzaldéhyde (Figure 31) en supposant qu'ils étaient représentatifs des différentes familles chimiques présentes dans l'échantillon. La température optimisée a été définie à 60 °C d'après les critères de sélection suivants : i) l'augmentation de la température d'extraction entre 50 et 60 °C conduit à l'augmentation de l'aire des pics de 33 à 57 % à l'exception du benzaldéhyde et de l'oct-1-én-3-ol pour lesquels aucune différence n'a été observée, ii) une augmentation de la température d'extraction au-dessus de 60 °C pourrait provoquer des modifications chimiques de composés labiles ou déclencher des réactions thermo-activées, iii) les conditions d'analyses doivent rester au plus proche des conditions sensorielles humaines.

⁷ EPI Suite : programme développé par l'agence de protection environnementale, EPA, des Etats-Unis, permettant une estimation des propriétés physiques et chimiques de molécules

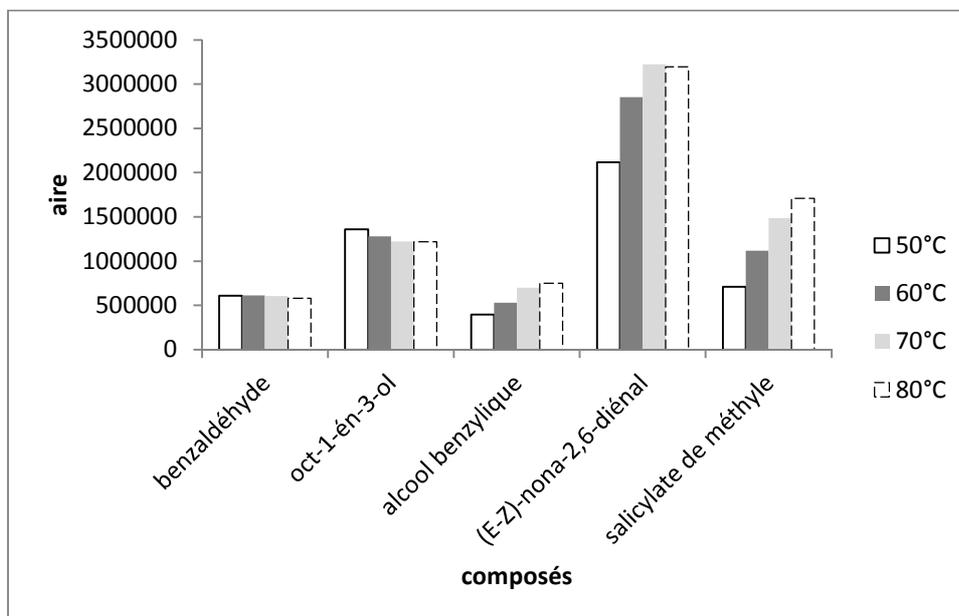


Figure 31: Réponse de 5 composés pour 4 températures d'extraction (fibre : DVB-CAR-PDMS, temps d'extraction : 600 s, analyse par GC/MS, température d'injection : 250 °C, colonne 100 % diméthylsiloxane 20 m x 150 µm x 0.150 µm, de 37 °C à 5 °C.min⁻¹ jusqu'à 250 °C (11 minutes))

c) Optimisation du temps d'extraction

La température d'extraction a été fixée à 60 °C, température optimisée dans le paragraphe précédent. En 800 s, la quantité maximale d'oct-1-én-3-ol, de benzaldéhyde et d'alcool benzylique a été évaluée en mesurant l'aire des pics (Figure 32). L'augmentation du temps d'extraction par un facteur 1,5 favorise sensiblement la quantité extraite du (E,Z)-nona-2,6-diène et du salicylate de méthyle mais influence très peu le nombre total de composés extraits et l'aire totale des pics intégrés (voir Tableau 14). Ainsi un temps d'extraction de 800 s a été choisi.

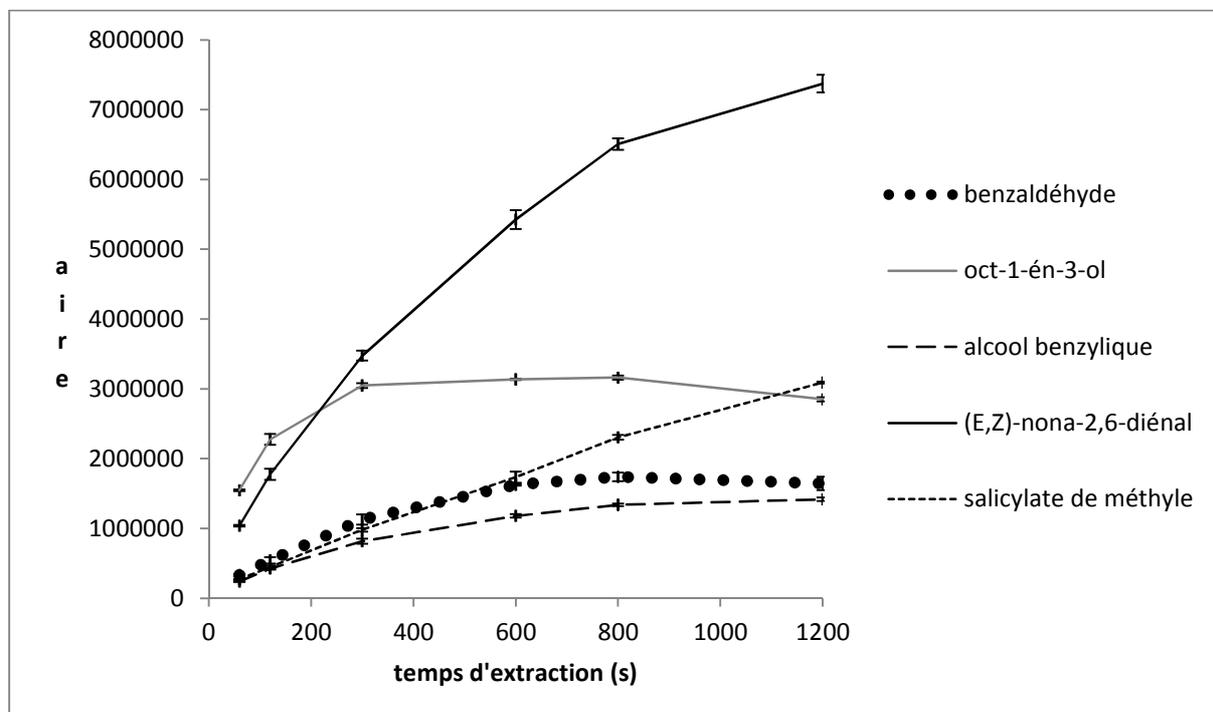


Figure 32: Etude du temps d'extraction (fibre : DVB-CAR-PDMS, température d'extraction : 60 °C, analyse par GC/MS, température d'injection : 250 °C, colonne 100 % diméthylsiloxane 20 m x 150 µm x 0.150 µm, de 37 °C à 5 °C.min⁻¹ jusqu'à 250 °C (11 minutes))

Tableau 14: Influence du temps d'extraction sur l'ensemble des composés (fibre : DVB-CAR-PDMS, température d'extraction : 60 °C, analyse par GC/MS, température d'injection : 250 °C, colonne 100 % diméthylsiloxane 20 m x 150 µm x 0.150 µm, de 37 °C à 5 °C.min⁻¹ jusqu'à 250 °C (11 minutes))

Temps d'extraction (s)	800	1200
Nombre total des pics intégrés	249 ± 7	272 ± 37
Aire totale intégrée	4,82.10 ⁷ ± 1,21%	5,07.10 ⁷ ± 2,80%

d) Caractérisation des composés

Au total, 31 composés ont été caractérisés pour la première fois en plus des neuf composés déjà cités dans la littérature. Le Tableau 15 répertorie les composés sur les trois fibres étudiées (DVB-CAR-PDMS, DVB-PDMS et PDMS).

Tableau 15: Caractérisation de l'absolue de feuilles de *Viola odorata*

Composés	RI litt	R.I.	France			Egypte 1			Egypte 2		
			DVB/CAR/P DMS	DVB/PDMS	PDMS	DVB/CAR/P DMS	DVB/PDMS	PDMS	DVB/CAR/P DMS	DVB/PDMS	PDMS
acide acétique	581	599	+	+	+	+	+	+	+	+	+
acétate d'éthyle	598	602	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pent-1-én-3-ol****	660	669	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pentanal	669	675	+	+	+	+	+	+	+	+	+
toluène	750	750	+	+	+	+	+	+	-	-	+
hexan-2-one	766	768	+	+	+	-	-	+	-	-	+
Inconnu 1		775	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inconnu 2		784	+	+	+	+	+	+	+	+	+
hexan-2-ol	783	791	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<u>(E)-hex-2-éнал</u>	826	829	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>(Z)-hex-3-éнал</u>	843	843	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>(E)-hex-2-éнал</u>	846	855	+	+	+	+	-	-	-	+	-
xylène**	855	855	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Hexanol	856	859	+	-	+	+	-	-	+	-	-
benzaldéhyde	933	932	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>oct-1-én-3-ol****</u>	967	969	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-pentylfurane	982	981	+	+	-	-	+	-	-	-	-
hexanoate d'éthyle	982	986	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>(E,E)</i> -hepta-2,4-diéнал	983	986	-	-	-	+	+	+	+	-	-
acide hexanoique	983	987	-	-	-	+	+	-	+	+	+
<u>acétate de (Z)-hex-3-éныle</u>	985	991	+	+	+	+	+	+	+	+	+
acétate d'hexyle	1002	1000	+	+	+	+	+	+	-	-	-
décane	1000	1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>alcool benzylique</u>	1017	1015	+	+	+	+	+	+	+	+	+
eucalyptol	1016	1018	-	-	+	+	-	+	+	+	+
limonène	1025	1020	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Inconnu 3		1045	-	-	-	-	-	-	+	+	+

benzoate de méthyle	1065	1071	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Inconnu 4		1071	-	-	-	-	-	-	+	+	+
nonanal	1089	1086	+	+	+	-	-	-	-	-	+
linalol	1089	1088	+	+	+	+	+	+	+	+	+
alcool phényléthylique	1091	1091	+	+	+	+	+	-	-	-	-
undécane	1100	1100	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Inconnu 5		1118	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<u>(E,Z)-nona-2,6-diéнал</u>	1127	1129	+	+	+	+	+	+	+	-	+
menthone	1136	1132	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<u>acétate de benzyle</u>	1134	1138	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>(E,Z)-nona-2,6-diéнал</u>	1154	1153	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Inconnu 6		1165	-	-	-	-	-	-	+	+	+
salicylate de méthyle	1168	1171	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α -terpinéol	1179	1174	-	+	+	+	+	+	+	+	+
dodécane	1200	1200	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Inconnu 7		1215	-	-	-	-	-	-	+	+	+
4-bromo-2-chlorophéanol		1241	-	-	-	+	+	+	+	+	+
tridécanе	1300	1300	-	-	-	+	+	+	+	+	+
eugéanol	1337	1334	-	-	-	+	+	+	+	+	+
jasmone	1363	1369	-	-	-	+	+	+	-	-	-

NB:

+ : détecté

- : non détecté

** isomère non identifié

****diastéréoisomère non défini

R.I: Indices de rétention calculés sur colonne HP-1

Déjà cités dans la littérature

Inconnu 1 [85, M⁺(3)] 72(1), 71(25), 67(5), 58(16), 57(7),55(3), 45(6), 43(21), 41(5)

Inconnu 2 [73, M⁺(12)] 60(2), 59(29), 58(3), 57(2), 56(2), 55(26), 45(6), 43(9), 41(8)

Inconnu 3 [138, M⁺(10)]109(2), 96(6),95(6),82(7), 81(6), 69(5), 68(8),67(10), 55(7)

Inconnu 4 [127, M⁺(2)] 126(2), 97(3), 85(6), 81(2), 71(9), 58(2), 57(20), 56(9), 55(6)

Inconnu 5 [152, M⁺(4)]95(5), 85(2), 82(4),81(6),71(2),67(5), 57(17), 56(3), 55(6)

Inconnu 6[149, M⁺(0,2)] 126(2), 99(3), 85(8), 71(12), 57(19), 56(3), 55(5), 43(20) , 42(5), 41(10)

Inconnu 7 [113, M⁺(0,3)] 41(9), 42(2,5), 43(14), 55(5), 56(5), 57(30), 70(3), 71(10), 85(3), 98(3)

Six composés : (*E*)-hex-2-éanal, (*Z*)-hex-3-éanol, (*E*)-hex-2-éanol, alcool benzylique, (*E,Z*)-nona-2,6-diéanal et (*E,Z*)-nona-2,6-diéanol ont été identifiés par Cu et al [13], oct-1-én-3-ol, acétate de benzyle et acétate (*Z*)-hex-3-ényle par Brevard [7]. **L'hexanoate d'éthyle et le (*E,Z*)-nona-2,6-diéanol ont été identifiés comme étant spécifiques à l'origine France, tandis que le (*E,E*)-hepta-2,4-diéanal, l'acide hexanoïque, le limonène, le tridécano et l'eugénol se sont révélés être spécifiques aux deux fournisseurs d'absolue Egypte.** Le xylène et le benzoate de méthyle ont uniquement été retrouvés dans l'échantillon Egypte 1 alors que le dodécano et la menthone ont été trouvés dans Egypte 2. L'addition d'un étalon interne dans tous les échantillons avant l'extraction a permis d'effectuer une comparaison quantitative des résultats. **Ainsi l'échantillon France est deux fois plus concentré en (*E,Z*)-nona-2,6-diéanal par rapport aux échantillons des deux fournisseurs Egypte. Les analyses en HS-SPME-GC/MS montrent aussi une concentration deux fois plus élevée en oct-1-én-3-ol et trois fois plus élevées en (*Z*)-hex-3-éanol dans l'échantillon France.**

e) Analyse des constituants majoritaires de la fraction volatile

La quantification des composés volatils majoritaires de l'absolue de feuilles de violette a été réalisée par GC-FID en injection liquide. Pour cela, l'échantillon a été dilué à 10% (en poids) dans l'éthanol. Une quantification avec extraction en HS-SPME aurait nécessité un développement de méthode plus complexe. La fraction volatile a ainsi été estimée par GC-FID, en tenant compte de la réponse d'un étalon interne à une concentration donnée, et de la réponse globale de l'ensemble des composés volatils (hors composés acides gras, éluant également en GC). Elle représente environ 2 % (en poids) dans l'absolue totale. Cette fraction est donc bien moins importante en quantité par rapport à la partie non volatile majoritairement constituée d'acides gras. 50 % (en poids) des composés volatils ont pu être identifiés dans les échantillons Egypte, et 31 % dans l'échantillon France.

Le Tableau 16 reporte les composés majoritaires de la fraction volatile. Ils ont été quantifiés par GC-FID, en utilisant un étalonnage externe avec un seul composé (standard) pour l'ensemble des composés à quantifier. Un facteur multiplicatif, RRF⁸ (Relative Response Factor) a été appliqué pour corriger les valeurs obtenues, afin de tenir compte des facteurs de réponses du FID, dépendant de la nature des composés détectés. Les RRF sont déterminés par l'analyse d'un composé *i* et d'un composé standard donné à une même concentration dans les mêmes conditions d'analyses [122,123]. Les corrections des teneurs en *n*-décane et undécane ont été calculées avec le RRF du tridécano, considérant que des composés d'une même famille chimique ont des facteurs de réponses similaires.

⁸ RRF = avec m_i , A_i masse et aire du composé et m_{std} , A_{std} pour le standard interne

La quantification du (*E,Z*)-nona-2,6-diéнал a été vérifiée par étalonnage externe : $1,50 \pm 0,01 \text{ mg.g}^{-1}$ ont été trouvés dans l'échantillon France et $0,65 \pm 0,01 \text{ mg.g}^{-1}$ dans l'échantillon Egypte 1.

Le 4-bromo-2-chlorophénol a été détecté par HS-SPME-GC/MS et quantifié à $0,49 \text{ mg.g}^{-1}$ (sans correction avec le RRF) dans l'absolue Egypte 1 par GC-FID. Ce composé est un métabolite du profénofos, un pesticide interdit dans la réglementation européenne et qui d'un point de vue sensoriel, est connu pour avoir une odeur d'ail [124]. La présence de 4-bromo-2-chlorophénol dans les absolues de feuilles de violette suggère la potentielle introduction du profénofos dans les cultures de violettes égyptiennes ou dans des cultures voisines.

Tableau 16: Composés volatils majoritaires identifiés dans les absolues de feuilles de violette (mg.g-1 de l'absolue)

Composés	RRF	Egypte 1 corr*°	France corr*°
oct-1-èn-3-ol	1,00	0,1	0,4
n-décane**	0,89	0,5	0,5
Acétate de (<i>Z</i>)-hex-3-ényle	1,20	-	0,4
eucalyptol	1,10	0,4	-
linalol	1,05	4,3	1,5
undécane**	0,89	0,6	-
(<i>E,Z</i>)-nona-2,6-diéнал	1,92	0,6	1,5
menthone	1,10	0,2	-
salicylate de méthyle	0,97	0,2	0,4
dodécane**	0,89	0,8	-
eugenol	1,20	1,1	-
total	-	8,8	4,7

*Correction avec les RRFs déterminés expérimentalement

**Utilisation du RRF du tridécane par analogie

° les écarts types sont $< 0,05 \text{ mg.g}^{-1}$

2.2.2.3. Analyse par DHS-GC/O/MS des absolues de feuilles de violette

Plusieurs composés volatils ont été identifiés dans les absolues de feuilles de violette et la plupart pour la première fois. Nous avons ensuite souhaité mettre en évidence les composés ayant un impact olfactif, ainsi que leur puissance puisque des différences avaient été soulevées lors de l'étude sensorielle pour les deux origines.

Pour réaliser cette étude, nous avons collaboré avec l'équipe QuaPA de l'INRA de Clermont-Ferrand, qui a mis en place un système de chromatographie en phase gazeuse couplé à huit ports olfactométriques (système multi-voies), permettant ainsi à huit panélistes de travailler en simultané sur l'analyse d'un échantillon (Figure 33) [125].

L'échantillon à analyser est tout d'abord extrait en espace de tête dynamique (DHS), suivi d'une étape de cryofocalisation des composés extraits avant injection en GC/MS. Dans un appareil simple voie, le flux sortant de la colonne est scindé en deux : une partie vers un détecteur physique, l'autre vers une ligne de transfert comportant un cône nasal à son extrémité. Dans le cas d'un GC/O multivoie, le flux est scindé en neuf ; afin d'alimenter les huit lignes de transfert allant aux ports de sniffing. Le nez est alors utilisé comme détecteur analytique, conjointement avec un détecteur physique (un spectromètre de masse dans le cadre de nos travaux). Le panéliste peut alors sentir le flux en sortie du cône et évaluer la présence/absence d'une odeur, son temps de perception, décrire les caractéristiques de l'effluve ainsi qu'apprécier son intensité odorante. Un chromatogramme issu de la détection physique, et un aromagramme (ou olfactogramme) issu de la détection humaine sont alors générés et permettent ainsi de repérer facilement les zones odorantes du chromatogramme. Composition chimique et odeurs peuvent alors être liées.

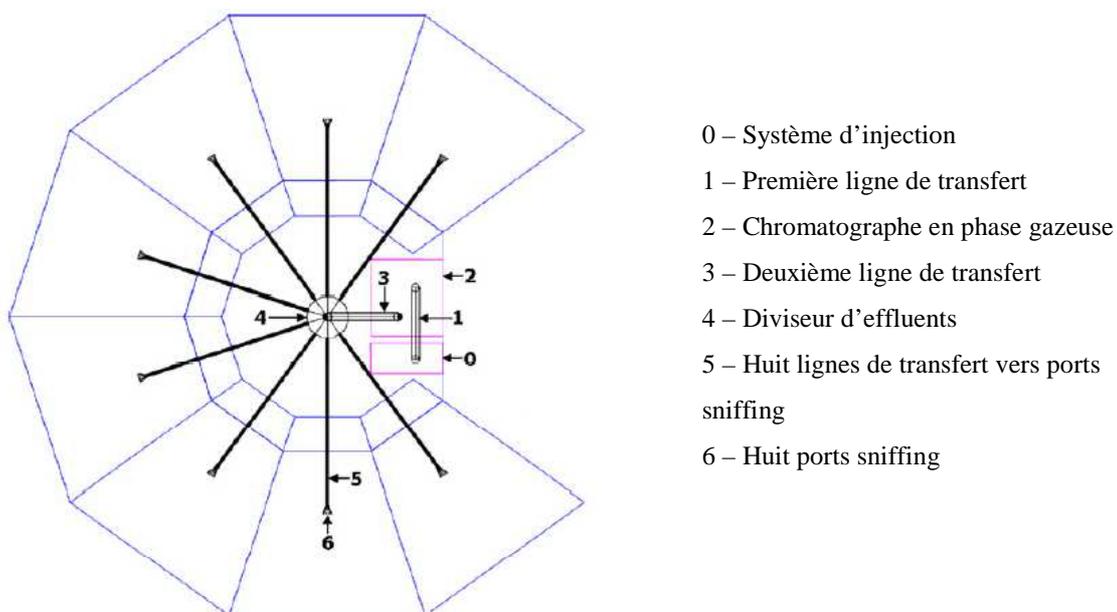


Figure 33: Architecture du système 8W-GC/O [125]

Différentes méthodologies permettent de fournir des informations sur l'impact olfactif des constituants : les méthodes de dilution, les méthodes de fréquence de détection et les méthodes d'intensité [126]. La méthode de traitement utilisée dans notre étude est le VIDEO-Sniff (Vocabulary-Intensity-Duration of Elementary Odours by Sniffing), méthode hybride combinant la fréquence de détection et les méthodes d'intensité, développée par cette même équipe de recherche [127] en 2003. Les panélistes indiquent la durée, la nature et l'intensité (sur une échelle allant de un et cinq) de la perception odorante. Le vocabulaire exprimé par les panélistes durant l'analyse GC/O est aussi pris en compte dans le traitement des informations.

Il est alors regroupé dans des pôles olfactifs (fruité, floral, boisé, épicé etc.). La somme des aromagrammes individuels, traitée par le logiciel AcquiSniff[®], donne le signal olfactif total. Les zones olfactives sont repérées à l'aide de couleurs caractéristiques du pôle correspondant à l'odeur décrite par le panéliste. La visualisation d'un aromagramme ressemble fortement à celle d'un chromatogramme, avec la surface des pics correspondant à l'intensité odorante mesurée et à son temps d'élution.

Les analyses par GC/O multi-voies ont conduit à la distinction de 24 zones odorantes dans une analyse chromatographique.

La Figure 34 représente les aromagrammes des échantillons France et Egypte. En haut de la Figure 34 ont été représentés les deux aromagrammes fusionnés, étant très similaires. Dans la même figure, les enveloppes de chaque zone odorante ont été dessinées. Elles sont analogues, exceptées pour trois zones dans l'échantillon France et une zone dans l'échantillon Egypte (cerclées en rouge sur la figure).

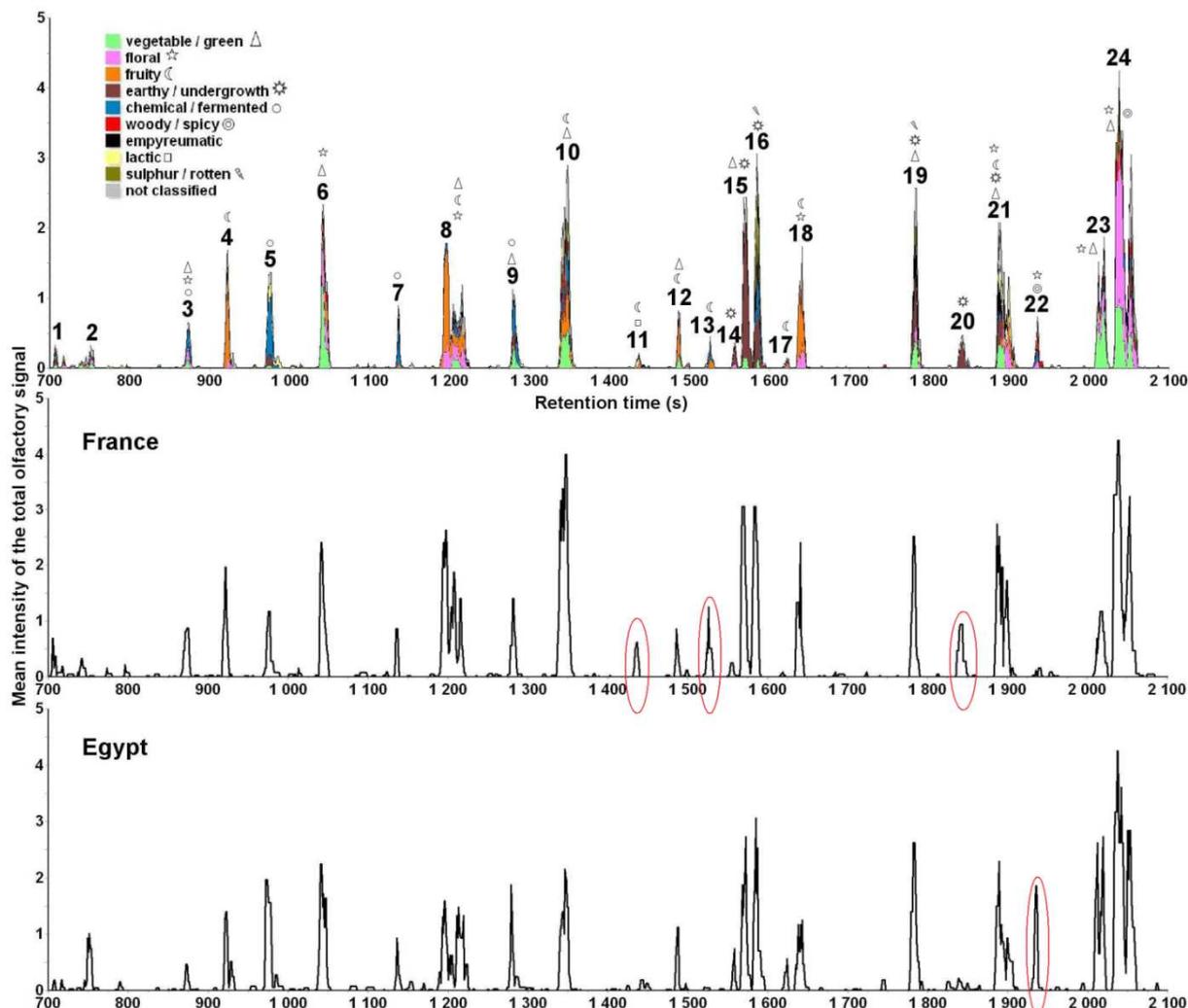


Figure 34: Aromagramme obtenu par l'analyse en GC/O multivoies des échantillons France (V04) et Egypte (V36) (colonne 5 % diphénylpolsiloxane, 95 % diméthylpolsiloxane, 60 m × 0,53 mm × 1,50 µm, 40 °C (5 min) puis à 4° C.min⁻¹ jusqu'à 220 °C (10 min))

Les identifications des composés et leurs descriptions olfactives dans chaque zone odorante ont été réalisées par analyse des spectres de masses avec les banques de données (NIST/EPA/NIH 2005 et Wiley 2007), les indices de rétention [128,129], et la comparaison de la description odorante avec le site web de référence « The good scents company » [130]. Le Tableau 17 résume l'ensemble des identifications. Des analyses supplémentaires ont été nécessaires pour compléter ce tableau. Des zones de co-élutions de composés ont été résolues par GC-GC/O (coupe à cœur), mais aussi grâce à un logiciel de déconvolution spatiale. Enfin, la GCxGC a été utilisée pour détecter des composés traces. L'ensemble de ces résultats est détaillé dans les paragraphes suivants.

Tableau 17: Identifications des zones odorantes

Zone odorante	Nom	RI litt apolaire ⁽¹⁾	RI apolaire ⁽¹⁾	Principales descriptions d'odeurs
1	pent-1-én-3-ol*	683	680	Champignon, raifort
2	pentanal	699	699	Fruité, foin
	éthylfuran	704	704	Malté
3	3-méthylpentan-3-ol	754	752	Fruité, rhum, végétal
4	4-méthylpentan-2-ol	759	758	Alcool, fruit mûr
5	3-méthylbut-2-énal*	783	783	Noisettes, chimique
6	<i>n</i> -hexanal	799	800	Vert, floral, fruité
7	furfural	836	831	Orange mûre, caramel, chimique
8	(<i>E</i>)-hex-3-énol	852	852	Vert, terreux
	(<i>E</i>)-hex-2-énal	857	854	Vert, fruité
	(<i>Z</i>)-hex-3-énol	852	855	Herbe verte
	(<i>E</i>)-hex-2-énol	862	863	Vert, fruité
	hexanol	865	866	Rhum, fruité, vert
9	acétate d'isoamyle	878	873	Banane, vert, foin, chimique
10	<i>n</i> -valérate d'éthyle	904	896	Pomme, vert
	(<i>Z</i>)-hept-4-énal	904	898	Vert, crémeux
	<i>n</i> -heptanal	900	900	Vert, haricot vert
11	inconnu*		937	Pomme, chou fleur, beurre
12	5-méthyl-(3H)-dihydrofuran-2-one	950	954	Pomme, vert, boisé, floral
13	benzaldéhyde	962	971	Amande, fruité, chimique
14	oct-1-én-3-ol	980	979	Champignon
15	6-méthyl-5-heptén-2-one	986	984	Pomme
	octan-3-one	989	986	Champignon
16	myrcène	989	990	Herbe verte, boisé, champignon
	2-pentylfuran	992	992	Fruité, vert
	hexanoate d'éthyle	985	996	Fruité, cireux, vert
17	(<i>Z</i>)-hex-3-ényl acétate	1007	1003	Fruité, vert, frais
18	acétate d'hexyle	1010	1009	Fruité, pomme, vert, citron, fruité
	acétate de (<i>E</i>)-hex-2-ényle	1014	1011	Fruité, pomme, vert, citron fruité
	(<i>E,E</i>)-hepta-2,4-diéнал	1009	1015	Vert
19	γ-terpinène	1061	1067	Boisé, citron
20	nonan-2-one	1091	1089	Savon
	2-méthoxy-3-(1-méthyléthyl)-pyrazine*	1091	1091	Boisé
	α-terpinolène	1088	1095	Citron
21	benzoate de méthyle	1106	1104	Chimique, amande
	nonanal	1104	1107	Concombre, thé bergamotte
	<i>cis</i> -rose oxyde**	1112	1115	Floral, boisé
22	3,5,5-triméthylcyclohex-2-énone**,	1120	1124	Menthe, boisé
	<i>trans</i> -oxyde de rose**	1127	1129	Rose
23	(<i>E,Z</i>)-nona-2,6-diéнал	1155	1158	Concombre, floral
	(<i>E</i>)-non-2-énal	1160	1164	Vert, gras
24	acétate de benzyle	1170	1168	Fruité, jasmin
	menthone	1172	1170	Frais, vert
	benzoate d'éthyle*	1171	1172	Fruité
	4-éthylbenzaldéhyde*	1171	1176	Amande
	Formiate de β-phényléthyle*	1178	1178	Rose, géranium
	2-méthoxy-3-(2-méthylpropyl)-pyrazine*	1183	1185	Poivron rouge
	caprylate d'éthyle	1193	1193	Fruité, tabac, boisé

RI⁽¹⁾: DB5; marqueur France *; marqueur Egypte ** ; marqueur France et Egypte

Des techniques de chromatographies gazeuses multidimensionnelles ont été utilisées afin d'améliorer le pouvoir résolutif et séparateur de l'analyse (difficultés souvent causées par des co-élutions multiples sur une seule dimension) [47] (Figure 35). La GC-multidimensionnelle nécessite deux colonnes chromatographiques, couplées différemment selon si l'on parle de GC-GC, correspondant à une technique de coupe à cœur ou si l'on parle de GC intégrale ou totale (GCxGC) [48]. La méthode de coupe à cœur GC-GC (heartcut) consiste en la sélection d'une fraction d'intérêt dans une première dimension (dans notre cas une colonne apolaire), fraction qui est ensuite envoyée (après cryofocalisation) dans une seconde dimension (colonne polaire) pour y être séparée. Cette « double » analyse permet ainsi d'obtenir des pouvoirs séparatifs bien plus importants et de résoudre des problèmes de co-élution de composés. En GCxGC, la totalité des effluents de la première colonne est transférée dans la deuxième dimension, augmentant considérablement le pouvoir de séparation des analytes.

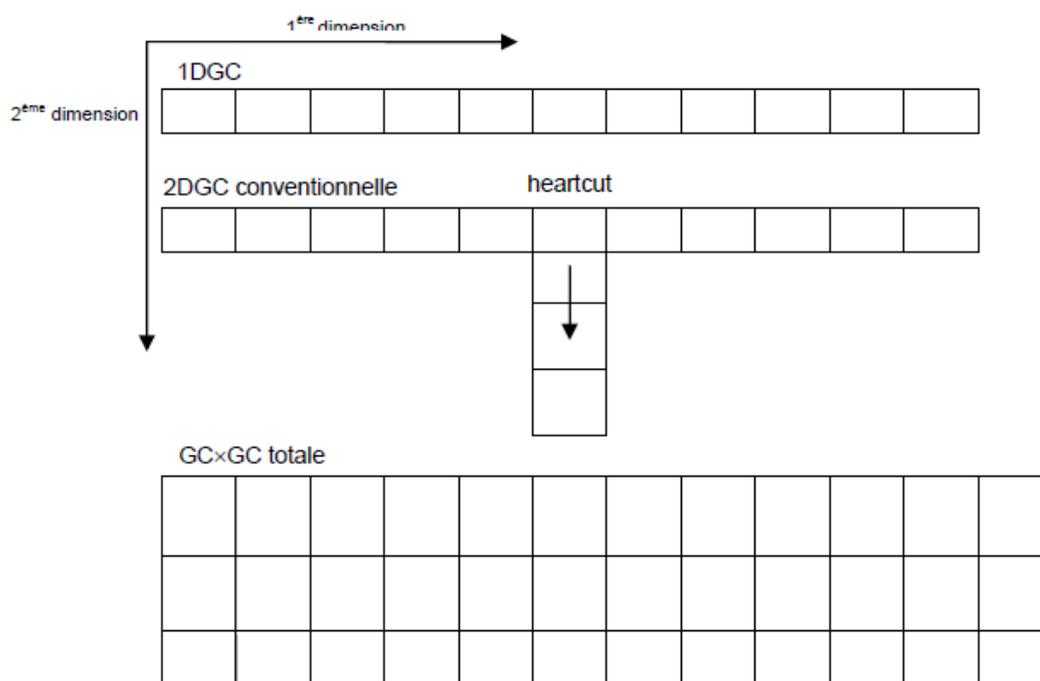


Figure 35: Illustration du gain de la séparation entre la 1D GC et de la 2D GC [126]

La détection d'un pic odorant peut correspondre aux composés identifiés dans la zone d'élution correspondante. Il n'est cependant pas impossible que l'odeur soit issue d'autres composés minoritaires, non détectés par le spectromètre de masse, présents dans cette zone d'élution. La coupe à cœur de la zone d'élution sur une autre polarité de colonne peut alors être une confirmation de l'identification. En effet, l'ordre d'élution et la séparation des composés étant modifiés, si l'odeur est une nouvelle fois assimilée au même composé : l'identification est confirmée.

Les zones 10, 23 et 24 de l'origine France, et les zones 22 et 24 de l'origine Egypte, ont été de nouveau analysées par GC-GC/O/MS simple voie. Le Tableau 18 récapitule ainsi les

composés identifiés par cette technique. La Figure 36 illustre la coupe à cœur de la zone 24 France avec les composés ayant pu être nouvellement identifiés. Pour les zones 10 et 23, l'heptanal, le (*E,Z*)-nona-2,6-diéнал et le (*E*)-non-2-éнал, déjà identifiés lors de l'analyse avec le système multivoies, ont été confirmés par cette technique, mais aucun autre composé n'a été mis en évidence.

Tableau 18: Identifications par GC-GC/O/MS

Zone de coupage	France	Egypte
10	Heptanal*	
22		Inconnu
23	(<i>E,Z</i>)-nona-2,6-diéнал* (<i>E</i>)-non-2-éнал*	
24	Ethylbenzoate 4-ethylbenzaldehyde β -phenylethylformate 2-methoxy-3-(2-methylpropyl)-pyrazine	Aucun

*ces composés ont été confirmés par GC-GC, déjà identifié lors de l'analyse sur système multivoies.

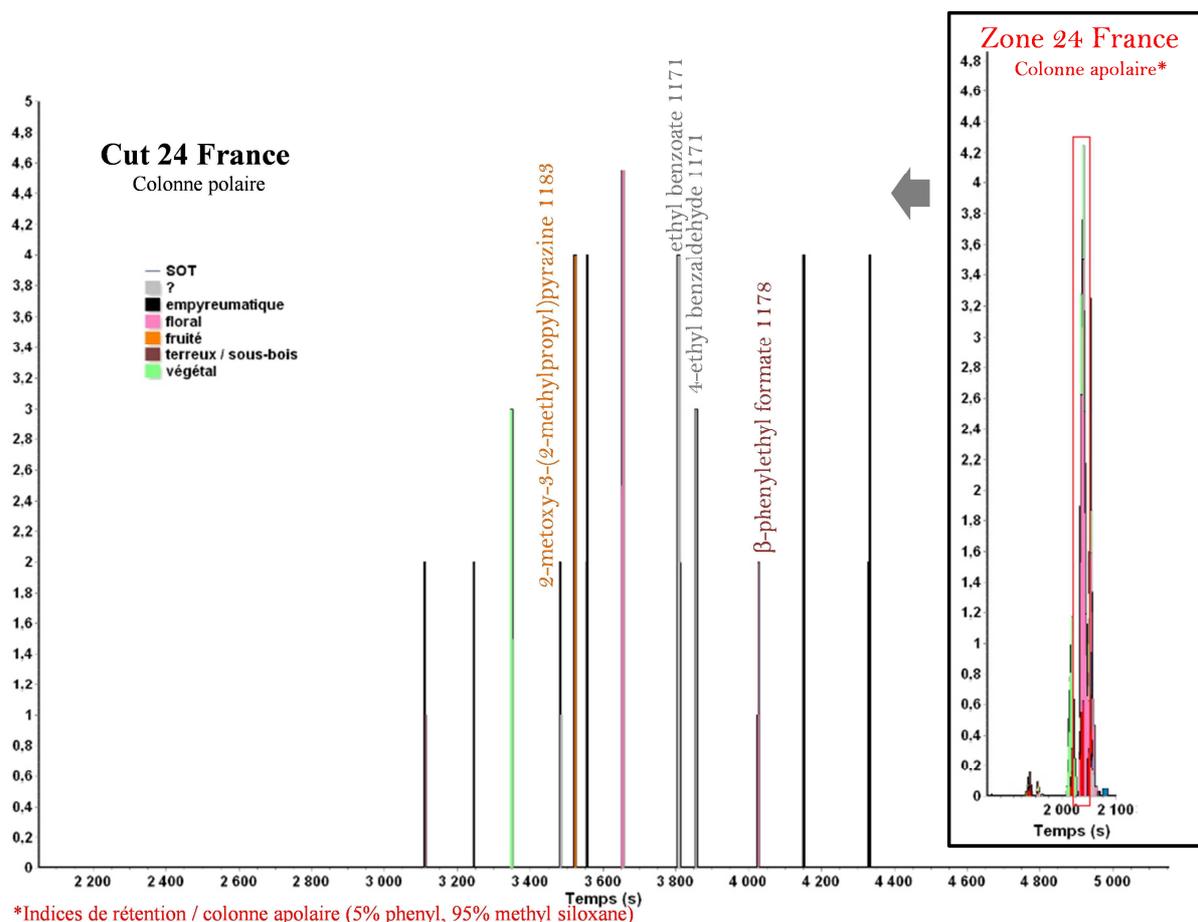


Figure 36: Coupe à cœur de la zone 24 France et identifications, en GC/O/MS monovoie

Enfin, la HS-SPME-GCxGC-ToFMS a été utilisée pour compléter les identifications des composés traces. Du fait de la meilleure sensibilité et résolution de ce spectromètre de masse en comparaison avec un quadropole et du pouvoir de séparation supérieur dû à la GCxGC, une recherche plus fine des composés odorants a pu être réalisée. Les zones odorantes ont été repérées grâce aux valeurs des indices de rétention. Cette technique permet l'analyse quasiment en simultanée des composés sur deux colonnes de polarités différentes. **Six composés ont ainsi pu être nouvellement identifiés : le 3-méthyl-pentan-3-ol, le furfural, la nonan-2-one, le 2-méthoxy-3-(1-méthoxyéthyl)-pyrazine, le 3,5,5-triméthylcyclohex-2-énone et le *trans*-oxyde de rose** (Tableau 19). La Figure 37 représente une portion zoomée du chromatogramme en deux dimensions permettant d'identifier le *trans*-oxyde de rose aux coordonnées (X= 1540 s et Y = 1,365 s).

Tableau 19: Identifications supplémentaires par GCxGC-ToFMS

France	Egypte
	3-méthyl-pentan-3-ol
	Furfural
	nonan-2-one
2-méthoxy-3-(1-méthyléthyl)-pyrazine	3,5,5-triméthylcyclohex-2-énone
	<i>trans</i> -oxyde de rose

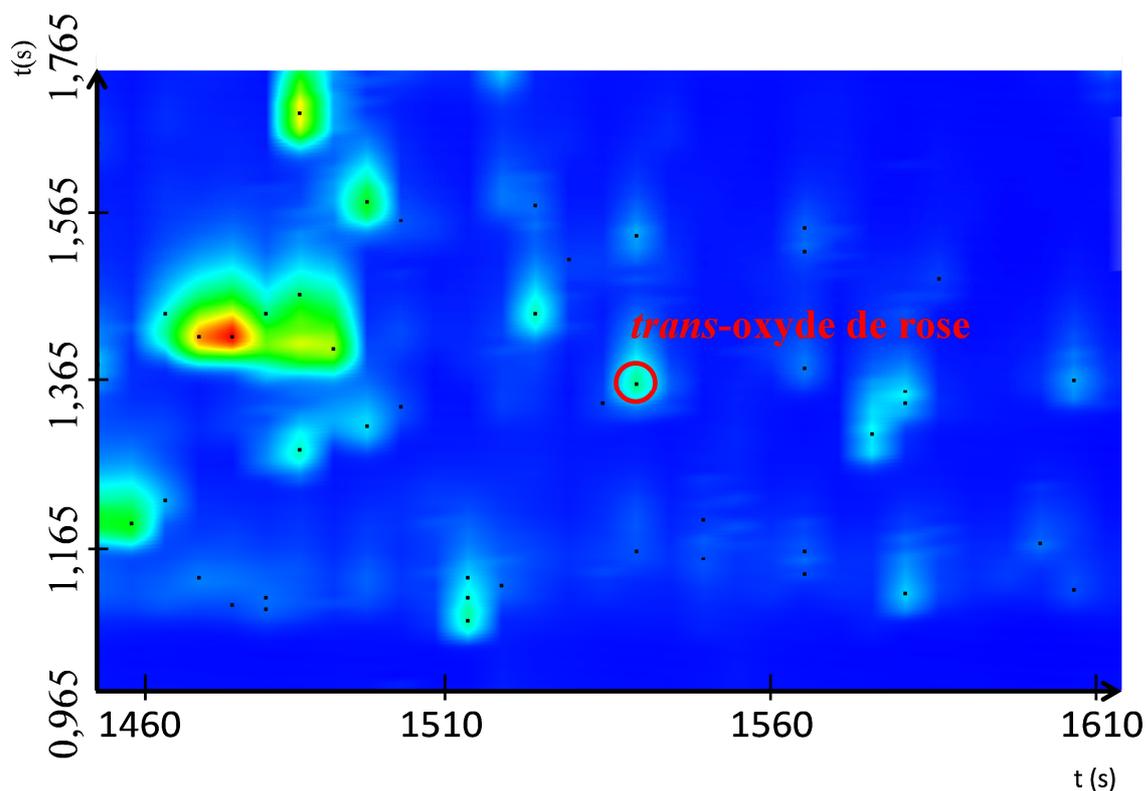


Figure 37: Identification du trans-rose oxyde par GCxGC-ToFMS (X, dimension apolaire = 1540 s, Y, dimension polaire = 1,365 s)

Pour finir, la **5-méthyl (3H)-dihydrofuran-2-one** a été identifiée après purification du spectre de masse obtenu en GC/O/MS en utilisant un logiciel de déconvolution spatiale MS³ Spectra Separation Software [131].

Les principales différences olfactives entre les deux origines sont :

- la présence de 2-méthoxy-3-(1-méthyléthyl)pyrazine (odeur boisée) avec une intensité de 1 % sur l'aromagramme pour l'origine France.

- la présence de 3,5,5-triméthyl-2-cyclohexénone (menthe, odeur boisée) et le *trans*-oxyde rose (odeur de rose) avec une intensité de 2 % pour le mélange des deux composés dans l'échantillon Egypte.

- un niveau de concentration différent en benzaldéhyde pour l'échantillon France (intensité de 1,3%) et l'échantillon Egypte (intensité proche de 0).

- la zone 11 non caractérisée a été identifiée comme étant spécifique à l'origine France avec une odeur de pomme, chou-fleur et beurre à une intensité de 0,5%.

Parmi ces distinctions, seule celle par le benzaldéhyde avait été décelée dans les analyses HS-SPME/GC-MS. Dans la zone 24, d'autres notes olfactives ont été perçues : florales, végétales et empyreumatiques pour lesquelles aucun composé n'a été détecté par le spectromètre de masse.

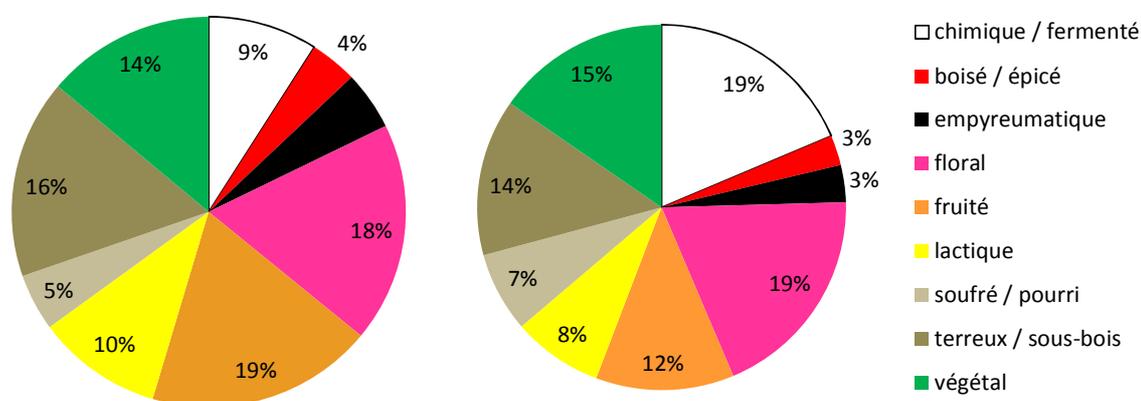


Figure 38: Répartition des classes olfactives dans les absolues de feuilles de violettes France (à gauche) et Egypte (à droite)

La Figure 38 montre la répartition des classes olfactives pour les deux origines. La part notes chimiques/fermentées est deux fois plus importante pour l'Egypte que pour la France. Cette particularité peut être due aux différences de qualité de solvants utilisés en Egypte, ainsi qu'aux pratiques de culture. La note fruitée est ensuite la différence la plus importante entre la France et l'Egypte (19 % / 12 %). Cependant, il est important de souligner que les classes fruité et floral peuvent être facilement confondues, tout comme les classes floral et verte.

Le 4-bromo-2-chlorophénol, détecté par HS-SPME-GC/MS à un indice de rétention de 1241 sur colonne apolaire, n'a pas été détecté dans l'analyse GC/O car il éluerait après la fin de l'analyse (au-delà des 30 min). Son impact olfactif n'a donc pas été évalué.

Avec leur présence à l'état de traces et des seuils de détection très bas, les composés suivants sont alors des composés odorants clés de l'absolue de feuilles de violette [132] : (*E,Z*)-nona-2,6-diéнал, (*E*)-non-2-éнал, *cis*-rose oxyde, (*Z*)-hept-4-éнал, oct-1-én-3-ol, *n*-nonanal, acétate d'hexyle, acétate d'isoamyle, *n*-heptanal, *n*-valérate d'éthyle, *n*-hexanal, 2-pentylfuran, myrcène, (*E*)-hex-2-éнал, *n*-pentanal, octan-3-one, benzoate d'éthyle, acétate de benzyle et (*Z*)-hex-3-éanol.

L'étude par DHS-GC/O/MS a permis d'identifier 49 composés (Tableau 20). Sur cet ensemble de composés, seuls 17 ont été identifiés par l'étude HS-SPME-GC/MS.

Tableau 20: Composés odorants actifs détectés dans les analyses HS-SPME-GC/MS

	I.R	Odorant	Composés	I.R	Odorant
acide acétique	599		eucalyptol	1018	
acétate d'éthyle	602		limonène	1020	
pent-1-én-3-ol	669	X	Inconnu 3	1045	
Pentanal	675	X	Inconnu 4	1064	
toluene	750		benzoate de méthyle	1071	X
hexan-2-one	768		Inconnu 5	1071	
Inconnu 1	775		nonanal	1086	X
Inconnu 2	784		linalol	1088	
hexan-2-ol	791		alcool phényléthylique	1091	
(<i>E</i>)-hex-2-éнал	829	X	undécane	1100	
(<i>Z</i>)-hex-3-éanol	843	X	Inconnu 6	1118	
<i>p</i> -xylène	853		(<i>E,Z</i>)-nona-2,6-diéнал	1129	X
(<i>E</i>)-hex-2-éanol	855	X	menthone	1132	X
xylène**	855		acétate de benzyle	1138	X
hexanol	859	X	(<i>E,Z</i>)-nona-2,6-diéanol	1153	
benzaldéhyde	932	X	Inconnu 7	1165	
oct-1-én-3-ol	969	X	salicylate de méthyle	1171	
2-pentylfurane	981	X	α -terpinéol	1174	
Hexanoate d'éthyle	986		dodécane	1200	
(<i>E,E</i>)-hepta-2,4-diéнал	986	X	Inconnu 8	1215	
acide hexanoïque	987		Inconnu 9	1241	
acétate (<i>Z</i>)-hex-3-ényle	991	X	tridécane	1300	
acétate d'hexyle	1000	X	eugénol	1334	
décane	1000		jasmone	1369	
alcool benzylique	1015				

En conclusion, 70 composés volatils ont été caractérisés dans cette étude, dont 61 jamais répertoriés pour cette espèce. L'identification de composés par HS-SPME-GC/MS et DHS-GC/O/MS apporte des informations complémentaires dans le secteur arômes et parfums (compte tenu aussi des différents systèmes d'extractions des composés volatils pour les analyses GC/O et HS-SPME-GC/MS). 17 composés ont été identifiés par ces deux techniques. 23 composés ont été identifiés seulement par GC/MS et 30 composés, seulement par GC/O/MS. Les résultats des analyses GC/O corrént très bien avec les résultats obtenus par analyse sensorielle : très forte odeur de concombre avec le (E,Z)-2,6-nonadiénal, note champignon/terreuse avec l'oct-1-én-3-ol et des notes vertes pour les autres composés. Par ailleurs, l'échantillon d'origine France est deux fois plus concentré en (E,Z)-2,6-nonadiénal en comparaison avec celui de l'origine Egypte, mais aussi au moins deux fois plus concentré en oct-1-én-3-ol, et enfin le (Z)-hex-3-énol était trois fois plus concentré d'après les analyses en HS-SPME-GC/MS. Parmi les composés odorants, le *cis*-oxyde de rose serait spécifique à une origine : l'Egypte. Ainsi les différences mises en évidence par l'analyse sensorielle sont dues à la fois à diverses concentrations de ces composés, mais aussi à la présence de composés traces avec un plus faible seuil de détection olfactif. L'accord olfactif entre les différents composés, entre aussi en jeu dans la perception des odeurs.

Ce travail sur les odorants de l'absolue de feuilles de violette a donné lieu à un article publié dans la revue Chemistry and Biodiversity [133].

Une majeure partie de la fraction volatile de l'absolue de violette a pu être identifiée grâce notamment à la multitude des bases de données spectrales existantes. En revanche, la recherche et l'identification des composés non volatils ne pouvant s'appuyer sur ce type de ressources est bien plus laborieuse et difficile. La complexité et le manque de connaissance sur la fraction non volatile imposent donc l'utilisation d'une technique d'analyse globale couplée à des moyens de retraitements puissants. Les techniques métabolomiques répondant parfaitement à ce cahier des charges ont donc été envisagées et évaluées dans la suite de ce travail de thèse.

2.2.3. Etude de la fraction non volatile

La mise au point d'une approche métabolomique sur une matrice spécifique nécessite l'optimisation de plusieurs étapes : la préparation de l'échantillon, le développement de la méthode d'analyse, et la mise en forme des données analytiques pour le traitement statistique. Mais avant d'entrer dans ces détails de mises au point, un paramètre essentiel ne doit pas être négligé : la connaissance de l'échantillon étudié, indispensable pour délimiter le champ d'investigation et définir les questions rationnelles auxquelles il nous est possible de répondre. Les informations obtenues sur les échantillons collectés permettront de mieux définir les questionnements avant d'envisager toute autre mise au point.

L'optimisation des différentes étapes nécessaires à la réalisation d'une étude métabolomique est discutée dans les paragraphes suivants. Les analyses ont été réalisées en UHPLC-ToFMS, instrument largement indiqué dans le cas d'études métabolomiques en spectrométrie de masse (voir Chapitre 1). Dans un premier temps, nous avons alors optimisé la séparation chromatographique, pour faciliter ensuite le traitement des données.

2.2.3.1. Développement de la méthode d'analyse

a) Choix de la colonne

Une étude préliminaire a été réalisée avec une colonne silice greffée d'octadecyl silane (Acquity UPLC® BEH C₁₈ 130 Å ; 1,7 µm ; 2,1 mm x 100 mm) avec une dilution de l'absolue au centième dans l'éthanol. Le temps d'analyse a été fixé à 40 min à un débit de 0,4 mL/min pour optimiser la séparation des composés. La rémanence de nombreux composés sur la colonne après analyse, a nécessité la mise en place d'une étape de nettoyage entre chaque échantillon d'absolue. L'injection d'un blanc éthanol était alors réalisée en conditions isocratiques avec 100 % d'isopropanol pendant 6 minutes, à un débit de 0,1 mL/min. Deux principaux inconvénients étaient alors observés : la nécessité d'insérer l'analyse d'un blanc éthanol dans les conditions d'analyse de l'étude, afin d'éliminer les composés résiduels potentiellement induits par le lavage à l'isopropanol mais aussi pour reconditionner la colonne pour l'échantillon suivant (particulièrement pour le changement de débit imposé par la méthode de lavage à l'isopropanol pour éviter les surpressions). Afin d'optimiser la durée des séquences d'analyses et maintenir les performances analytiques sur un grand nombre d'injections, une autre colonne a été étudiée.

Les colonnes de silice greffée phényl-hexyl offrent une sélectivité différente : grâce à des interactions π - π , elles ont une bonne sélectivité pour les composés à noyaux aromatiques, motif structural important dans produits de type : « absolues ». Elles présentent aussi une

capacité de rétention moindre des composés lipidiques. Ainsi, une colonne phényl-hexyl (Acquity UPLC® BEH Phenyl (130 Å ; 1,7 µm ; 2,1 mm x 100 mm)) a permis un gain de temps, du fait d'une meilleure élution de l'ensemble des composés de la matrice (Figure 39) : l'étape de nettoyage devenant alors inutile. Le temps d'analyse a été optimisé à 32 min, en comparaison des 86 min nécessaires avec une colonne C₁₈ pour analyser l'échantillon suivant.

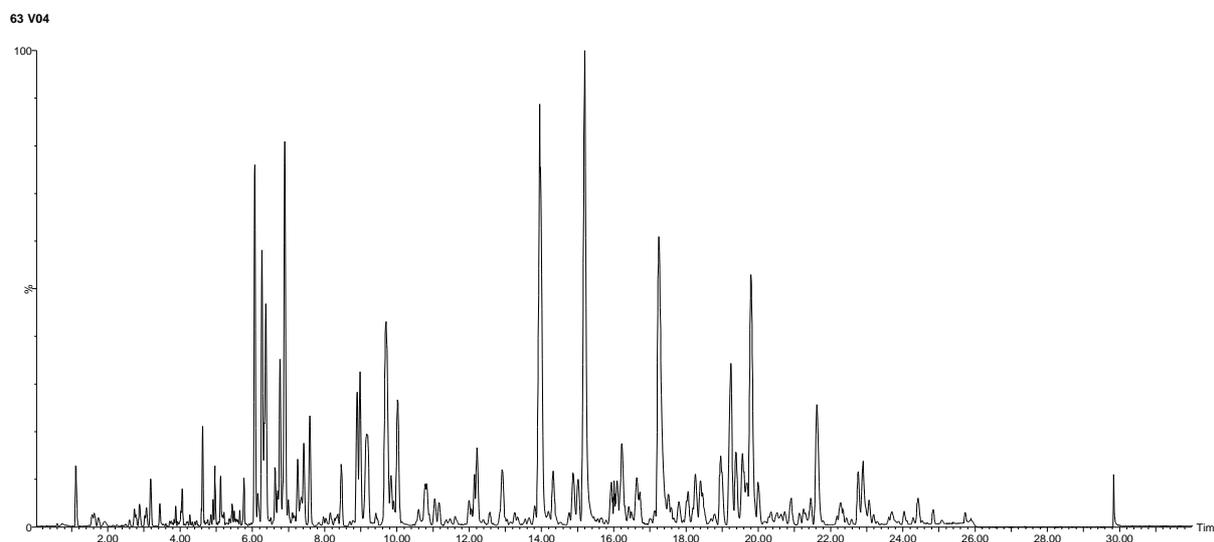


Figure 39: Chromatogramme d'une absolue France (V04) dans les conditions optimisées sur colonne Phényl-hexyl

b) Le gradient

Nos expériences ont montré qu'en moyenne 1500 ions pouvaient être détectés au cours d'une seule analyse de nos extraits. Un premier essai de gradient a été étudié avec H₂O:AF (Acide Formique) (99,9:0,1) (solvant A) et CH₃CN:AF (99,9:0,1) (solvant B) de 10 % de B à 100 % de B. Il a ensuite été optimisé pas à pas jusqu'à l'obtention de la meilleure séparation en un minimum de temps. Le meilleur compromis a été trouvé avec un débit de 0,4 mL.min⁻¹ : en conditions isocratiques pendant 1 min à 22 % de B, gradient linéaire de 22 % à 51 % de B en 4 min, gradient linéaire de 51 % à 88 % de B pendant 20 min, conditions isocratiques à 100 % de B pendant 4 min et enfin 3 min à 22 % de B pour revenir aux conditions initiales (Figure 40).

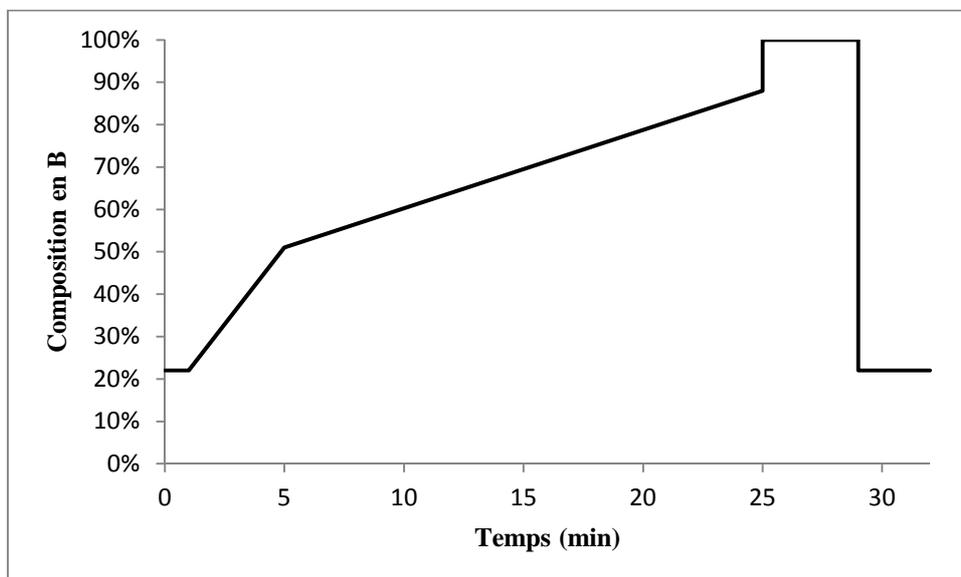


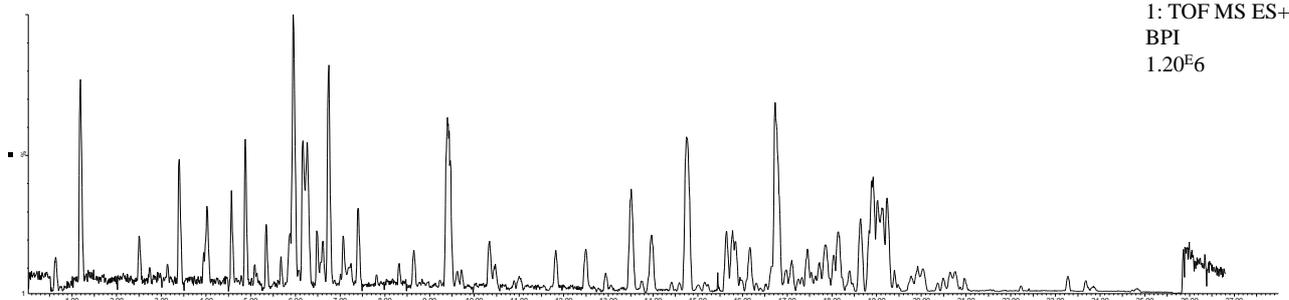
Figure 40: Gradient optimisé

c) Température de colonne

La température de colonne a été testée à 30 °C et 40 °C. Il a été choisi de chauffer la colonne à une température minimale de 30 °C afin de ne pas subir les fluctuations de températures potentielles du laboratoire, et ainsi assurer une meilleure répétabilité.

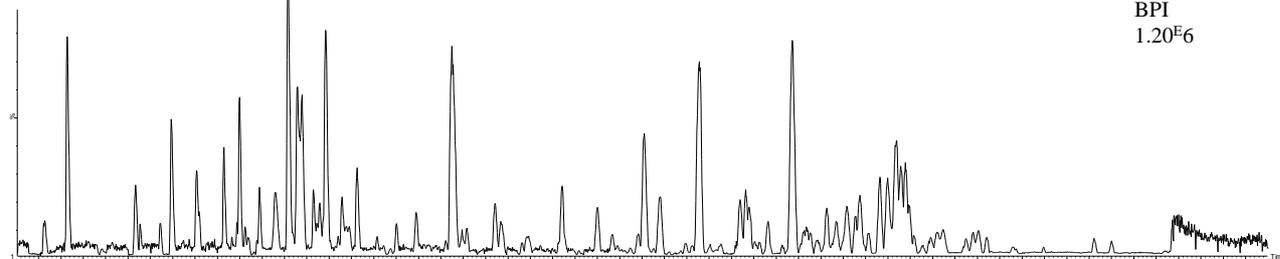
La température de 40 °C a été testée pour évaluer l'influence d'une augmentation de température sur la séparation des composés. Des résultats similaires ont été obtenus pour les deux températures aussi bien au niveau des profils (Figure 41) que du nombre de composés détectés (d'après une extraction d'ion avec Markerlynx). La température de 30 °C a alors été sélectionnée.

T = 40 °C



1: TOF MS ES+
BPI
1.20E6

T = 30 °C



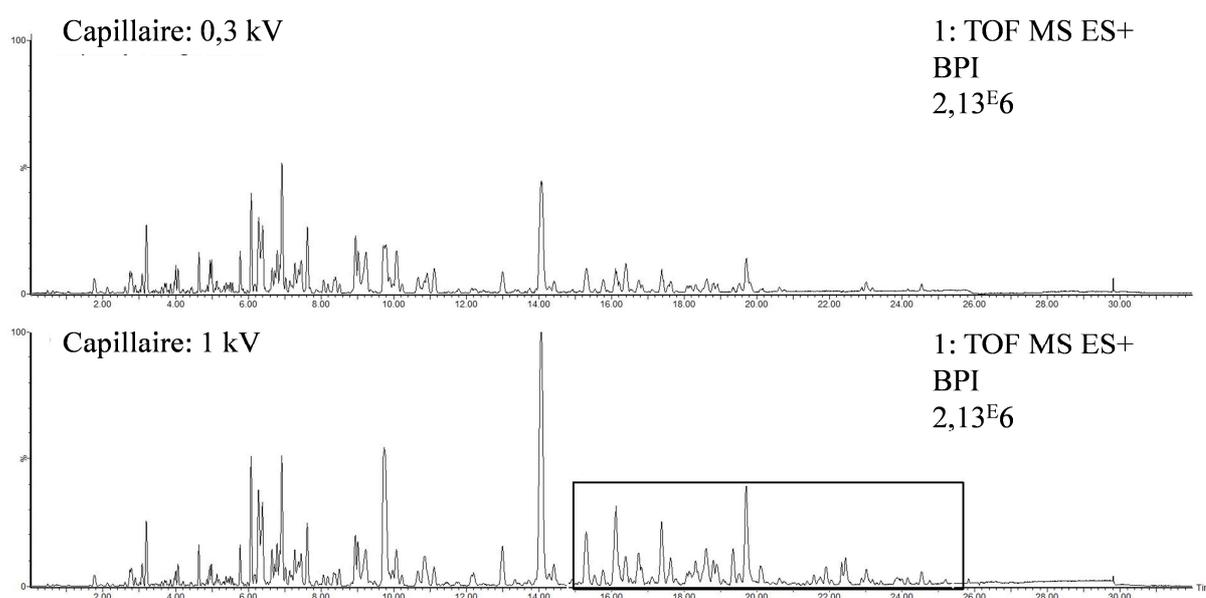
1: TOF MS ES+
BPI
1.20E6

Figure 41: Comparaison des chromatogrammes de V04 (France) à T = 40 °C et T = 30 °C

La séparation chromatographique a ainsi été optimisée sur colonne Phényl, thermostatée à 30 °C, à un débit de 0,4 mL.min⁻¹, avec le gradient optimisé Figure 40.

d) Conditions du spectromètre de masse : voltage du capillaire

L'électrospray en mode positif a été le premier mode étudié. Le voltage du capillaire a été optimisé à 1 kV (Figure 42). En effet une perte de sensibilité était observée à 0,3 kV (voltage conseillé par le constructeur en mode LC), pour les composés éluant après 15 min.



Capillaire: 0,3 kV

1: TOF MS ES+
BPI
2,13E6

Capillaire: 1 kV

1: TOF MS ES+
BPI
2,13E6

Figure 42: Comparaison des chromatogrammes avec différents voltages de capillaire: 0,3 kV et 1 kV dans les conditions chromatographiques optimisées

L'électrospray en mode négatif a été utilisé pour l'étude des origines géographiques France/Egypte, avec un voltage de capillaire à 1 kV aussi, mais un cône d'échantillonnage de 40 V. Les espèces ioniques détectées pour un analyte vont dépendre de sa nature et du mode d'ionisation choisi. Ainsi, les études en positif et en négatif permettent d'acquérir des données complémentaires (ou doubles, pour les constituants s'ionisant dans les deux modes). Il n'est pas possible d'effectuer une comparaison directe entre ces deux modes : chacun nécessite un paramétrage différent de la source d'ionisation pour travailler dans des conditions optimales. Dans le cadre de notre étude exploratoire, le volume d'informations étant déjà très important en mode positif, nous avons choisi de continuer l'évaluation de l'approche métabolomique avec ce paramétrage.

Une fois la méthode d'analyse développée et optimisée, six séries d'analyses ont été réalisées (Figure 43). L'ensemble des 80 échantillons de l'étude de la violette (purs et adultérés) ont été préparés (Chapitre 3) puis analysés trois fois. 240 analyses d'une durée de 32 minutes chacune devaient alors être programmées ; soit 128 h. Un tel volume d'analyses doit être mis en place méthodiquement afin de contrôler au mieux les variabilités analytiques intervenant au cours des analyses. Une étude préliminaire a montré la stabilité du système analytique pour une durée de 40 h d'analyses. Pour contrôler et maîtriser les variations, il est indispensable de suivre le bon déroulement d'une série par l'ajout de blancs et surtout de pools. Le pool consiste en un mélange équivolumique de l'ensemble des échantillons de l'étude (les 80 échantillons dans cette étude). Le blanc permet de contrôler la présence de contaminations dans le système analytique. Les échantillons pools, distribués tout au long de la série d'analyses, serviront de référence pour évaluer et le cas échéant corriger les biais éventuels observés au niveau des intensités mesurées dus aux variations au cours de la série d'analyses et entre les différentes séries d'analyses. Les échantillons et leurs répliqués ont été distribués aléatoirement en six séries d'analyses en respectant la construction méthodique d'une série.

Entre chaque série d'analyse étaient réalisés :

- un nettoyage de source (cône, surcône, baffle plate)
- les phases mobiles, ainsi que la solution du calibrant de référence (lockmass) étaient fraîchement préparées
- la calibration de l'appareillage ainsi que l'ajustement de la résolution et de l'intensité du calibrant de référence (lockmass).

Une série d'analyses comprenait alors : l'analyse d'un blanc solvant (éthanol), dix analyses de l'échantillon pool pour le conditionnement de la colonne [134], et ensuite une alternance de quatre échantillons/un pool, et enfin un blanc pour clore la série (Figure 43).

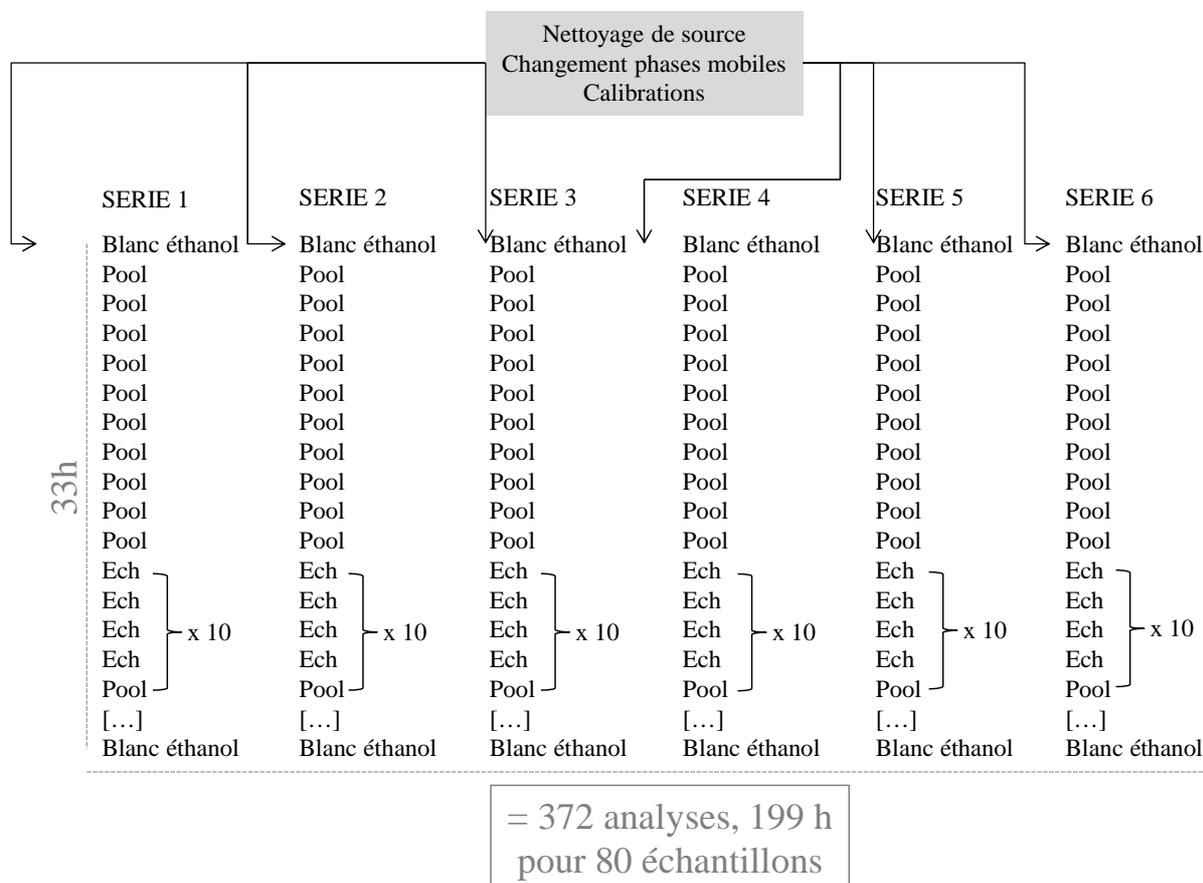


Figure 43: Configuration des séries d'analyses pour l'absolue de violette

2.2.3.2. Traitement des données

a) Observation préliminaire des données sous Masslynx

Dans un premier temps, les données acquises sont observées sous Masslynx, logiciel de traitement des chromatogrammes. Les chromatogrammes des dix pools du début de chaque série sont superposés afin de contrôler le bon équilibre du système analytique en début de série (alignement des temps de rétention, contrôle de la répétabilité des intensités des ions). Cette vérification peut être réalisée pendant le déroulement de la série, et permettre ainsi de détecter de potentiels problèmes dus à l'instrument ou aux préparations de solvants utilisés (problèmes de fuite, sur le système LC ou le spectromètre de masse impactant l'alignement des temps de rétention, de contaminations faisant perdre de la sensibilité au signal etc.). Ensuite, les pools insérés dans la série d'analyse sont aussi superposés, afin de vérifier le bon déroulement de la série. Enfin, les pools de début et de fin de série de l'ensemble des séries

sont superposés, pour évaluer là encore les biais entre les différentes séries d'analyses. Cette dernière étape permet notamment d'évaluer les décalages de temps de rétention et les largeurs de pics à mi-hauteur, informations utiles pour paramétrer l'extraction des ions sous Markerlynx XS par la suite.

Cette étude préliminaire permet de vérifier rapidement le bon déroulement des analyses, et valide la possibilité de réaliser un traitement statistique sur ces données.

b) Export des données dans Markerlynx XS

L'extraction des ions dans une matrice numérique est réalisée avec Markerlynx XS. Pour cela, une nouvelle séquence d'échantillons est construite avec l'ensemble des analyses des six séries, en excluant les neuf pools présents au début de chaque séquence (on conserve le 10^{ème} utile par la suite) pour la mise en conditions du système analytique ainsi que les analyses de blancs (Figure 44). **Cette séquence est constituée de 306 analyses.**

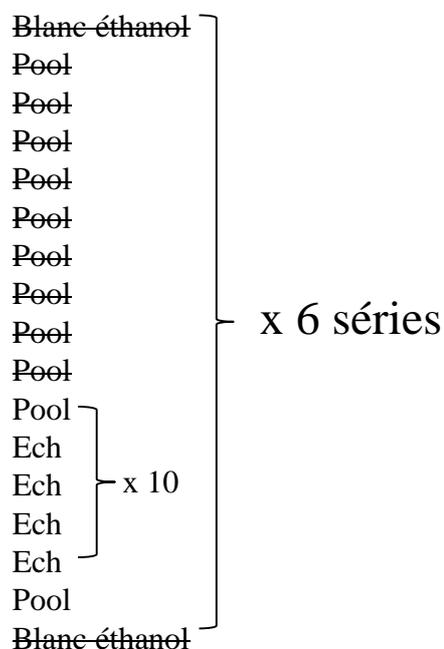


Figure 44: Séquence de traitement des données sous Markerlynx XS

Une première détermination des paramètres est réalisée : la largeur de la fenêtre de masse (XIC Window), la largeur de pic à 5% de la hauteur, le bruit de la ligne de base entre deux pics, la fenêtre de temps de rétention, la fenêtre de masse (Mass Window), et le niveau d'élimination du bruit. Il faut différencier la « XIC Window » de la « Mass Window ». La « XIC window » fixe les bornes d'extraction d'un ion dans un chromatogramme. Elle permet de discriminer deux ions de m/z très proches (par exemple 219,0001 et 219,0020), éluant au même temps de rétention. La « Mass Window » est prise en compte lors de l'alignement des données entre les différents chromatogrammes. Elle permet de déterminer si un ion m/z

219,0001 éluant à t dans le chromatogramme 1, est le même que celui de m/z 219,0001 éluant à t+15 s dans le chromatogramme 2 par exemple.

Le temps de calcul de Markerlynx pouvant être long (entre 2 et 3 h pour l'ensemble des données), un premier test sur quatre échantillons est tout d'abord mené pour faciliter l'optimisation.

Une fois la première matrice obtenue (Tableau 21) plusieurs vérifications sont effectuées dans la matrice numérique exportée sous EXCEL. Dans un premier temps le nombre de 0 (intensité = 0) dans la matrice numérique d'ions est évalué. Un nombre de 0 trop important met en évidence un mauvais paramétrage de l'extraction des ions. Toutefois il faut prendre en compte le nombre de groupes d'échantillons⁹ différents (autant de variabilités possibles) au sein de l'étude. S'il y a un grand nombre de groupes, il y aura de ce fait un plus grand nombre de différences et de phénomènes d'absence/présence d'ions spécifiques : d'où l'introduction de nombreux 0 dans la matrice.

Le deuxième point à contrôler est la non duplication d'un ion (extraction multiple d'un seul ion). Ce test permet de vérifier le bon paramétrage de la « XIC window » et de la « Mass Window ». Dans le cas des paramètres fixés dans ces études :

- la « Mass Window » = 0,05 Da, signifie qu'un ion à m/z +/- 0,025 Da est considéré comme étant identique entre deux chromatogrammes à un temps de rétention donné (respectant la fenêtre de temps de rétention fixée).
- la « XIC Window » = 0,02 Da, signifie qu'un ion en dehors des bornes : m/z +/- 0,01 Da à un temps de rétention donné dans UN chromatogramme est différent de l'ion à m/z +/- 0,01 Da. Deux ions seront alors extraits dans ce chromatogramme à ce temps de rétention donné.
- la valeur de la fenêtre de temps de rétention est aussi très importante dans le processus d'extraction. Si celle-ci est choisie trop large, des ions de même m/z dans différents chromatogrammes mais différant par un temps de rétention très proche pourraient être fusionnés sous une seule étiquette « tr, m/z » (cas d'isomères par exemple).

Une fois ces paramètres validés, l'extraction est réalisée sur l'ensemble des données brutes.

⁹ un groupe d'échantillon peut être : des échantillons de même origine géographique, de même origine botanique, des échantillons ayant une spécificité particulière en commun etc. Les échantillons sont rassemblés par groupes selon leurs similitudes. Les groupes sont prédéfinis lors de la planification de l'étude, selon la problématique rencontrée.

Tableau 21: Matrice numérique obtenue après extraction des données

m/z - tR	Ion 1	Ion 2	Ion 3
Ech 1	INTENSITES		
Ech 2			
Ech 3			

c) Prétraitement de la matrice numérique

La matrice numérique finale brute obtenue, une première Analyse en Composantes Principales (ACP) est calculée avec le module Extended Statistics de Markerlynx (ou SIMCA-P / donnant lieu aux mêmes résultats). Cette ACP permet de mettre en évidence d'éventuels problèmes dus aux étapes précédentes de la méthode (étape analytique, étape d'extraction des ions, étape de prétraitement de la matrice). Le mode de normalisation appliqué est le mode Pareto, qui applique le calcul suivant aux différents ions : $\frac{y_i - y_{imoy}}{\sqrt{\sigma_{y_i}}}$ où y_i est l'intensité de l'ion i , y_{imoy} la moyenne des intensités de l'ion i dans l'ensemble des échantillons, et σ_{y_i} la valeur de l'écart type de l'ion i dans l'ensemble des échantillons. Ce mode permet de donner plus de poids aux ions de faibles intensités. Il est largement utilisé dans le traitement de données LC/MS : en effet, les ions spécifiques des groupes d'échantillons peuvent aussi bien être des ions de faibles intensités que des ions de fortes intensités. Ainsi, une normalisation Pareto permet de donner autant de poids à ces deux types de données, et ainsi de construire des modèles statistiques s'appuyant sur un maximum d'informations (et donc d'expliquer au mieux la variabilité).

Dans ce modèle (ACP), la répartition des différents pools des six séries peut mettre en évidence un effet intra et/ou inter série (variation des intensités des ions des pools au cours du temps). Ceci a été le cas avec le jeu de données de la violette (voir Figure 45a). Une correction de type Van der Kloet [135] peut être alors être appliquée sur la matrice brute à partir des échantillons pools afin de réajuster les intensités des ions ayant pu évoluer intra-série ou inter-série.

Au sein d'une même série, la variation entre deux pools successifs est considérée comme linéaire. La correction est alors basée sur une régression du premier ordre.

Soit X la matrice numérique.

Soit $X_{p,b,pool}$, la valeur d'intensité du pic p d'un pool de la série b .

Soit i : le numéro d'injection de l'échantillon pool dans la série b (pour le premier pool de la série : valeur = 1, pour le deuxième pool, valeur = 6 etc.).

$$X_{p,b,pool} = \beta_{p,b,pool} * i_{b,pool} + \alpha_{p,b,pool}$$

Équation 3 : Calcul de α et β

→ α et β sont calculés avec l'Équation 3.

Soit $G_{p,b,i}$: valeur de calibration linéaire du pool pour le pic p d'un échantillon i dans le batch b .

Soit i : le numéro d'injection de l'échantillon dans la série b (pour le premier échantillon de la série : valeur = 2, pour le deuxième échantillon, valeur = 3, pour le cinquième échantillon, valeur = 7 etc.).

$$G_{p,b,i} = \beta_{p,b,pool} * i_b + \alpha_{p,b,pool}$$

Équation 4 : Calcul de $G_{p,b,i}$

→ Calcul de $G_{p,b,i}$ par l'Équation 4.

$$X'_{p,b,i} = X_{p,b,i} / G_{p,b,i}$$

Équation 5 : Calcul de X'

→ X' la nouvelle matrice corrigée intra-série par l'Équation 5.

Pour l'effet inter-série, la correction pour l'ensemble des séries est basée sur une série choisie comme étant la référence. La variance des échantillons est supposée uniforme au sein d'une série.

Soit $A_{p,b}$ la valeur moyenne de l'intensité d'un pic p dans tous les pools d'une série b .

Soit $A_{p,1}$ la valeur moyenne de l'intensité d'un pic p dans tous les pools de la série de référence.

Soit $Cf_{p,b}$ le facteur d'amplification de l'intensité d'un pic par rapport à une série de référence.

$$Cf_{p,b} = A_{p,1} / A_{p,b}$$

Équation 6 : Calcul de $Cf_{p,b}$

→ Calcul de $Cf_{p,b}$ par l'Équation 6.

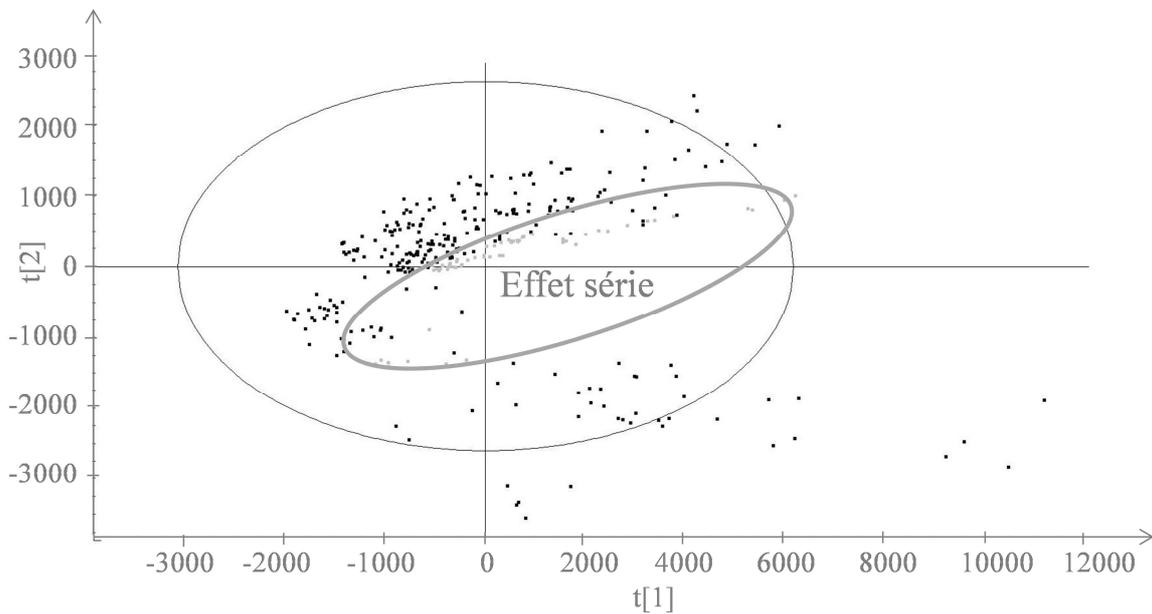
$$X''_{p,b,i} = C_{f_{p,b}} * X'_{p,b,i}$$

Équation 7 : Calcul de X''

→ X'' la nouvelle matrice corrigée intra et inter-série par l'Équation 7.

La vérification de l'application de ce prétraitement peut être effectuée en réalisant une nouvelle ACP ; les échantillons pools devant cette fois être regroupés au centre du modèle, comme dans le cas de notre étude (Figure 45b).

a.



b.

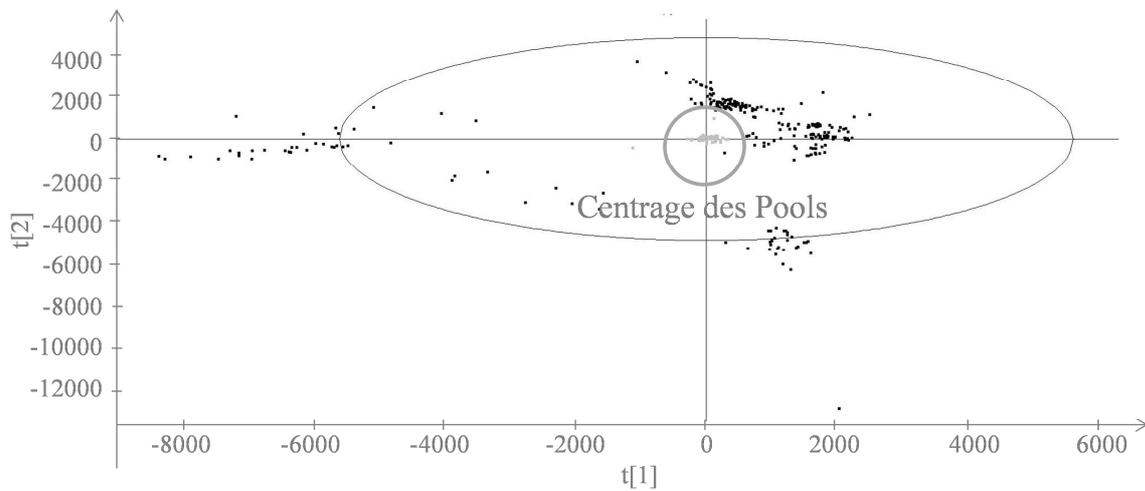


Figure 45: Correction des données brutes par Van der Kloet des 306 analyses constituant la nouvelle séquence pour le traitement sous Markerlynx XS: a. ACP avant correction ; b. ACP après correction

Enfin, la moyenne des réplicats est calculée pour réduire encore davantage la déviation analytique pouvant intervenir au cours des différentes séries (les trois réplicats sont distribués de manière aléatoire dans les différentes séries). La moyenne des pools est aussi calculée afin de contrôler la position centrée de cet échantillon moyenné dans la représentation graphique du modèle statistique.

Un coefficient de variation CV peut aussi être calculé par l'Équation 8 suivante (avant moyenne des réplicats).

$$CV = \frac{ABS(CV_{\text{échantillon}} - CV_{\text{pool}})}{CV_{\text{pool}}}$$

Équation 8 : Calcul du CV

Le coefficient de variation de chaque ion ($CV_{\text{échantillon}}$) est calculé considérant la valeur d'intensité de cet ion dans la totalité des analyses des échantillons (hors pools) ; le même calcul est fait (CV_{pool}) afin d'évaluer le coefficient de variation de chaque ion dans l'ensemble des pools. Le CV doit avoir une valeur inférieure à 30 % [134]. Une valeur supérieure suggère une variation de l'ion trop importante pour être significative des échantillons (variation davantage expliquée par la variation inhérente à un échantillon spécifique). Les ions ayant alors des valeurs de $CV > 30\%$ sont éliminés de la matrice. Ce dernier tri des ions n'est pas toujours applicable. Dans le cas précis de notre étude, nous ne l'utilisons pas. En effet, les séries contiennent des analyses d'échantillons issus de plusieurs groupes différents. Les variations sont alors très nombreuses entre ces groupes. La suppression d'ions ayant des $CV > 30\%$ pourrait alors induire la suppression des ions d'intérêts marqueurs de ces groupes. Par exemple, l'étude de l'ajout de molécules particulières dans certains échantillons (cas des adultérations) et pas dans d'autres peut alors introduire un biais dans ces calculs et ainsi induire la suppression de l'ion correspondant. Il aura effectivement une valeur de CV plus importante que 30% considérant que ces ajouts n'aient par exemple été réalisés que dans 9 échantillons/70, leur poids étant donc proportionnellement aussi faible dans l'échantillon Pool.

Une fois les données corrigées, et moyennées, la moyenne des pools est supprimée de la matrice finale pour la construction des modèles statistiques suivants.

2.2.3.3. Discussion sur la validation d'un modèle statistique PLS-DA

La régression linéaire des moindres carrés [136] (PLS-DA) est le modèle statistique qui a été appliqué à chaque jeu d'échantillons, extrait de la matrice numérique finale, pour lequel une problématique précise était posée. En effet, ce type de modèle recherche la relation entre des variables prédictives et des variables dépendantes. Ce paragraphe va poser **les règles de validation d'un modèle PLS-DA**, indispensables à l'interprétation des résultats.

Un modèle PLS-DA est validé selon la valeur de R^2Y cumulée obtenue pour les premières composantes principales (en général la ou les deux première(s)), la valeur du Q^2 cumulée et selon le résultat du test de permutation.

- R^2Y mesure l'explication de la variabilité entre les groupes d'échantillons pour le modèle PLS-DA constitué (pour un nombre de composantes principales fixe), Q^2 représente l'erreur de prédiction du modèle. Les deux valeurs (les valeurs cumulées des composantes) doivent être supérieures à 0,5 et le plus proche de 1, Q^2 étant toujours plus petit que R^2Y . Nous nous sommes fixés des seuils de **$R^2Y > 0,5$ et $Q^2 > 0,5$, pour que le modèle passe le premier test de validation**. Le calcul de Q^2 se fait par le biais de validations croisées. Le jeu de données utilisé est divisé par 7 (sous SIMCA-P et Markerlynx XS) : $6/7^{\text{ème}}$ des échantillons forment le modèle, et $1/7^{\text{ème}}$ des données sont utilisées pour la validation. L'erreur quadratique moyenne est alors calculée. Le calcul est répété 7 fois jusqu'à ce que l'ensemble des échantillons (les $6/7^{\text{ème}}$ restant) soient passés en ensemble de validation. La moyenne des erreurs quadratiques moyennes est alors calculée pour donner lieu à l'erreur de prédiction Q^2 .
- Le test de permutation consiste à réaffecter des échantillons à des groupes en randomisant les valeurs d'indicatrice Y qui définissent l'appartenance aux différents groupes. De nouvelles valeurs de R^2Y et Q^2 sont alors calculées (axe vertical). Ces valeurs donnent de mauvais résultats par définition puisque le modèle devient alors moins bon (les échantillons n'étant plus affectés aux bons groupes). L'axe horizontal correspond à la corrélation entre l'indicatrice Y originale et les indicatrices permutées. Plus la permutation aboutit à un Y différent, plus les R^2Y et Q^2 doivent être faibles. On peut donc tracer des droites de régression en utilisant les R^2Y et Q^2 . Le R^2Y qui est calculé sans validation croisée peut malgré tout être bon (du fait du très grand nombre de variables par rapport au nombre d'individus). **On s'est fixé pour l'ordonnée à l'origine une valeur maximum de 0,6. Les Q^2 sont eux obtenus par validation croisée et ceux obtenus sur des Y permutés doivent forcément tendre vers 0. Par**

conséquent la droite des Q^2 doit couper l'axe des ordonnées en valeur négative (Figure 46). Enfin, l'ensemble des valeurs R^2 et Q^2 doivent respectivement se situer en valeur d'ordonnée, au-dessous de la valeur la plus à droite du graphique. 100 permutations sont réalisées.

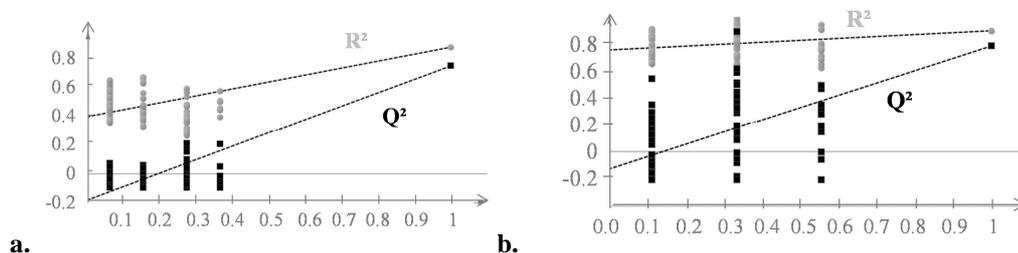


Figure 46: Illustration d'un test de permutation a. valide ; b. non valide

Par la suite un modèle PLS-DA ne sera considéré valide que sous la condition d'un $R^2Y > 0,5$, $Q^2 > 0,5$ et d'un test de permutation valide.

2.2.3.4. Résultats des études métabolomiques et interprétations

La configuration des analyses des 80 échantillons ayant été rigoureusement préparée, l'ensemble des échantillons ont pu être comparés les uns aux autres, et permettre ainsi de proposer une multitude de modèles répondant à diverses questions d'authentification.

Quatre problématiques ont ainsi pu être résolues par des modèles statistiques validés selon la première composante de la PLS-DA (Tableau 22). Elles sont présentées dans les parties suivantes. Les modèles non validés sont aussi discutés par la suite.

Tableau 22: Paramètres des modèles validés

Modèles validés	R^2Y	Q^2
France/Egypte	0,88	0,75
Egypte adultéré avec Egypte/France	0,73	0,57
Egypte adultéré avec ML*/Egypte	0,82	0,74
Egypte adultéré épinard/Egypte	0,68	0,51

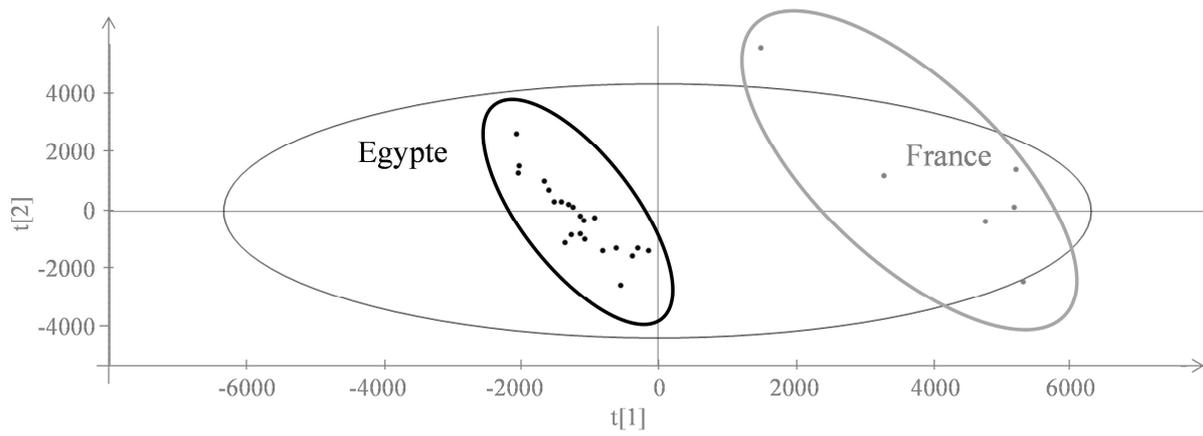
*ML : Linoléate de méthyle

a) Distinction des origines géographiques et des mélanges d'origines

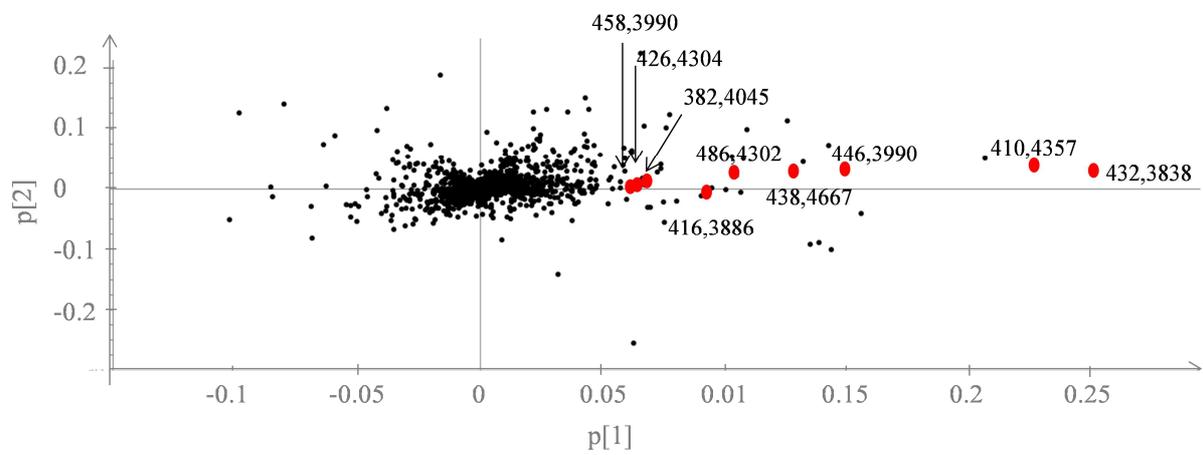
Les extraits français et égyptiens sont distinctement discriminés avec la première composante principale du modèle PLS-DA (Figure 47) qui explique la variabilité du modèle à 88 %. A partir du loadings plot correspondant, des marqueurs d'origines ont été mis en

évidence. Du fait du très grand nombre d'échantillons dans cette étude et des corrections multiples des données (Van der Kloet, normalisation, moyennes), nous avons choisi de nous focaliser sur la sélection des ions présentant les plus grandes différences d'intensités dans les chromatogrammes. Pour cela, nous avons retenu les marqueurs présentant des ratios d'intensités entre les deux origines supérieurs à cinq. Ce choix nous permet de proposer une liste de marqueurs avec une grande certitude. Neuf marqueurs de l'origine France ont ainsi été mis en évidence (Tableau 23), alors qu'aucun marqueur spécifique de l'origine Egypte n'a été trouvé.

a.



b.



c.

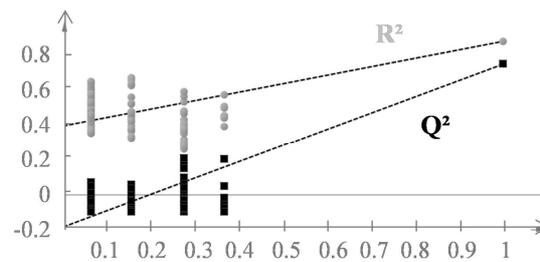


Figure 47: a. Scores plot du modèle PLS-DA pour l'absolute France et Egypte par ESI(+); b. Loadings plot avec les marqueurs; c. test de permutation validé

Tableau 23: Marqueurs de l'origine France par ESI(+)

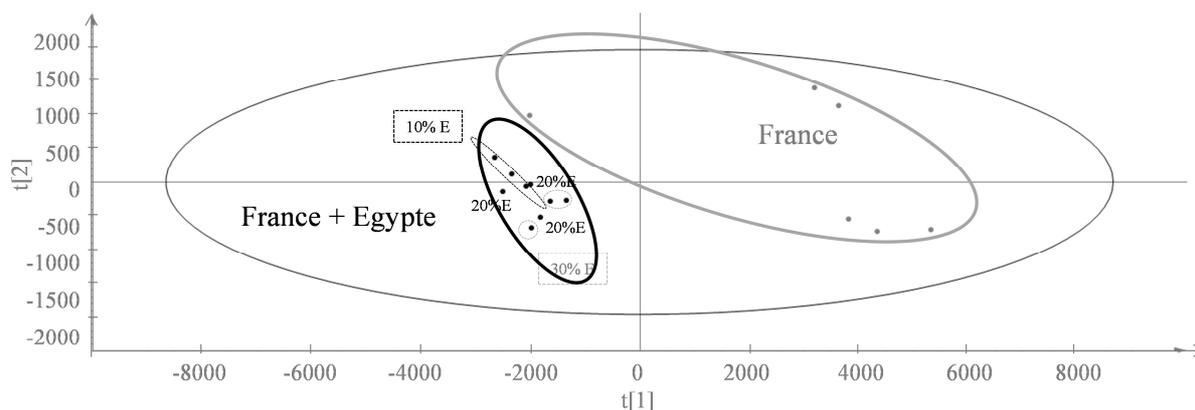
Marqueurs (ESI+)	Tr (min)	R F/E*
432,3838	15,10	5
458,3990	15,59	89
446,3990	16,16	17
486,4302	17,53	65
382,4045	17,72	225
416,3886	17,95	6
426,4304	18,31	49
410,4357	19,69	76
438,4667	21,51	14

*Valeurs moyennes des rapports des intensités France/Egypte

Une autre étude a été menée avec les mêmes échantillons en électrospray négatif. Pour la réaliser, la méthode analytique a été adaptée : le gradient d'élution a été modifié et le temps d'analyse raccourci à 22 min. Seuls quatre marqueurs ont été distingués dans ce cas-là, déjà cités dans l'étude en électrospray positif (aux temps de rétention 15,10 min, 15,59 min, 16,16 min et 17,53 min) (voir Tableau 23). Dans le cas de cette étude, le mode positif s'est montré plus informatif que le mode négatif. La corrélation de ces résultats confirme par ailleurs notre méthodologie.

En plus d'une distinction des échantillons par leur origine géographique, cette méthode métabolomique a aussi permis la discrimination des absolues résultant d'un mélange des origines France et Egypte, jusqu'à des ratios 1 : 9 (v/v) (Figure 48). Les extraits France mélangés avec des extraits Egypte (à 10, 20, 30 %) ont été discriminés des échantillons France purs avec 75 % de la variabilité expliquée avec la première composante du modèle PLS-DA (Tableau 22).

a.



b.

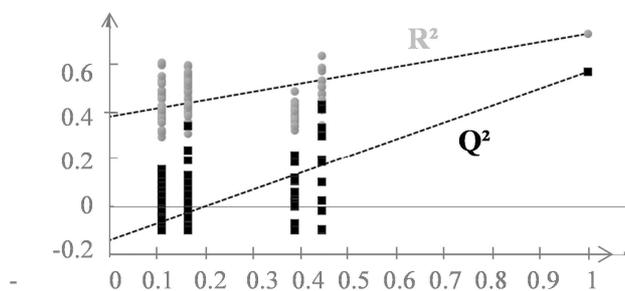


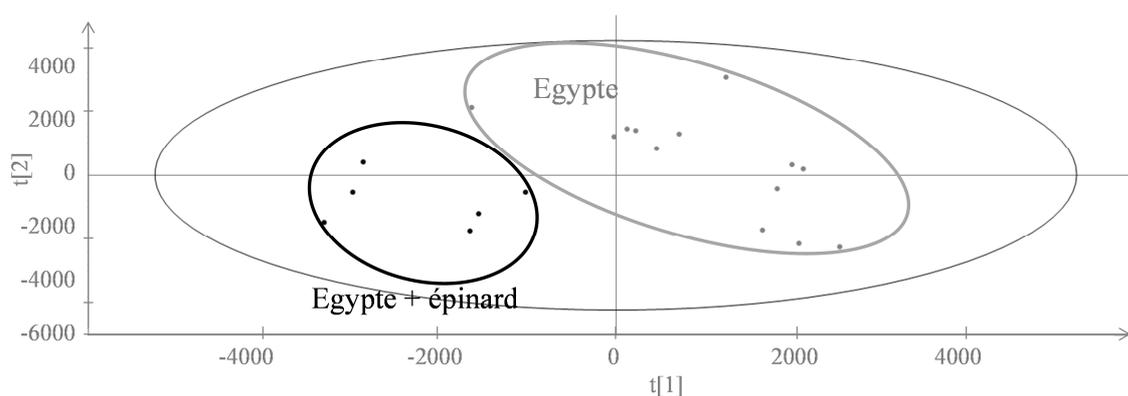
Figure 48 : a. Scores plot du modèle PLS-DA pour l'absolue France adultérée avec 10, 20, 30% d'absolue Egypte par ESI(+); b. test de permutation validé

Il est aussi très intéressant de constater que les mélanges d'extraits Egypte de différents fournisseurs (et de différentes régions d'Egypte) ne conduisent pas à des modèles validés. Aucune différence notable entre ces échantillons n'est ainsi mise en évidence. Il n'existerait donc pas de différences importantes dans la fraction non volatile de ces échantillons. Les conditions de culture et les procédés de fabrication sont les principales sources de variations entre les extraits. Considérant que l'ensemble des zones de cultures se situe dans le delta du Nil, ce paramètre ne doit pas être une source importante de variation. Ainsi les procédés de fabrication de chaque usine ne sont pas non plus responsables de variations et doivent alors être très similaires. Cependant, nous ne pouvons pas conclure sur la totalité de l'extrait. Les impacts potentiels de ces deux sources de variation (culture et procédé) peuvent être important sur la fraction volatile et donc sur la qualité olfactive de l'extrait comme nous l'avons vu dans l'étude de la fraction volatile.

b) *Mélanges d'absolues Égypte avec une absolue d'épinard*

Les absolues d'épinard étaient utilisées comme moyen d'adultération du fait des ressemblances de leurs fractions volatiles avec les absolues de feuilles de violette, mais aussi du fait de leur aspect visuel similaire (feuille et extrait) [137]. Ce type d'adultération a été reporté dans des documents non officiels et a été issu de témoignages d'agriculteurs. Les origines Égypte 2 et 3 adultérées avec 10, 20 et 30 % d'épinard ont été discriminées des absolues pures d'origine Égypte 2 et 3 selon les deux premières composantes principales ($R^2Y_{cum} = 0,68$ et $Q^2_{cum} = 0,51$) (Figure 49).

a.



b.

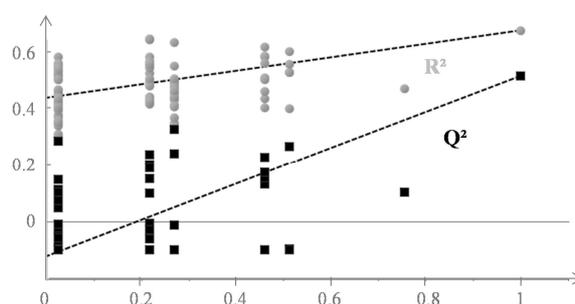


Figure 49 : a. Scores plot du modèle PLS-DA pour l'absolue Égypte adultérée avec 10, 20, 30% d'absolue épinard par ESI(+); b. test de permutation validé

c) *Ajout d'un composé synthétique*

L'addition de composés synthétiques appartenant naturellement à la composition de l'extrait naturel est un mode d'adultération économiquement intéressant. En effet, ils sont souvent moins onéreux que les extraits naturels et plus facilement accessibles. Deux sortes d'ajouts ont un intérêt : l'ajout de composés odorants pour améliorer le profil olfactif de l'extrait, et l'ajout de composés non volatils pour falsifier la quantité réelle d'extrait naturel fournie.

- Ajout d'un composé volatil et odorant : (*E,Z*)-2,6-nonadiénal

Le (*E,Z*)-2,6-nonadiénal, est un des composés odorants les plus puissants dans les extraits de *Viola odorata* L. [133]. Ainsi, une adultération avec ce composé peut améliorer artificiellement la qualité du produit. L'origine France est habituellement préférée par les parfumeurs. En effet, selon notre première étude sur les composés odorants caractéristiques des absolues de *Viola odorata*, l'extrait français a des notes plus fleuries et plus vertes que l'origine Egypte, qualifiée de terreuse. Par ailleurs, la concentration en (*E,Z*)-2,6-nonadiénal a été trouvée deux fois plus élevée dans les échantillons d'origine France (1,5 mg/g d'absolue) que dans les échantillons d'origine Egypte (0,6 mg/g d'absolue) [133]. Il apparaît donc intéressant d'adultérer des absolues de qualité moyenne avec ce composé.

Nous avons alors envisagé l'approche métabolomique pour discriminer ces adultérations dans les absolues d'origine Egypte. Malgré une bonne ionisation du composé à 0,01 % dans l'éthanol en électrospray positif, cet ajout n'a pas été détecté dans les échantillons de violette (ajout correspondant à 1 % dans l'extrait pur). Cette approche n'est ainsi pas efficace dans ce cas : ce composé minoritaire dans l'extrait pur entre 0,1 et 1 % est très certainement soumis à des effets matrices ou bien il n'élue pas sous forme de pic fin. Cependant, ces adultérations ont été détectées par le nez humain sans équivoque, excepté pour l'ajout à 0,1 %, correspondant à une concentration en (*E,Z*)-2,6-nonadiénal équivalente à celle d'une absolue d'origine France. Ainsi, un ajout de 0,1 % dans une absolue d'origine Egypte pourrait être une contrefaçon offrant une qualité olfactive proche de l'origine France, et incluant seulement un coût supplémentaire de 3 €/kg d'absolue Egypte (Fontarome). Des analyses en GC/MS seraient plus appropriées dans ce cas précis.

- Ajout d'un composé non volatil: le linoléate de méthyle

Le linoléate de méthyle (ML), composé non volatil, est naturellement présent dans l'extrait à une teneur approximative de 0,15 % (travaux non publiés). Son coût est de 100 €/kg (PCAS). Les extraits égyptiens adultérés avec le linoléate de méthyle à trois niveaux de concentrations (10 %, 15 % et 20 %) ont été distingués de l'origine Egypte pure (Figure 50a). L'ion moléculaire du linoléate de méthyle a été mis en évidence dans le loadings plot comme marqueur spécifique responsable de la distribution des deux groupes (Figure 50b). Au travers de cet exemple, cette approche métabolomique a montré des résultats probants dans la détection et l'identification d'une adultération du produit. Contrairement au cas de l'adultération avec l'absolue d'épinard, la nature de l'adultération avec un seul composé peut être identifiée (sous réserve d'être détectable dans les conditions d'analyse) ; l'identification est beaucoup plus difficile dans le cadre de l'ajout d'un extrait complexe.

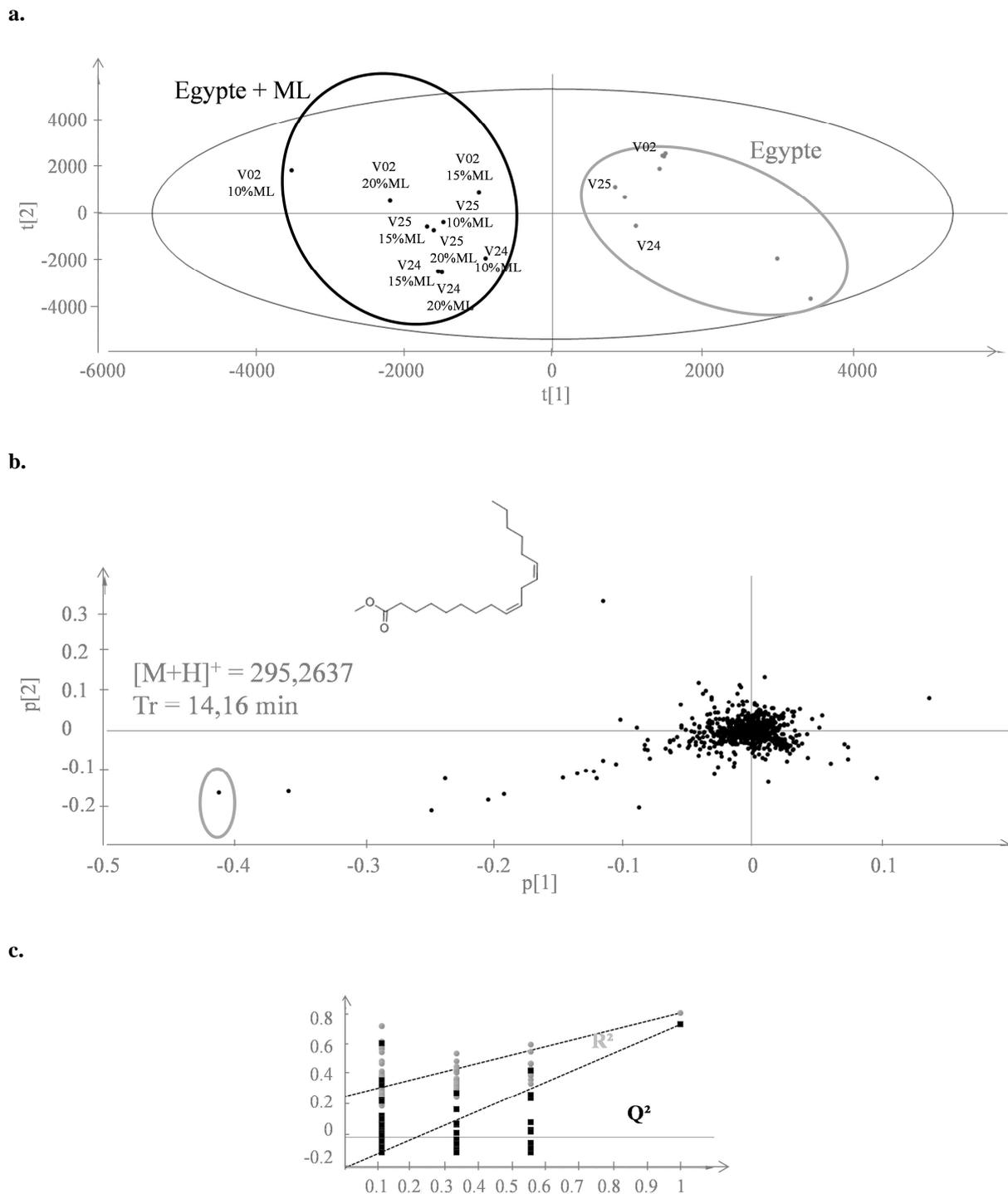


Figure 50: a. Scores plot du modèle PLS-DA de l'ajout de linoléate de méthyle; b. Loadings plot du modèle PLS-DA de l'ajout de linoléate de méthyle ; c. test de permutation validé

2.2.3.5. Stratégies mises en place pour l'identification des marqueurs

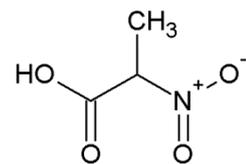
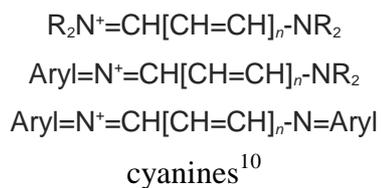
Le travail d'identification des marqueurs détectés par l'approche métabolomique est de loin l'étape la plus complexe [138]. En effet, les spectromètres de masse comme le ToF peuvent produire des signaux très intenses pour des composés minoritaires, voire à l'état de traces.

Dans un premier temps, une recherche bibliographique exhaustive a été menée sur *Viola odorata* et les autres espèces appartenant au genre *Viola*. Ces données ont été comparées avec celles obtenues par les analyses de spectrométrie de masse haute résolution : l'ionisation de composé en électrospray positif et négatif, les hypothèses de composition élémentaire et les ions fragments (Tableau 24).

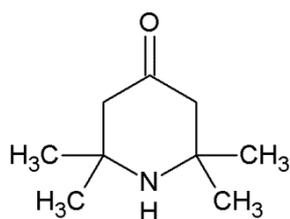
Tableau 24: Données complémentaires pour les marqueurs d'origine France (Δ ppm < 5ppm, i-Fit = 3, résultats classés selon la meilleure distribution isotopique)

TR (min)	m/z ESI+	m/z ESI+ fragments	Composition élémentaire la plus probable	Δ ppm	FIT confidence (%)	m/z ESI-
15,10	432,3838	138,0918/121,0652 (20-30V)	C ₂₈ H ₄₉ NO ₂	0.5	97.11	430,3692
15,59	458,3990	138,0918/121,0652 (20-30V)	C ₃₀ H ₅₁ NO ₂	1.5	89.42	456,3834
16,16	446,3990	138,0918/121,0652 (20-30V)	C ₂₉ H ₅₁ NO ₂	1.6	100	444,3836
17,53	486,4302	138,0918/121,0652 (20-30V)	C ₃₂ H ₅₅ NO ₂	2.7	99.96	484,4143
17,72	382,4045	312,3279/88,0769 (20-30V)	C ₂₅ H ₅₁ NO	1.6	100	
17,95	416,3886	122,0974/105,0713 (20-30V)	C ₂₈ H ₄₉ NO	3.6	99.99	
18,31	426,4304	417,3359/408,4170/261,2213 (20-30V)	C ₂₇ H ₅₅ NO ₂	1.6	95.66	
19,69	410,4357	340,3569 (20-30V)	C ₂₇ H ₅₅ NO	1	100	
21,51	438,4667	368,3871 (20-30V)	C ₂₉ H ₅₉ NO	1.6	100	

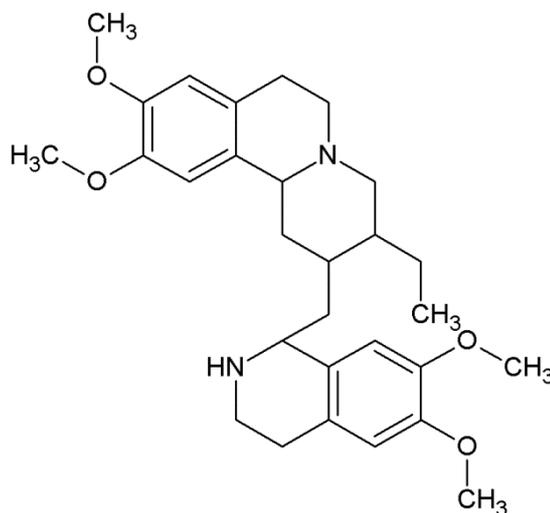
L'ensemble des marqueurs contiendrait des atomes d'azote. Quatre d'entre eux sont ionisables en électrospray positif et en électrospray négatif, et ont une fragmentation similaire avec les fragments m/z 138,0918 (C₈H₁₁NO) et 121,0652 (C₈H₉O). Malheureusement, aucun recoupement n'a pu être réalisé entre ces données et celles issues de la bibliographie. En effet, très peu de données sur les composés azotés dans le genre *Viola* sont répertoriées, exceptés les cyclotides, protéines cycliques contenant une trentaine d'acides aminés [139]. Les cyanines [140], l'acide 2-nitropropionique (C₃H₅NO₄) [140,141], la triacétonamine (odoratine) (C₉H₁₇NO) [140,141], la violine (composé similaire à l'évétine C₂₉H₄₀N₂O₄) [140,141] et l'isoquinoline (C₉H₇N) [142] sont les seuls composés retrouvés (voir les structures Figure 51).



acide 2-nitropropionique
 $C_3H_5NO_4$ (m/z 119)

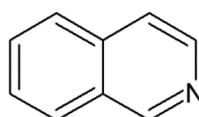


triacétonamine
 $C_9H_{17}NO$ (m/z 155)



émétine
 $C_{29}H_{40}N_2O_4$ (m/z 480)

isoquinoléine



C_9H_7N (m/z 129)

Figure 51: Composés azotés de *Viola odorata*

Une étude bibliographique plus large a été réalisée sur les molécules azotées retrouvées dans les extraits naturels.

¹⁰ Aryl = dérivé d'un hydrocarbure aromatique (dérivé du benzène, dérivé du toluène etc.)

Les composés azotés dans les extraits naturels de plantes

Les composés azotés ne sont pas universellement classifiés. Des divergences interviennent selon les auteurs et le domaine d'expertise : chimie, et médecine en particulier. Pour déterminer la nature d'un composé azoté, on parlera d'acides aminés, de peptides, de protéines, d'alcaloïdes, d'amines, d'amides, de vitamines, glucosinolates, isocyanates etc.

Les alcaloïdes

La famille la plus largement décrite dans la littérature est celle des alcaloïdes. Le terme est d'ailleurs sujet à diverses définitions [143] :

- 1) Composés qui présentent une toxicité plus ou moins importante agissant sur le système nerveux ; à caractère basique ; comportant un cycle hétéroazoté ; issus des acides aminés ou de leurs dérivés ; ayant une distribution limitée dans la nature.
- 2) Composés comportant au moins un atome d'azote lié à deux atomes de carbone ; au moins un cycle et pas nécessairement un hétérocycle ; ne pouvant être des vitamines ou des hormones ou des unités structurales de substances cellulaires macromoléculaires.
- 3) Groupe contenant des bases azotées dont la plupart sont des drogues.

Selon l'IUPAC, les alcaloïdes sont des composés basiques (la plupart hétérocycliques) retrouvés dans la plupart du règne végétal. Les acides aminés, peptides, protéines, nucléotides, acides nucléiques, sucres aminés et antibiotiques sont des alcaloïdes. Certains composés neutres bio-génétiquement liés avec des composés alcaloïdes basiques en font aussi partie [144].

Les alcaloïdes sont issus de précurseurs acides aminés mis en jeu lors de la biosynthèse du composé [143,145] (Figure 52).

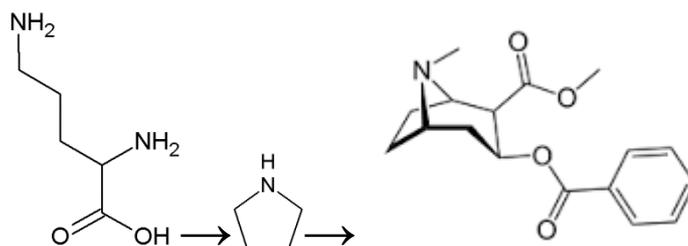


Figure 52: Ornithine (acide aminé), pyrrolidine (précurseur acide aminé), cocaïne (alcaloïde)

Autres composés azotés assimilés à des alcaloïdes

D'autres composés azotés sont produits lors de réactions d'amination [145]. L'atome d'azote est introduit par le biais d'un acide aminé, mais son squelette n'est pas conservé (Figure 53).

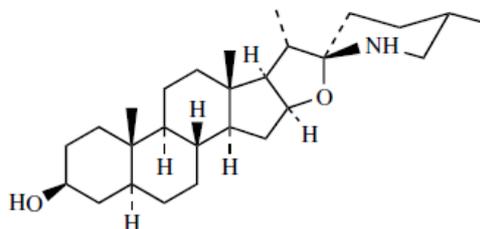
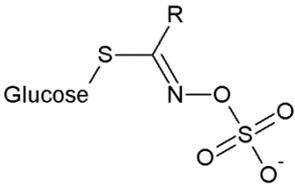


Figure 53: Alcaloïde stéroïdien : tomatidine

Les composés issus des glucosinolates

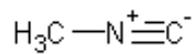
Les glucosinolates peuvent subir une dégradation enzymatique qui mènent à trois sous familles de composés : les isothiocyanates, les nitriles et les thiocyanates [146] (Tableau 25).

Tableau 25: Composés azotés issus des glucosinolates

composé	structure
Glucosinolate*	
isothiocyanate	$-\text{N}=\text{C}=\text{S}$
nitrile	$-\text{C}\equiv\text{N}$
thiocyanate	$\text{N}\equiv\text{C}-\text{S}-$

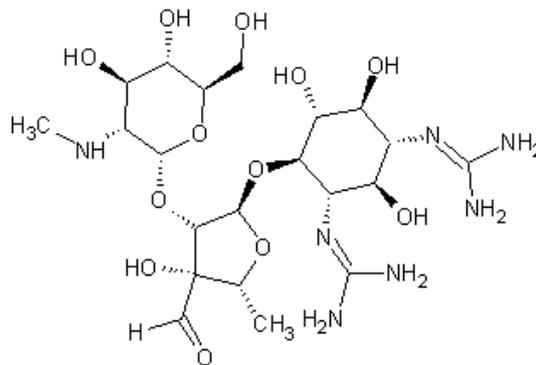
*Rest variable : chaîne soufrée, chaîne aliphatique linéaire, chaîne alcoolique, hydrocarbure aromatique etc.

A ne pas confondre avec les nitriles, on retrouve aussi les isocyanures [147] (Figure 54).

**Figure 54: Isocyanure de méthyle**

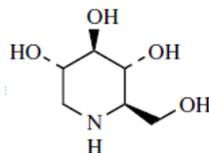
Les glycosides aminés

Les glycosides aminés ont deux ou trois sucres liés à une molécule de cyclohexane amino substituée [145] (Figure 55).

**Figure 55: Streptomycine**

Les sucres aminés

Les sucres aminés sont issus d'une réaction de transamination d'un cétose [145] (Figure 56).

**Figure 56: Deoxymannojirimycin**

Aucune donnée sur ces composés n'a été trouvée pour les espèces appartenant au genre *Viola*. Cependant, considérant les compositions élémentaires des quatre marqueurs $C_{28}H_{49}NO_2$, $C_{30}H_{51}NO_2$, $C_{29}H_{51}NO_2$, $C_{32}H_{55}NO_2$, présentant une fragmentation identique et une ionisation en électrospray positif et négatif, nous avons supposé l'appartenance à une même famille. Pour cela, une recherche de structure commune sous SciFinder pour ces formules brutes, nous a amené à proposer une sous-structure de type cholestane (Figure 57).

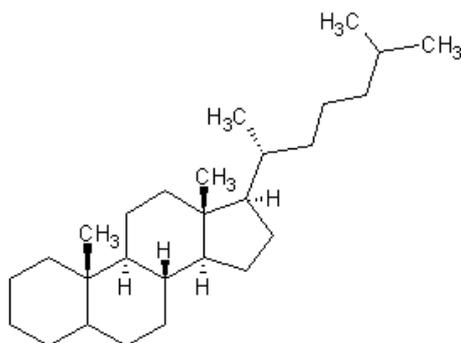


Figure 57: Structure d'un cholestane

Nous nous sommes ensuite tournés vers une approche classique dans le domaine de la chimie des substances naturelles en réalisant un fractionnement par chromatographie préparative. Cette méthode longue permet d'isoler de la matière et potentiellement de récupérer les marqueurs purifiés pour identification et/ou réalisation d'essais biologiques ou chimiques. Cette étude a été guidée par des injections systématiques des fractions récoltées en UHPLC-HRMS afin de tracer les marqueurs d'intérêt.

a) *Première stratégie : non ciblée*

Le fractionnement de l'absolue (850 mg), a été d'abord réalisé en chromatographie liquide préparative couplée à des détecteurs DAD et DEDL. Les fractions comprenant les marqueurs (fractions contrôlées par analyses en UHPLC-HRMS) ont été analysées par RMN du proton. Parmi elles, quatre fractions présentaient des signaux interprétables par RMN : les fractions contenant m/z 486,4302 ; 382,4045 ; 416,3886 et 438,4667 avec une quantité collectée respective de 8,4 mg, 22,6 mg, 7,5 mg, 15,2 mg. La fraction contenant l'ion marqueur à m/z 382,4045 était à un niveau de pureté élevé, conduisant à une étude plus poussée par des analyses RMN 1D et 2D. Des comparaisons avec la littérature ont permis d'identifier ce composé comme étant l'acide putranjivique (Figure 58) [148], composé majoritaire de cette fraction. Malheureusement le spectre de masse en électrospray négatif à m/z 441 $[M-H]^-$ de ce composé ne correspond pas au spectre de masse du marqueur ciblé. Il

s'agit néanmoins de la première mise en évidence de ce composé dans *Viola odorata*. Il avait été identifié auparavant dans les feuilles de *Putranjiva roxburghii* [148].

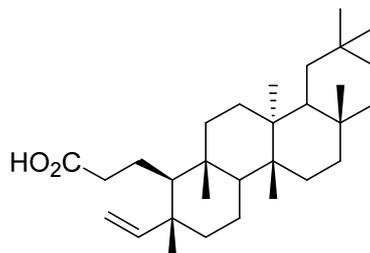


Figure 58: Acide putranjivique

La deuxième étape de purification de ces quatre fractions a été réalisée avec un système de chromatographie semi-préparative. Les composés majoritaires de chaque fraction détectables en DEDL ont été collectés. Malheureusement, aucun des marqueurs n'a été identifié **parmi ces composés majoritaires** après une nouvelle analyse **des composés récoltés** par UHPLC-HRMS (Tableau 26).

Tableau 26 : Pics majoritaires collectés par chromatographie semi-préparative des quatre fractions obtenues par chromatographie préparative

Fraction (<i>m/z</i>)	Nombre de pics collectés	Masse min – masse max de ces pics
382,4045	4	<1 mg – 5 mg
486,4302	5	<1 mg
416,3886	3	<1 mg – 1 mg
438,4667	5	<1 mg – 1 mg

Les marqueurs sont certainement présents dans le « bruit de fond » de chacune des fractions. Connaissant les masses récoltées pour chaque composé majoritaire dans chaque fraction, et connaissant la masse initiale de la fraction, nous avons déduit le niveau de concentration potentiel des marqueurs dans les 850 mg d'absolue purifiée. En estimant que le marqueur représenterait dans le meilleur des cas 1/10^{ème} de la masse des composés minoritaires de la fraction, nous avons calculé une proportion de 0,02 % (w:w) d'un marqueur dans l'absolue pure. L'exemple de calcul est décrit dans la Figure 59.

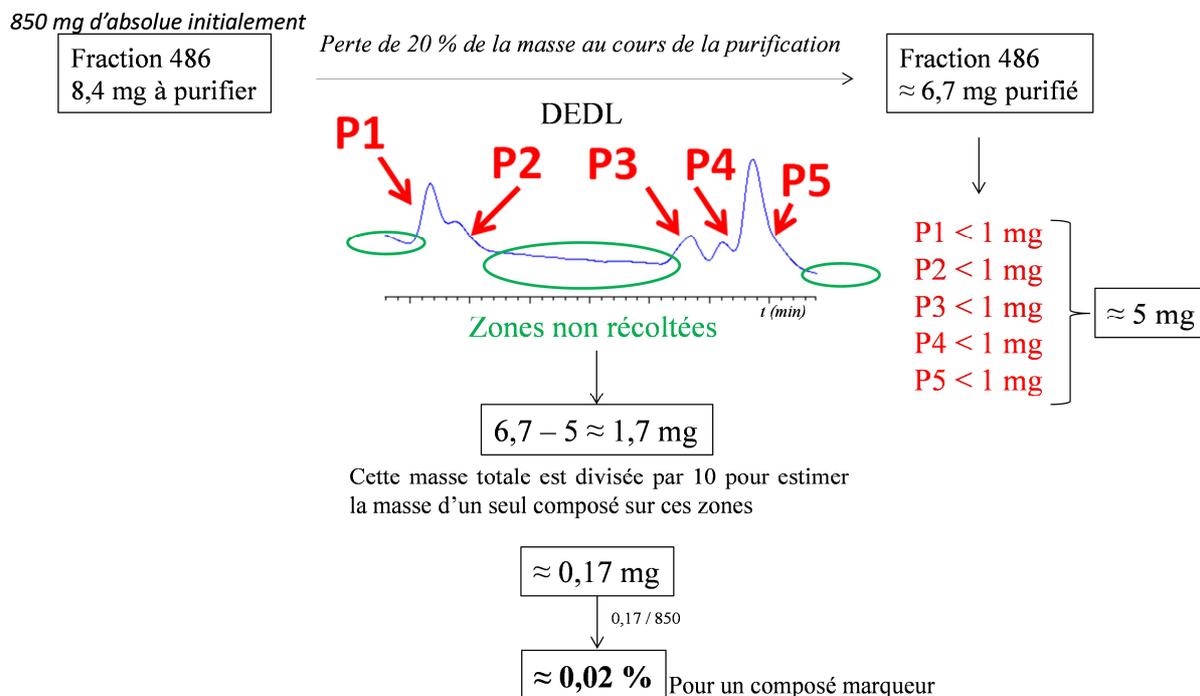


Figure 59 : Exemple de calcul pour l'estimation de la masse d'un marqueur dans la fraction 486

b) *Seconde stratégie : ciblage des alcaloïdes*

Aucun résultat probant n'étant ressorti du fractionnement non ciblé pour identifier les marqueurs, nous avons tenté une alternative pour obtenir des fractions enrichies en marqueurs. Les compositions élémentaires obtenues par les analyses HRMS ayant montré la présence d'un atome d'azote dans l'ensemble des marqueurs, nous avons décidé de cibler les composés de type alcaloïdes. Cette hypothèse pourrait expliquer en effet les faibles quantités de ces marqueurs possédant un caractère hydrophile, dans l'absolue, obtenue après une extraction à l'hexane apolaire.

Dans un premier temps, une extraction classique des alcaloïdes a ainsi été réalisée sur l'absolue de feuilles de violettes [149] (Figure 60).

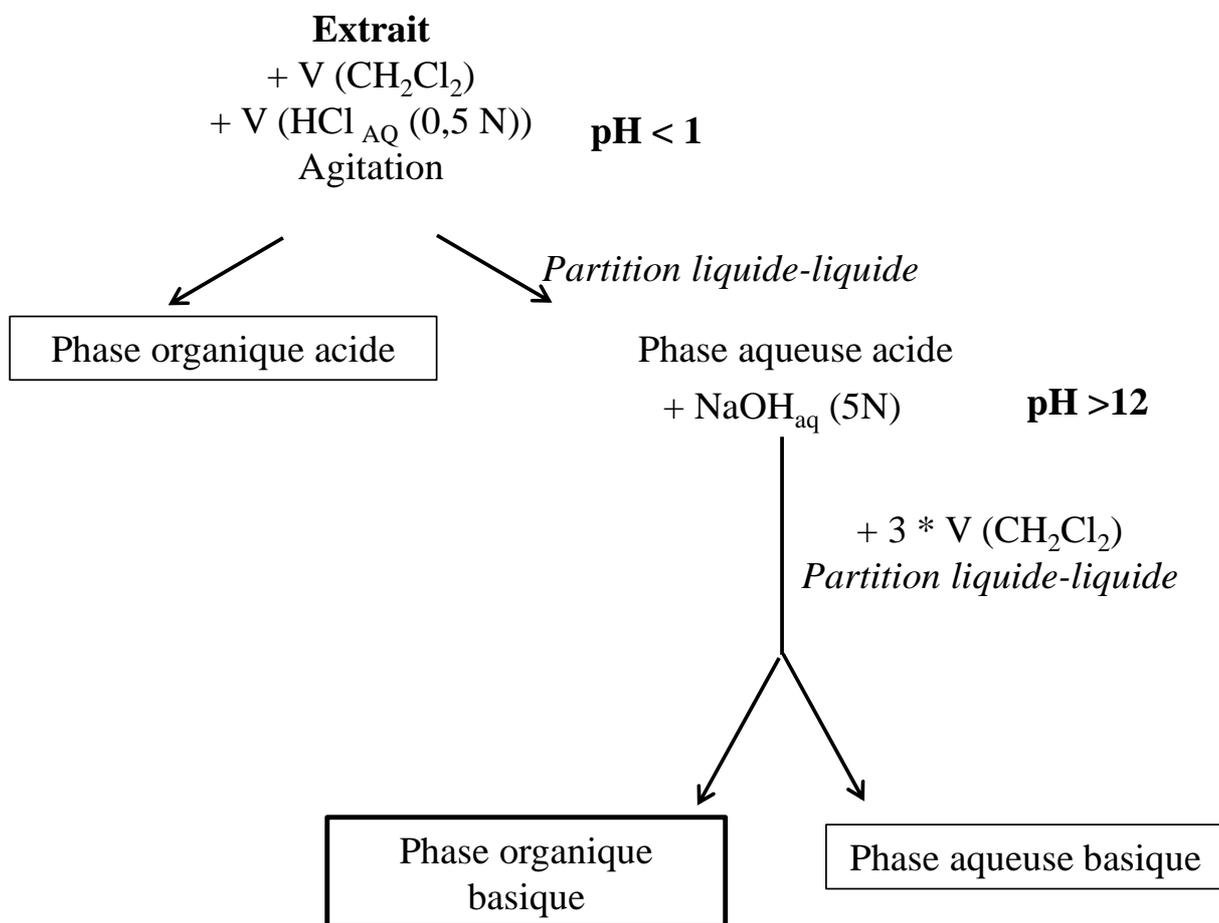


Figure 60 : Extraction des alcaloïdes de l'absolue

L'analyse de la fraction organique basique enrichie en alcaloïdes, ainsi que de la fraction organique neutre et de la phase aqueuse basique ont été réalisées en UHPLC-HRMS. Ces résultats ont montré une répartition des marqueurs dans l'ensemble des fractions.

Dans un second temps, nous avons réalisé un extrait aux ultrasons de feuilles fraîches avec un mélange dichlorométhane/méthanol (50/50, v/v) [150], plus adapté à l'extraction d'alcaloïdes (contrairement à l'hexane). La fraction basique a aussi été extraite. Ni l'extrait, ni la fraction basique n'ont montré d'enrichissement en marqueurs.

Les marqueurs ne seraient ainsi pas basiques et ne correspondraient pas à des alcaloïdes. Nous pouvons suggérer que ces composés intégrant probablement une fonction azotée non basique pourraient être des amides, nitriles, isocyanures ou encore des cyanates ou isocyanates que l'on rencontre dans les plantes.

Cette dernière partie montre la difficulté rencontrée lors de l'étape d'identification de composés non volatils, minoritaires (ou à l'état de traces) non répertoriés dans la littérature. De grandes quantités d'extrait pourraient permettre l'isolement de ces composés. Cependant, la forte valeur ajoutée des absolues étudiées (9000 € le Kg pour la France) pourrait alors être un facteur limitant.

Cette première étude métabolomique sur l'absolue de feuilles de violette a montré des résultats intéressants et exploitables par le secteur de la parfumerie. Des marqueurs de l'origine France ont pu être trouvés (marqueurs d'intensités plus importantes dans la France que dans l'Egypte). Des ajouts d'absolue Egypte dans des échantillons d'absolue France plus onéreux ont aussi été mis en évidence. L'adultération avec un autre extrait végétal complexe, l'absolue d'épinard, a pu être détectée, même s'il serait très complexe d'en identifier la nature dans un cas réel. L'ajout de linoléate de méthyle a été très clairement identifié dans le loadings plot correspondant au modèle. La teneur en linoléate de méthyle est donc bien responsable de la répartition des groupes dans le scores plot. L'ensemble de ces travaux a conduit à un article intitulé «Metabolomics for the authentication of natural extracts used in flavour and fragrances : the case study of *Viola odorata* absolutes », en soumission.

Nous avons souhaité valider cette méthodologie en étudiant diverses problématiques d'origines et d'adultérations sur une deuxième matière première emblématique de la parfumerie : l'absolue de rose.

2.2. Application aux absolues de *Rosa damascena* et *centifolia*

Dans une première partie, l'approche métabolomique a été développée sur des problématiques d'authentification d'espèces botaniques, d'origines géographiques et d'adultérations. Dans une seconde partie des résultats expérimentaux sont discutés sur les possibilités et les limites dans la réutilisation de données brutes d'un jeu d'échantillons d'une étude antérieure avec un jeu d'échantillons fraîchement préparé et analysé.

2.2.4. Recherche d'authentification d'espèces botaniques, d'origines géographiques et de mise en évidence d'adultérations

Contrairement au cas de la violette, deux espèces de roses sont employées en parfumerie : *Rosa damascena* et *Rosa centifolia*. Une première étude a alors été réalisée sur l'authentification botanique de l'absolue. *R. damascena* étant cultivée en Bulgarie, au Maroc et en Turquie, nous avons ensuite cherché à discriminer ces différentes origines géographiques. Enfin, nous avons étudié la possibilité de mettre en évidence des adultérations des absolues de roses.

Nous avons rencontré des difficultés dans l'approvisionnement en échantillons de l'espèce botanique *Rosa centifolia*. L'absolue de cette espèce botanique, nommée « Rose de Mai » en France est produite chaque année en petites quantités. Elle est donc rare et très coûteuse (pouvant aller jusqu'à 6 fois le prix d'une absolue de *Rosa damascena* selon le pays d'origine et l'année : 16 500 €/kg en 2013).

La méthode d'analyse utilisée a été rigoureusement la même que celle développée et optimisée dans la première étude sur la violette. Seul le débit de phase mobile a été ajusté à 0,5 mL/min, permettant un affinement des pics chromatographiques. La Figure 61 représente deux chromatogrammes de *Rosa damascena* et *Rosa centifolia*. Il est intéressant de constater la très forte similitude entre ces deux espèces botaniques par l'analyse en UHPLC-ToFMS. Cette observation est un des éléments justifiant l'utilité d'une étude métabolomique, permettant une recherche fine et précise des différences entre les échantillons.

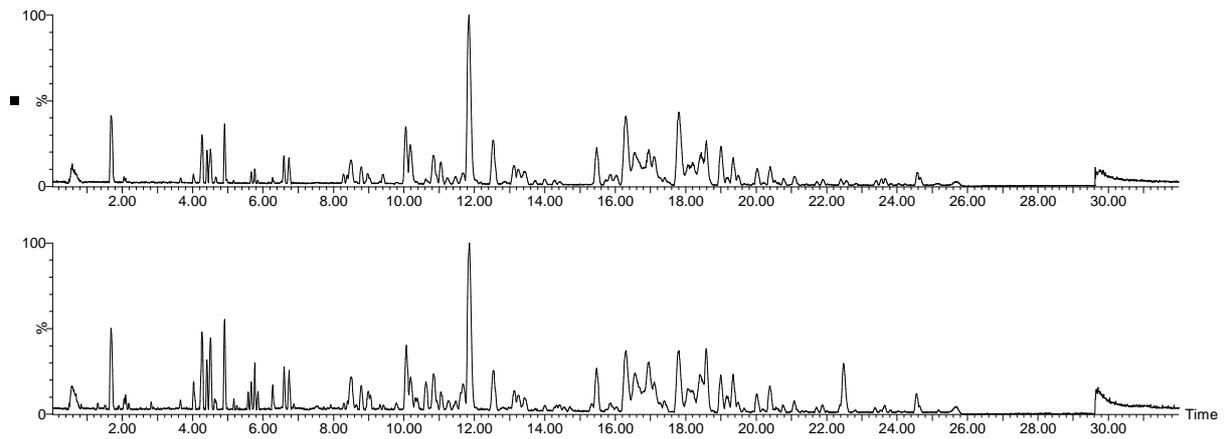
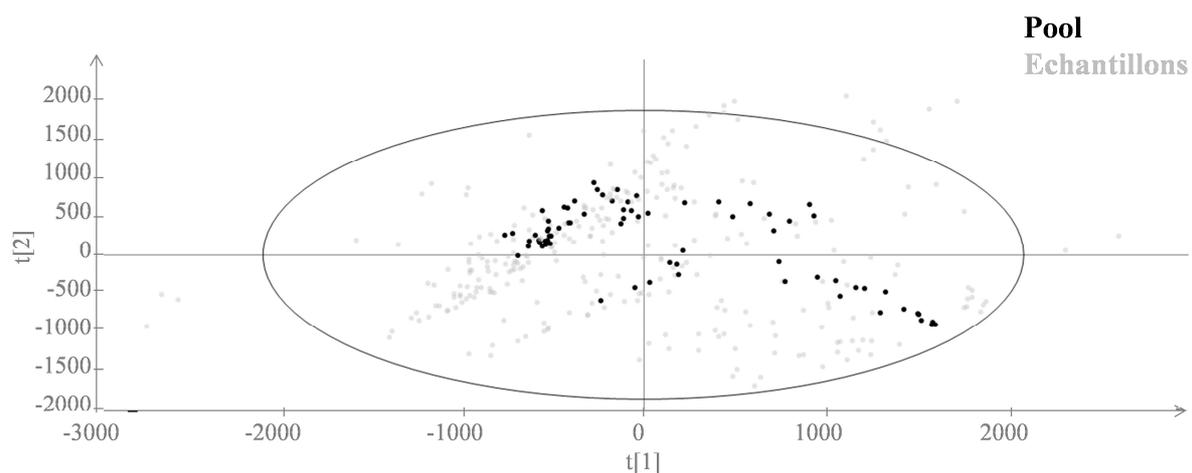


Figure 61: Chromatogrammes de *R. damascena* (en haut) et *R. centifolia* (en bas)

Les paramètres d'extraction des ions ont été optimisés pour ces conditions d'analyses (cf. Partie expérimentale). La correction Van der Kloet a été une nouvelle fois appliquée aux données (neuf séries d'analyses) (Figure 62).

a.



b.

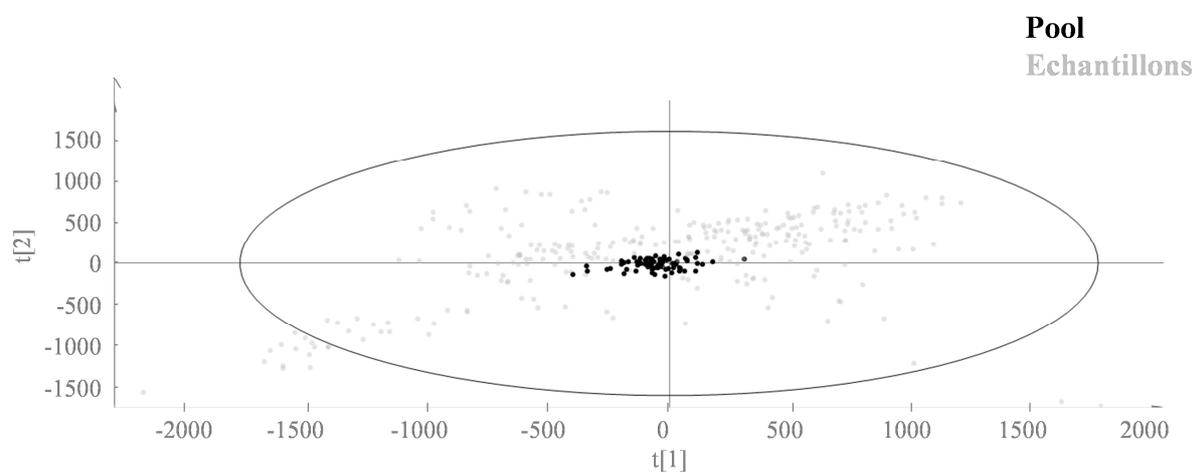


Figure 62: ACP des données brutes, a. avant la correction Van der Kloet, b. après la correction Van der Kloet (p pour pools en noir, et s pour échantillons en gris)

Plusieurs problématiques ont pu être résolues grâce à des modèles statistiques validés sur la première composante de la PLS-DA (Tableau 27).

Tableau 27 : Liste des modèles validés selon la première composante de la PLS-DA

Modèles validés	R ² Y	Q ²
<i>R. centifolia</i> / <i>R. damascena</i>	0,92	0,78
(<i>R. dama</i> + 10/20/30 % <i>R. centi</i>) vs <i>R. dama</i>	0,81	0,52
(<i>R. dama</i> + 10/20/30 % <i>R. centi</i>) vs <i>R. centi</i>	0,86	0,7
Turquie <i>R. dama</i> / Maroc <i>R. dama</i>	0,90	0,85
(<i>R. dama</i> + 5/10/15 % nonadécane) vs <i>R. dama</i>	0,72	0,58

N.B: *R. dama*: *R. damascena*, *R. centi*: *R. centifolia*

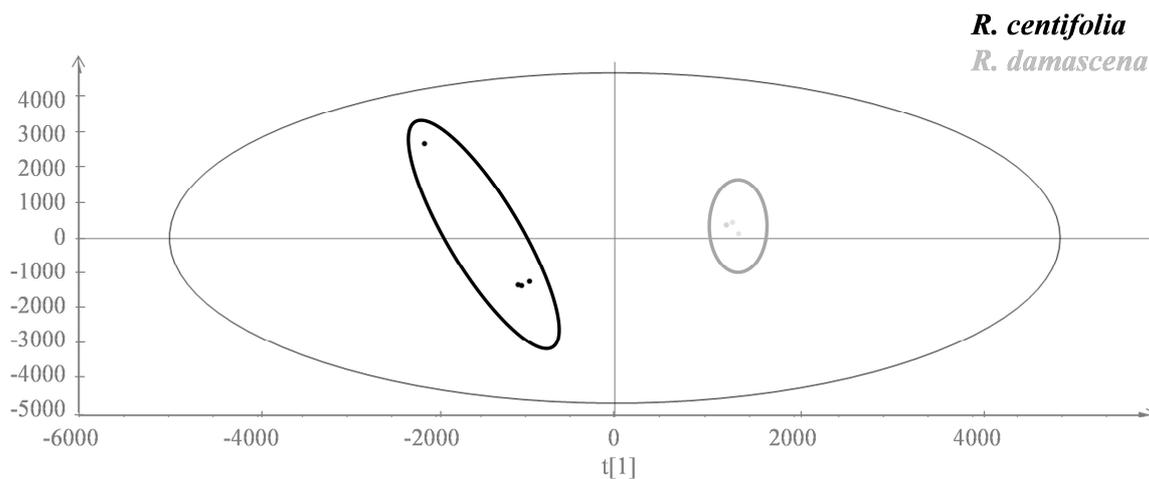
Chacun des résultats de ces modèles, ainsi que ceux des modèles non validés, sont décrits par la suite.

2.2.4.1. Les espèces botaniques : *Rosa damascena* versus *Rosa centifolia*

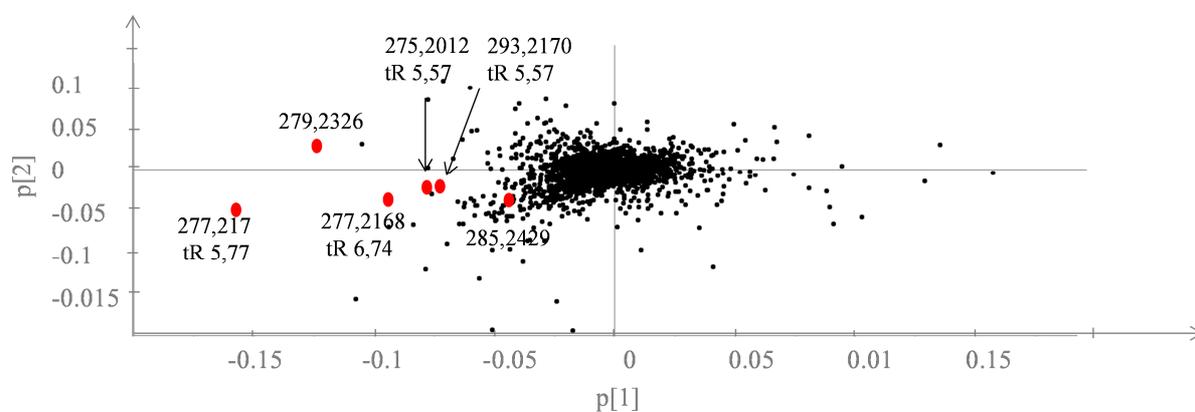
a) Marqueurs de *Rosa centifolia*

La discrimination des absolues entre les espèces *R. centifolia* et *R. damascena* est très nette (Figure 63). Néanmoins, le nombre d'échantillons appartenant à chaque groupe est critiquable. L'explication provient de la rareté et du prix de l'absolue de *Rosa centifolia*, comme expliqué dans l'introduction de cette étude. Nous étions ainsi en possession de quatre échantillons de *R. centifolia* et 32 échantillons de *R. damascena* (Maroc, Bulgarie, Turquie). Nous avons alors décidé de travailler avec une sélection de quatre échantillons de *R. damascena* pour obtenir un modèle équilibré. Ainsi, deux échantillons de *R. damascena* provenant du Maroc ont été choisis, et deux autres échantillons provenant de la Turquie afin d'assurer une plus large diversité au sein du groupe *R. damascena*. En plus des classiques tests de permutation pour contrôler la validité du modèle, des modèles prédictifs ont montré la bonne classification d'échantillons (parmi les 28 échantillons de *R. damascena* restant) ne participant pas au calcul du modèle.

a.



b.



c.

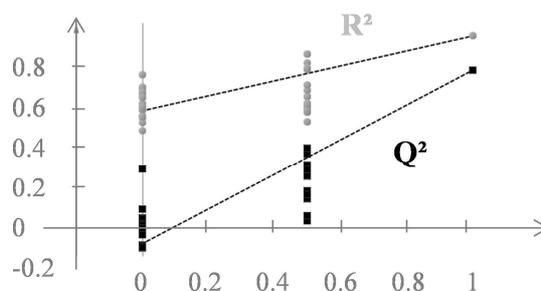


Figure 63: a. Scores plot du modèle PLS-DA *R. centifolia* vs *R. damascena* ; b. Loadings plot avec les marqueurs *R. centifolia* c. test de permutation validé

Des composés marqueurs de l'absolue de l'espèce *R. centifolia* par leur intensité à minima deux fois supérieures à celle de l'espèce *R. damascena*, ont été détectés (Tableau 28). Cette valeur a été abaissée comparativement au cas de l'absolue de feuilles de violette (rapport de cinq), afin de relever davantage de marqueurs. Les différences d'intensités dans le cas de l'absolue de rose sont moins importantes.

Tableau 28: Liste des marqueurs de l'absolue *R. centifolia*

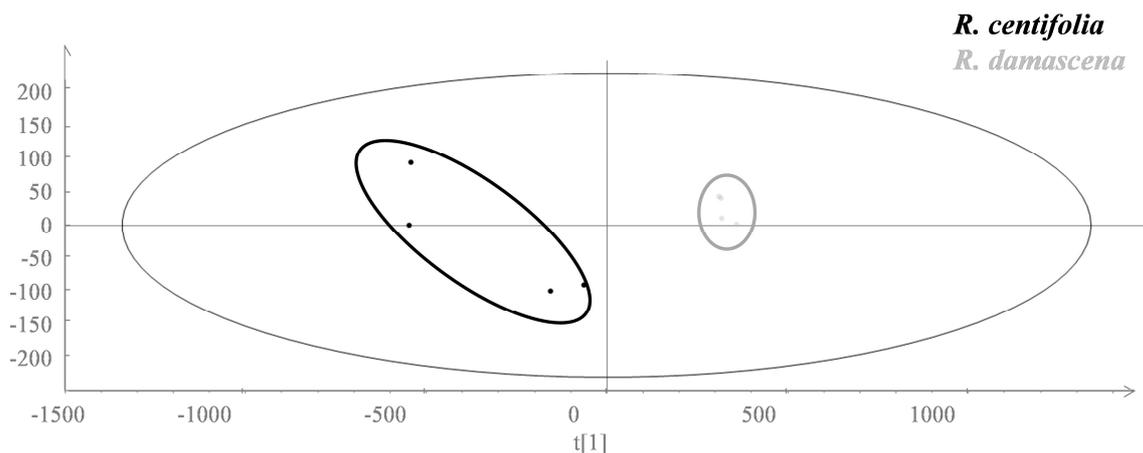
Ref	Tr (min)	ESI ⁺	R (C/D)*	Composition élémentaire la plus probable	Δppm	FIT confidence (%)
M1	4,69	285,2429	8	C ₁₇ H ₃₂ O ₃	3,5	100
M2	5,57	293,2118°	5	C ₁₈ H ₂₈ O ₃	1,7	99,3
M3	5,57	275,2012	9	C ₁₈ H ₂₆ O ₂	4	99,98
M4	5,77	277,2170°	3	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	2,9	99,94
M5	6,28	279,2326°	4	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	2,5	100
M6	6,74	277,2168	3	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	3,2	100

*Rapport d'intensité *R. centifolia*/*R. damascena*

° Marqueurs révélés en ESI

Trois de ces marqueurs sont aussi ionisables en électrospray négatif. Un autre modèle PLS-DA est calculé en tenant uniquement compte des intensités de ces marqueurs dans les deux groupes d'échantillons ($R^2Y = 0,92$ and $Q^2 = 0,80$) (Figure 64). La valeur du R^2Y est strictement identique, tandis que l'erreur de prédiction est améliorée. Ce modèle montre bien la spécificité de ces marqueurs pour distinguer les deux espèces botaniques.

a.



b.

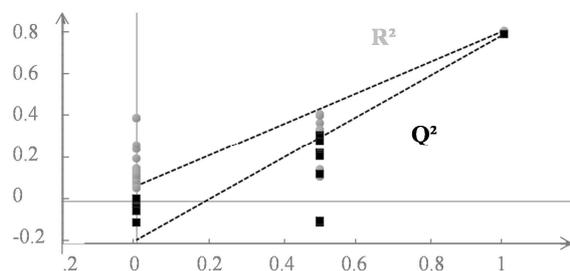


Figure 64: a. Scores plot du modèle PLS-DA tracé uniquement avec les valeurs d'intensité des marqueurs ; b. test de permutation validé

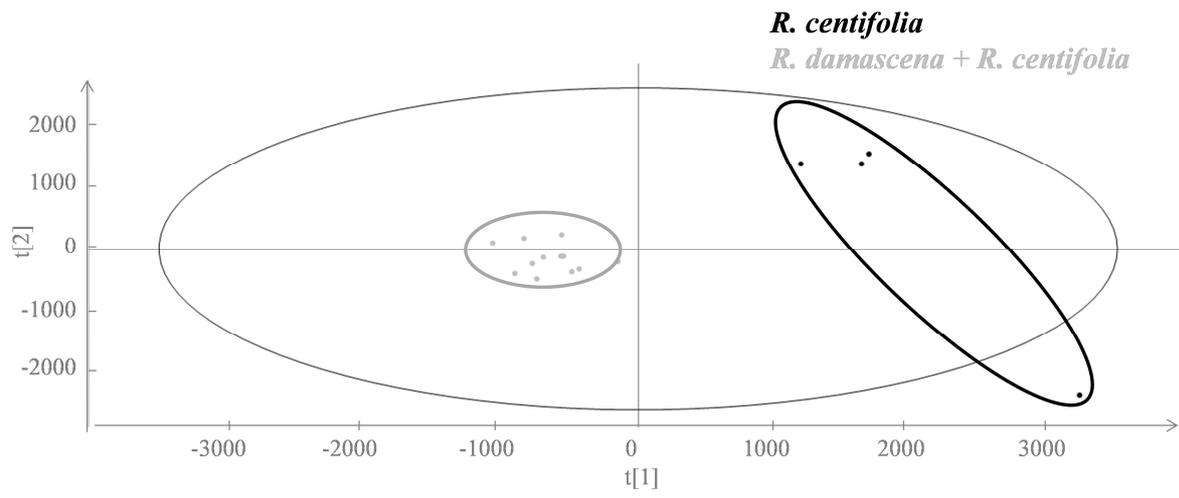
Les marqueurs M2 et M3 sont liés par la perte d'une molécule d'eau. Trois couples de marqueurs sont fortement corrélés (coefficients de corrélation > 0,99) (Tableau 29).

Tableau 29: Coefficients de corrélation pour trois couples de marqueurs

Couple	Coefficient de corrélation
M2/M6	0,999
M2/M4	0,994
M4/M6	0,990

Des hypothèses sur l'identité de ces marqueurs ont été émises par la consultation de la base de données "The Good Scents Company" (thegoodscentscompany.com). Cette base contient des données organoleptiques ainsi que les propriétés d'ingrédients du secteur arômes et parfums. L'acétate de phényldihydrocitronellyle a été proposé pour la composition élémentaire $C_{18}H_{28}O_2$ caractérisé par son odeur de rose. Le propanoate de nerolidyle a été proposé pour la composition élémentaire $C_{18}H_{30}O_2$ avec son odeur florale. Enfin, le farnésol étant un composé de la fraction volatile de l'absolue de rose [19], nous avons aussi considéré

a.



b.

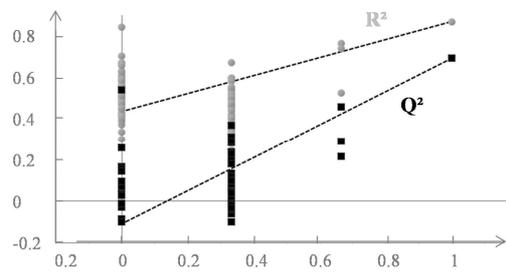
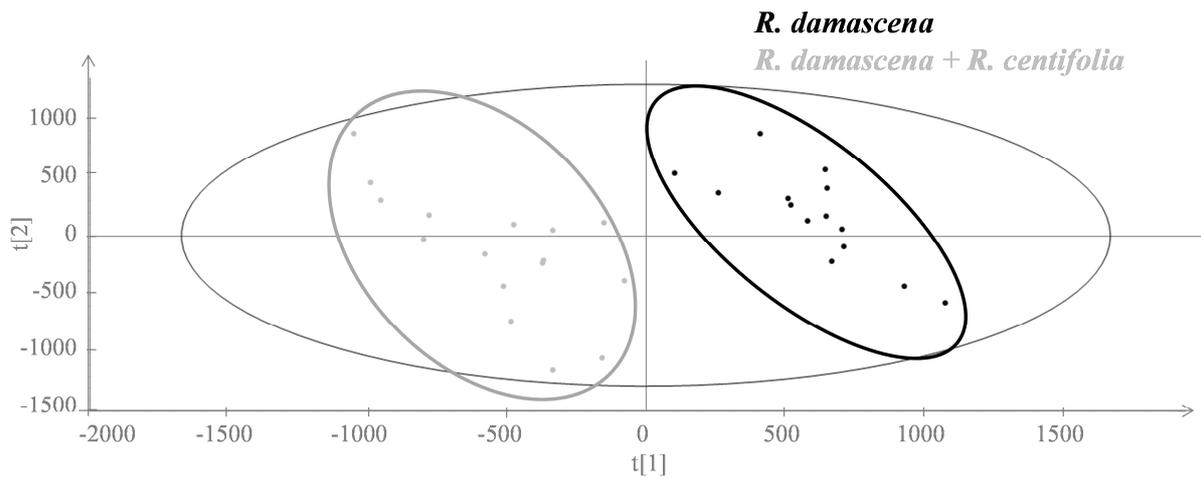


Figure 66: a. Scores plot des modèles PLS-DA, ajout de *R. centifolia* à *R. damascena*, versus *R. centifolia* pur ; b. test de permutation validé

a.



b.

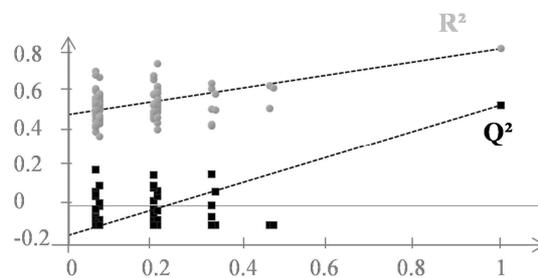


Figure 67: a. Scores plot des modèles PLS-DA, ajout de *R. centifolia* à *R. damascena*, versus *R. damascena* pur ; b. test de permutation validé

Ces modèles montrent clairement qu'il est possible de mettre en évidence des adultérations d'espèces botaniques. Dans cet exemple, pris à titre de modèle méthodologique et non d'un intérêt économique réel, nous montrons l'adultération de l'espèce *R. damascena* par l'espèce *R. centifolia* en comparaison avec les échantillons purs.

De nouveaux modèles ont été construits en utilisant les groupes d'échantillons : *R. damascena* pur, *R. centifolia* pur et les mélanges d'échantillons en proportions connues (proportions en *R. damascena* plus importantes) (Figure 68). Les critères de validation des modèles ont été suivis selon le paragraphe 2.2.3.3.

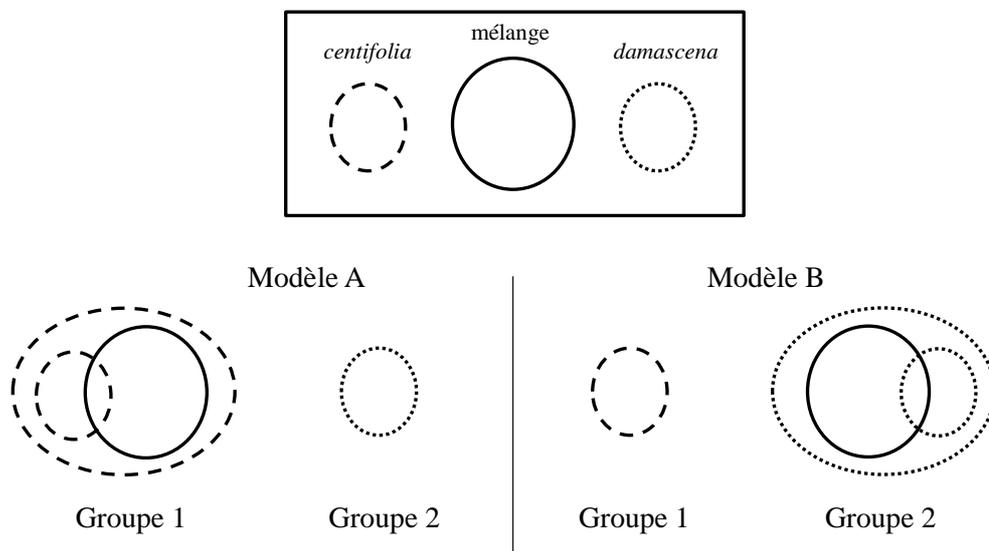


Figure 68: Description du modèle A et du modèle B

Pour le premier modèle (A), les échantillons des mélanges entre *R. damascena* et *R. centifolia* et les échantillons *R. centifolia* purs ont été regroupés sous le groupe 1. Un modèle PLS-DA a alors été construit avec groupe 1 versus le groupe d'échantillons *R. damascena* purs. **Ce modèle n'a pas pu être validé.** Pour le second modèle (B), les échantillons des mélanges entre *R. damascena* et *R. centifolia* et les échantillons *R. damascena* purs ont été regroupés sous le groupe 2. Le groupe 2 a alors été comparé au groupe d'échantillons *R. centifolia* purs. **Ce modèle (B) a été validé selon la première composante PLS-DA ($R^2Y = 0,88$ et $Q^2 = 0,70$) avec 100 permutations.** Prenant ainsi en considération le fait que **le modèle initial comparant les échantillons purs *R. damascena* et *R. centifolia* (Tableau 27, Figure 63) était validé**, que le modèle (A) n'est pas validé, et que le modèle (B) est validé, il peut être conclu que le groupe des mélanges d'échantillons est davantage similaire aux échantillons *R. damascena* qu'aux *R. centifolia*. Ce qui est en effet le cas puisque entre 10, 20 et 30% de *centifolia* étaient ajoutés aux échantillons *R. damascena*.

D'après ces résultats, une adultération peut être attestée avec une très forte probabilité.

2.2.4.2. Origines géographiques de *Rosa damascena* : Maroc versus Turquie

La Figure 69 représente deux chromatogrammes de *R. damascena* de Turquie et du Maroc montrant de très fortes similitudes. Les échantillons de *Rosa damascena* du Maroc et de Turquie sont cependant bien discriminés (Tableau 27, Figure 70). Aucun marqueur respectant nos critères de sélection n'a été détecté comme dans la problématique de l'espèce botanique. Ceci signifie qu'aucun marqueur avec un ratio d'intensité minimum de deux n'a été trouvé entre les deux origines.

D'autres modèles ont été étudiés mais non validés. Le modèle avec le mélange Turquie avec Maroc, comparé au Maroc et comparé à la Turquie (modèle à trois groupes) n'a pas été validé. Le modèle a alors été simplifié avec la comparaison du mélange Turquie et Maroc avec les échantillons de Turquie purs (deux groupes) : ce modèle n'a pas non plus été validé. Les différences entre les origines géographiques ne sont donc pas suffisamment importantes. Ces résultats montrent une fois de plus qu'il est difficile de mettre en évidence une adultération si les différences initiales entre les échantillons purs ne sont pas suffisamment importantes.

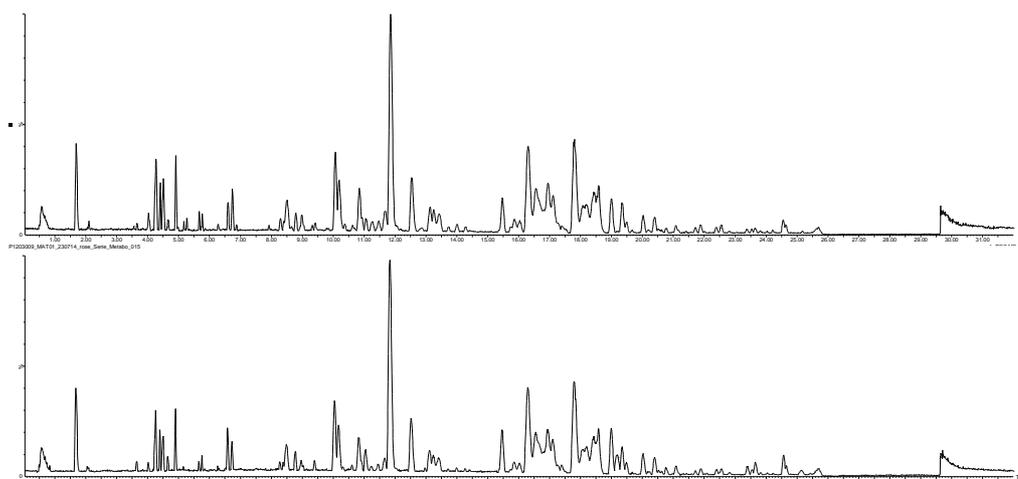


Figure 69: Chromatogrammes de *R. damascena* de Turquie (en haut), du Maroc (en bas)

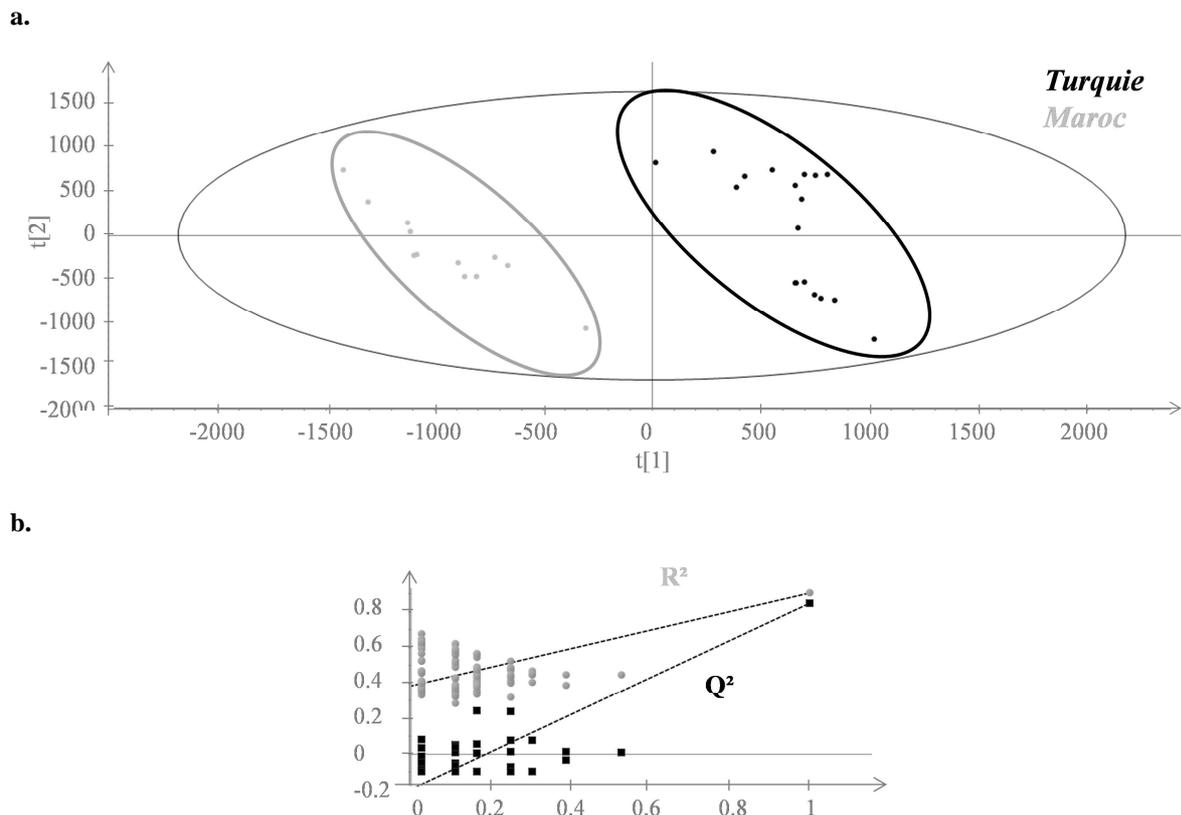


Figure 70: a. Scores plot du modèle PLS-DA Maroc vs Turquie ; b. test de permutation validé

2.2.4.3. Adulteration avec des composés synthétiques : nonadécane et alcool phényl éthylique

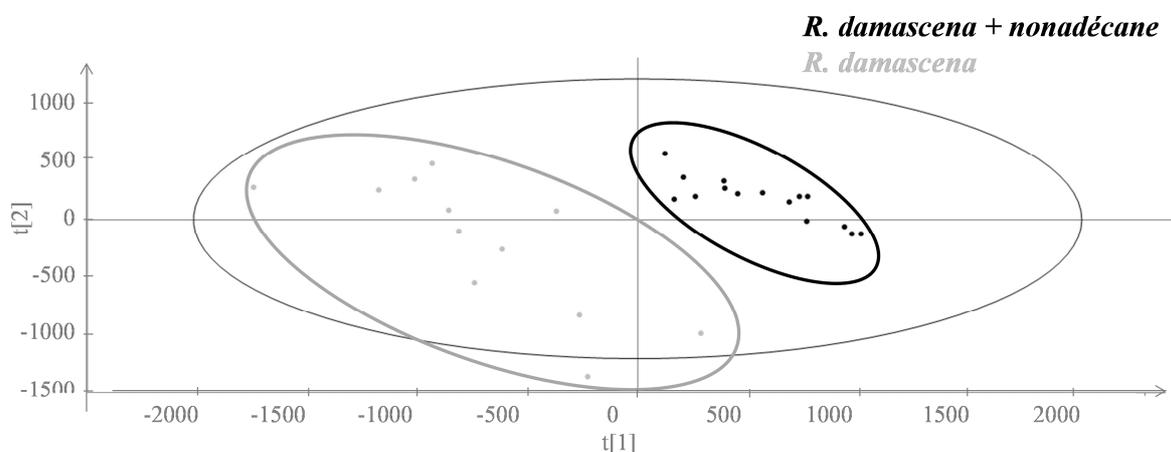
Le nonadécane est naturellement présent dans l'absolue de rose (4,35 % de la fraction volatile [20]). Il s'agit d'une adulteration économiquement intéressante avec un prix de 650 €/Kg (Acros Organics) pour une absolue de rose pouvant coûter jusqu'à 16500 €/Kg. Nous l'avons dosé par étalonnage externe dans trois absolues de *R. centifolia* et trois absolues de *R. damascena* (Tableau 30). On le retrouve à 3,1 % \pm 1,0 % dans l'absolue totale de *R. damascena*.

Tableau 30 : Dosage de l'alcool phényléthylique et du nonadécane dans l'absolue de rose par GC-FID

	<i>R. centifolia</i>	<i>R. damascena</i>
Alcool phényléthylique (%)	24,4 ± 10,9	36,7 ± 2,4
Nonadécane (%)	1,1 ± 1,1	3,1 ± 1,0

L'ajout de nonadécane (5 %, 10 % et 15 %) aux échantillons de *R. damascena* a été mis en évidence par le modèle PLS-DA (Figure 71). Le composé n'est pas ionisé en électrospray, mais l'effet dilution dû à l'ajout de ce composé, a permis la détection de l'adultération.

a.



b.

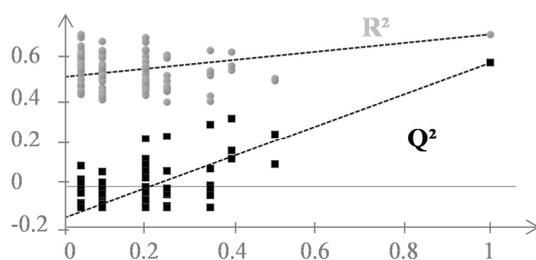


Figure 71: a. Scores plot du modèle PLS-DA, adultération avec le nonadécane ; b. test de permutation validé

L'alcool phényl éthylique est un composé odorant caractéristique de la note olfactive de la rose. Il est naturellement présent dans l'absolue (63,19-71,80 % dans la fraction volatile [19]) et peut être trouvé à 5,50 €/Kg (synthétique, Bernardi), le rendant ainsi un composé adultérant de choix. Il a aussi été dosé dans trois absolues de *R. centifolia* et de *R. damascena* (Tableau 30). On le retrouve à 36,7 % ± 2,4 % dans l'absolue totale de *R. damascena*. Le modèle PLS-DA *R. damascena* adultéré versus *R. damascena* pur, n'a pas été validé. L'ajout

de ce composé à hauteur de 5, 10 et 15 % n'a donc pas été détecté. L'effet dilution n'est pas visible comme dans le cas du nonadécane (modèle non validé), et il n'est pas non plus ionisé en électrospray positif. Nous supposons ainsi que la teneur en alcool phényléthylrique dans les échantillons purs varie naturellement dans des proportions similaires aux ajouts (au moins pour les ajouts de 5 et 10 %). Aucune discrimination ne peut alors être envisagée à ces teneurs.

Dans cette étude sur l'absolue de rose, nous avons pu discriminer les deux espèces botaniques et proposer des marqueurs de l'absolue de *R. centifolia*. Les origines géographiques de la *R. damascena* Turquie et Maroc ont aussi pu être discriminées par un modèle PLS-DA valide. Cependant aucun marqueur fort de cette discrimination n'a pu être mis en évidence. L'adultération avec le nonadécane (5, 10 et 15 %) a été détectée par un effet dilution de l'ajout de ce composé dans l'absolue. Dans un cas réel, l'adultération aurait été détectée, mais aucune identité n'aurait pu être proposée (dans le mode d'ionisation électrospray). Enfin, l'adultération avec l'alcool phényl éthylique, étant réalisée dans des teneurs faibles (au maximum la moitié de la teneur réelle avec les 15 %), et considérant une variation au sein d'échantillons d'un même groupe proche des teneurs ajoutées (pouvant aller jusqu'à 5 % de différence sur l'exemple des trois échantillons de *R. damascena* dosés en GC-FID), la détection de cette adultération à 5, 10 et 15 % n'a pas pu être réalisée.

2.2.5. Discussion sur la possibilité et les limites de la réutilisation de données archivées

Cette deuxième partie d'étude sur la rose permet d'ouvrir une discussion importante : dans quelle mesure est-il possible de réunir au sein d'un même modèle statistique des données acquises à deux instants différents. En effet, avec pour objectif d'utiliser l'approche métabolomique dans une démarche d'authenticité et de contrôle qualité à réception de nouveaux échantillons, une telle possibilité permettrait l'obtention de résultats rapides. Dans le cas contraire, de nouvelles analyses de l'ensemble des échantillons et du nouvel échantillon seraient consommatrices de temps et impossible « pratiquement » à réaliser.

Nous nous intéressons tout d'abord aux données brutes, obtenues juste après l'acquisition, avant une quelconque correction ou normalisation. Dans un deuxième temps nous évaluerons les solutions à envisager pour pouvoir traiter ces données.

2.2.5.1. Etude des données brutes

Un nouveau jeu de données a été acquis indépendamment de celui exploité dans la première partie du chapitre sur la rose, en une seule série à « t + 4 mois » (cf. Partie expérimentale). L'objectif de cette étude est de comparer des données acquises à un temps « t » à celles acquises à un temps « t + 4 mois » sur les mêmes échantillons conservés au réfrigérateur à 4 °C et sur ces mêmes références d'échantillons fraîchement préparés.

Une superposition des chromatogrammes des différentes sources de données a confirmé la possibilité d'effectuer des comparaisons en termes d'intensités et de largeurs de pics (Figure 72). Afin de travailler sur l'ensemble de ces données dans un même modèle, il a fallu réaliser une nouvelle extraction des ions dans une matrice unique (en élargissant la fenêtre de temps de rétention pour palier au décalage des temps de rétention).

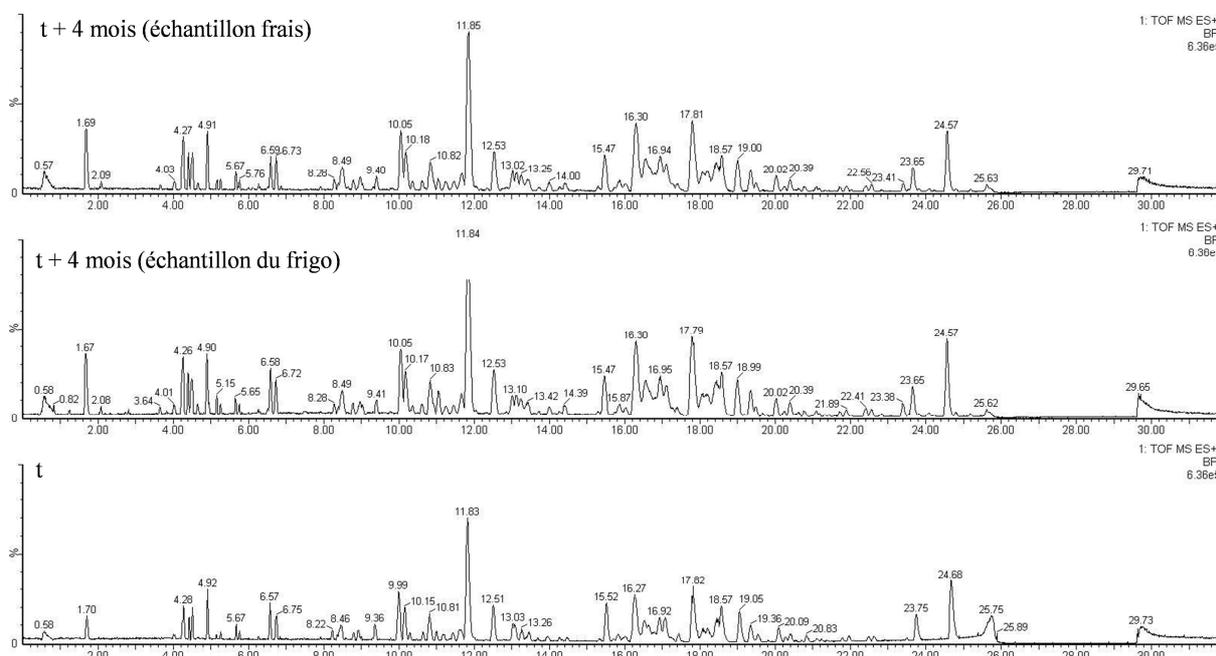


Figure 72: Comparaison des analyses de R25 à t, t + 4 mois conservé au frigo, t + 4 mois fraîchement préparé

Les positions des pools de « t + 4 mois frais » et de « t + 4 mois frigo » ont été contrôlées sur des ACP séparées : les pools étaient bien centrés au milieu de leurs données respectives, ce qui confirme le bon déroulement de l'acquisition des données.

Sur la Figure 73, sont représentées l'ensemble des données brutes. Si les données à « t » sont prises comme référence, les données à « t + 4 mois frais » et à « t + 4 mois frigo » sont décalées par translation horizontale. Ces données à « t + 4 mois » (frais et frigo) ont été analysées dans la même série. L'effet de translation est donc probablement lié à la conservation des échantillons au frigo durant 4 mois. Le décalage entre « t + 4 mois frais » et

« t » doit être principalement dû aux variations inhérentes au spectromètre de masse, très sensible à l'environnement du laboratoire, à des contaminations, etc.

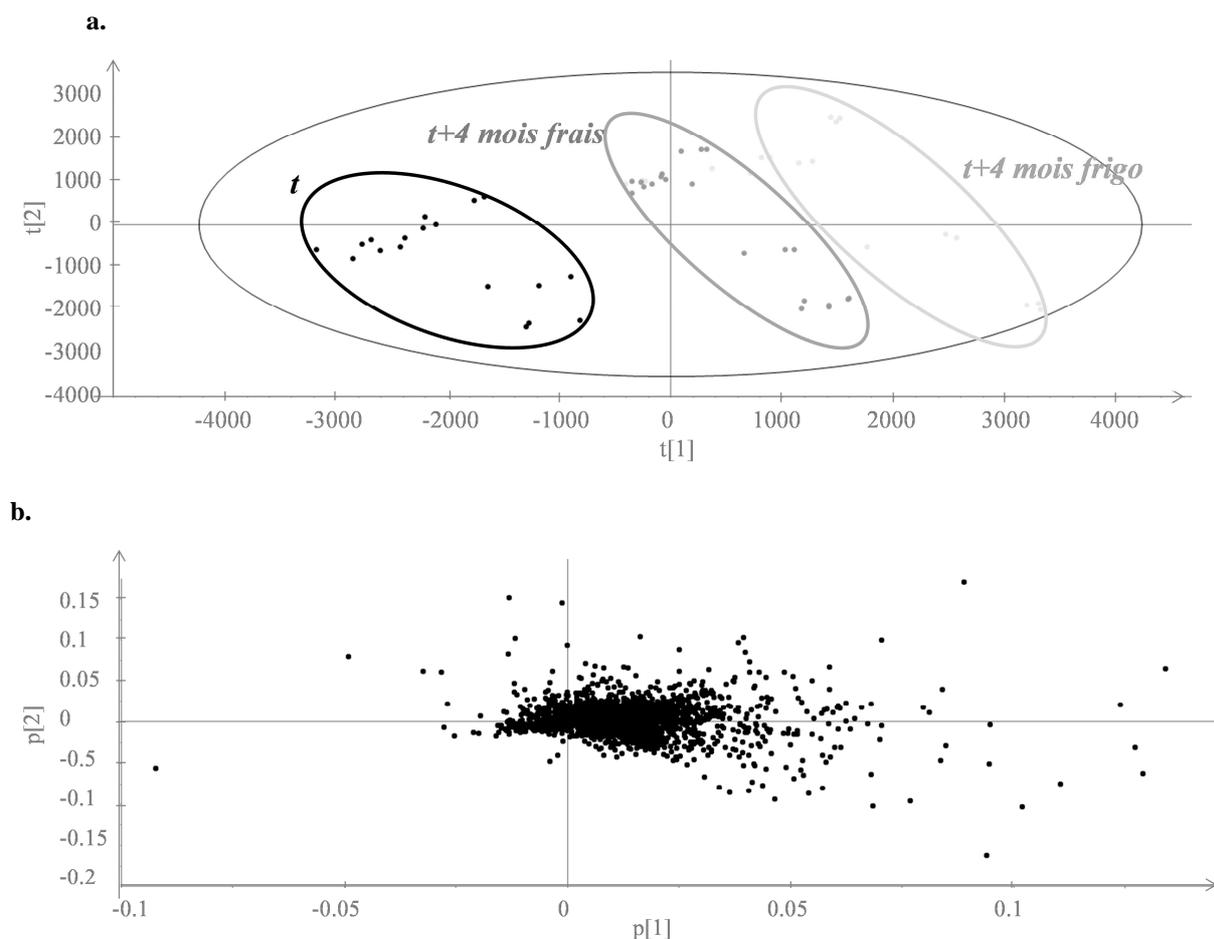
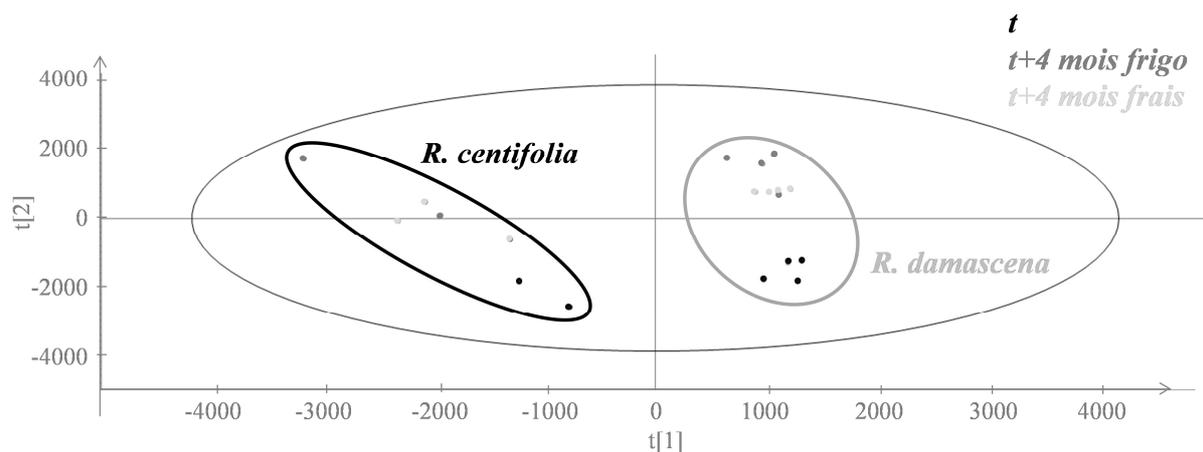


Figure 73: a. ACP de l'ensemble des données brutes ; b. Loadings plot correspondant

2.2.5.2. Etude de nouveaux modèles

Afin d'étudier les données plus précisément à l'aide des modèles PLS-DA, les valeurs moyennes des intensités des triplicats de l'ensemble des données ont été calculées (« t », « t+4 mois frigo », « t+4 mois frais »). Le modèle correspondant à la distinction entre *R. damascena* et *R. centifolia* a ensuite été construit (Figure 74). Il a été validé selon la première composante PLS-DA ($R^2Y = 0,90$ et $Q^2 = 0,80$).

a.



b.

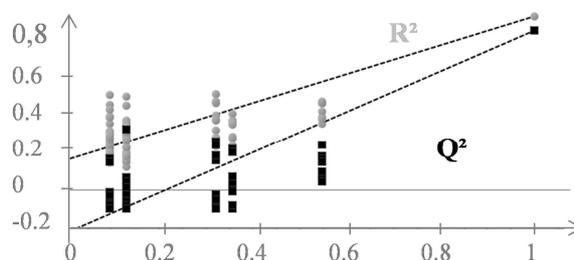


Figure 74: a. Scores plot du nouveau modèle PLS-DA avec l'ensemble des données réunies ; b. test de permutation validé

Les valeurs des ions VIP (Variable Importance for Projection : importance de la variable pour la prédiction d'un modèle) avaient presque les mêmes valeurs que celles du modèle de la première étude (données à « t »), celles du modèle « t + 4 mois frais » ($R^2Y = 0,95$ et $Q^2 = 0,89$) et ce nouveau modèle comprenant toutes les données réunies (Tableau 31). Ces valeurs représentent la contribution du marqueur dans le calcul du modèle.

Tableau 31 : Valeurs des VIP pour les différents modèles à t, t + 4 mois frais, et avec l'ensemble des données

VIP	t	t+4 mois frais	Nouveau modèle
TR_4,69_mz_285,2429	2,2	1,7	2,0
TR_5,57_mz_293,2118	3,8	3,7	4,3
TR_5,57_mz_275,2012	4	4,7	5,2
TR_5,77_mz_277,2170	8,1	8,5	9,6
TR_6,28_mz_279,2326	6,7	5,8	6,7
TR_6,74_mz_277,2168	4,9	4,7	5,3

Cependant, le même travail effectué pour distinguer l'origine Maroc de l'origine Turquie n'a pas donné de modèle validé. Ainsi, **la possibilité d'introduire de nouvelles analyses parmi d'anciennes données peut être problématique dans certains cas.**

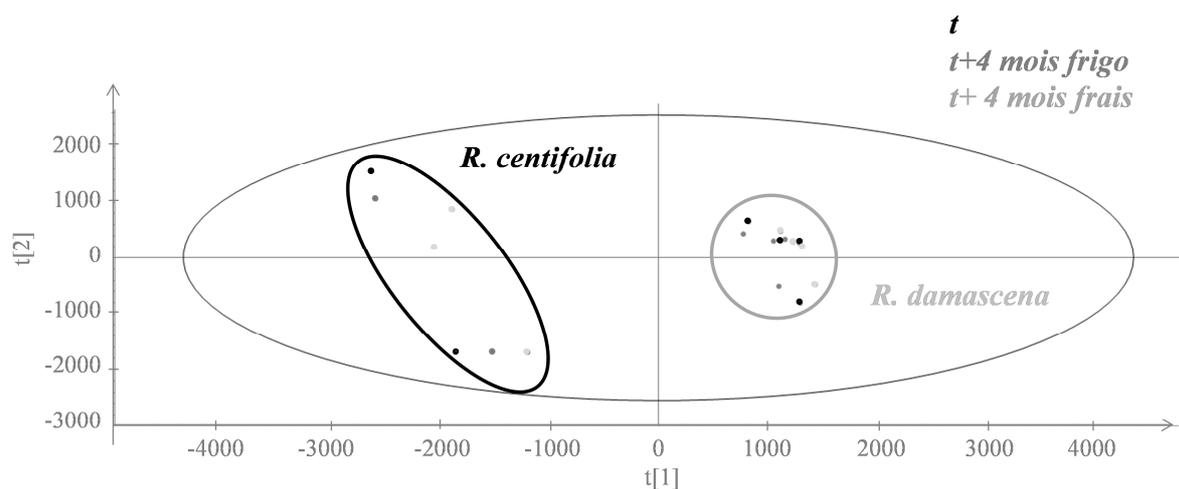
La correction de Van der Kloet utilisée dans la première étude ne pourrait pas être employée pour corriger les données dans ce cas précis :

- 1) Le pool ne pourrait pas être rigoureusement identique (en effet les nouveaux échantillons n'étaient pas présents dans l'étude précédente).
- 2) Le pool doit être préparé au même moment que les échantillons.

Ces critères n'étant pas respectés, un biais supplémentaire pourrait être introduit avec l'utilisation de ce type de correction. Une autre solution peut alors être envisagée. Nous avons testé un autre type de normalisation : les valeurs moyennes des intensités de chaque ion pour chaque catégorie d'échantillons (« t », « t + 4 mois frais », « t + 4 mois frigo ») ont été calculées ; ainsi, chaque intensité d'ion était ensuite divisée par la valeur moyenne correspondant à sa catégorie d'échantillons, et ensuite multipliée par la valeur moyenne globale des trois catégories.

Comme le montre l'ACP de la Figure 75, la normalisation a permis de corriger les biais entre les données à « t », « t + 4 mois frais » et « t + 4 mois frigo ».

a.



b.

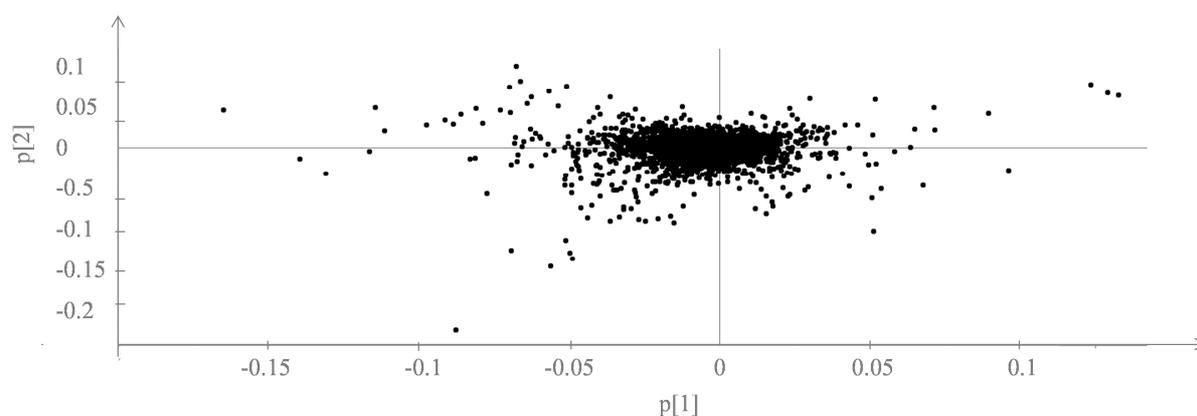


Figure 75: a. ACP des données normalisées ; b. Loadings plot correspondant

L'impact de cette correction a été de nouveau évalué sur le modèle PLS-DA *R. centifolia* / *R. damascena*. Les valeurs $R^2Y = 0,95$ and $Q^2 = 0,93$ ont encore été améliorées sur la première composante de la PLS-DA. Les valeurs VIP du modèle après normalisation (Tableau 32) sont très similaires à celles des modèles précédents (Tableau 31).

Tableau 32: Valeurs des VIP du modèle après normalisation

VIP	Nouveau modèle après normalisation
TR_4,69_mz_285,2429	1,9
TR_5,57_mz_293,2118	4,0
TR_5,57_mz_275,2012	4,9
TR_5,77_mz_277,2170	9,1
TR_6,28_mz_279,2326	6,4
TR_6,74_mz_277,2168	5,0

La distinction entre l'origine Turquie et l'origine Maroc n'a encore pas pu être résolue après cette correction.

Les différences de résultats entre les deux modèles (*R. centifolia*/*R. damascena*: (C), Turquie/Maroc: (D)) sont expliqués par la présence de marqueurs importants pour (C) (avec des ratios d'intensités entre 3 et 9 fois supérieurs pour la *R. centifolia*), absents dans le modèle (D). Une hypothèse serait de dire qu'effectivement, il existe des **différences entre le Maroc et la Turquie, constantes, mais peu importantes**. Ces échantillons auraient des **différences très fines**, qui seraient **du même ordre de grandeur que les valeurs des variations dues à l'instrumentation analytique**. Ainsi, quand d'anciennes données sont comparées à de nouvelles données, ces biais analytiques empêcheraient de discriminer les échantillons.

En conclusion, pour comparer d'anciennes données et de nouvelles données, l'extraction des ions doit être de nouveau réalisée, avec quelques modifications de paramètres (normalement juste la fenêtre de temps de rétention). Une normalisation peut être appliquée, comme décrite dans la dernière partie, pour réduire les différences d'intensité et améliorer les résultats. **Cette normalisation est efficace dans le cas où il existe de fortes différences entre les groupes d'échantillons**. Van der Kloet n'est pas une correction à envisager dans le cas présent. Ceci pointe bien le besoin d'obtenir systématiquement des analyses rigoureuses afin d'avoir par la suite un minimum de biais à corriger. La correction Van der Kloet est cependant très précieuse lorsqu'il s'agit d'étudier un très grand nombre d'échantillons répartis dans de multiples séries d'analyses, pour pouvoir distinguer jusqu'à de très faibles différences entre les échantillons.

Une réflexion importante doit être menée en amont de toute étude métabolomique dépendant du :

- nombre d'échantillons certifiés
- nombre de groupes à étudier : peut conduire à une division de l'étude métabolomique en plusieurs séries d'analyses spécifiques à une question donnée, ou au contraire à mélanger l'ensemble des échantillons s'ils peuvent tous servir à répondre à plusieurs problématiques (le cas de nos travaux)
- utilisation des données : ponctuelle ou potentiellement réutilisables

2.3. Discussion et conclusion : apport de l'approche métabolomique dans le secteur arômes et parfums

La composition de la fraction non volatile d'un extrait naturel est d'une grande richesse. Cette source d'information est jusqu'à présent peu exploitée dans les extraits solvant (concrètes et absolues) utilisés en parfumerie. Etant peu étudiée, elle est aussi peu contrôlée et laisse donc la possibilité d'une variabilité importante sur 50 à 95 % de l'extrait total. Les absolues sont utilisées en parfumerie, en cosmétiques mais aussi en arômes alimentaires. Elles sont donc omniprésentes en parfumerie fine, mais aussi dans les produits de consommation courante. L'ingrédient est alors soumis à plusieurs réglementations, selon son application finale, afin de protéger le consommateur. Les absolues sont utilisées pour leurs propriétés organoleptiques, et principalement pour leur qualité olfactive en parfumerie. Cependant, cette qualité peut varier selon la composition non volatile de la matrice : les propriétés des molécules odorantes peuvent en être impactées (la volatilisation notamment, et donc l'odeur perçue).

A ce jour, nous avons répertorié très peu d'études métabolomiques en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution en lien avec les ingrédients naturels utilisés en parfumerie. Deux études ont retenu notre attention : une première sur l'étude de l'origine de production et des procédés d'extraction des huiles essentielles de citron [62] et une seconde sur l'authentification géographique et botanique des rhizomes d'iris [118]. Cette thèse réunit ainsi les premiers travaux sur les absolues, extraits complexes, dont la fraction non volatile est peu connue.

Deux études de cas ont été réalisées pour évaluer l'intérêt d'une approche métabolomique non ciblée sur deux extraits emblématiques de l'orgue du parfumeur.

- L'absolue de feuilles de violette de l'espèce *Viola odorata*, avec son odeur verte, puissante, à la note de concombre.
- L'absolue de pétales de roses, des espèces *Rosa centifolia*, à odeur de rose fraîche, verte, abricot et *Rosa damascena*, à odeur confiturée, mieillée, avec des notes plus grasses.

L'absolue de feuilles de violette France a pu être discriminée de l'Egypte : autant dans l'étude de la fraction volatile et des odorants, que dans l'étude de la fraction non volatile avec la mise en évidence de neuf composés marqueurs, probablement issus d'une même famille chimique azotée, à priori non basique, et comprenant une sous structure de type « cholestane ». La présence de ces marqueurs à l'état de traces dans l'absolue a été le facteur limitant les

possibilités de les isoler. L'adultération de la fraction non volatile avec le linoléate de méthyle, composé naturellement présent dans l'extrait, a été clairement identifiée pour des adjonctions de 10, 15 et 20 %. En revanche, les extraits provenant de plusieurs fournisseurs d'Egypte n'ont pas pu être différenciés, montrant probablement une très forte similitude dans la fraction non volatile de ces extraits. L'adultération par le (*E,Z*)-2,6-nonadienal représentatif de l'odeur de concombre, de 0,1 % à 1 % dans l'absolue n'a pas pu être mise en évidence par cette méthode. Ce composé, minoritaire dans l'absolue (entre 0,06 % et 0,15 %), présente un très fort pouvoir odorant et impacte ainsi fortement la qualité olfactive de l'extrait. Cependant, malgré son ionisation en électrospray positif dans un solvant, ce composé n'a pas été détecté dans la matrice absolue. Dans ce cas précis, la GC-MS serait une technique plus adaptée pour mettre en évidence l'adultération (composé volatil qui s'ionise très bien en Ionisation électronique). Ceci rappelle la nécessité de la complémentarité des méthodes, et donc la difficulté à trouver une méthode « universelle » permettant de mettre en évidence tous types de problèmes liés à l'authenticité.

L'absolue de *Rosa centifolia* est un des extraits les plus coûteux de la parfumerie. Nous avons pu la différencier de l'absolue de *Rosa damascena* par six marqueurs. Plusieurs hypothèses d'identifications ont été testées, suite à la consultation de la base de données « The Good Scents Company », par le biais de composés synthétisés et de composés standards commercialisés. Deux marqueurs (issus du même composé) ont pu être identifiés grâce à un standard disponible dans notre laboratoire, à 5,57 min, m/z 293,2118 et m/z 275,2012 : **l'acide 12-oxophytodiénoïque**. Le m/z 293,2118 est le $[M+H]^+$ de ce composé, tandis que le m/z 275,2012, est son fragment.

Les absolues de *Rosa damascena* d'origine Maroc et Turquie ont aussi pu être distinguées par PLS-DA, mais nous n'avons présenté aucun marqueur d'origine, ceux-ci n'entrant pas dans nos critères de sélection (rapport d'intensité entre les groupes au minimum supérieur à 2).

L'adultération à 5, 10, 15 % en nonadécane a été observée par la PLS-DA. Cependant, seul l'effet dilution du composé a été mis en évidence. Dans ce cas-là, aucune identification du moyen d'adultération ne serait possible par cette technique : en effet, le composé n'est pas ionisable en électrospray. Ici encore, l'utilisation d'une autre source d'ionisation (Ionisation électronique, et GC, puisque le composé est volatil) serait la solution. La combinaison de plusieurs techniques peut ainsi se révéler, une fois de plus, indispensable.

L'ajout de l'alcool phényléthylique à 5, 10, 15 %, composé odorant naturellement présent dans l'absolue et caractéristique de l'odeur de la rose, n'a pas été mis en évidence. Une des hypothèses formulées est la suivante : la variation naturelle de la teneur de ce composé dans les absolues est supposée être du même ordre de grandeur que les ajouts appliqués.

L'adultération avec un composé, même volatil, s'il est ionisable en électrospray, selon la teneur de l'adultération, peut être mise en évidence en UHPLC-ToFMS. Cette technique permet de couvrir une gamme importante d'analytes : à la fois les composés volatils et les composés non volatils. En revanche, un complément en GC-ToFMS (à Ionisation électronique) permettrait d'offrir un champ plus large pour les composés volatils non ionisables en électrospray (tel que le nonadécane).

Une des grandes questions soulevées lors de ces travaux était de savoir dans quelle mesure les données acquises pourraient être réutilisées. Dans le cadre de notre étude, la durée d'analyse de la méthode développée est de 32 min. La construction d'un modèle, demanderait 6 à 8 échantillons pour représenter chaque groupe, ce qui est une valeur minimale : plus le nombre d'échantillons est important, mieux sont gommées les différences dues à l'individu (variations biologiques inévitables dans toute entité individuelle d'une même espèce). Ainsi, l'étude d'un seul nouvel échantillon, en respectant la construction d'une séquence métabolomique, nécessiterait, dans le cas de l'étude sur deux groupes (deux espèces botaniques par exemple) 55 analyses, soit 29 h et 20 min d'analyse. Il est donc indispensable de proposer des éléments de réponse à cette question, primordiale pour estimer les contraintes de la mise en œuvre d'une telle méthode. Ainsi, dans l'étude sur la rose, nous nous sommes intéressés au traitement de données acquises à un temps t , sur des échantillons donnés préparés à t , et de données acquises à un temps $t + dt$, sur les mêmes références d'échantillons, mais préparés à $t + dt$. Les résultats ont montré la possibilité d'introduire de nouvelles données aux anciennes, tout en gardant un œil très critique à chaque étape de retraitement. Cette comparaison des données a été rendue possible par la présence de forts marqueurs d'intensité discriminant les deux groupes *R. centifolia* et *R. damascena*. En revanche, pour des groupes d'échantillons, tels que l'origine géographique Maroc et Turquie (de *R. damascena*) ici, ce nouveau traitement a été un échec. En effet, aucun marqueur de forte intensité n'avait été révélé dans la première partie de notre étude. Le mélange des données à un temps $t + dt$ n'a alors pas été concluant. Le cadre dans lequel les données peuvent être réutilisées doit alors être bien défini. Cette dernière remarque n'enlève pas la puissance de l'outil métabolomique. Dans un objectif de recherche de nouveaux types d'adultérants des extraits, il offre de larges perspectives (notamment avec l'utilisation de la correction Van der Kloet, indispensable lors de l'étude d'un grand nombre d'échantillons). Une fois identifiés, ces adultérants peuvent alors être recherchés de manière ciblée dans les nouveaux échantillons et dosés.

Même si l'acquisition des données sur un instrument tel qu'un UHPLC-ToFMS est onéreuse (instrument coûteux, opérateur expérimenté pour la manipulation, solvants de très haute qualité), la forte valeur économique de certains extraits naturels peut justifier le choix de cette approche pour garantir l'authenticité. La quantité des échantillons utilisée peut être minimale (50 mg), du fait de la très grande sensibilité de l'appareillage.

Nous avons essayé de réaliser une collecte d'informations exhaustive sur les absolues de feuilles de violette France et Egypte. Nous nous sommes très vite heurtés à plusieurs problèmes. Les intermédiaires de la filière des ingrédients arômes/parfums peuvent être nombreux. La première étape est la culture, par l'agriculteur. Dans un second temps, intervient le courtier : il va s'approvisionner en matière végétale chez différents agriculteurs selon la quantité qui lui a été demandée par l'industrie productrice de l'extrait. Enfin, les extraits obtenus peuvent aussi être achetés par d'autres industriels producteurs de matières premières. La traçabilité, selon le pays cultivateur peut alors être très difficile à suivre. Finalement, même dans un cas « simple », avec des fournisseurs volontaires et collaboratifs, la collecte d'informations a été difficile à réaliser, et très imprécise. Nous avons alors recentré notre travail sur des critères contrôlables d'origines géographiques et d'espèces botaniques.

La plus grande limite de ces travaux a finalement été la caractérisation des composés identifiés comme marqueurs. Cette difficulté est en premier lieu due à une mauvaise connaissance de ces extraits. Très peu d'études sont disponibles sur les fractions non volatiles. Il n'y a ainsi pas de bases de données. Elles devraient être construites en interne, sur un appareil donné, dans des conditions précises. En effet, l'ionisation des composés et les rendements de fragmentation, dépendent fortement des conditions analytiques : source d'ionisation et conditions de fragmentation induites par collision.

La seconde difficulté est finalement liée à une des performances de l'instrument analytique : la grande sensibilité, permettant la détection d'éléments traces. Ce paramètre est un avantage pour l'étude exhaustive des échantillons. Il peut s'agir en revanche d'un inconvénient pour deux raisons :

- la détection de contaminants (liés à différentes sources : la verrerie, les contacts avec différents plastiques, les solvants, une pollution atmosphérique, etc.) pouvant occulter des composés d'intérêt

- la détection de composés marqueurs du fait de leur très bonne ionisation (présentant un fort rapport d'intensités entre les origines), mais à l'état de traces dans l'échantillon : l'isolement de ces composés devient alors très problématique.

Ce dernier inconvénient peut aussi être perçu comme un avantage : la mise en évidence de marqueurs majoritaires dans l'extrait, permettrait une caractérisation aisée du composé, et donc une fraude plus accessible. Cependant, pour des marqueurs minoritaires, indécélables par d'autres techniques, pour lesquels il est malheureusement très complexe de déterminer l'identité exacte (autre que le temps de rétention, une valeur de masse exacte et un spectre de fragmentation dans des conditions précises), nous sommes en présence d'éléments d'authentification indiscutables. L'identité n'étant pas révélée, la fraude devient alors impossible à réaliser, ou à masquer. Pour le cas de l'adultération, si elle est importante (ce qui est le cas pour une fraude sur la fraction non volatile – sinon inutile), soit on observera un effet dilution (avec une adultération donc difficile à identifier), soit on pourra aller à l'identification du composé (mode positif, et mode négatif). La caractérisation de l'adultérant peut encore rester un problème pour les mêmes raisons que citées précédemment.

Nous concluons sur l'intérêt de cette méthodologie dans le secteur arômes et parfums. Deux types de situations sont à distinguer :

- une entité disposant de l'instrument analytique UHPLC-HRMS : il est alors possible d'accumuler des données pour discriminer des échantillons, même dans les cas où la caractérisation des marqueurs n'est pas possible.

- une entité disposant uniquement de résultats d'études et d'instruments analytiques plus classiques : l'utilisation de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution permet la mise en évidence de marqueurs spécifiques, pouvant ensuite être l'objet d'études ciblées sur un autre instrument analytique plus simple.

Dans le premier cas, des travaux pourraient être réalisés inter-laboratoires, afin de contrôler la mise en évidence de ces mêmes marqueurs par les mêmes échantillons et la même méthodologie. Il reste cependant très important d'appuyer le fait que la mise en œuvre d'une approche à empreinte métabolomique par UHPLC-HRMS est à considérer comme une méthodologie très rigoureuse, à éloigner de l'idée d'une technique simple et automatique.

Pour un laboratoire disposant uniquement des résultats d'études, des techniques de dosage des composés marqueurs caractérisés peuvent être mises en place, sous réserve d'un seuil de détection suffisamment élevé pour des instruments type GC/MS, GC-FID et LC-UV-ELSD par exemple. Dans le cas d'un composé à l'état de trace, une préparation d'échantillon spécifique pourrait être envisagée.

Enfin, la mise en place d'un projet collaboratif avec un grand nombre d'industries productrices d'extraits permettrait l'élaboration d'une large étude avec la solution à une limite inévitable : l'approvisionnement en échantillons certifiés.



Chapitre 3 : Matériels et méthodes analytiques

3.1. Echantillons et produits chimiques

3.1.1. Echantillons

Les absolues de feuilles de violettes d'origine Egypte ont été fournies par trois fournisseurs égyptiens (Zagazig pour le fournisseur 1, Tanta pour le fournisseur 2, Qalyoubeya et Tanta pour le fournisseur 3 – régions situées dans le delta du Nil). Les absolues de feuilles de violettes d'origine France ont été extraites chez Payan Bertrand, de récoltes provenant de l'exploitation de Mr Quentin à Tourrettes-sur-Loup (06140 France). L'identité taxonomique de la plante a été certifiée par le Dr. Thomas Marcussen, physiologiste des plantes et spécialiste du genre *Viola* [9,10] sur photographie de la plante : tiges, feuilles, fleurs, racines de France et d'Egypte (Figure 76). Les spécimens ont été déposés au Jardin Botanique de Nice (référéncé internationalement sous le nom : JBVN) avec les numéros d'enregistrement suivants : C-3752 pour Tourrettes-sur-Loup, C-3753 pour le fournisseur 2 et C-3754 pour le fournisseur 1. Les échantillons proviennent de différentes années allant de 2005 à 2013 (Tableau 33). Les échantillons sont stockés à l'abri de la lumière à une température de 15°C.



Figure 76: Photos des spécimens France, Egypte 1 et Egypte 3

Tableau 33: Liste des échantillons d'absolues de feuilles de violette

Référence	Origine	Année	Référence	Origine	Année
V04	France	2008	V35	Egypte 2	2009
V19	France	2006	V36	Egypte 2	2008
V20	France	2006	V06	Egypte 1	2011
V21	France	2006	V22	Egypte 1	2006
V51	France	2013	V23	Egypte 1	2005
V37	France	2005	V26	Egypte 1	2006
V02	Egypte 2	2012	V27	Egypte 1	2008
V03	Egypte 2	2010	V29	Egypte 1	2006
V05	Egypte 2	2011	V31	Egypte 1	2006
V24	Egypte 2	2010	V34	Egypte 1	2008
V25	Egypte 2	2010	V50	Egypte 1	2013
V30	Egypte 2	2005	V28	Egypte 3	2010
V32	Egypte 2	2010	V47	Egypte 3	2012
V33	Egypte 2	2005	V48	Egypte 3	2012
			V49	Egypte 3	2011

Pour l'étude de l'absolue de pétales de roses, les échantillons proviennent de quatre origines géographiques : Maroc, Bulgarie, Turquie et France. Les échantillons d'origine Maroc, Bulgarie et Turquie sont des absolues de *Rosa damascena* Mill., tandis que les absolues de France sont de *Rosa centifolia* L. provenant de trois producteurs de matières premières grassois. Ces échantillons sont des extraits obtenus en 2010, 2011, 2012 et 2013 (Tableau 34).

Tableau 34: Liste des échantillons d'absolues de pétales de rose

Référence	Origine	Année	Référence	Origine	Année
R01	Maroc	2010	R21	Turquie	2011
R02	Maroc	2011	R22	Turquie	2011
R03	Maroc	2011	R23	Turquie	2011
R04	Maroc	2011	R24	Turquie	2011
R05	Maroc	2011	R25	Turquie	2010
R06	Maroc	2012	R26	Turquie	2010
R07	Maroc	2012	R27	Turquie	2010
R08	Maroc	2012	R28	Turquie	2010
R09	Maroc	2012	R29	Turquie	2012
R10	Maroc	2013	R30	Turquie	2012
R11	Maroc	2013	R31	Turquie	2012
R12	Maroc	2013	R32	Turquie	2012
R13	Bulgarie	2013	R33	Turquie	2012
R14	Bulgarie	2011	R34	Turquie	2012
R15	Mix*	2011	R35	Turquie	2013
R16	Mix*	2010	R36	Turquie	2013
R17	Mix*	2011	R37	France	2013
R18	Mix*	2011	R38	France	2013
R19	Turquie	2011	R39	France	2013
R20	Turquie	2011	R40	France	2013

*Mix correspond à un mélange commercial non défini de *Rosa damascena* et de *Rosa centifolia*

3.1.1.1. Absolues de violette : analyse sensorielle, HS-SPME-GC/MS

- Les absolues de feuilles de violettes utilisées pour l'étude des profils odorants ont été fabriquées en 2008 (V04, V27, V36). Il s'agissait d'un échantillon d'origine France de Payan Bertrand, un échantillon d'origine Egypte du fournisseur 1 et un échantillon d'origine Egypte du fournisseur 2.
- Les absolues de feuilles de violettes utilisées pour l'étude de l'impact du (*E,Z*)-2,6-nonadiénal sont V02, V24, V25.

3.1.1.2. Absolues de violette et absolues de rose : analyses GC/O et GC-FID

Les deux échantillons d'absolue de feuilles de violette utilisés pour l'analyse par GC/O et GC-FID sont l'échantillon France et l'échantillon Egypte fournisseur 2 cités ci-dessus (V04, V36). Les six échantillons d'absolue de rose utilisés pour le dosage de l'alcool

phényléthylque et du nonadécane en GC-FID sont : R38, R40 et R41 pour la *R. centifolia* et R01, R13 et R19 pour la *R. damascena*.

3.1.1.3. Absolues de violette et absolue de rose : analyses UHPLC-QToFMS

Pour l'étude de l'absolue de feuilles de violette, la liste des échantillons est la même que Tableau 33 à l'exception de V36.

L'absolue d'épinard (*Spinacia oleracea* L) a été fourni par Payan Bertrand.

Pour l'étude de l'absolue de rose, la liste des échantillons est la même que Tableau 34.

3.1.1.4. Fractionnement et extraction des composés azotés basiques de l'absolue de violette

L'absolue de violette V51 a été utilisée dans cette partie.

3.1.1.5. Feuilles de violettes

Les feuilles fraîches extraites par la suite aux ultrasons ont été récoltées à Tourrettes-sur-Loup en France, le 1^{er} Octobre 2014 (Figure 77).



Figure 77 : Feuilles récoltées

3.1.2. Solvants et standards

3.1.2.1. Standards utilisés pour les analyses HS-SPME-GC/MS

Un mélange d'alcane (C_7 - C_{40}) (pureté >96%, fourni par Sigma Aldrich), est utilisé pour le calcul des indices de rétention. L'étalon interne ajouté aux échantillons est le dihydromyrcénol de Bordas (pureté > 98%).

3.1.2.2. Standards utilisés pour les analyses GC-FID et analyses sensorielles

Eugénol (100 %, QUIMDIS), acétate de (Z)-hex-3-ène (98,7 % PRODASYNTH), eucalyptol (100 %, Diffusions Aromatiques), linalol (100 %, BASF), salicylate de méthyle (100 %, Grasse Chimie), menthone (80,7 %, AXXENCE), alcool phényléthylique (100 % ARCO). (E,Z)-nona-2,6-diéнал (>95 %), oct-1-ène-3-ol (>98 %), tridécano (>99 %), 4-bromo-2-chlorophénol (> 99 %), et nonadécane (>99,8 %) ont été fournis par Sigma Aldrich.

3.1.2.3. Standards utilisés pour l'étude métabolomique en UHPLC-QToFMS

(E,Z)-nona-2,6-diéнал (>96 %), méthyl linoléate (ML) (>99 %) et nonadécane (>99,8 %) ont été fournis par Sigma Aldrich. L'alcool phényléthylique (AP) (>99 %) a été fourni par ARCO (100%).

3.1.2.4. Standards utilisés pour l'identification des marqueurs de la rose

L'acétal d'amyl cinnamaldehyde diéthylique (>95 %) et l'acide α -linoléique (>99 %) ont été fournis par Sigma Aldrich. L'acide 12-oxo-phytodiénoïque était disponible dans notre laboratoire (analyses RMN du standard en Annexes.).

3.1.2.5. Solvant de dilution des échantillons pour les analyses GC-FID et analyses sensorielles

L'éthanol utilisé est fourni par Brenntag (96°).

3.1.2.6. Solvant de dilution des échantillons pour les analyses UHPLC-QToFMS

L'éthanol utilisé a été fourni par Biosolve (ULC/MS grade).

3.1.2.7. Solvants de phases mobiles pour UHPLC-QToFMS

L'acétonitrile (CH₃CN, Biosolve ULC/MS grade), l'acide formique (AF, Biosolve ULC/MS grade), l'éthanol (EtOH, Biosolve ULC/MS grade) et l'eau purifiée (système Milli-Q Barnstead Easypure II avec une résistivité de 18,2 MW) ont été utilisés pour les analyses en UHPLC-QToFMS.

3.1.2.8. Solvants utilisés pour l'isolement des marqueurs de la violette

Le solvant de dilution de l'absolue et le solvant « at column dilution » utilisé pour la première étape de purification des marqueurs était l'éthanol (EtOH, Sigma G-Chromasolv > 99,9 %). L'acétonitrile (CH₃CN, Sigma, Chromasolv Plus, for HPLC > 99,9 %) et l'acide formique (Sigma, >95 %) ont été utilisés pour la chromatographie préparative et semi-

préparative. Le dichlorométhane (CH_2Cl_2 , Sigma, Chromasolv, for HPLC > 99,9 %), le méthanol (MeOH, Sigma, Chromasolv, for HPLC > 99,9 %), l'acide chlorhydrique (HCl, Sigma, >37 %) et l'hydroxyde de sodium (NaOH, Sigma) ont été utilisés pour l'obtention de l'extrait de feuilles fraîches et des fractions basiques.

3.1.2.9. Synthèse

Pour la synthèse de l'acétate de dihydrocitronellylphényle ont été utilisés du dihydrocitronnellol (>98 %, Sigma Aldrich) et de l'acide phényl acétique (99,9 %, Grasse Chimie). Pour la synthèse du propanoate de farnésyle ont été utilisés du farnésol (>95 %, Sigma Aldrich) et de l'acide propionique (>99,5 %, Sigma Aldrich). Ces deux synthèses ont nécessité : du toluène (Chromasolv for HPLC, 99,9 %, Sigma Aldrich), et de l'acide sulfurique (0,25 mol/L, ChemLab).

Pour la synthèse du propanoate de nérolidyle ont été utilisés du nérolidol (>98 %, Sigma Aldrich), du chlorure de propionyle (>98 %, Sigma Aldrich), de la triéthylamine (>99 %, Sigma Aldrich), du dichlorométhane (Chromasolv for HPLC, 99,9 %) et du carbonate de sodium de Sigma Aldrich.

3.1.3. Préparation des échantillons

3.1.3.1. Analyse sensorielle

- profil odorant de l'absolue de feuilles de violette France et Egypte

Des dilutions à 10 % dans l'éthanol ont été effectuées pour les trois absolues. Un quatrième échantillon, mélange équi-volumique des trois précédents a ensuite été préparé.

- impact olfactif du (*E,Z*)-2,6-nonadiénal dans le profil olfactif de l'absolue

Des dilutions à 10 % dans l'éthanol ont été réalisées. Une solution mère de (*E,Z*)-2,6-nonadiénal à 10 % (v/v) dans l'éthanol a été préparée. A partir de cette solution, des ajouts de 0,01 %, 0,05 % et 0,1 % de (*E,Z*)-2,6-nondiénal ont été réalisés aux dilutions d'absolues à 10 %.

3.1.3.2. HS-SPME-GC/MS

100 μL d'une solution à 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de dihydromyrcénol a été ajouté à 1 g d'absolue.

3.1.3.3. GC-FID

Pour l'étude de la fraction volatile de l'absolue de feuilles de violette : 20 μL d'une solution à 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de dihydromyrcénol a été ajoutée à 100 mg d'absolue et 900 mg

d'éthanol. Des solutions de calibration ont été préparées à partir d'une solution à 10 mg.mL⁻¹ de dihydromyrcénol à 0,02, 0,05, 0,10, 0,15 et 0,2 mg.mL⁻¹. La même gamme de concentration a été préparée pour le (*E,Z*)-2,6-nonadiénal (avec ajout d'un étalon interne dihydromyrcénol à 0,2 mg.mL⁻¹). Pour l'estimation des RRFs, des solutions des composés oct-1-èn-3-ol, acétate de (*Z*)-hexényle, eucalyptol, linalol, menthone, salicylate de méthyle, eugénol et tridécane ont été préparées à 0,2 mg.mL⁻¹ dans l'éthanol avec addition d'étalon interne de dihydromyrcénol à 0,2 mg.mL⁻¹. L'évaluation du RRF du tridécane a été utilisée pour la semi-quantification des composés de même nature (décane, undécane et dodécane).

Pour le dosage de l'alcool phényléthylique et du nonadécane par GC-FID, des dilutions 1/10 des absolues ont été réalisées dans l'éthanol. Des solutions de calibration ont été préparées dans l'éthanol à partir d'une solution mère à 80 mg.mL⁻¹ pour l'alcool phényléthylique à 10 mg.mL⁻¹, 20 mg.mL⁻¹, 30 mg.mL⁻¹, 40 mg.mL⁻¹ et 80 mg.mL⁻¹. Des solutions de calibration ont été préparées dans l'éthanol à partir d'une solution mère à 5 mg.mL⁻¹ pour le nonadécane à 0,5 mg.mL⁻¹, 1 mg.mL⁻¹, 1,5 mg.mL⁻¹, 2 mg.mL⁻¹ et 5 mg.mL⁻¹.

3.1.3.4. UHPLC-ToFMS

3.1.3.4.1. Etude sur l'absolue de feuilles de violette

Les échantillons d'absolues ont été dilués au centième dans l'éthanol. Un échantillon appelé Pool contient 26µL de chaque échantillon dilué au centième (Tableau 35).

Tableau 35: Liste des mélanges et ajouts dans les absolues de feuilles de violette

<i>Ref</i>	<i>Echantillons</i>	<i>(v:v)</i>	<i>Ref</i>	<i>Echantillons</i>	<i>(v:v)</i>
<i>Mélanges d'extraits de fournisseurs d'Egypte différents</i>			<i>Ajout de methyl linoléate</i>		
E2:E1	V02:V06	90:10 / 80:20 / 70:30	E2:ML	V02:ML	90:10 / 85:15 / 80:20
E2:E3	V02:V47	90:10 / 80:20 / 70:30	E2:ML	V24:ML	90:10 / 85:15 / 80:20
E1:E3	V06:V47	90:10 / 80:20 / 70:30	E2:ML	V25:ML	90:10 / 85:15 / 80:20
<i>Mélanges d'extraits d'Egypte et de France</i>			<i>Ajout de (E,Z)-2,6-nonadiénal</i>		
F:E2	V04:V02	90:10 / 80:20 / 70:30	E2:N	V02:N	99.9:0.1 / 99.5:0.5 / 99:1
F:E1	V04:V06	90:10 / 80:20 / 70:30	E2:N	V24:N	99.9:0.1 / 99.5:0.5 / 99:1
F:E3	V04:V47	90:10 / 80:20 / 70:30	E2:N	V25:N	99.9:0.1 / 99.5:0.5 / 99:1
<i>Mélanges d'extraits d'Egypte et d'absolue d'épinard</i>					
E2:S	V02:Ep	90:10 / 80:20 / 70:30			
E3:S	V47:Ep	90:10 / 80:20 / 70:30			

F: France; E1: Egypte 1; E2 : Egypte 2 ; E3 : Egypte 3 ; Ep: épinard; ML: Methyl Linoléate; N: (E,Z)-2,6-nonadiénal

Les différents mélanges ont été préparés à trois concentrations à partir d'extraits purs dilués au centième dans l'éthanol. Trois échantillons différents d'origine Egypte 2 ont été dilués au centième dans l'éthanol et du méthyl linoléate a été ajouté à trois concentrations : 0,1 %, 0,15 % et 0,2 % (correspondant à 10, 15 et 20 % dans l'extrait pur). Ce composé est initialement présent à des teneurs de l'ordre de 0,15 % dans l'absolue d'après une étude préliminaire interne. Son acide associé (acide linoléique) est lui présent à des teneurs comprises entre 10 et 17 % (w/w) d'après la même étude.

Pour l'ensemble de cette étude, les échantillons préparés ont été stockés à 8 °C à l'abri de la lumière.

3.1.3.4.2. Etude sur l'absolue de pétales de rose

Les échantillons d'absolues sont dilués au cinq centième dans l'éthanol. Un échantillon appelé Pool contient 15 µL de chaque échantillon dilué au cinq centième (Tableau 36).

Tableau 36: Liste des mélanges et ajouts dans les absolues de pétales de rose

<i>Ref</i>	<i>Echantillons</i>	<i>(v:v)</i>	<i>Ref</i>	<i>Echantillons</i>	<i>(v:v)</i>
<i>Ajout d'alcool phényléthylique</i>			<i>Mélange de damascena et centifolia</i>		
DM1:AP	R01:AP	95:5 / 90:10 / 85:15	DM11:C1	R11:R37	90:10 / 80:20 / 70:30
DM2:AP	R02:AP	95:5 / 90:10 / 85:15	DM12:C1	R12:R37	90:10 / 80:20 / 70:30
DM3:AP	R03:AP	95:5 / 90:10 / 85:15	DB1:C1	R13:R37	90:10 / 80:20 / 70:30
DM4:AP	R04:AP	95:5 / 90:10 / 85:15	DB2:C1	R14:R37	90:10 / 80:20 / 70:30
DM5:AP	R05:AP	95:5 / 90:10 / 85:15			
<i>Ajout de nonadecane</i>			<i>Mélange de Turquie et de Maroc</i>		
DM6:N	R06:N	95:5 / 90:10 / 85:15	DT1:DM1	R19:R01	90:10 / 80:20 / 70:30
DM7:N	R07:N	95:5 / 90:10 / 85:15	DT2:DM1	R20:R01	90:10 / 80:20 / 70:30
DM8:N	R08:N	95:5 / 90:10 / 85:15	DT3:DM1	R21:R01	90:10 / 80:20 / 70:30
DM9:N	R09:N	95:5 / 90:10 / 85:15	DT4:DM1	R22:R01	90:10 / 80:20 / 70:30
DM10:N	R10:N	95:5 / 90:10 / 85:15			

DM pour Damascena Maroc, DT pour Damascena Turquie, C pour Centifolia, AP pour alcool phényléthylique, N pour nonadécane

Les différents mélanges ont été préparés à trois concentrations à partir d'extraits purs dilués au cinq centième dans l'éthanol.

Pour l'ensemble de cette étude, les échantillons préparés ont été stockés à 8°C à l'abri de la lumière.

3.1.3.4.3. *Etude complémentaire sur l'absolue de pétales de rose*

Dans cette étude, des échantillons conservés au réfrigérateur utilisés pour l'étude métabolomique sur la rose ont été ré-analysés. Ces mêmes échantillons ont été re préparés fraîchement ; afin de réaliser une étude sur ce moyen de conservation. Deux nouveaux échantillons pools ont été préparés (avec 100 µL de chaque échantillon) : un échantillon pool avec les échantillons provenant du réfrigérateur et un échantillon pool préparé avec les échantillons fraîchement préparés.

Les échantillons suivants sont concernés par cette étude : R01, R02, R19, R25, R37 et R40.

3.2. Analyses sensorielles

3.2.1. Etudes olfactives du profil odorant de l'absolue de feuilles de violette France et Egypte

Panélistes : Pour le test triangulaire, les panélistes avaient une connaissance des ingrédients naturels mais n'étaient pas entraînés à ce type de test (20 panélistes). Pour le test descriptif, les panélistes étaient entraînés à décrire des notes olfactives. Ce panel regroupait des parfumeurs, des scientifiques et des experts des ingrédients naturels (11 panélistes).

Organisation : Deux types de tests ont été organisés. Trois tests triangulaires ont été réalisés sur chaque paire d'échantillons : France, Egypte 1 et Egypte 2. Pour chaque comparaison, les panélistes disposaient de trois mouillettes: deux appartenaient au même échantillon, la troisième à l'autre échantillon de la paire [28,31].

Pour le test descriptif, six paramètres étaient évalués: la note verte, la note terreuse, la note grasse/huileuse, la note florale, la note marine et la puissance. Chaque paramètre était noté de 0 (note non perçue) à 4 (note puissante). Les notes de cœur et les notes de tête ont été étudiées séparément. Pour les notes de cœur, les mouillettes étaient préparées environ deux heures avant le test. Pour les notes de tête, les mouillettes étaient préparées au moment de l'expérience.

3.2.2. Etude de l'impact olfactif du (E,Z)-2,6-nonadiénal dans le profil olfactif de l'absolue

L'impact de l'ajout de (E,Z)-2,6-nonadiénal a été étudié dans l'origine Egypte 2. A trois extraits purs de ce même fournisseur ont été ajoutés à trois niveaux de concentrations le (E,Z)-2,6-nonadiénal : 0,1%, 0,5% et 1%. Ces préparations, en plus de l'échantillon pur, ont été évaluées dans des dilutions au dixième dans l'éthanol. L'objectif était de déterminer si

l'ajout de (*E,Z*)-2,6-nonadiénal était repéré comparativement à l'échantillon pur (dilué aussi) de référence. Les échantillons devaient être classés du moins odorant au plus odorant en (*E,Z*)-2,6-nonadiénal (odeur verte-concombre). Les six panélistes étaient familiers avec ce produit.

3.3. Chromatographie en phase gazeuse

3.3.1. HS-SPME-GC/MS

3.3.1.1. Passeur d'échantillons et extraction

Un passeur d'échantillons CTC Analytics SPME a été acquis chez PAL system (Suisse) et les fibres chez Supelco (Bellefonte, PA). Les fibres employées pour l'extraction des composés volatils sont: PolyDiMéthylSiloxane (PDMS 100 μm), PolyDiMéthylSiloxane-DiVinylBenzène (PDMS-DVB 65 μm), DiVinylBenzène-CARboxen-PolyDiMéthylSiloxane (DVB-CAR-PDMS 50/30 μm) et PolyAcrylate (85 μm). Avant utilisation, les fibres ont été conditionnées selon les recommandations du fabricant. 1 g d'absolue de feuilles de violettes a été placé dans un vial headspace de 20 mL scellé par un septum en PTFE/silicone. Le temps d'incubation du vial avant extraction était au minimum de 3 h avant analyse. La température d'extraction était de 60 °C et la durée d'extraction de 800 secondes (l'optimisation des paramètres étant discutée dans la partie Résultats et Discussions). Après exposition, la fibre est thermiquement désorbée dans le chromatographe, et laissée dans le port d'injection durant 180 secondes. L'injecteur était programmé à 250°C et opérait en mode split 1/50.

3.3.1.2. Méthode GC/MS

Les analyses GC/MS ont été réalisées avec un GC Agilent 7890A couplé à un spectromètre de masse 5975C inert MSD Agilent. La chromatographie gazeuse est équipée d'une colonne capillaire VF-1MS (100 % diméthylsiloxane, 20 m x 150 μm (diamètre interne) x 0,15 μm (épaisseur de film)) de Varian, liner de diamètre interne 4 mm. Gaz vecteur : hélium (débit constant de 1 mL/min) ; programmation du four : de 37 °C (1 min) à 250 °C à 5 °C/min, puis palier de 11 min à 250 °C ; température de source : 230 °C ; température de la ligne de transfert : 260°C ; énergie de ionisation : 70 eV. Les spectres de masse en ionisation électronique (EI) ont été enregistrés entre 40–400 u.

3.3.1.3. Identifications des constituants

L'identification des constituants est basée sur la comparaison des spectres de masse avec des bases de données commerciales, NIST 2012, Wiley, et internes au laboratoire. Les indices de rétention ont été calculés en utilisant la série homologue des alcanes (C₇-C₄₀) et comparés aux indices de rétention disponible dans le Webbook de la NIST [129] ainsi que dans Kondjoyan et Berdagué [128]. Chaque analyse a été réalisée en triplicat après l'optimisation expérimentale.

3.3.2. GC-FID

Les analyses en GC-FID ont été réalisées à l'aide d'un GC Agilent 7890 (Agilent Technologies) muni d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Le GC est équipé d'un injecteur automatique liquide, liner de diamètre interne 4 mm et d'une colonne capillaire VF-1MS (100% diméthylpolysiloxane, 20 m x 150 µm i.d x 0.15 µm (épaisseur de film)) de Agilent Technologies. Le gaz vecteur est l'hydrogène (débit constant: 1 mL/min); la température de l'injecteur est réglée à 250 °C et le ratio de split à 1:160 avec un volume d'injection de 1 µL; la programmation de température de four est de 60 °C à 250 °C à 12 °C/min, pour finir avec un palier isotherme de 9 min. Les débits d'oxygène et d'hydrogène pour le détecteur FID sont respectivement de 350 mL.min⁻¹ and 35 mL.min⁻¹; la température du détecteur est fixée à 250 °C.

Pour le dosage de l'absolue de violette, la semi-quantification est corrigée par le calcul expérimental des facteurs de réponse relatifs [122,123], ($RRF = \frac{m_i \times A_{std}}{m_{std} \times A_i}$ avec m_i , A_i masse et aire du composé et m_{std} , A_{std} pour le standard interne), entre le standard interne (dihydromyrcénol) et le composé. Les deux composés sont analysés dans le même échantillon à la même concentration dans l'éthanol (0.2 mg.mL⁻¹).

Le dosage de l'alcool phényléthylique et du nonadécane pour l'absolue de rose est réalisé avec la même méthode d'analyse par étalonnage externe.

3.3.3. DHS-GC/O/MS à huit voies (8W-GC/O) selon la méthode VIDEO-Sniff

L'appareillage 8W-GC/O utilisé est décrit en détail dans l'article de Berdagué *et al.* [125]. La configuration présentée est couplée à un système d'extraction-concentration de composés volatils de type DHS (Dynamic HeadSpace). Le système comprend huit box

individuels ayant chacun son propre éclairage, isolation sonore et climatisation par flux laminaire (désodorisation de l'air par filtrage sur charbon actif et air thermostaté à 22 °C). L'air circule du plafond vers le sol afin d'isoler l'évaluateur au maximum d'éventuelles interférences olfactives dues à l'air ambiant ou à l'odeur propre de l'évaluateur. Le diamètre de l'ensemble est de 4,5 m.

3.3.3.1. Extraction, concentration et injection

Les composés volatils ont été extraits par DHS (Dynamic Headspace) (Tekmar, Cincinnati, OH, USA). L'échantillon (2 µL d'absolue de violette) est placé sur de la laine de verre désactivée à l'aide d'une seringue en bas d'un extracteur en Pyrex (réf.M3, Mallières, Aubière, France) à température ambiante (21 °C). Les conditions d'extraction étaient les suivantes : le piégeage est réalisé en 1 min à 40 °C avec un flux d'hélium à 40 mL.min⁻¹. Le piège (longueur de travail 180 mm, diamètre interne ¼ inch ; 1 inch = 2,54 cm) est rempli avec un adsorbant Tenax TA 60–80 mesh (Supelco, Bellefonte, PA, USA) et maintenu à 30°C. Une étape de séchage d'une minute permet d'éliminer des traces d'eau résiduelles. Les composés volatils ont été désorbés du piège à 215°C pendant 10 min en utilisant de l'hélium et transmis dans la zone de cryo-focalisation (refroidi à -150°C par de l'azote liquide) par la première ligne de transfert à 205°C. La zone de cryo-concentration est ensuite chauffée à 220°C pendant 2 minutes pour injecter en mode splitless.

3.3.3.2. Séparation chromatographique, division et transfert des effluents vers les postes d'évaluation olfactive.

Les composés volatils ont été séparés à l'aide d'un chromatographe Agilent 4890D (Agilent, Massy, France) sur colonne capillaire RTX-5 (5 % diphénylpolysiloxane, 95 % diméthylpolysiloxane, 60 m × diamètre interne 0,53 mm × épaisseur de la phase stationnaire 1,50 µm ; Restek, Evry, France). Programmation du four : palier de 5 min à 40 °C, gradient de température de 4 °C/min jusqu'à 220 °C et palier de 10 min à 220 °C. Gaz vecteur hélium ; débit constant 8 mL/min. Une deuxième ligne de transfert chauffée à 208 °C fait la connexion entre la colonne et le diviseur d'effluents.

3.3.3.3. Identification des composés odorants

Un appareillage GC/O/MS indépendant composé d'un chromatographe Agilent 6890, d'un spectromètre de masse Agilent 5973 (Agilent, Massy, France) et d'un port olfactométrique unique a été utilisé dans les mêmes conditions que l'appareillage précédent. L'instrument permet de travailler en GC/O/MS tout comme l'appareillage multi-voies ou en

GC-GC/O/MS (type heartcut) afin d'étudier de façon plus détaillée les zones odorantes déterminées en GC/O huit voies. Le système était équipé d'une colonne capillaire RTX-5MS (5% phényl, 95% méthylsiloxane, 60 m x 0,32 mm (diamètre interne) x 1 µm (épaisseur de film)) de Restek et une DBWAXETR (100% polyéthylène glycol, 30 m x 0,32 mm (diamètre interne) x 1 µm (épaisseur de film)) de J&W Scientific. Le programme du four est identique à celui de la GC/O huit voies. Les données GC/O du système multipoint ont été synchronisées avec celles du mono-GC/O/MS en utilisant les logiciels AcquiSniff® et MSDChem Agilent® C.00.00.108,153.

Les composés volatils ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masse avec les banques de données (NIST/EPA/NIH 2005 et Wiley 2007), indices de rétention [128,129], et comparaison de la description odorante avec le site web de référence « The good scents company » [130]. Les spectres de masse en ionisation électronique (EI) ont été enregistrés entre 33–230 u. Afin de résoudre les potentielles co-élutions de composés, i) des spectres de masse purifiés ont pu être extraits en utilisant le logiciel de déconvolution Mass Spectra Separation Software [131], ii) des analyses ont été réalisées en SPME-GCxGC-ToFMS [152].

3.3.3.4. *Acquisition et analyse des données olfactométriques*

Les données olfactométriques ont été acquises avec le logiciel AcquiSniff® à une vitesse de 1 scan/s. Pendant l'analyse olfactive, les juges devaient : a) indiquer la perception d'une odeur en appuyant sur un bouton pendant toute la durée du stimulus, b) décrire leur perception odorante, c) donner l'intensité du stimulus sur une échelle allant de 1 à 5 (1 étant le plus faible, 5 étant le plus fort). Tous les juges étaient des non-fumeurs sans pathologies connues, sélectionnés pour leur sensibilité odorante et la capacité de détecter des odeurs et de décrire une large gamme d'odeurs durant des tests GC/O. Tous étaient familiers avec l'équipement. La description des perceptions odorantes se fait par vocabulaire libre qui devait rester le plus simple et précis possible. Les juges n'avaient aucune information sur la nature de l'échantillon et étaient rémunérés pour leur participation. La durée des analyses sniffing était de 35 min.

L'enregistrement numérique du vocabulaire, de l'intensité et de la durée de perception des odeurs est lancé automatiquement lors de l'injection des composés volatils dans le système chromatographique. Ainsi sont obtenus huit aromagrammes et huit enregistrements audio individuels qui sont traités par l'analyste après chaque analyse avec AcquiSniff® afin d'incorporer leur contenu dans les aromagrammes. Les données ont été analysées par la méthode VIDEO-Sniff en décomposant le signal olfactif total (T.O.S. ou S.O.T, la somme des

huit aromagrammes individuels) en pôles olfactifs. Ces derniers ont été définis pendant le traitement des données en fonction du vocabulaire des juges afin de colorer les zones odorantes clés de l'aromagramme.

Deux analyses ont été conduites pour l'absolue de violette (origine France et origine Egypte) avec les huit mêmes sniffers. Deux aromagrammes ont donc été obtenus.

Les odeurs identifiées par les panélistes ont été comparées aux odeurs décrites dans différentes bases de données disponibles en libre accès [130,132].

3.3.4. HS-SPME-GC×GC/ToFMS

Une fibre SPME CAR/PDMS 75 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA) a été utilisée pour l'extraction des composés volatils de l'espace de tête de l'absolue. La fibre a été conditionnée selon les recommandations du fabricant avant l'analyse. 2 µL d'absolue sont déposés dans un flacon SPME de 20 mL scellé.

Après 30 min d'équilibrage de l'espace de tête, la fibre SPME est introduite dans le flacon et exposée à l'espace de tête pendant 2 min à 21 °C. Puis, elle est désorbée thermiquement dans le liner d'injection (liner SPME 0,75 mm (diamètre interne) et septum de type MerlinMicroseal®) du GC pendant 2 min à 280 °C. L'injection en mode splitless est réalisée avec un automate SPME CombiPAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Suisse) dans un chromatographe Agilent 6890N (Agilent, Massy, France) équipé d'un spectromètre de masse à temps de vol (ToF) type LECO Pegasus 4D (LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA) équipé d'un modulateur cryogénique (LECO Quad Jet Modulator). Les deux colonnes chromatographiques et le modulateur se trouvent dans le four du chromatographe Agilent 6890N (Figure 78). La première dimension chromatographique (colonne 1) était une colonne capillaire DB5MS (5% phenyl, 95% methylsiloxane, 30 m x 0,25 mm (diamètre interne) x 0,25 µm (épaisseur film)) Agilent. La seconde dimension chromatographique (colonne 2) était une colonne capillaire BP20 (100% polyethylene glycol, 1 m x 0,1 mm (diamètre interne) x 0,1 µm (épaisseur de film)). Le four de la première colonne a été maintenu à 40 °C pendant 5 min, puis un gradient de température de 4 °C/min a été employé jusqu'à 230 °C, suivi d'un palier de 10 min à 230 °C. Le four de la deuxième colonne a été programmé pour être constamment supérieur de 15 °C à la température du four 1. Gaz vecteur hélium; débit constant 1 mL/min. Température de la ligne de transfert 250 °C ; température de la source d'ionisation 200 °C ; voltage du détecteur 1600 V. La séquence de modulation comprenait une période de modulation de 5 s et une impulsion de chaleur de 1,2 s. Les spectres de masse en ionisation électronique (EI) ont été enregistrés entre 33–230 u à une vitesse de scan de 200 scans/s.

Le traitement des chromatogrammes 2D est réalisé avec le logiciel ChromToF™ avec un rapport signal/bruit de 10. La banque de données NIST/EPA/NIH 2005 (NIST, Gaithersburg, USA) a été utilisée pour l'identification des composés et des indices de rétention ont été calculés sur colonne apolaire.

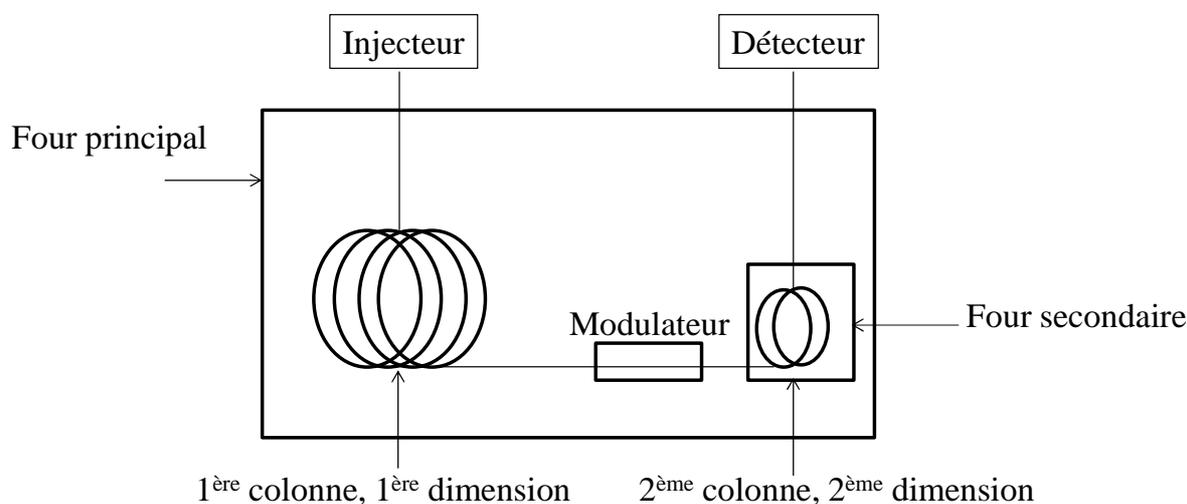


Figure 78: Schématisation des deux fours et du modulateur du système GCxGC

3.4. Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution

3.4.1. Paramètres d'analyse

Les analyses UHPLC-QToFMS ont été réalisées à l'aide d'un système Acquity UPLC couplé au XEVO-G2-QToF (Quadrupole-Temps de vol) équipé d'une colonne Acquity UPLC BEH Phenyl (130 Å (taille des pores), 1,7µm (taille de particules), 2,1 mm x 100 mm). Le mode d'ionisation est l'électrospray [68] et le ToF a un pouvoir de résolution de 22500 FWHM mesuré sur le $[M+6H]^{6+}$ de l'insuline bovine ($m/z = 956$). Le volume d'injection est de 2 µL. Pour l'étude sur l'absolue de feuille de violette, l'échantillon est dilué au centième dans l'éthanol, et pour l'étude de l'absolue de pétale de rose, l'échantillon est dilué au cinq centième. La méthode optimisée est la suivante (voir développement de la méthode dans la partie résultats) : température de colonne à 30°C; température du passeur d'échantillon 8°C ; débit de phase mobile: 0,4 mL.min⁻¹ pour la violette, 0,5 mL.min⁻¹ pour la rose; gradient d'élution avec eau: AF 99,9:0,1 (v/v) (solvant A) CH₃CN:AF 99,9:0,1 (v/v) (solvant B): conditions isocratiques (22% B) pendant 1 min, gradient linéaire de 22% à 51% B en 4 min, gradient linéaire de 51 à 88% pendant 20 min, 4 min dans des conditions isocratiques (100% B) pour retourner aux conditions initiales en 3 min. L'injecteur est rincé systématiquement avec deux solvants de rinçage : un solvant à fort pouvoir d'élution, l'acétonitrile (300 µL)

pour la violette, et l'éthanol (300 µL) pour la rose et un solvant à composition majoritairement aqueuse, à savoir eau et 10% d'acétonitrile (900 µL).

La durée d'analyse totale est de 32 min. Les paramètres de la source en électrospray positif: voltage du capillaire : 1 kV; voltage du cône d'échantillonnage: 30 V ; voltage du cône d'extraction : 3V ; température de source : 120°C ; température de désolvatation : 500°C ; débit de gaz de nébulisation : 10 L/h ; débit de gaz de désolvatation : 1000 L/h. Le gaz de désolvatation et de nébulisation est de l'azote ultra pur (> 99,9995 %).

Des analyses ont aussi été réalisées en électrospray négatif, avec un voltage du cône d'échantillonnage de 40V. Le gradient a été modifié : conditions isocratiques (30% B) pendant 1 min, gradient linéaire de 30% à 50% B en 4 min, conditions isocratiques à 50% B en pendant 4 min, gradient linéaire de 70 à 90% en 6 min, 3 min dans des conditions isocratiques (100% B) pour retourner aux conditions initiales en 3 min.

La gamme des masses enregistrées est comprise entre 100 Da et 1200 Da ; durée de scan : 0,25 s. Les acquisitions sont faites en mode MS^E Centroid sans énergie de collision pour la fonction 1 et avec une rampe d'énergie de collision pour la fonction 2, allant de 20 à 30 V.

Le calibrant de référence (lockmass) est enregistré en parallèle avec une durée de scan de 0,2 s, un intervalle de 15 s, sur une fenêtre de masse de 0,3 Da avec une moyenne de 3 scans.

3.4.2. Construction d'une séquence d'analyse pour l'approche métabolomique

Le développement d'une étude métabolomique implique de nombreuses précautions quant à la mise en œuvre de la partie analytique. 70 échantillons ont été préparés pour la violette, 94 pour la rose et répliqués 3 fois. 210 analyses pour la violette et 282 pour la rose, d'une durée de 32 minutes chacune doivent alors être programmées ; soit 112 h pour la violette et 150 h pour la rose. Un tel volume d'analyses doit être mis en place méthodiquement afin de contrôler au mieux les variabilités analytiques intervenant au cours des analyses. Ainsi, les séries d'analyses ont été constituées de la façon suivante : l'analyse d'un blanc solvant (éthanol), 10 analyses de l'échantillon Pool pour l'équilibrage de la colonne, et ensuite une alternance de 4 échantillons/ un Pool, et enfin un blanc pour clore la série. Entre chaque série d'analyses, étaient réalisés un nettoyage de source (cône, surcône, baffle plate) dans un premier bain à ultrasons d'eau et acide formique pendant 15 min, un deuxième bain de rinçage à l'eau et un troisième bain au méthanol ; un renouvellement des phases mobiles et de la solution de calibrant de référence (lockmass) ; la calibration de

l'appareillage ainsi que l'ajustement de la résolution et de l'intensité du calibrant de référence (lockmass).

Six séries d'analyses ont été nécessaires pour l'étude sur la violette, et neuf séries d'analyses pour l'étude sur la rose.

Pour l'étude complémentaire menée sur des échantillons d'absolues de pétales de rose réalisée pour évaluer la réutilisation de données acquises à un temps t dans un temps $t+dt$, une séquence métabolomique a été construite de la même manière que décrit ci-dessus. L'ensemble des analyses a été réparti au sein d'une seule et même séquence (38h), avec trois réplicats de chaque échantillon, distribués aléatoirement. Le pool utilisé pour cette étude est le pool des échantillons fraîchement préparés.

3.5. Outils statistiques

Markerlynx XS de Waters et SIMCAP+ 13.0.2 de Umetrics (Umeå, Sweden) sont les deux logiciels de traitements statistiques utilisés pour les données métabolomiques. Une macro spécifique développée à l'INRA de Clermont Ferrand par l'équipe de l'Unité de Nutrition Humaine a permis l'application d'une correction de type Van der Kloet de la matrice numérique [135]. L'extraction des ions est réalisée par le biais de Markerlynx ; les données sont ensuite prétraitées par différents calculs sous tableur Excel ainsi que, si nécessaire, par la macro Van der Kloet ; et enfin les différents modèles statistiques sont calculés sous Markerlynx XS ou SIMCAP+.

3.5.1. Markerlynx XS : paramètres d'extraction des ions

3.5.1.1. Paramètres d'extraction pour l'étude sur la violette

Fonction : 1 ; type d'analyse : détection de pic ; fenêtre de masse XIC: 0,02 Da ; Largeur de pic à 5% de la hauteur : 20 secondes ; Ligne de base de bruit entre deux pics : 10000 (intensité) ; Pas de lissage; Intensité des marqueurs : 20000 ; fenêtre de masse : 0,05 Da ; fenêtre de temps de rétention : 0,8 min ; niveau d'élimination du bruit : 6.

3.5.1.2. Paramètres d'extraction pour l'étude sur la rose

Fonction : 1 ; type d'analyse : détection de pic ; fenêtre de masse XIC: 0,02 Da ; Largeur de pic à 5% de la hauteur : 20 secondes ; Ligne de base de bruit entre deux pics : 5000 (intensité) ; Pas de lissage; Intensité des marqueurs : 2000 ; fenêtre de masse : 0,05 Da ; fenêtre de temps de rétention : 0,3 min ; niveau d'élimination du bruit : 10.

Pour l'étude complémentaire sur la rose, seul le paramètre fenêtre de temps de rétention a été modifié : 0,8 min.

3.5.2. Prétraitement de la matrice de données sur tableur EXCEL

Dans un premier temps est évalué le nombre de 0 dans la matrice numérique d'ions. Le deuxième point à contrôler est : la non duplication d'un ion.

Une fois ces paramètres validés, une première Analyse en Composantes Principales (ACP) est calculée avec cette matrice brute. Dans ce modèle, la répartition des différents pools des différentes séries peut mettre en évidence un effet série (voir partie Résultats et Discussion). Une correction de type Van der Kloet peut être alors être appliquée sur la matrice brute à partir des échantillons pools afin de réajuster les intensités des ions ayant pu évoluer au sein d'une série et entre les séries.

Dans un troisième temps, la moyenne des réplicats est calculée afin de participer à la diminution de la déviation analytique pouvant intervenir au cours des différentes séries (les trois réplicats sont distribués de manière aléatoire dans les différentes séries).

La moyenne des pools est aussi calculée afin de contrôler la position centrée de cet échantillon moyenné dans la représentation graphique du modèle statistique.

3.5.3. Calcul des modèles statistiques

Chaque étude débute par une ACP des données brutes. Le mode de normalisation appliqué est le mode Pareto, qui applique le calcul suivant aux différents ions : $\frac{y_i - y_{imoy}}{\sqrt{\sigma_{y_i}}}$ où y_i est l'intensité de l'ion i , y_{imoy} la moyenne des intensités de l'ion i dans l'ensemble des échantillons, et σ_{y_i} la valeur de l'écart type de l'ion i dans l'ensemble des échantillons.

Une fois l'ACP validée (suite à une correction par Van der Kloet si nécessaire) et les moyennes des réplicats calculées, le second modèle statistique utilisé est la PLS-DA (régression des moindres carrés partielle). Le mode de normalisation appliqué est aussi le mode Pareto.

Le modèle PLS-DA est validé selon la valeur de R^2Y obtenue pour les premières composantes principales (en général les deux premières), la valeur du Q^2 et selon le résultat du test de permutation. Les deux valeurs (les valeurs cumulées des composantes) doivent être supérieures à 0,5 et le plus proche de 1, Q^2 étant toujours plus petit que R^2Y . Q^2 correspond à l'erreur de prédiction, alors que le R^2Y explique l'appartenance aux groupes.

Le calcul de Q^2 se fait par le moyen de validations croisées: 1/7 des données servent à cette validation (automatique) : l'ensemble des données participe au calcul (en boucle).

Le test de permutation consiste à réaffecter des échantillons à des groupes au hasard. De nouvelles valeurs de R^2Y et Q^2 sont alors calculées. Ces valeurs doivent donner de mauvais résultats puisque le modèle devient alors moins bon (les échantillons n'étant plus affectés aux bons groupes). La droite correspondant au R^2Y doit couper l'axe des ordonnées en dessous de 0,6, et la droite des Q^2 doit couper l'axe des ordonnées en valeur négative. Enfin, l'ensemble des valeurs R^2Y et Q^2 doivent respectivement se situer en valeur d'ordonnée, au-dessous de la valeur la plus à droite du graphique.

Équation 9: Q^2cum

$$[Q^2cum]_h = 1 - \prod_{a=1}^h \frac{PRESS_a}{RESS_{a-1}}$$

Équation 10: R^2cum

$$R^2cum = 1 - \frac{PRESS_h}{\sum_i (y_i - \bar{y})^2}$$

Avec h le nombre de composantes principales

\bar{y} valeur moyenne des indicatrices¹¹

Avec PRESS: Predicted Residual Sum of Squares

Avec RESS : Residual Sum of Squares

Équation 11: RESS

$$RESS_h = \sum_i (y_{(h-1),i} - \hat{y}_{(h-1),i})^2$$

y valeur des indicatrices, \hat{y} valeur des indicatrices **estimées** en utilisant le modèle

Équation 12: PRESS

$$PRESS_h = \sum_i (y_{(h-1),i} - \hat{y}_{(h-1),-i})^2$$

y valeur des indicatrices, \hat{y} valeur des indicatrices **estimées** en utilisant le modèle **sans le groupe (soit 1/7^{ème} de l'ensemble des données) contenant l'échantillon i**

¹¹ Indicatrices : valeurs qui indiquent l'appartenance des échantillons aux groupes

3.6. Stratégies d'isolement des marqueurs France d'absolue de violette

3.6.1. Première stratégie : chromatographie préparative guidée par la masse et chromatographie semi-préparative

La première purification a été réalisée avec une HPLC préparative couplée à un détecteur UV barrette de diodes et DEDL (Système d'autopurification de Waters : Passeur d'échantillons 2767, pompe binaire 2545, détecteur à barrettes de diodes 2998, détecteur DEDL 2424, pompe HPLC 515 pour le solvant de "make up" et "at column dilution") sur colonne Phenyl-Hexyl (5 μm , 19 mm x 100 mm X-Bridge de Waters). L'absolue France (V51) a été diluée 10 fois dans l'éthanol. Le volume d'injection était de 600 μL . Le solvant "make up" était composé de $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (80:20; v/v) à un débit de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ et le solvant "at column dilution" était l'éthanol à un débit de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La méthode optimisée a été réalisée avec un gradient de $\text{H}_2\text{O}/\text{AF}$ (99,8:0,2; v/v) (solvant A) $\text{CH}_3\text{CN}/\text{AF}$ (99,8:0,2; v/v) (solvant B) à un débit de 19 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$: conditions isocratiques (22 % B) pendant 4 min, gradient linéaire de 22% à 41% B en 10 min, gradient linéaire de 41 à 45 % B pendant 2 min, conditions isocratiques (55 % B) pendant 3 min, gradient linéaire de 55 à 75 % B pendant 44 min, 12 min en conditions isocratiques (100 % B) pour finir avec 5 min de reconditionnement. La durée d'analyse totale était de 85 min. La purification a été guidée par des analyses en UHPLC-HRMS pour contrôler la présence des marqueurs dans les fractions collectées (même méthode d'analyse que dans l'approche métabolomique). 850 mg d'absolue pure a été purifié. Les fractions de 13,5 mL ont été automatiquement collectées par le passeur d'échantillons; et elles ont été évaporées avec un système d'évaporation Rocket Synergy de Genevac SP Scientific. Entre 0,9 mg et 22,6 mg de composés ont été récoltés par fractions. Elles ont été analysées en RMN du proton (Bruker Avance 500 MHz, pic résiduel de CDCl_3 comme calibration à 7,26 ppm). Quatre fractions ont été sélectionnées car elles montraient des signaux exploitables en RMN : les fractions contenant m/z 486,4302, 382,4045, 416,3886 et 438,4667 avec une quantité collectée respective de 8,4 mg, 22,6 mg, 7,5 mg, 15,2 mg. La fraction contenant le marqueur à m/z 382,4045 a été étudié plus en détails par RMN 1D et 2D dans le CDCl_3 .

Une deuxième étape de purification a été réalisée sur ces quatre fractions avec une HPLC semi-préparative (PU 2087 Plus de Jasco, détecteur DEDL Sedex 85 de Sedere, détecteur UV 2075 Plus de Jasco) et une colonne Phényl-Hexyl (5 μm , 10 mm x 250 mm XSELECT de Waters). Le débit était de 4 mL/min. Les solvants d'éluion étaient $\text{H}_2\text{O}/\text{AF}$ (99,9:0,1; v/v) (solvant A) et $\text{CH}_3\text{CN}/\text{AF}$ (99,9:0,1; v/v) (solvant B). Le gradient utilisé pour

m/z 438,4667 était: conditions isocratiques (80 % B) pendant 5 min, gradient linéaire de 80 à 85 % B en 5 min, gradient linéaire de 85 à 95 % B en 20 min, gradient linéaire de 95 à 100 % B en 5 min, conditions isocratiques (100 % B) pendant 10 min, pour finir avec 6 min de reconditionnement. Un autre gradient a été utilisé pour les masses m/z 486,4302, 382,4045, 416,3886: conditions isocratiques (80 % B) pendant 5 min, gradient linéaire de 80 à 95 % B en 25 min, gradient linéaire de 95 à 100 % B en 5 min, pour finir avec 6 min de reconditionnement.

3.6.2. Seconde stratégie: purification des alcaloïdes

Les feuilles fraîches de violette ont été extraites avec un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (50:50, v/v) [150] dans un extracteur à ultrasons (PEX3, 200W, 24 kHz, de REUS, Contes, France). 2 kg de feuilles ont été extraites pendant 1 h par batch de 400 g (1L de chaque solvant par batch). L'extrait a ensuite été filtré, séché avec Na_2SO_4 et le solvant évaporé. Le rendement était de 4,03 % (w/w).

Pour l'extraction basique, l'extrait de départ (absolue ou extrait de feuilles $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) a été solubilisé dans le CH_2Cl_2 et lavé sous conditions acides pour éliminer les résidus neutres et acides dans la phase organique. Pour 100 g d'absolue (V51), 500 mL de CH_2Cl_2 et 500 mL de HCl (0,5 N) ont été ajoutés. Pour 2 g d'extrait de feuilles $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 50 mL de CH_2Cl_2 et 50 mL de HCl (0,5 N) ont été ajoutés. Les pH des phases aqueuses ont ensuite été élevés (ajout de NaOH 5 N) pour atteindre des conditions basiques (pH 12). Elles ont été extraites avec 3 x 300 mL et 3 x 80 mL de CH_2Cl_2 (pour l'absolue et les extraits de feuilles respectivement) pour obtenir les composés alcaloïdes dans la seconde phase organique. Les fractions basiques ont été analysées en UHPLC-HRMS, après une dilution au centième dans l'éthanol, dans les mêmes conditions que celles utilisées pour l'approche métabolomique.

3.7. Synthèse

3.7.1. Synthèse de l'acétate de dihydrocitronellylphényle et du propionate de farnésyle

Les synthèses ont été réalisées avec un montage Dean Stark. Dans un ballon de 25 mL, introduire 0,7 g de l'alcool correspondant et 1,4g de l'acide correspondant, 10 mL de toluène et 1,5 mL de H_2SO_4 . Porter le mélange au reflux du toluène (110 °C) pendant 4 heures. Refroidir le mélange. Effectuer trois lavages du mélange avec 15 mL d'une solution de NaCl

saturée. Récupérer la phase organique et la sécher sur du sulfate de magnésium. Après évaporation, le produit est récupéré.

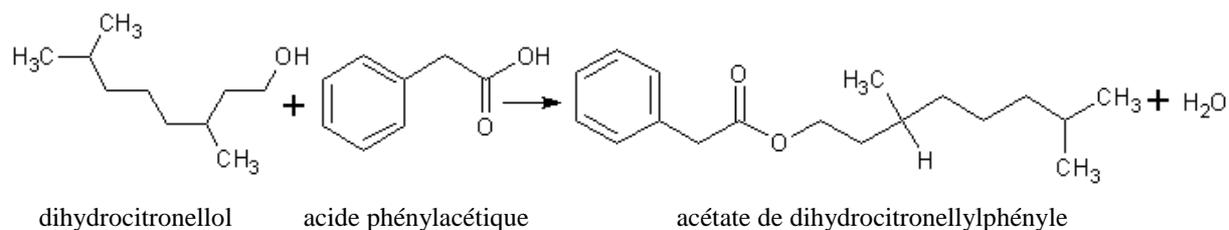


Figure 79: Synthèse de l'acétate de dihydrocitronellylphényle

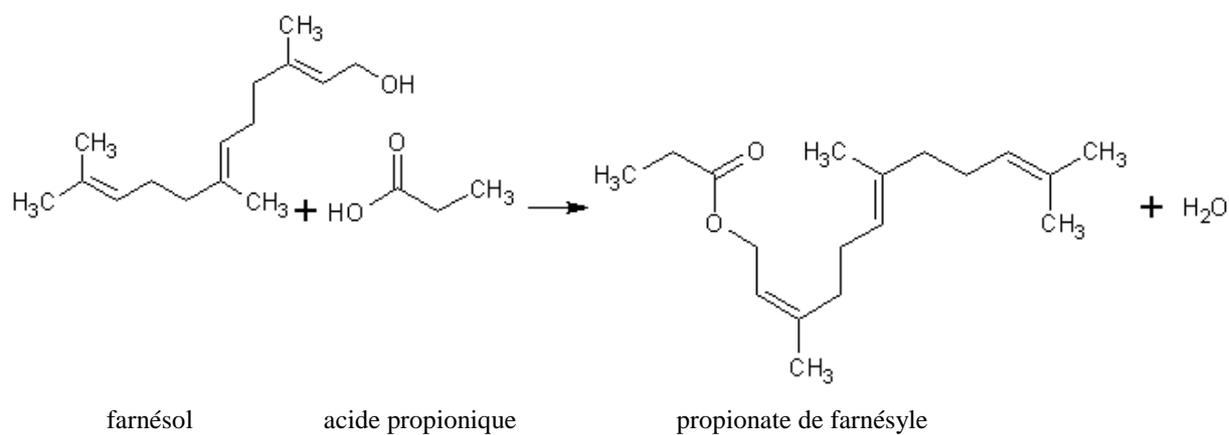


Figure 80: Synthèse du propionate de farnésyle

3.7.2. Synthèse du propionate de nérolidyle

Le propionate de nérolidyle a été synthétisé avec le chlorure de propionyle. 0,9 mL de chlorure de propionyle, 2,5 g de nérolidol et 1,4 mL de triéthylamine ont été introduits dans un ballon. Le mélange a été chauffé à 30 °C pendant 4 heures. Il a ensuite été refroidi à température ambiante. 15 mL de dichlorométhane ont été ajoutés au mélange. Enfin, trois lavages ont été réalisés avec une solution aqueuse saturée de Na₂CO₃. La phase organique a été récupérée et séchée sur MgSO₄ avant évaporation.

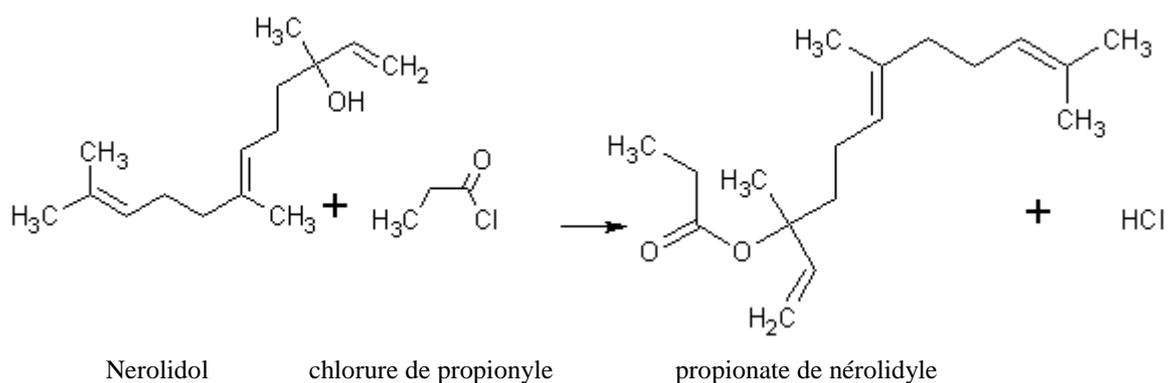


Figure 81: Synthèse du propionate de nérolidyle



Annexes

Annexe 1 : Le métabolisme des plantes

Une plante est un organisme vivant subissant des modifications dans sa composition métabolique dues à un ensemble de conditions externes auxquelles elle est soumise.

Deux classes de métabolites co-existent : les métabolites primaires et les métabolites secondaires (ou spécialisés). Les premiers sont les composés participant aux processus vitaux de la plante tels que sa croissance (carbohydrates, sucres, protéines, acides gras, acides nucléiques). Les seconds sont souvent caractéristiques de l'expression d'une espèce et ont un rôle de protection de la plante contre les compétiteurs ou les prédateurs [153]. Cette catégorie regroupe la plupart des produits naturels actifs.

La limite de la définition entre métabolites primaires et métabolites secondaires reste cependant difficile à déterminer, notamment pour le cas des sucres et acides gras pouvant être classés dans ces deux catégories ; même si classiquement rangés dans celle des métabolites primaires. Ceux-ci peuvent en effet être largement caractéristiques d'une espèce donnée, et présenter des activités pharmacologiques importantes [145].

La photosynthèse (Figure A1), la glycolyse, la β -oxydation des acides gras, et l'absorption des protéines sont les principaux mécanismes du métabolisme primaire. Ces derniers permettent la synthèse de l'acetyl-CoA, l'acide shikimique, l'acide mélavonique et la deoxyxylulose 5-P, intermédiaires menant à la production des métabolites secondaires (Figure A2). Les métabolites secondaires sont issus trois voies fondamentales ; dont les actions peuvent être combinées dans différentes configurations pour l'obtention d'un même composé [145]. Le Tableau A1 répertorie les différentes familles de molécules produites par ces intermédiaires.

La photosynthèse

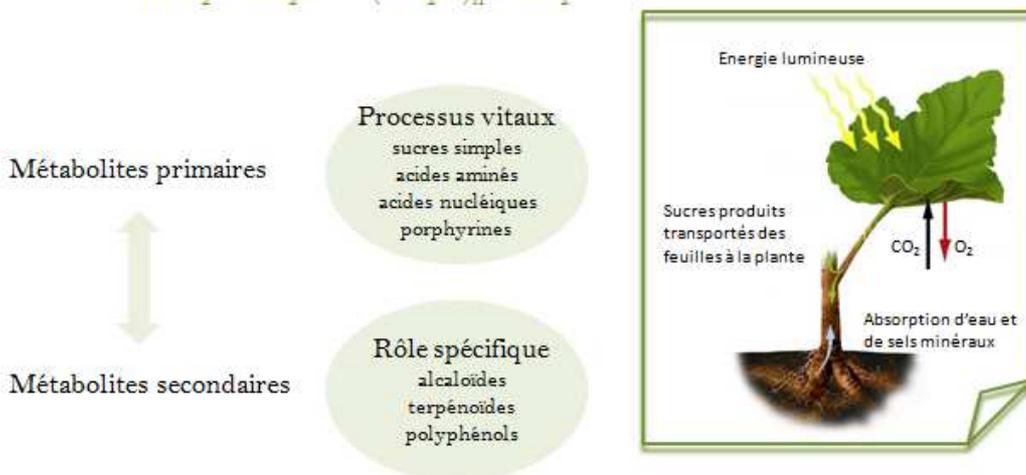


Figure A1: Réactions chimiques au sein d'une plante. La vie d'un végétal est régit par la photosynthèse. L'énergie solaire, les gaz présents dans l'atmosphère et les éléments minéraux dans le sol, sont indispensables à cette réaction qui permet l'auto-élaboration de la matière organique par la plante.

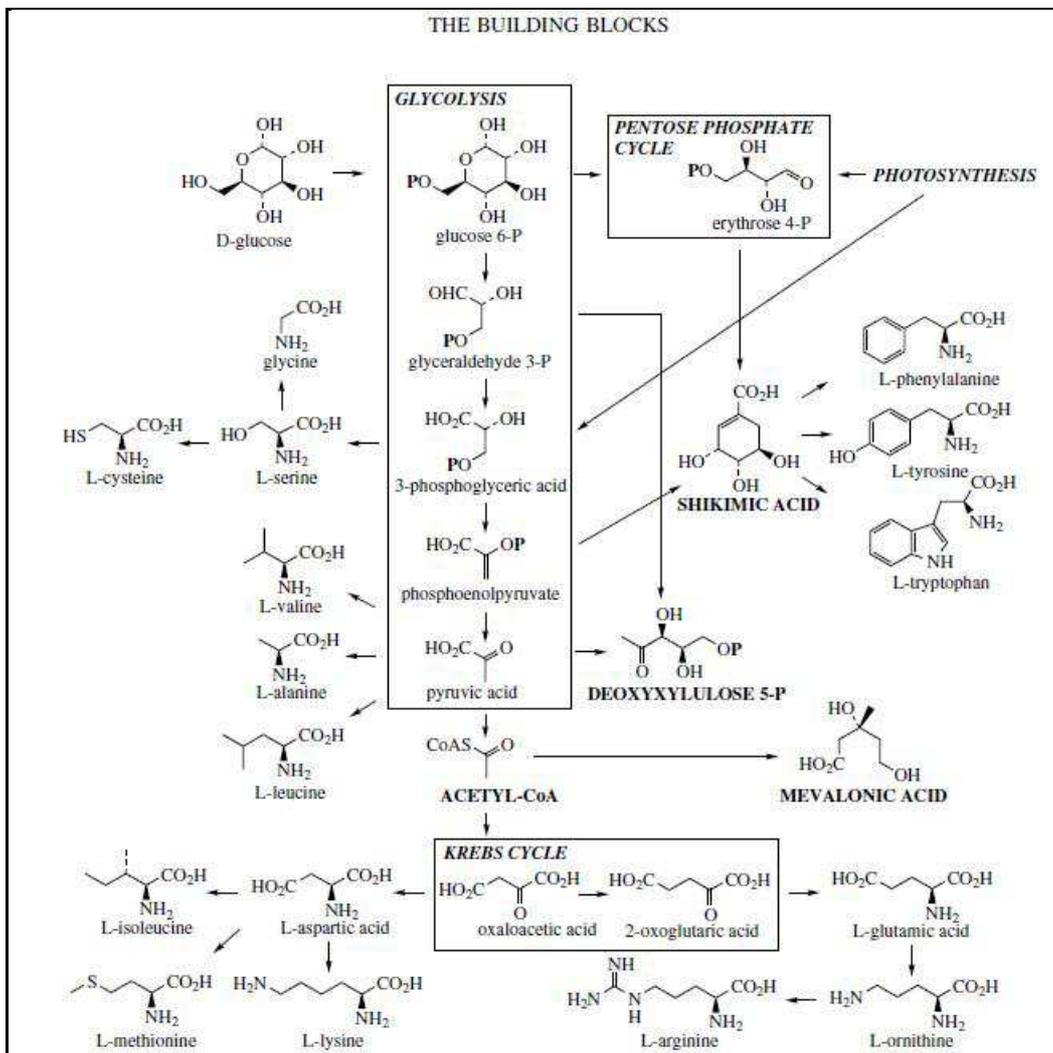


Figure A2: Blocs fondamentaux du métabolisme [145]

Tableau A1: Métabolites secondaires issus des quatre intermédiaires [1]

Voie	Acetyl-CoA	Acide shikimique	Acide mélavonique et Deoxyxylulose 5-P
Métabolites secondaires	Phenols, prostaglandines, antibiotiques macrolides, acides gras	Phenols, dérivés d'acide cinnamique, lignanes, alcaloïdes	Terpénoïdes et stéroïdes.

Dans les extraits naturels sont principalement retrouvés les alcaloïdes, les terpénoïdes et les composés aromatiques/phénoliques.

- *Les alcaloïdes*

Les alcaloïdes sont des métabolites secondaires hétérocycliques azotés. Les acides aminés (phénylalanine, tyrosine, tryptophane, lysine, ornithine), produits du métabolisme primaire, sont à l'origine de leur biosynthèse. Ils bénéficient de propriétés hydrophiles et basiques. Ces composés sont biologiquement actifs, on retrouve parmi eux : des drogues/médicaments (codéine, morphine, cocaïne, quinine) [145] et poisons (le curare) [154].

- *Les terpénoïdes*

Les terpénoïdes sont construits à partir d'un motif de base : l'isoprène. Les terpénoïdes sont classés selon leur nombre d'unités terpéniques : C5 (hémiterpène : une unité d'isoprène), C10 (monoterpène : deux unités d'isoprène), C15 (sesquiterpènes : trois unités d'isoprène), C20 (diterpènes : quatre unités d'isoprène), C30 (triterpènes), C40 (caroténoïdes) etc. Les monoterpènes, les sesquiterpènes et les terpénoïdes sont les composés volatils principaux retrouvés dans des extraits naturels tels que les huiles essentielles [155].

Ils sont biosynthétisés par deux voies : la voie du mévalonate et la voie du MEP (methylerythritol) [145].

- *Les composés phénoliques*

Les composés phénoliques sont construits à partir d'un motif de base : le phénol. Ils dérivent pour la majorité des acides aminés phénylalanine et tyrosine.

Les techniques de production des extraits naturels du secteur de la parfumerie et des cosmétiques conduisent principalement à l'extraction des métabolites secondaires. Les voies enzymatiques (mécanisme de coupe de la plante par exemple) et de dégradations (thermiques, etc.) engendrent des transformations supplémentaires de métabolites primaires en métabolites secondaires : cas des acides gras présenté ci-dessous.

1. La voie de la *lipoxygenase* : dégradation enzymatique des acides gras

La *lipoxygénase* [126] est la voie de dégradation enzymatique des acides gras issus des triglycérides, phospholipides et glycolipides. Cette voie est plus largement présentée du fait de la présence majoritaire d'acides gras dans les absolues de plantes étudiées par la suite. Elle est à l'origine de la synthèse de nombreux composés odorants à 6 ou 9 atomes de carbones, comportant aussi des atomes d'oxygène (Figure A3).

La *lipoxygénase* est une enzyme qui entre en contact avec des acides gras insaturés (acides linoléique et linolénique par exemple) lors de la rupture des parois cellulaires (coupe de la plante par exemple). Tout au long de ce mécanisme sont générés des aldéhydes, des oxoacides, et des alcools. L'abondance et la nature d'enzymes comme les *hydroperoxydes lyases* (HPL) vont favoriser la synthèse de certains composés. Ainsi, chaque plante ayant une composition en HPL spécifique, certaines produiront majoritairement des composés en C6 (ex : (Z)-hex-3-énol) et d'autres des composés en C9 (ex : (E)-non-2-énol).

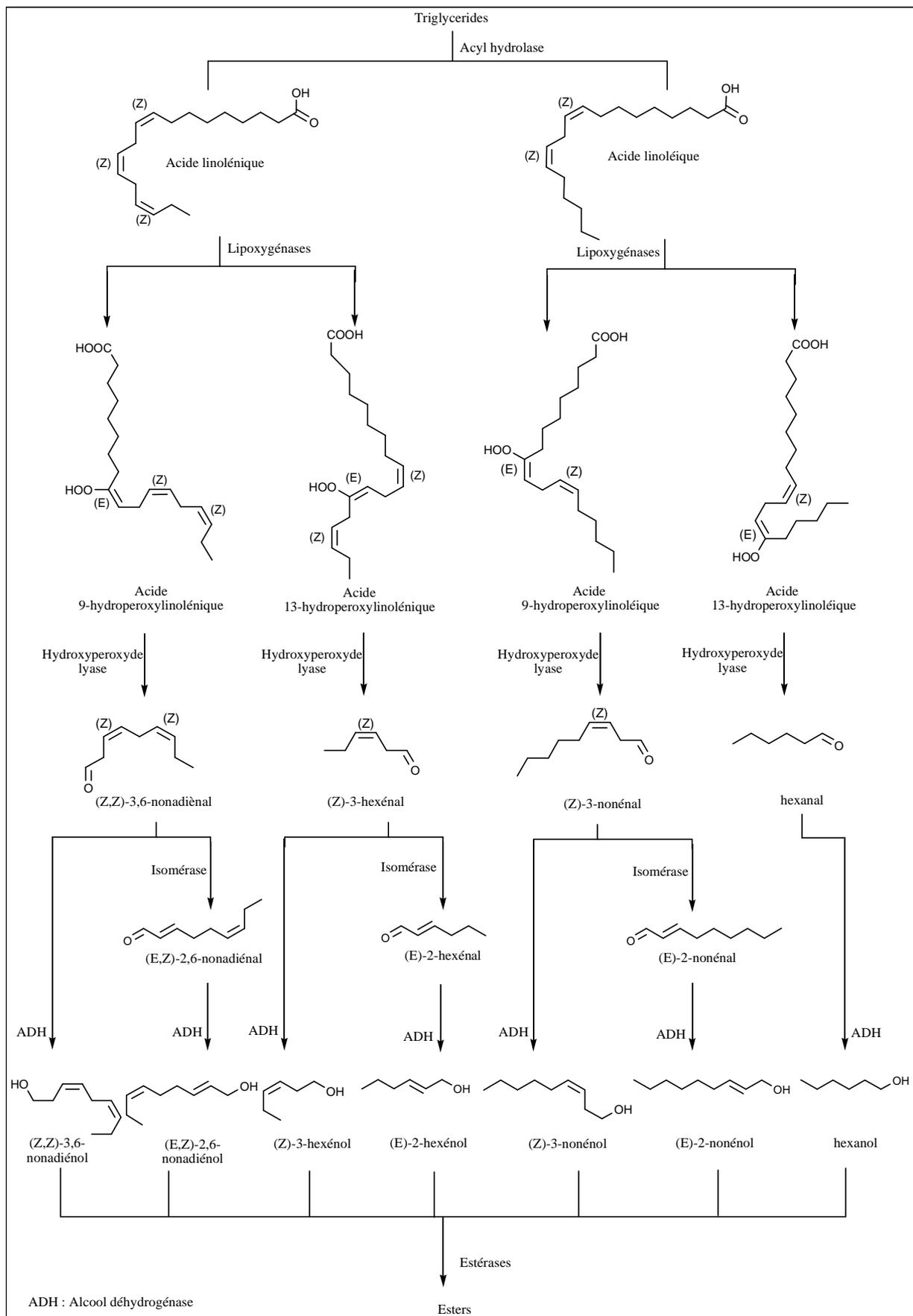


Figure A3: La voie de la lipoxygénase: dégradation enzymatique des acides gras[126]

2. La dégradation thermique des acides gras

Bien que les procédés d'extraction par solvant (pour l'obtention des absolues) ne mettent pas en œuvre de fortes températures (40-50°C max), d'autres procédés tels que l'hydrodistillation doivent atteindre le point d'ébullition de l'eau. Des dégradations thermiques d'autres natures peuvent aussi intervenir lors du transport de la matière fraîche mais également lors du stockage dans l'attente de son traitement etc. Ces différents niveaux de chauffage peuvent engendrer des dégradations thermiques des acides gras. Une réaction d'auto-oxydation conduit à la production d'hydroperoxyacides, qui se décomposent ensuite en alcools, alcanes, alcènes, aldéhydes, acides, cétones et esters. En plus des acides linoléiques et linoléiques, les acides oléiques et arachidoniques sont aussi impliqués [126] (Figure A4).

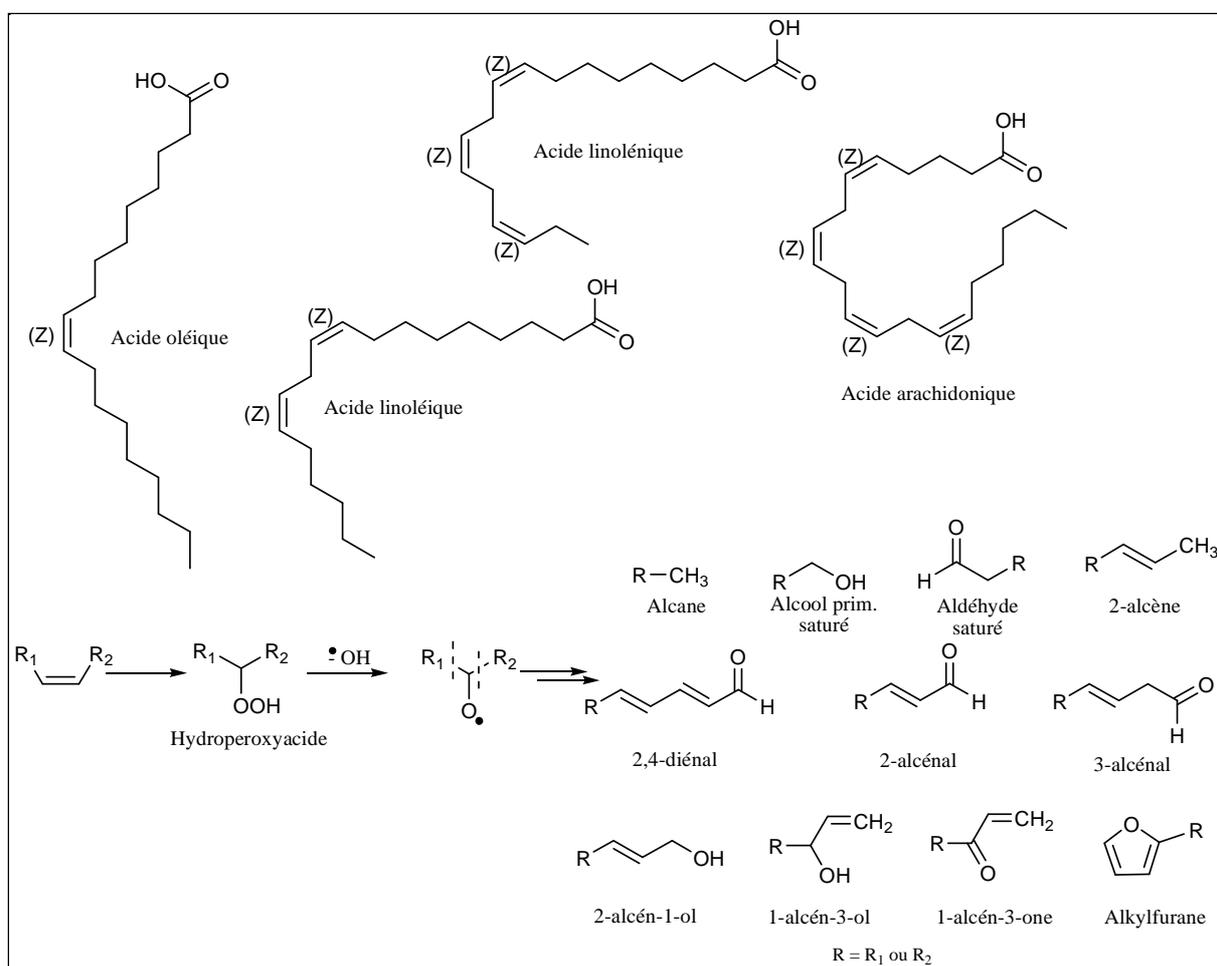


Figure A4: Dégradation thermique des acides gras [126]

D'autres voies de dégradations importantes interviennent chez les plantes : la dégradation des glucosinolates [156], la cysteine-lyase [157], la dégradation des caroténoïdes [158] ou encore la réaction de Maillard (pouvant se dérouler à basse température) [159].

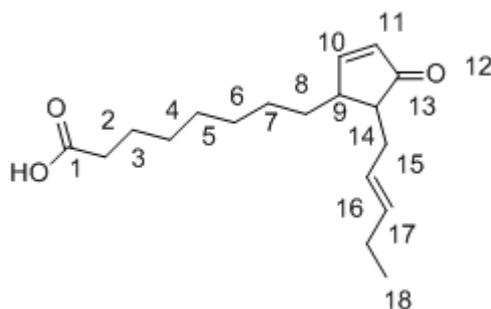
Annexe 2: Questionnaire fournisseurs

Ref Echantillon		
Variété botanique (contrôlée par un spécialiste?)		
Date de récolte		
Date d'extraction		
Situation géographique et environnement	Situation géographique / Coordonnées GPS	
	Informations sur l'ensoleillement d'une journée (matin, après-midi)	
	Exposition de la culture (nord, sud, est, ouest)	
	Pluviométrie de l'année de récolte	
	Gel de l'année de récolte	
	Environnement immédiat des cultures (autres cultures?, usines, cours d'eau...)	
	Composition du sol	
Culture	Arrosage (volume)	
	Traitement phytosanitaire	
	Age des pieds de violettes	
Récolte	Outil du cueilleur	
	Parties de la plante extraite (feuilles uniquement?, tiges?)	
	Stockage de la récolte avant extraction? Sous quelles conditions?	
	Saisons de récolte	
	Nombre de coupes et dates	
	Récolte: matin, après-midi?	

Extraction	Solvants	
	Temps d'extraction	
	Températures d'extraction	
	Rendements en concrète	
	Rendements en absolues	
	Conditions de stockage des extraits	
Informations diverses		

Question supplémentaire: Avez-vous connaissance d'adultérations pouvant être pratiquées sur ce type d'extrait?

Annexe 3 : Acide 12-oxo-phytodiénoïque



Position	δ_C , mult	δ_H , mult (J en Hz)	HMBC (C->H)
1	177.6, C	-	
2	33.8, CH ₂	1.47, m	3, 4
3	24.8, CH ₂	1.59, q (7.25)	2, 4
4	29.2, CH ₂	1.32, m	2, 3, 5, 6
5	29.1, CH ₂	1.32, m	3, 4, 6, 7
6	29.6, CH ₂	1.32, m	5, 7, 8
7	27.5, CH ₂	1.36, m	6, 8
8	34.4, CH ₂	2.33, m	7, 10, 13
9	47.2, CH	2.55, qd	8, 10, 13, 14a, 14b
10	167.7, CH	7.59, dd (5.72&2.47)	8, 9, 11, 13
11	133.0, CH	6.10, dd (5.76&1.88)	10
12	212.0, C	-	
13	51.6, CH	2.01, m	8, 9, 10, 11, 14a, 14b
14a	28.4, CH ₂	2.45, m	9, 13
14b		2.28, m	9, 13
15	125.2, CH	5.23, dd (12.67&7.60)	13, 14a, 14b, 16
16	134.1, CH	5.43, dd (13.21&7.24)	13, 14a, 14b, 15, 18
17	20.7, CH ₂	2.02, m	16, 18
18	14.4, CH ₃	0.93, t (7.54)	

Références

- [1] Briot E., La chimie des élégances - La parfumerie parisienne au XIXe siècle, naissance d'une industrie de luxe, *Thèse en Sciences Sociales*, Conservatoire national des arts et métiers, centre d'histoire des techniques et de l'environnement, **2008**.
- [2] Berthoud F., Une industrie du rêve et de la beauté Editions d'Assalit, Toulouse, **2005**.
- [3] Forcisi S., Moritz F., Kanawati B., Tziotis D., Lehmann R., Schmitt-Kopplin P., Liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics research: mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling, *Journal of Chromatography A* 1292 (**2013**) 51.
- [4] Le Guérier A., Le parfum : des origines à nos jours, Odile Jacob, Paris, **2005**.
- [5] Naves Y.R., Technologie et Chimie des Parfums Naturels, Masson et CIE, Paris, **1974**.
- [6] Penchev P.I., Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions, *Thèse de Génie des procédés et de l'Environnement*, Institut National Polytechnique Toulouse, **2010**.
- [7] Les violettes en parfumerie, Un jour, une plante, Musée International de la Parfumerie, Grasse, **2009**.
- [8] Gilly G., Les plantes à parfum et huiles essentielles à Grasse, L'Harmattan, **1997**.
- [9] Marcussen T., Allozymic variation in the widespread and cultivated *Viola odorata* (Violaceae) in western Eurasia, *Botanical Journal of the Linnean Society* 151 (**2006**) 563.
- [10] Malécot V., Marcussen T., Munzinger J., Yockteng R., Henry M., On the origin of the sweet-smelling Parma violet cultivars (Violaceae): wide intraspecific hybridization, sterility, and sexual reproduction, *American Journal of Botany* 94 (**2007**) 29.
- [11] Arctander S., Perfume and flavor materials of natural origin, Elizabeth, New Jersey, **1960**.
- [12] Karioti A., Furlan C., Vincieri F.F., Bilia A.R., Analysis of the constituents and quality control of *Viola odorata* aqueous preparations by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399 (**2011**) 1715.
- [13] Cu J.Q., Perineau F., Gaset A., Volatile components of violet leaves, *Phytochemistry* 31 (**1992**) 571.
- [14] Tarbouriech M.-F., Des églantiers et des roses, Inra, Gap, 18/10/2013, www7.inra.fr/dpenv/pdf/tarbod21.pdf.
- [15] Zrira S., La rose du Dadès, **2006**, www.agrimaroc.net/146.pdf.

- [16] Joichi A., Yomogida K., Awano K.-I., Ueda Y., Volatile components of tea-scented modern roses and ancient Chinese roses, *Flavour and Fragrance Journal* 20 (2005) 152.
- [17] Garnero J., Guichard G., Buil P., L'huile essentielle et la concrète de rose de Turquie, *Rivista italiana essenze profumi piante officinali aromi saponi cosmetici aerosol* n° ind (1976.03) (1976).
- [18] Guenther E., The essential oils, D. Van Nostrand Company, New York, 1952.
- [19] Aycı F., Aydınli M., Bozdemir Ö.A., Tutaş M., Gas chromatographic investigation of rose concrete, absolute and solid residue, *Flavour and Fragrance Journal* 20 (2005) 481.
- [20] Ulusoy S., Bosgelmez-Tinaz G., Secilmis-Canbay H., Tocopherol, carotene, phenolic contents and antibacterial properties of rose essential oil, hydrosol and absolute, *Current Microbiology* 59 (2009) 554.
- [21] Kurkcuoglu M., Baser K.H.C., Studies on Turkish Rose Concrete, Absolute, and Hydrosol, *Chemistry of Natural Compounds* 39 (2003) 457.
- [22] Aydinli M., Tutaş M., Production of rose absolute from rose concrete, *Flavour and Fragrance Journal* 18 (2003) 26.
- [23] Reverchon E., Delta Porta G., Rose concrete fractionation by supercritical CO₂, *The Journal of Supercritical Fluids* 9 (1996) 199.
- [24] Babu K.G.D., Singh B., Joshi V.P., Singh V., Essential oil composition of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) distilled under different pressures and temperatures, *Flavour and Fragrance Journal* 17 (2002) 136.
- [25] Kumar N., Bhandari P., Singh B., Bari S.S., Antioxidant activity and ultra-performance LC-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for phenolics-based fingerprinting of Rose species: *Rosa damascena*, *Rosa bourboniana* and *Rosa brunonii*, *Food and Chemical Toxicology* 47 (2009) 361.
- [26] Fernandez X., Chemat F., La chimie des huiles essentielles: Tradition et innovation, Vuibert, Paris, 2012.
- [27] Elortondo F.J.P., Ojeda M., Albisu M., Salmerón J., Etayo I., Molina M., Food quality certification: An approach for the development of accredited sensory evaluation methods, *Food Quality and Preference* 18 (2007) 425.
- [28] Touraille C., Evaluation Sensorielle manuel méthodologique, Tec & Doc, Paris, 2005.
- [29] Jaubert J.N., Gordon G., Doré J.C., Une organisation du champ des odeurs : 2ème partie, modèle descriptif de l'organisation de l'espace odorant, *Parfums, Cosmétiques, Aromes* 78 (1987) 71.
- [30] Ghosland F., Fernandez X., L'herbier parfumé, Plume de carotte, Toulouse, 2010.
- [31] Analyse sensorielle - Méthodologie - Essai triangulaire, Norme ISO 4120:2004.
- [32] Sarker S.D., Latif Z., Gray A.I., Natural products isolation, 2nd, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2006.

- [33] Cseke L.J., Kirakosyan A., Kaufman P.B., Warber S.L., Duke J.A., Briemann H.L., Natural products from plants, 2nd, CRC Taylor & Francis Group Boca Raton, Florida, **2006**.
- [34] Waksmundzka-Hajnos M., Sherma J., Kowalska T., Thin layer chromatography in phytochemistry, CRC Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, **2008**.
- [35] Kubeczka K.H., Formáček V., Essential oils analysis by capillary gas chromatography and 13-C NMR spectroscopy, Wiley, Weinheim, **2002**.
- [36] Tranchant J., Chromatographie en phase gazeuse, T.I. Masson, Issy-les-Moulineaux, **1996**.
- [37] Meyer V.R., Practical High-performance Liquid Chromatography, Wiley, Padstow, Cornwall, **2010**.
- [38] Bouchoux G., Sablier M., Spectrométrie de masse: principe et appareillage, *Techniques de l'ingénieur* P2645 (**2005**).
- [39] Delahunty C.M., Eyres G., Dufour J.-P., Gas chromatography-olfactometry, *Journal of Separation Science* 29 (**2006**) 2107.
- [40] Shirey E., Handbook of Solid Phase Microextraction, Chemical Industry Press, Beijing, **2009**.
- [41] Supelco, Guide to Solid Phase Extraction, Sigma Aldrich Bulletin 910 (**1998**).
- [42] Nováková L., Vlčková H., A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation, *Analytica Chimica Acta* 656 (**2009**) 8.
- [43] Bicchi C., Binello A., D'Amato A., Rubiolo P., Reliability of Van den Dool Retention Indices in the Analysis of Essential Oils, *Journal of Chromatographic Science* 37 (**1999**) 288.
- [44] Lee S.-J., Finding key odorants in foods: Gas chromatography olfactometry, *Food Science and Biotechnology* 12 (**2003**) 597.
- [45] Kalachova K., Cajka T., Sandy C., Hajslova J., Pulkrabova J., High throughput sample preparation in combination with gas chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry (GC-MS/MS): A smart procedure for (ultra)trace analysis of brominated flame retardants in fish, *Talanta* 105 (**2013**) 109.
- [46] Rodríguez-Carrasco Y., Moltó J.C., Mañes J., Berrada H., Development of a GC-MS/MS strategy to determine 15 mycotoxins and metabolites in human urine, *Talanta* 128 (**2014**) 125.
- [47] Eyres G., Marriott P.J., Dufour J.-P., The combination of gas chromatography-olfactometry and multidimensional gas chromatography for the characterisation of essential oils, *Journal of Chromatography A* 1150 (**2007**) 70.
- [48] Mondello L., Tranchida P.Q., Dugo P., Dugo G., Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: A review, *Mass Spectrometry Reviews* 27 (**2008**) 101.

- [49] Kind T., Fiehn O., Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry, *BMC Bioinformatics* 8 (2007) 105.
- [50] Laville R., Castel C., Fattarsi K., Roy C., Legendre L., Delbecque C., Garry P.-P., Audran A., Fernandez X., Low sclareol by-product of clary sage concrete: chemical analysis of a waste product of the perfume industry, *Flavour and Fragrance Journal* 28 (2013) 93.
- [51] Günther H., NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, Allemagne, 2013.
- [52] Fernandez X., Lizzani-Cuvelier L., Loiseau A.-M., Périchet C., Delbecque C., Volatile constituents of benzoin gums: Siam and Sumatra. Part 1, *Flavour and Fragrance Journal* 18 (2003) 328.
- [53] Jirovetz L., Buchbauer G., Stoyanova A., Balinova A., Guangjiun Z., Xihan M., Solid phase microextraction/gas chromatographic and olfactory analysis of the scent and fixative properties of the essential oil of *Rosa damascena* L. from China, *Flavour and Fragrance Journal* 20 (2005) 7.
- [54] Schipilliti L., Dugo G., Santi L., Dugo P., Mondello L., Authentication of Bergamot Essential Oil by Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometer (GC-C-IRMS), *Journal of Essential Oil Research* 23 (2011) 60.
- [55] Kreis P., Mosandl A., Chiral compounds of essential oils. Part XII. Authenticity control of rose oils, using enantioselective multidimensional gas chromatography, *Flavour and Fragrance Journal* 7 (1992) 199.
- [56] Ravid U., Putievsky E., Katzir I., Ikan R., Weinstein V., Determination of the enantiomeric composition of citronellol in essential oils by chiral GC analysis on a modified γ -cyclodextrin phase, *Flavour and Fragrance Journal* 7 (1992) 235.
- [57] Li Y.-q., Kong D.-x., Wu H., Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC-MS and FTIR spectroscopy, *Industrial Crops and Products* 41 (2013) 269.
- [58] Martin G.J., Tracing back the origin of vanillin by SNIF-NMR, *Industrial Chemistry Library* Volume 8 (1996) 506.
- [59] Descartin M.A.T., Figueroa P.P.B., Valdez J.D.G., Authentication of origin and method of production of lysine and methionine by carbon and nitrogen isotope provenance determination, Bibliographic information available from INIS: http://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:44096897 (2013).
- [60] Saraswathy A., Shakila R., Sunilkumar K.N., HPTLC Fingerprint Profile Of Some Cinnamomum Species, *Pharmacognosy Journal* 2 (2010) 211.
- [61] Buiarelli F., Cartoni G.P., Coccioli F., Ravazzi E., Analysis of orange and mandarin essential oils by HPLC, *Chromatographia* 31 (1991) 489.
- [62] Mehl F., Marti G., Boccard J., Debrus B., Merle P., Delort E., Baroux L., Raymo V., Velazco M.I., Sommer H., Wolfender J.-L., Rudaz S., Differentiation of lemon essential oil based on volatile and non-volatile fractions with various analytical techniques: a metabolomic approach, *Food Chemistry* 143 (2014) 325.

- [63] Hall R.D., Plant metabolomics, a new opportunity for quality analyses, *newfood* 16 (2013).
- [64] Regal P., Anizan S., Antignac J.P., Le Bizec B., Cepeda A., Fente C., Metabolomic approach based on liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry to screen for the illegal use of estradiol and progesterone in cattle, *Analytica Chimica Acta* 700 (2011) 16.
- [65] Jiang Z., Sun J., Liang Q., Cai Y., Li S., Huang Y., Wang Y., Luo G., A metabonomic approach applied to predict patients with cerebral infarction, *Talanta* 84 (2011) 298.
- [66] Ribeiro J.S., Augusto F., Salva T.J., Ferreira M.M., Prediction models for Arabica coffee beverage quality based on aroma analyses and chemometrics, *Talanta* 101 (2012) 253.
- [67] Besada C., Sanchez G., Salvador A., Granell A., Volatile compounds associated to the loss of astringency in persimmon fruit revealed by untargeted GC–MS analysis, *Metabolomics* 9 (2013) 157.
- [68] Andrés-Iglesias C., Blanco C.A., Blanco J., Montero O., Mass spectrometry-based metabolomics approach to determine differential metabolites between regular and non-alcohol beers, *Food Chemistry* 157 (2014) 205.
- [69] Pujos-Guillot E., Hubert J., Martin J.F., Lyan B., Quintana M., Claude S., Chabanas B., Rothwell J.A., Bennetau-Pelissero C., Scalbert A., Comte B., Hercberg S., Morand C., Galan P., Manach C., Mass spectrometry-based metabolomics for the discovery of biomarkers of fruit and vegetable intake: citrus fruit as a case study, *Journal of Proteome Research* 12 (2013) 1645.
- [70] Bar-Akiva A., Ovadia R., Rogachev I., Bar-Or C., Bar E., Freiman Z., Nissim-Levi A., Gollop N., Lewinsohn E., Aharoni A., Weiss D., Koltai H., Oren-Shamir M., Metabolic networking in *Brunfelsia calycina* petals after flower opening, *Journal of Experimental Botany* 61 (2010) 1393.
- [71] Xiong A., Yang L., Ji L., Wang Z., Yang X., Chen Y., Wang X., Wang C., Wang Z., UPLC-MS based metabolomics study on *Senecio scandens* and *S. vulgaris*: an approach for the differentiation of two Senecio herbs with similar morphology but different toxicity, *Metabolomics* 8 (2012) 614.
- [72] Maree J., Kamatou G., Gibbons S., Viljoena A., Van Vuuren S., The application of GC–MS combined with chemometrics for the identification of antimicrobial compounds from selected commercial essential oils, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 130 (2014) 172.
- [73] Hanhineva K., Rogachev I., Kokko H., Mintz-Oron S., Venger I., Kärenlampi S., Aharoni A., Non-targeted analysis of spatial metabolite composition in strawberry (*Fragaria ananassa*) flowers, *Phytochemistry* 69 (2008) 2463.
- [74] Kim N., Kim K., Choi B.Y., Lee D., Shin Y.S., Bang K.H., Cha S.W., Lee J.W., Choi H.K., Jang D.S., Lee D., Metabolomic approach for age discrimination of Panax ginseng using UPLC-Q-ToF MS, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (2011) 10435.

- [75] Zhang J., Wang X., Yu O., Tang J., Gu X., Wan X., Fang C., Metabolic profiling of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) during fruit development and maturation, *Journal of Experimental Botany* 62 (2011) 1103.
- [76] Gavicho Uarrota V., Moresco R., Coelho B., Nunes da Costa E., Martins Peruch L.A., Neubert E.d.O., Rocha M., Maraschin M., Metabolomics combined with chemometric tools (PCA, HCA, PLS-DA and SVM) for screening cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots during postharvest physiological deterioration, *Food Chemistry* (2014).
- [77] Oliver S.G., Winson M.K., Kell D.B., Baganz F., Systematic functional analysis of the yeast genome, *Trends in Biotechnology* 16 (1998) 373.
- [78] Dettmer K., Aronov P.A., Hammock B.D., Mass spectrometry-based metabolomics, *Mass Spectrometry Reviews* 26 (2007) 51.
- [79] Ernst M., Silva D.B., Silva R.R., Vencio R.Z.N., Lopes N.P., Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing, *Natural Product Reports* (2014).
- [80] Chunxiu Hu G.X., Mass-spectrometry-based metabolomics analysis for foodomics, *Trends in Analytical Chemistry* 61 (2014) 207.
- [81] Wang X., Sun H., Zhang A., Wang P., Han Y., Ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry as a sensitive and powerful technology for metabolomic studies, *Journal of Separation Science* 34 (2011) 3451.
- [82] Allwood J.W., Ellis D.I., Goodacre R., Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant-host interactions, *Physiologia Plantarum* 132 (2008) 117.
- [83] Marshall A.G., Hendrickson C.L., Fourier transform ion cyclotron resonance detection: principles and experimental configurations, *International Journal of Mass Spectrometry* 215 (2002) 59.
- [84] Makarov A., Scigelova M., Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 3938.
- [85] Waters, Instrument Specifications Waters Xevo G2 QTof, 2011, www.waters.com
- [86] Swartz M.E., Ultra Performance Liquid Chromatography: An Introduction, *LC-GC* (Mai 2005).
- [87] Swartz M.E., Murphy B.J., Ultra performance liquid chromatography: tomorrow's HPLC technology today, *LPI* (Jun 2004).
- [88] www.waters.com, 27/05/14.
- [89] Gaskell S.J., Electrospray: Principles and Practice, *Journal of Mass Spectrometry* 32 (1997) 677.
- [90] Taflin D.C., Ward T.L., Davis E.J., Electrified droplet fission and the Rayleigh limit, *Langmuir* 5 (1989) 376.

- [91] Banerjee S., Mazumdar S., Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte, *International Journal of Analytical Chemistry* (2012).
- [92] Waters, Waters XEVO G2 QToF: Post installation documentation for standard flow applications, 2009, www.waters.com
- [93] Trufelli H., Palma P., Famiglini G., Cappiello A., An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews* 30 (2011) 491.
- [94] Mass spectrometry, Fundamental LC-MS, Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI), Chromacademy, 16/07/14, www.chromacademy.com
- [95] Voyksner R.D., LC/MS: The Techniques of Electrospray, APCI and APPI, Conférence ASMS 2012, Baiona, Espagne, 05/09/12.
- [96] Bagag A., Photoionisation et spectrométrie de masse: un nouvel outil pour l'identification de biomolécules, *Thèse de Chimie*, Université d'Evry Val d'Essonne, 2008.
- [97] Guilhaus M., Special feature: Tutorial. Principles and instrumentation in time-of-flight mass spectrometry. Physical and instrumental concepts, *Journal of Mass Spectrometry* 30 (1995) 1519.
- [98] Vaidyanathan S., Goodacre R., in: Lees M. (Ed.), Food Authenticity and Traceability, Woodhead Publishing, 2003, p. 71.
- [99] Forveffle L., Vercauteren J., Rutledge D.N., Multivariate statistical analysis of two-dimensional NMR data to differentiate grapevine cultivars and clones, *Food Chemistry* 57 (1996) 441.
- [100] Nord L.I., Kenne L., Jacobsson S.P., Multivariate analysis of ¹H NMR spectra for saponins from *Quillaja saponaria* Molina, *Analytica Chimica Acta* 446 (2001) 197.
- [101] Schoonjans V., Taylor N., Hudson B.D., Massart D.L., Characterization of the similarity of chemical compounds using electrospray ionization mass spectrometry and multivariate exploratory techniques, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 28 (2002) 537.
- [102] Okuyama S., Mitsui T., Ishida Y., Ohtani H., Tsuge S., Discriminative analysis of denatured vegetable oils by thermally assisted hydrolysis and methylation-gas chromatography combined with multivariate analysis, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 64 (2002) 187.
- [103] Smith C.A., Want E.J., O'Maille G., Abagyan R., Siuzdak G., XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification, *Analytical Chemistry* 78 (2006) 779.
- [104] Lommen A., Kools H., MetAlign 3.0: performance enhancement by efficient use of advances in computer hardware, *Metabolomics* 8 (2012) 719.
- [105] Reichenbach S.E., Tian X., Tao Q., Ledford Jr E.B., Wu Z., Fiehn O., Informatics for cross-sample analysis with comprehensive two-dimensional gas chromatography and high-resolution mass spectrometry (GCxGC–HRMS), *Talanta* 83 (2011) 1279.

- [106] Wang Y., Lehmann R., Lu X., Zhao X., Xu G., Novel, fully automatic hydrophilic interaction/reversed-phase column-switching high-performance liquid chromatographic system for the complementary analysis of polar and apolar compounds in complex samples, *Journal of Chromatography A* 1204 (2008) 28.
- [107] Venter A., Rohwer E.R., Comprehensive two-dimensional supercritical fluid and gas chromatography with independent fast programmed heating of the gas chromatographic column, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 3699.
- [108] Wahyuni Y., Ballester A.R., Tikunov Y., de Vos R.C., Pelgrom K.T., Maharijaya A., Sudarmonowati E., Bino R.J., Bovy A.G., Metabolomics and molecular marker analysis to explore pepper (*Capsicum* sp.) biodiversity, *Metabolomics* 9 (2013) 130.
- [109] UMETRICS, SIMCA User Guide, 2012.
- [110] Lebart L., Piron M., Morineau A., Statistique exploratoire multidimensionnelle, 4ème, Dunod, Paris, 2006.
- [111] Bylesjo M., Rantalainen M., Cloarec O., Nicholson J.K., Holmes E., Trygg J., OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification, *Journal of Chemometrics* 20 (2006) 341.
- [112] Xie G., Plumb R., Su M., Xu Z., Zhao A., Qiu M., Long X., Liu Z., Jia W., Ultra-performance LC/TOF MS analysis of medicinal Panax herbs for metabolomic research, *Journal of Separation Science* 31 (2008) 1015.
- [113] Aprea E., Gika H., Carlin S., Theodoridis G., Vrhovsek U., Mattivi F., Metabolite profiling on apple volatile content based on solid phase microextraction and gas-chromatography time of flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 4517.
- [114] Diaz R., Pozo O.J., Sancho J.V., Hernandez F., Metabolomic approaches for orange origin discrimination by ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Food Chemistry* 157 (2014) 84.
- [115] Montero-Prado P., Bentayeb K., Nerin C., Pattern recognition of peach cultivars (*Prunus persica* L.) from their volatile components, *Food Chemistry* 138 (2013) 724.
- [116] Gledhill A., Uria D., Simple differentiation of black tea samples using a chemometric approach with Markerlynx XS application manager, Note d'application Waters (2008).
- [117] Xiang Z., Wang X.Q., Cai X.J., Zeng S., Metabolomics study on quality control and discrimination of three curcuma species based on gas chromatograph-mass spectrometry, *Phytochemical Analysis* 22 (2011) 411.
- [118] Masson J., Liberto E., Brevard H., Bicchi C., Rubiolo P., A metabolomic approach to quality determination and authentication of raw plant material in the fragrance field. Iris rhizomes: A case study, *Journal of Chromatography A* 1368 (2014) 143.
- [119] Warren C., Aranda I., Cano F.J., Metabolomics demonstrates divergent responses of two Eucalyptus species to water stress, *Metabolomics* 8 (2012) 186.
- [120] Ku K.M., Choi J.N., Kim J., Kim J.K., Yoo L.G., Lee S.J., Hong Y.S., Lee C.H., Metabolomics analysis reveals the compositional differences of shade grown tea (*Camellia sinensis* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (2010) 418.

- [121] Guo N., Yu Y., Ablajan K., Li L., Fan B., Peng J., Yan H., Ma F., Nie Y., Seasonal variations in metabolite profiling of the fruits of *Ligustrum lucidum* Ait, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 25 (2011) 1701.
- [122] Tissot E., Rochat S., Debonneville C., Chaintreau A., Rapid GC-FID quantification technique without authentic samples using predicted response factors, *Flavour and Fragrance Journal* 27 (2012) 290.
- [123] Cicchetti E., Merle P., Chaintreau A., Quantitation in gas chromatography: usual practices and performances of a response factor database, *Flavour and Fragrance Journal* 23 (2008) 450.
- [124] Sanchez Saez J.J., Herce Garraleta M.D., Calvo Anton P., Folgueiras Alonso M.L., Identification of 4-bromo-2-chlorophenol as a contaminant responsible for organoleptic taint in melons, *Food Additives & Contaminants* 8 (1991) 627.
- [125] Berdagué J.L., Tournayre P., Cambou S., Novel multi-gas chromatography–olfactometry device and software for the identification of odour-active compounds, *Journal of Chromatography A* 1146 (2007) 85.
- [126] Breme K., Analyse d'extraits naturels utilisés en parfumerie par GC/Olfactométrie, *Thèse de Chimie*, Université de Nice Sophia-Antipolis, Nice, 2008.
- [127] Berdagué J.L., Tournayre P., Flavour Research at the Dawn Twenty-First Century, Tec & Doc, Paris, 2003.
- [128] Kondjoyan N., Berdagué J.L., A Compilation of relative retention indices for the analysis of aromatic compounds, Edition du Laboratoire Flaveur, Theix, 1996.
- [129] NIST Webbook Website, 18/06/2013, <http://webbook.nist.gov/chemistry/>
- [130] The good scents company, 2014, <http://www.thegoodscentcompany.com/>
- [131] Abouelkaram S., Berdagué J.L., MS3 Spectra Separation Software, Outil logiciel d'aide à la purification de spectres de masse en mélanges complexes, 2010.
- [132] Leffingwell and Associates Website, 2013, <http://www.leffingwell.com/odorthre.htm>
- [133] Saint-Lary L., Roy C., Paris J.-P., Tournayre P., Berdagué J.-L., Thomas O.P., Fernandez X., Volatile Compounds of *Viola odorata* Absolutes: Identification of Odorant Active Markers to Distinguish Plants Originating from France and Egypt, *Chemistry & Biodiversity* 11 (2014) 843.
- [134] Naz S., Vallejo M., García A., Barbas C., Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics, *Journal of Chromatography A* 1353 (2014) 99.
- [135] van der Kloet F.M., Bobeldijk I., Verheij E.R., Jellema R.H., Analytical error reduction using single point calibration for accurate and precise metabolomic phenotyping, *Journal of Proteome Research* 8 (2009) 5132.
- [136] Westerhuis J., Velzen E.J., Hoefsloot H.J., Smilde A., Multivariate paired data analysis: multilevel PLS-DA versus OPLS-DA, *Metabolomics* 6 (2010) 119.
- [137] Näf R., Velluz A., The volatile constituents of extracts of cooked spinach leaves (*Spinacia oleracea* L.), *Flavour and Fragrance Journal* 15 (2000) 329.

- [138] Wolfender J.-L., Marti G., Thomas A., Bertrand S., Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts, *Journal of Chromatography A* (2014).
- [139] Ireland D.C., Colgrave M.L., Nguyencong P., Daly N.L., Craik D.J., Discovery and Characterization of a Linear Cyclotide from *Viola odorata*: Implications for the Processing of Circular Proteins, *Journal of Molecular Biology* 357 (2006) 1522.
- [140] Khare C.P., *Indian Herbal Remedies*, Springer, 2003.
- [141] Duke J.A., *Handbook of Phytochemical constituents of GRAS Herbs and Other Economic Plants, Health and Fitness*, Boca Raton, Florida, 2000.
- [142] Abdulsalam Abdulrahman R., Kadhm Abdullah M., Estimation of Some Plant Secondary Products in *Urtica dioica* L., *Viola odorata* L. and *Melissa officinalis* L. Naturally Grown in Hawraman-Kurdistan Region of Iraq, *Journal of Agricultural Science and Technology B* (2013).
- [143] Aniszewski T., *Alkaloids - Secrets of Life*, Elsevier, Amsterdam, 2007.
- [144] <http://goldbook.iupac.org/A00220.html>, 19/01/2015.
- [145] Dewick P.M., *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3, John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, Angleterre, 2009.
- [146] Crozier A., Clifford M.N., Ashihara H., *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, Blackwell Publishing, Singapore, 2006.
- [147] Scheuer P.J., Isocyanides and cyanides as natural products, *Accounts of Chemical Research* 25 (1992) 433.
- [148] Sengupta P., Dey A.K., Terpenoids and related compounds. xXI. the structures and stereochemistry of putranjivic acid and putranjic (putric) acid., *Tetrahedron* 28 (1972).
- [149] Bettelheim F., Brown W., Campbell M., Farrell S., *Introduction to General, Organic and Biochemistry*, Brooks/Cole, Belmont, USA, 2010.
- [150] Hossain M.B., Tiwari B.K., Gangopadhyay N., O'Donnell C.P., Brunton N.P., Rai D.K., Ultrasonic extraction of steroidal alkaloids from potato peel waste, *Ultrasonics Sonochemistry* 21 (2014) 1470.
- [151] Taki N., Sasaki-Sekimoto Y., Obayashi T., Kikuta A., Kobayashi K., Aina T., Yagi K., Sakurai N., Suzuki H., Masuda T., Takamiya K., Shibata D., Kobayashi Y., Ohta H., 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*, *Plant Physiology* 139 (2005) 1268.
- [152] Théron L., Tournayre P., Kondjoyan N., Abouelkaram S., Santé-Lhoutellier V., Berdagué J.-L., Analysis of the volatile profile and identification of odour-active compounds in Bayonne ham, *Meat Science* 85 (2010) 453.
- [153] Meyer S., Reeb C., Bosdeveix R., *Botanique, Biologie et Physiologie végétales*, 2ème, Maloine, Paris, 2008.

- [154] Booij H.H.D.J., The history of neuromuscular blocking agents, *Current Anaesthesia & Critical Care* 11 (2000) 27.
- [155] Loza-Tavera H., Monoterpenes in essential oils. Biosynthesis and properties, *Advances in Experimental Medicine and Biology* 464 (1999) 49.
- [156] Chen S., Andreasson E., Update on glucosinolate metabolism and transport, *Plant Physiology and Biochemistry* 39 (2001) 743.
- [157] Mifflin B.J., Lea Peter J., The biochemistry of plants: Intermediary Nitrogen Metabolism, Stumpf & Conn, 1990.
- [158] Rios J.J., Fernández-García E., Mínguez-Mosquera M.I., Pérez-Gálvez A., Description of volatile compounds generated by the degradation of carotenoids in paprika, tomato and marigold oleoresins, *Food Chemistry* 106 (2008) 1145.
- [159] Nursten H., The Maillard Reaction : Chemistry, Biochemistry and Implications, WILEY-VCH, Weinheim, Allemagne, 2005.