



**HAL**  
open science

# Caractérisation chimique d'huiles essentielles de conifères introduits en Corse et de plantes endémiques de Madagascar

Gabriel Garcia

► **To cite this version:**

Gabriel Garcia. Caractérisation chimique d'huiles essentielles de conifères introduits en Corse et de plantes endémiques de Madagascar. Chimie. Université de Corse, ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT ET SOCIETE, UMR CNRS 6134 (SPE), 2017. Français. NNT: . tel-02529789v1

**HAL Id: tel-02529789**

**<https://hal.science/tel-02529789v1>**

Submitted on 2 Apr 2020 (v1), last revised 12 Nov 2021 (v2)

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

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



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



**Thèse présentée pour l'obtention du grade de**  
**DOCTEUR EN CHIMIE**  
**Mention : Chimie Organique et Analytique**

**Soutenue publiquement par**

**GABRIEL GARCIA**

Le 11 Décembre 2017

---

**Caractérisation chimique d'huiles essentielles de conifères  
introduits en Corse et de plantes endémiques de Madagascar**

---

**Directeur :**

Mr Félix TOMI, Pr, Université de Corse

**Rapporteurs :**

Mr Pascal RICHOMME, Pr, Université d'Angers

Mr Hervé CASABIANCA, IGR-HDR, Université de Lyon

**Jury :**

Mr Pascal RICHOMME, Pr, Université d'Angers

Mr Hervé CASABIANCA, IGR-HDR, Université de Lyon

Mr Jean-Jacques FILIPPI, MC-HDR, Université de Nice

Mr Hugues BREVARD, Dr, Directeur Scientifique, Robertet S.A.

Mr Ange BIGHELLI, Pr, Université de Corse

Mr Joseph CASANOVA, Pr, Université de Corse

**Membre invité :**

Mr Félix TOMI, Pr, Université de Corse









# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	XI
ABBREVIATIONS	XV
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : LES DIFFERENTES METHODES D'IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS DES SUBSTANCES NATURELLES	9
<b>I. Analyse par couplage « en ligne » (voie A)</b>	<b>13</b>
I.1. Quantification par GC(RI)	13
I.2. Identification par GC-MS	15
<b>II. Identification des constituants après séparation (voie B)</b>	<b>16</b>
<b>III. Identification par RMN <sup>13</sup>C sans séparation préalable (voie C)</b>	<b>18</b>
III.1. Intérêt de la RMN <sup>13</sup> C	18
III.2. Identification de constituants en mélange par RMN <sup>13</sup> C	19
III.2.1. L'observation des signaux	20
III.2.2. L'individualisation des signaux	20
III.2.3. L'attribution des signaux	21
III.3. Méthode d'analyse développée au laboratoire	23
III.3.1. Le principe de la méthode	23
III.3.2. Application à l'analyse d'huiles essentielles	25
• Combinaison de la chromatographie sur colonne et de la RMN <sup>13</sup> C	26
• Combinaison de l'hémisynthèse et de la RMN <sup>13</sup> C	27
III.3.3. Applications à d'autres familles chimiques	27
III.3.4. Etudes de variabilité chimique	29
III.3.5. Résolution de plusieurs problèmes analytiques	30
• Identification de molécules qui co-éluent	30
• Identification de molécules non éluées en GC(RI) et GC-MS	30
• Identification de molécules thermosensibles	31
• Identification des stéréoisomères	32
CHAPITRE II : CARACTERISATION D'HUILES ESSENTIELLES « SANS DIFFICULTES ANALYTIQUES PARTICULIERES »	36
<b>Article 1. Chemical compositions of essential oils of five introduced conifers in Corsica</b>	<b>44</b>
1. Introduction	45
2. Results and discussion	45
3. Experimental	50
3.1. Plant material, isolation of essential oil	50
3.2. Gas Chromatography	51
3.3. Gas Chromatography-Mass Spectrometry in Electron Impact Mode	51

3.4. Nuclear Magnetic Resonance	51
3.5. Identification and quantification of individual components	52
3.6. Statistical analysis	52
<b>Article 2. Chemical composition of <i>Melicope belahe</i> (Baill.) T. G. Hartley (Rutaceae) leaf essential oil from Madagascar</b>	<b>54</b>
1. Introduction	55
2. Results and discussion	55
3. Experimental	58
3.1. Plant collection	58
3.2. Botanical description	58
3.3. Extraction and fractionation of essential oil	58
3.4. Gas chromatography (GC)	59
3.5. Mass spectroscopy (GC-MS)	59
3.6. <sup>13</sup> C Nuclear magnetic resonance (NMR)	59
3.7. Identification of components	60
<b>CHAPITRE III : COMPOSES THERMOSENSIBLES ET DIFFERENTIATION DE DIASTEREISOMERES</b>	<b>62</b>
<b>Article 3. Chemical composition of leaf and bark essential oils of <i>Vepris unifoliolata</i> from Madagascar</b>	<b>66</b>
1. Introduction	67
2. Results and discussion	68
2.1. Leaf essential oil	68
2.2. Bark essential oil	70
2.2.1. Isofuranodiene/curzerene	71
2.2.2. Germacrone/ <i>trans</i> -β-elemenone	71
2.2.3. Germacrene A/β-elemene and germacrene B/γ-elemene	72
3. Experimental	74
3.1 Plant material	74
3.2. Analytical GC	74
3.3. GC-MS analysis	75
3.4. <sup>13</sup> C-NMR analysis	75
3.5. Quantification of components	75
<b>Article 4. Integrated Analysis of the Bark Oil from <i>Cinnamosma madagascariensis</i> by GC(RI), GC-MS and NMR. <sup>13</sup>C-NMR data of Cyclocopacamphene and Cyclosativene</b>	<b>77</b>
1. Introduction	78
2. Results and discussion	78
2.1. Leaf essential oil	78
2.2. Bark essential oil	80
2.2.1. Identification of cyclocopacamphene	80
2.2.2. Composition of bark oil from <i>Cinnamosma madagascariensis</i>	82
3. Experimental	83
3.1. Plant material, isolation, chromatographic fractionation of EO	83
3.2. Gas chromatography and nuclear magnetic resonance	84
3.3. Gas chromatography-mass spectrometry	84
3.4. Identification and quantification of individual components	84
<b>CHAPITRE IV : ELUCIDATION STRUCTURALE DE NOUVELLES MOLECULES</b>	<b>88</b>
<b>Article 5. New Pinane Derivatives Found in Essential Oils of <i>Calocedrus decurrens</i></b>	<b>92</b>
1. Introduction	93

2. Results	94
2.1. Analysis of <i>C. decurrens</i> Leaf, Old Branches and Young Branches Essential Oils by GC(RI), GC-MS and <sup>13</sup> C-NMR	94
2.2. Structure Elucidation of Unidentified Compounds	97
2.2.1. Identification of Pin-2-en-8-ol (A)	97
2.2.2. Identification of Pin-2-en-8-yl Acetate (B)	100
2.2.3. Identification of Pin-2-en-8-al (C)	101
2.2.4. Identification of Methyl Pin-2-en-8-oate (D)	104
3. Discussion	105
4. Materials and Methods	106
4.1. Plant Material, Isolation of Essential Oils	106
4.2. Fractionation of the Young Branches Essential Oil	106
4.3. Preparation of pin-2-en-8-al (C)	106
4.4. Gas Chromatography	107
4.5. Gas Chromatography-Mass Spectrometry in Electron Impact Mode	107
4.6. Preparative Capillary-Gas Chromatography	108
4.7. Gas Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry	108
4.8. Nuclear Magnetic Resonance	110
4.9. Identification and Quantification of Individual Components	110
4.10. Spectral Data	111
<b>Article 6. New sesquiterpenes including a novel skeleton (Elionurane) from <i>Elionurus tristis</i> oils</b>	<b>113</b>
1. Introduction	115
2. Results and discussion	116
2.1. Analysis of <i>E. tristis</i> aerial parts and roots essential oils by GC(RI), GC-MS and <sup>13</sup> C-NMR	116
2.2. Identification of unusual compounds	119
2.2.1. 1(10)-Aristolene-2-one (A), Aristolone (B), Acorenone B (C) and Cyclocopacamphene (D)	119
2.2.2. Identification of 2- <i>epi</i> -Prezizaene (E) and 2- <i>epi</i> -Prezizaan-7-ol (F)	121
2.3. Identification of new compounds	123
2.3.1. Structure Elucidation of 7- <i>epi</i> -Khusian-2-ol (G) and 4,8-di- <i>epi</i> -Acorone (H)	123
2.3.2. Structure Elucidation of 2- <i>epi</i> -Ziza-5-en-2-ol (I) and Elionurone (J)	126
2.4. Possible Biosynthesis Pathway for Elionurane Skeleton	129
3. Conclusion	131
4. Experimental	132
4.1. Plant material, isolation of essential oils	132
4.2. Oils fractionation	132
4.3. Acidification of Elionurone (J)	133
4.4. Gas Chromatography	134
4.5. Gas Chromatography-Mass Spectrometry in Electron Impact Mode	134
4.6. Gas Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry	134
4.7. Preparative capillary-Gas Chromatography	135
4.8. Nuclear Magnetic Resonance	135
4.9. Identification and quantification of individual components	136
4.10. Spectral data	136
<b>CONCLUSION</b>	<b>142</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>152</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>165</b>

<b>Annexes de l'article 5. New Pinane Derivatives Found in Essential Oils of <i>Calocedrus decurrens</i></b>	<b>167</b>
Annexe 1 : RMN 1D du Pin-2-èn-8-ol (A)	169
Annexe 2 : RMN 1D de l'Acétate de Pin-2-èn-8-yle (B)	175
Annexe 3 : RMN 1D du Pin-2-èn-8-al (C)	181
Annexe 4 : RMN 1D du Pin-2-èn-8-oate de Méthyle (D)	187
<b>Annexes de l'article 6. New sesquiterpenes including a novel skeleton (Elionurane) from <i>Elionurus tristis</i></b>	<b>193</b>
Annexe 5 : Données MS de la 1(10)-Aristolèn-2-one (A)	195
Annexe 6 : Données MS du Cyclocopacamphène (D)	196
Annexe 7 : Données MS du 2-épi-Prézizaène (E)	197
Annexe 8 : Données MS et RMN 1D de l'Aristolone (B)	199
Annexe 9 : Données MS et RMN 1D de l'Acorenone B (C)	205
Annexe 10 : Données MS et RMN 1D du 2-épi-Prézizaan-7-ol (F)	211
Annexe 11 : Données MS et RMN 1D du 7-épi-Khusian-2-ol (G)	217
Annexe 12 : Données MS et RMN 1D de la 4,8-di-épi-Acorone (H)	223
Annexe 13 : Données MS et RMN 1D du 2-épi-Ziza-5-èn-2-ol (I)	229
Annexe 14 : Données MS et RMN 1D de l'Elionurone (J)	235
<b>RESUMES</b>	<b>241</b>
<b>Résumés des articles en français</b>	<b>243</b>
Article 1. Chemical compositions of essential oils of five introduced conifers in Corsica	245
Article 2. Chemical composition of <i>Melicope belahe</i> (Baill.) T. G. Hartley (Rutaceae) leaf essential oil from Madagascar	246
Article 3. Chemical composition of leaf and bark essential oils of <i>Vepris unifoliolata</i> from Madagascar	247
Article 4. Integrated Analysis of the Bark Oil from <i>Cinnamosma madagascariensis</i> by GC(RI), GC-MS and NMR. <sup>13</sup> C-NMR data of Cyclocopacamphene and Cyclosativene	248
Article 5. New Pinane Derivatives Found in Essential Oils of <i>Calocedrus decurrens</i>	249
Article 6. New sesquiterpenes including a novel sketeton (Elionurane) from <i>Elionurus tristis</i> oil	250
<b>Résumé vulgarisé</b>	<b>253</b>
<b>Riassuntu vulgarizatu</b>	<b>255</b>
<b>Abstract</b>	<b>257</b>
<b>Résumé</b>	<b>260</b>





# REMERCIEMENTS

Je souhaite en premier lieu remercier le Pr Félix TOMI, mon directeur de thèse, qui m'a accompagné durant ce travail de recherche et qui m'a toujours soutenu dans mes projets. Vous avez su me guider et me transmettre la passion de la recherche au cours de cette thèse. Je profite également de cette occasion pour vous dire que j'ai particulièrement appréciée cette expérience à vos côtés ainsi que vos qualités humaines. Un grand merci.

Je suis également sensible à l'honneur que me font Pascal RICHOMME (Pr) et Hervé CASABIANCA (IGR-HDR) ainsi que le Dr Hugues BREWARD en acceptant de juger ce travail. Je suis bien aise de bénéficier de leur expertise.

Je tiens également à remercier les Pr Vincent CASTOLA et Ange BIGHELLI qui m'ont offert l'opportunité d'intégrer le projet MARINA Cosmétique avant de débiter ma thèse ; et encore merci à Ange qui a accepté de juger ce travail de thèse.

Je remercie le Pr Joseph CASANOVA pour ses conseils toujours avisés et pertinents au cours de mes travaux et pour sa participation à ce jury de thèse.

Je remercie Jean-Jacques FILIPPI (MC-HDR) qui m'a accueilli volontiers dans son laboratoire à l'ICN. Merci également à toi pour ces bons moments de franches rigolades et ces discussions interminables sur les zizaanes. Je suis particulièrement touché que tu puisses juger ce travail. Merci également à Loïc TISSANDIE pour sa bonne humeur et son aide lors de mes passages à l'ICN.

Un grand merci à Pierre TOMI (MC) pour son entrain (avec un grand E), sa façon d'être inégalable et surtout son aide si précieuse pour l'enseignement (heureusement que vous étiez là). L'enseignement à vos côtés fut un vrai régal.

Merci à Marc GIBERNAU (CR-HDR) toujours là pour me donner de bons conseils. Bien que tu ne sois pas chimiste de formation tu t'es toujours intéressé à mon travail et y a toujours apporté un regard éclairé. Merci de m'avoir accompagné durant ces années.

Jérôme ALBRE (Post-doctorant), merci pour ta bonne humeur et pour ton aide.

Pascale BRADESI (MC), je suis heureux d'avoir dispensé à vos côtés les enseignements de chimie organique en L2.

Je remercie chaleureusement Hélène ESSELIN (doctorante), Dr Sylvain SUTOUR, Dr Anne-Marie NAM, Dr Ophélie BAZZALI, Dr Tao XU et Dr Maxime CHEVALIER, qui furent mes collègues de paillasse durant toute cette thèse. Je n'oublie pas tous ces bons moments (des discussions sérieuses, au surf, en passant par des fous rires).

Jennifer GALTIE (je ne t'oublie pas), je tiens à te remercier pour ta gentillesse (et là, c'est avec un grand G), tu es toujours à l'écoute des autres. J'ai apprécié toutes nos discussions même si nos points de vue étaient parfois divergents.



Yves THIBAUDAT, j'ai apprécié ces années à te côtoyer, ces rigolades pour mes problèmes de PC (LOL) et puis bien sûr les mâchons stéphanois.

Merci à tous les étudiants à qui j'ai dispensé des enseignements, et tout particulièrement Guillaume et Lola, j'ai passé trois belles années d'enseignement à vos côtés. Je vous souhaite plein de bonheur pour l'avenir.

Marc DJIE BI, Stéphane GOORE, Blanchard BOUE et Albert KAMBIRE (doctorants ivoiriens), je tenais par ces quelques lignes à vous remercier tous les quatre de nous avoir transmis une part de votre sagesse heureuse au quotidien. J'ai apprécié tous ces bons moments passés à vos côtés (et Blanchard je n'ai pas perdu de vue « Le But »).

Brice LECOEVRE, Dalia SI AHMED, Manuel ESPINOSA, Guillaume PIGELET, David OUVRARD, Ghjuvan' Antone FAGGIANELLI (MC), Tina LE-MAO, Katia KASPERI, merci à tous pour votre joie de vivre au quotidien, et tous ces bons moments.

José FIESCHI, Denis BLANQUET, Gilles NOTTON (MC-HDR), Alain LOUCHE (Pr), Xavier SILVANI (IGR), Emmanuel VINCIGUERRA, Marie-Christine BOSQUET, Françoise PIETRI, Dominique DE ROCCA SERRA (MC), je tenais à vous exprimer mes remerciements pour votre gentillesse.

Je remercie l'ensemble de l'équipe « Chimie des Produits Naturels ». Merci également aux membres de l'Ecole Doctorale.

Merci à l'Université de Corse qui m'a formé. Je remercie également la CTC qui a financé ce projet de thèse.

Francescu SQUARCINI, professeur de SVT, qui participe régulièrement aux traductions de divers ouvrages de biologie en langue corse. Merci pour son aide lors de la traduction du résumé en langue Corse.

Ma famille, mon frère, Emilie, mes parents, mon grand-père. Juste merci, vous avez toujours été là pour me soutenir, merci d'avoir fait de moi ce que je suis. Cette thèse, c'est aussi la vôtre. Adrien, je profite de cette occasion pour te dire que je suis fier de toi, de ton parcours et je te souhaite de révolutionner le monde au cours de ta thèse (et non il n'y a pas de rêves trop grands !).

Elodie. Par où commencer ? Mais je vais tout de même prendre la plume pour te dire que tout ce que tu as fait pour moi est exceptionnel, j'espère que j'en suis digne. Juste une dernière chose, I Love You.

C'est avec le cœur rempli d'émotions que je m'adresse à toi Mamie, toi qui es partie rejoindre les Dieux trop tôt. Je te dédie ce travail, j'aurai tant aimé que tu puisses assister à cette soutenance et voir ton petit-fils devenir docteur. Ici, au royaume des mortels nous pensons à toi.

A toutes et à tous. Je suis partagé entre le bonheur d'achever cette thèse et l'émotion de vous quitter, je me répète, mais je me suis régalé durant ces années à vos côtés. Vous avez été ma seconde famille. Je vous souhaite à toutes et à tous pleins de bonheur pour l'avenir.  
Vous allez me manquer.

***Dio vi salvi Regina***





# ABBREVIATIONS

**Et<sub>2</sub>O** : Ether diéthylique

**AcOEt** : Acétate d'éthyle

**D<sub>2</sub>O** : Eau deutérée

**mg** : Milligramme

**mL** : Millilitre

**%** : Pourcentage

**ACP** : Analyse en Composante Principale

**ppm** : Partie Par Million

**SPME** : MicroExtraction sur Phase Solide

**GC** : Chromatographie Gazeuse

**GC(RI)** : Chromatographie Gazeuse – Indices de Rétention

**pc-GC** : Chromatographie Gazeuse Capillaire Préparative

**tr** : Temps de Rétention

**RI** : Indices de Rétention

**FID** : Détecteur à Ionisation de Flamme

**RF** : Facteurs de Réponse

**GC-MS** : Chromatographie Gazeuse couplée à un Spectromètre de Masse

**MS** : Spectromètre de Masse

**EI** : Impact Electronique

**CI** : Ionisation Chimique

**HREIMS** : Spectromètre de Masse en Impact Electronique à Haute Résolution

**GCxGC-MS** : Chromatographie Gazeuse Bidimensionnelle couplée à un Spectromètre de Masse

**GC-MS/MS** : Chromatographie Gazeuse couplée à deux Spectromètres de Masse en Tandem

**GC-O** : Chromatographie Gazeuse couplée à un Olfactomètre

**LC** : Chromatographie Liquide

**LC-MS** : Chromatographie Liquide couplée à un Spectromètre de Masse

**HPTLC** : Chromatographie sur Couche Mince Haute Performance

**prep. TLC** : Chromatographie sur Couche Mince Préparative

**HPLC** : Chromatographie Liquide Haute Performance

**prep. HPLC** : Chromatographie Liquide Haute Performance Préparative

**CC** : Chromatographie sur Colonne

**UV** : UltraViolet

**IR** : InfraRouge

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire

**RMN 1D** : Résonance Magnétique Nucléaire à 1 dimension

**RMN 2D** : Résonance Magnétique Nucléaire à 2 dimensions

**DEPT** : Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

**J** : Constante de couplage

**m/z** : Rapport Masse/Charge

**<sup>1</sup>H** : Hydrogène

**<sup>13</sup>C** : Carbone-13

**COSY** : COrrrelation SpectroscopY

**TOCSY** : TOtal Correlated SpectroscopY

**NOESY** : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

**INADEQUATE** : Incredible Natural Abundance Double QUAntum Transfer Experiment

**HSQC** : Heteronuclear Single Quantum Correlation

**HMBC** : Heteronuclear Multiple Bond Correlation

**NOE** : Effet Overhauser Nucléaire

**C-H** : Carbone-Hydrogène

**T<sub>2</sub>** : Temps de relaxation spin-spin

**S/B** : Rapport Signal/Bruit

**B<sub>0</sub>** : Champ magnétique de la RMN

**MHz** : Mégahertz

**δ** : Déplacement chimique

**Δ(δ)** : Variation de déplacement chimique



# Introduction





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

Le secteur des PAM (Plantes Aromatiques et Médicinales) est un secteur en plein essor. La demande en huile essentielle est en constante augmentation. Au-delà des acheteurs historiques que sont les parfumeurs, il y a une demande toujours plus grande de la part du grand public, notamment depuis l'avènement de la tendance « Bio ».

Plusieurs régions à travers le monde cultivent à plus ou moins grande échelle les PAM, qui deviennent dans certains cas l'emblème d'un terroir. Elles permettent à leurs régions respectives de rayonner à travers le monde. Ce qui a pour conséquence de peser énormément dans l'économie régionale : soit directement par la vente des huiles essentielles, soit indirectement en dynamisant le tourisme et tout ce qui y est lié de près ou de loin.

*Chrysopogon zizanioides* plus connu sous le nom de vétiver, dont la racine constitue une des matières premières les plus utilisées en parfumerie via son huile essentielle, appartient à la famille des Poaceae (au même titre que le blé) et est massivement cultivée dans plusieurs régions tropicales telles que : Java, Haïti, Brésil, Chine, Madagascar, Japon ou encore La Réunion.

Madagascar est une île-continent particulièrement réputée pour sa richesse floristique unique au monde, avec un taux d'endémisme particulièrement élevé. Cette flore endémique singulière ainsi que sa situation géographique font de Madagascar un laboratoire pour la réalisation d'études phytochimiques. L'île possède aussi des produits-phares tels que le ravintsara, le géranium bourbon ou l'ylang-ylang mais son potentiel demeure immense car bon nombre d'espèces sont encore inconnues.

En France, la lavande et le lavandin dont la production a atteint 1240 tonnes d'huiles essentielles au cours de l'année 2010 sont très largement cultivés en Provence. Elles sont aujourd'hui devenues des plantes emblématiques de cette région et contribuent à créer un véritable agrotourisme.

En Corse, l'huile emblématique est l'immortelle ou hélichryse corse de son nom scientifique *Helichrysum italicum ssp. italicum*. Elle a su s'imposer sur le marché des PAM en moins de

trois décennies, grâce à ses propriétés anti traumatique et cicatrisante. Elle est aussi très utilisée en cosmétique, en particulier dans la gamme de la société L'Occitane. La filière des PAM en Corse est aujourd'hui en plein développement mais présente paradoxalement une trop grande dépendance liée à la production de l'huile essentielle d'immortelle. Cette filière, même si elle produit déjà d'autres huiles essentielles comme le myrte ou le romarin doit envisager une plus grande diversification de son offre sur un marché très concurrentiel.

Dans ce contexte, ce travail présentait deux objectifs principaux :

- contribuer à la valorisation de plantes endémiques de Madagascar très utilisées en médecine traditionnelle, à travers la caractérisation chimique de leurs huiles essentielles, dans le cadre d'une collaboration que notre équipe mène depuis une dizaine d'années avec l'université d'Antananarivo. En raison de la complexité des mélanges, la stratégie analytique a été adaptée, afin d'identifier avec certitude un maximum de constituants des huiles essentielles ;
- contribuer à la caractérisation chimique d'huiles essentielles de conifères introduits en Corse par l'Office National des Forêts. Au cours du siècle dernier, l'ONF a introduit plusieurs espèces de conifères en Corse. Ces introductions ont été effectuées pour tester le potentiel d'adaptabilité de ces espèces aux conditions pédoclimatiques de Corse dans le but de trouver une ou plusieurs essences de substitution dans le cas d'éventuelles catastrophes telles que : des ravages causés par des nuisibles, une pandémie, ou encore des feux de forêts. Ces introductions qui sont parfaitement connues et répertoriées n'avaient à notre connaissance jamais fait l'objet d'investigations.

Nous nous sommes intéressés aux huiles essentielles de plusieurs espèces de conifères introduites en Corse (*Larix decidua*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus ponderosa*, *Sequoiadendron giganteum*, *Cryptomeria japonica* et *Calocedrus decurrens*) qui pourraient contribuer à un élargissement de la gamme des huiles essentielles produites en Corse mais également aux huiles essentielles de diverses espèces endémiques de Madagascar (*Melicope belahe*, *Vepris unifoliolata*, *Cinnamosma madagascariensis* et *Elionurus tristis*).

Nous aurions pu structurer ce manuscrit autour de la géographie : les huiles essentielles de Corse puis celles de Madagascar. Mais nous avons préféré le construire en fonction des

stratégies analytiques choisies, qui dépendent de la difficulté analytique, mais aussi de l'importance de la contribution de l'apport de la RMN <sup>13</sup>C qui fait partie des savoir-faire de l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse.

Le premier chapitre de ce manuscrit introduit les différentes étapes d'analyse d'une huile essentielle depuis l'extraction du végétal jusqu'aux différentes méthodes analytiques mises en œuvre pour l'identification des constituants qui peuvent schématiquement se scinder en trois voies (A, B et C). La voie A constitue le moyen le plus rapide d'analyse des huiles essentielles et repose principalement sur l'association de la GC(RI) et GC-MS. La voie B est la voie de choix lors de l'analyse chimique d'une huile essentielle complexe lorsque la voie A n'apporte que des informations parcellaires. Cette voie est caractérisée par deux étapes bien distinctes. La première consiste à fractionner le mélange, alors que la seconde étape est mise en œuvre lorsque le composé d'intérêt est pur ou suffisamment purifié pour enregistrer ses données spectrales et les comparer aux données issues de la littérature. La voie C, qui a été envisagée par l'équipe « Chimie et Biomasse », il y a une vingtaine d'années, présente les caractéristiques communes aux voies A et B. En effet, elle allie la rapidité procurée par la voie A et la fiabilité d'identifications procurée par la voie B.

Dans le second chapitre de cette thèse, nous décrirons dans un premier temps les huiles essentielles de différents organes (aiguilles, feuilles, bois, cônes et feuillage) de cinq conifères introduits en Corse (*Larix decidua*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus ponderosa*, *Sequoiadendron giganteum* et *Cryptomeria japonica*) dans le but de déterminer si les conditions pédoclimatiques de la Corse pourraient avoir une influence sur la composition chimique de ces huiles. Dans un second temps, nous nous intéresserons à l'huile essentielle de feuilles de *Melicope belahe*, plante endémique de Madagascar qui n'a fait, jusqu'à présent, l'objet d'aucune étude.

Le troisième chapitre est consacré à l'analyse des huiles essentielles de deux espèces malgaches qui présentent des spécificités analytiques : *Vepris unifoliolata* (feuilles et écorces) avec la présence de molécules thermosensibles, et *Cinnamosma madagascariensis* (feuilles et écorces) qui contient un couple d'épimères difficilement différenciable par les techniques classiques.

Le quatrième et dernier chapitre regroupe quant à lui, les huiles essentielles dont la composition chimique est la plus complexe. Il s'agit de *Calocedrus decurrens* (feuilles et branches), conifère introduit en Corse dans une station expérimentale de l'ONF au sud de l'île et d'*Elionurus tristis* (parties aériennes et racines), espèce endémique malgache. Plusieurs étapes de fractionnement ont été effectuées pour conduire à l'identification de nombreuses molécules nouvelles. Certaines présentent des squelettes fréquemment rencontrés comme les dérivés pinaniques dans l'huile essentielle de *C. decurrens* alors que d'autres présentent des squelettes rares voire nouveaux (*E. tristis*).





# **Chapitre I :**

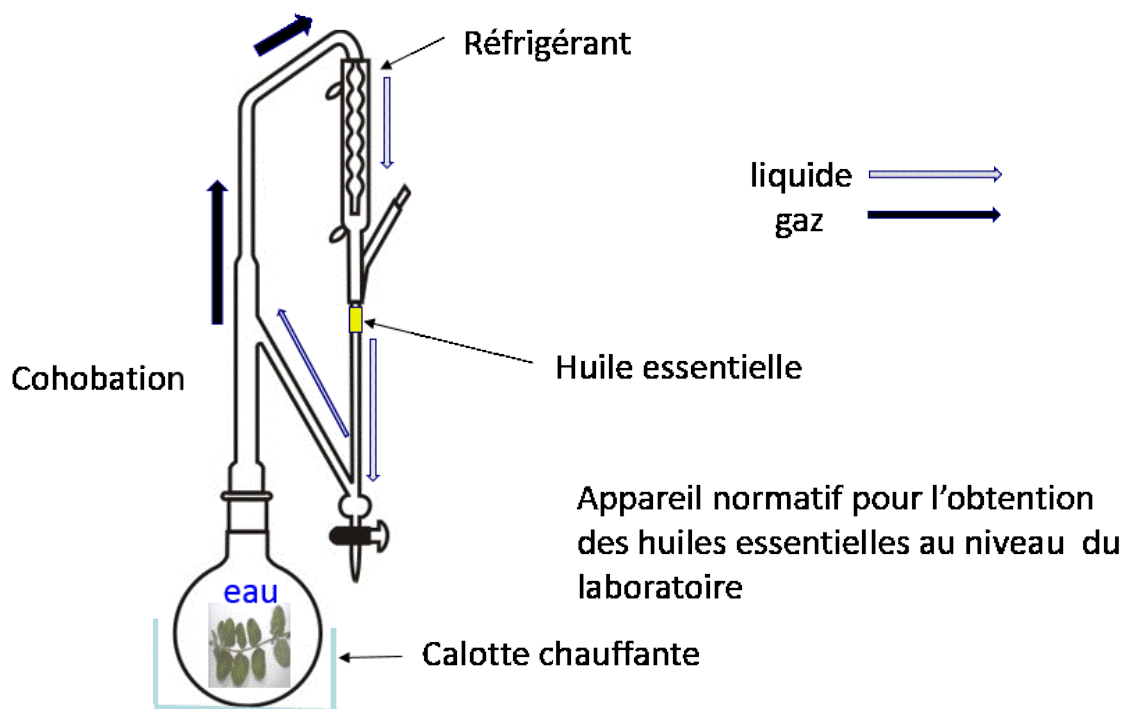
**Les différentes méthodes d'identification  
des constituants des substances naturelles**





Le terme « Huile Essentielle » est défini par plusieurs organismes : pharmacopée française, ANSM ou AFNOR. Les huiles essentielles (HE), sont obtenues par entraînement à la vapeur d'eau, par hydrodistillation ou par expression à froid de certains fruits (épicarpe des agrumes). Cette définition par procédé est donc restrictive et exclut les procédés qui utilisent des solvants mais aussi l'extraction par fluide supercritique ou par micro-ondes. Les huiles essentielles font partie intégrante du secteur des PAM (Plantes Aromatiques et Médicinales) et trouvent de nombreuses utilisations dans des secteurs industriels très divers, principalement en parfumerie, cosmétique, pharmaceutique et agroalimentaire.

L'hydrodistillation est la principale technique d'extraction des huiles essentielles (au niveau d'un laboratoire). Elle consiste à immerger le végétal dans un ballon contenant de l'eau qui est portée à ébullition. La vapeur d'eau détruit les cellules de la plante et entraîne sous forme gazeuse l'huile essentielle. Ces vapeurs sont ensuite condensées dans le réfrigérant en deux phases non miscibles, la première est l'hydrolat (phase aqueuse), la seconde surnageant au-dessus de l'hydrolat est l'huile essentielle dont la densité est inférieure à celle de l'eau (Figure 1).

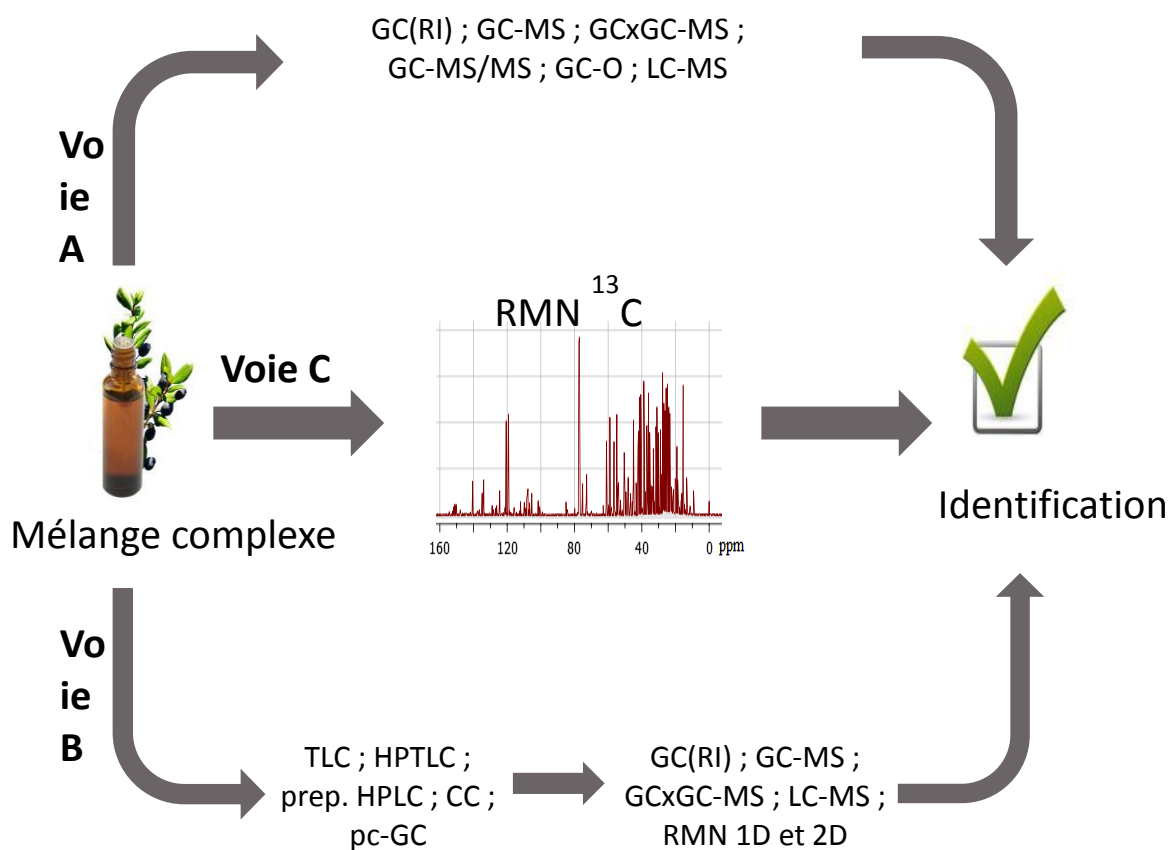


**Figure 1.** Schéma d'un appareil de type « Clevenger ».

La composition chimique d'une huile essentielle est majoritairement caractérisée par des molécules appelées terpènes. Ce sont des molécules constituées de plusieurs motifs isopréniques, le plus souvent ce sont des monoterpènes (10 carbones, 2 motifs isopréniques), sesquiterpènes (15 carbones, 3 motifs isopréniques) et diterpènes (20 carbones, 4 motifs isopréniques). D'autres molécules telles que les phénylpropanoïdes sont également retrouvées et plus rarement les norterpènes, ce sont des terpènes (mono-, sesqui- ou diterpènes) auxquels il manque un carbone (nor), deux carbones (dinor) ou encore trois carbones (trinor).

La valorisation de ces produits naturels, quel que soit leur secteur d'application (parfumerie, cosmétique, aromathérapie), passe obligatoirement par une étape de caractérisation chimique afin de déterminer précisément leurs compositions. Une analyse dite de routine (ex : contrôle qualité dans l'industrie de la parfumerie) est classiquement réalisée à l'aide de la GC(RI) et GC-MS (voie A). Les études plus approfondies, cas d'huiles essentielles plus complexes (molécules qui co-éluent, molécules inconnues) nécessitent l'utilisation de plusieurs étapes de chromatographie associées à plusieurs techniques spectroscopiques (voie B). Ces deux possibilités d'analyse (voies A et B) sont les plus utilisées à l'heure actuelle pour la caractérisation chimique des produits naturels.

Cependant, une troisième voie (voie C) se situe à mi-chemin entre les voies A et B. En effet, elle est presque aussi « rapide » que la voie A et présente une capacité d'identification qui se rapproche de celle de la voie B. Elle met en œuvre la RMN du  $^{13}\text{C}$  pour identifier les constituants du mélange sans séparation préalable suivant une méthodologie d'analyse développée depuis une vingtaine d'années par l'équipe « Chimie et Biomasse ».



**Figure 2.** Méthodes d'analyses d'un mélange complexe

## I. Analyse par couplage « en ligne » (voie A)

La voie A constitue le moyen le plus rapide d'analyse des huiles essentielles. Elle associe généralement une technique chromatographique (qui permet l'individualisation des constituants) à une technique spectroscopique (qui permet l'identification des constituants par comparaison de leurs données avec celles des produits de référence issus des banques de données). Elle est la voie de choix pour les analyses dites de routine comme par exemple pour le contrôle qualité d'échantillons d'huiles essentielles utilisées en parfumerie ne présentant pas de difficultés analytiques particulières.

### I.1. Quantification par GC(RI)

La chromatographie gazeuse (ou GC de son acronyme en langue anglaise) est, de par sa robustesse et sa reproductibilité la technique de quantification de référence pour l'analyse des huiles essentielles. L'analyte est injecté, puis vaporisé dans le four (à l'aide d'une

programmation de température) et enfin élué dans deux colonnes de chromatographie de polarités différentes (ex : phases stationnaires apolaire type DB-1 et polaire type DB-WAX) par un gaz vecteur (diazote, dihydrogène, hélium ou argon) jusqu'à être brûlé dans un détecteur à ionisation de flamme (FID). Les différents constituants du mélange vont se séparer et sortir des colonnes les uns après les autres à différents temps de rétention (tr), qui sont fonction des températures de vaporisation de chaque molécule et de leur affinité respective avec les phases stationnaires. La GC permet également la quantification des constituants d'un mélange. En effet, le FID est quantitatif, cela signifie qu'à chaque pic est associée une aire qui est représentative de la quantité relative de chaque composé (exprimé en %). Cependant, les molécules ne répondent pas de la même manière vis-à-vis du FID, cela dépend de la nature de la molécule (nature des atomes constitutifs, arrangement des atomes entre eux). Ainsi, pour une meilleure appréciation de la quantité de chaque constituant Bicchi et al. (2008) et Tissot et al. (2012) développèrent deux techniques basées sur la comparaison de l'aire de chaque composé avec celle d'étalon interne qui sont respectivement pour chaque méthode le nonane et l'octanoate de méthyle. Les aires de chacun des composés sont ainsi corrigées par des facteurs de réponse (RF) par rapport à l'aire des étalons internes.

Les temps de rétention sont des valeurs fortement influencées par l'appareillage : nature de la phase stationnaire et longueur des colonnes, programmation de température, vieillissement des phases. Il faut savoir que deux appareils configurés de la même manière élueront avec des temps de rétention légèrement différents les constituants d'un échantillon donné. Ainsi, pour éviter cela autant que faire ce peu et ainsi pouvoir comparer les analyses issues d'appareillages différents, Van Dan Dool et Kratz (1963) ont mis au point les indices de rétention (RI), qui sont obtenus en prenant en compte le temps de rétention de chaque constituant du mélange et les temps de rétention des deux alcanes encadrant le constituant d'intérêt. Cela contribue à diminuer fortement l'influence de l'appareillage et ainsi de permettre une comparaison plus aisée avec les données issues de la littérature. L'indice est calculé par interpolation linéaire à partir des alcanes dont les RIs sont fixés comme les nombres de carbones multipliés par cent.

Malgré cela, il arrive très fréquemment que des molécules dont les RIs sont trop proches voire superposés (coélution) ne puissent être correctement identifiées. C'est le cas par

exemple, du limonène et du  $\beta$ -phéllandrène qui coéluent sur colonne DB-1, mais également du *trans*- $\alpha$ -bergamotène qui coélué avec le calarène sur cette même colonne.

Ainsi, et à juste titre, la GC ne peut être considérée comme une technique d'identification mais demeure une technique de quantification efficace à condition de prendre certaines précautions.

## **I.2. Identification par GC-MS**

L'identification des constituants d'une huile essentielle est, dans la majorité des cas, réalisée par GC mais avec cette fois-ci un spectromètre de masse (MS) en guise de détecteur, c'est ce que l'on appelle le couplage GC-MS. Le spectromètre de masse peut-être de type : ionisation chimique (CI) ou impact électronique (EI). La GC-MS en mode CI présente un intérêt particulier car cette ionisation dite « douce » permet de voir le pic moléculaire de toutes les molécules (même les plus fragiles comme les alcools ou les acétates) et d'ainsi connaître leurs masses molaires. Cependant ce mode d'ionisation n'est que peu utilisé en raison de la rareté des banques de données enregistrées dans ces conditions.

Le mode impact électronique (EI) est de loin, le plus utilisé et permet dans la plupart des cas de connaître la masse molaire du composé. De plus, cette ionisation dite « dure » offre un spectre de masse complet caractérisé par une multitude d'ions à différents  $m/z$  (rapport masse/charge), ce qui a pour but de donner beaucoup d'informations quant aux fragments perdus et ainsi d'avoir une première idée de la structure de la molécule. Mais l'atout principal de cette technique est le nombre de bibliothèques commerciales disponibles : Adams (2007), McLafferty et Stauffer (1994), NIST (1999) et König et al. (2001).

Néanmoins, les propositions des différentes bibliothèques commerciales doivent être considérées avec beaucoup de précaution, car lors de leurs interrogations il est impossible de ne pas avoir de réponse. Plus concrètement, dans certains cas l'opérateur peut être orienté sur une mauvaise structure. C'est la raison pour laquelle, lorsque qu'une identification est sûre (c'est-à-dire que les RIs, le spectre de masse et la RMN  $^{13}\text{C}$  correspondent aux données de la littérature), le spectre de masse de la molécule en question vient enrichir la bibliothèque propre au laboratoire. De cette façon, lorsque ce composé sera une nouvelle fois rencontré dans une huile essentielle sa concordance sera

bien supérieure avec la banque du laboratoire qu'avec les commerciales, car l'enregistrement des spectres de masse dans les mêmes conditions (machine, colonnes, programmation de température) permet une meilleure reproductibilité des analyses.

Pour illustrer cette méthode nous pouvons par exemple citer l'analyse des fractions volatiles d'*Elionurus hensii* (obtenues par hydrodistillation et SPME) récoltée en République du Congo qui a permis l'identification d'une centaine de composés dont par exemple le caryophylla-4(14),8(15)-dien-5 $\alpha$ -ol et l'aristolone qui sont des molécule plutôt rares (Yang et al., 2013).

## **II. Identification des constituants après séparation (voie B)**

La voie B est la voie de choix lors de l'analyse chimique d'une huile essentielle complexe pour laquelle la voie A ne propose pas de données suffisamment fiables (composé absent de la banque ou ambiguïté entre plusieurs propositions).

Cette voie est caractérisée par deux étapes bien distinctes. La première consiste à fractionner le mélange au moyen de méthodes chromatographiques telles que : CC, prep. TLC, prep. HPLC ou encore pc-GC. Cette étape peut également être accompagnée d'extractions liquide/liquide, de partitions acido-basiques ou encore d'une distillation fractionnée (celles-ci pouvant intervenir en amont ou en aval des méthodes chromatographiques).

La seconde étape, quant à elle, s'effectue lorsque le composé d'intérêt est pur ou suffisamment purifié pour enregistrer ses données spectrales (UV, IR, MS, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C) et les comparer aux données issues de la littérature. Dans le cas de nouvelles molécules ou de molécules non répertoriées dans les banques de données commerciales, la comparaison avec la littérature s'avérant impossible, le recours à la RMN bidimensionnelle est obligatoire. En effet, la RMN et plus particulièrement la RMN 2D est la technique analytique offrant le plus d'informations sur la structure de la molécule. Elle permet d'identifier les corrélations homonucléaires entre hydrogènes (COSY, TOCSY, NOESY) et entre carbones (INADEQUATE), mais aussi et surtout les corrélations hétéronucléaires entre hydrogènes et carbones (HSQC, HMBC). Les séquences COSY et TOCSY permettent de mettre en évidence les corrélations

scalaires entre hydrogènes d'une même molécule (généralement  $^3J$  dans le cas du COSY et longue distance dans le cas du TOCSY). La séquence NOESY, quant à elle permet d'apprécier la proximité spatiale de plusieurs hydrogènes via l'effet NOE.

Les séquences hétéronucléaires HSQC et HMBC permettent respectivement de voir les corrélations  $^1J_{C-H}$  et les corrélations C-H plus longue distance ( $^2J_{C-H}$  à  $^4J_{C-H}$ , en général). Ce type de stratégie analytique est décrit dans des centaines d'articles et nous proposons ci-dessous quelques exemples marquants mais aussi des recherches menées par l'équipe « Chimie et Biomasse » :

- en 1997, au moyen de plusieurs chromatographies successives (CC, prep. TLC), deux nouveaux pigments de la famille des anthocyanes : 3-O-(6-O-trans-caffeyt-2-O- $\beta$ -glucopyranosyl- $\beta$ -glucopyranoside)-5-O- $\beta$ -glucoside cyanidine et 3-O-(6-O-trans-caffeyt-2-O- $\beta$ -glucopyranosyl- $\beta$ -glucopyranoside)-5-O- $\beta$ -glucoside peonidine ont été isolés dans la patate douce (*Ipomoea batatas*) (Goda et al., 1997) ;
- Weyerstahl et al. (2000) étudièrent une huile essentielle de vétiver d'Haïti (connue pour être une des huiles les plus complexes au monde). Après une séparation acido-basique et une distillation fractionnée sur colonne de Vigreux, les auteurs identifièrent un très grand nombre de sesquiterpènes ou dérivés avec des squelettes peu communs : prézizaane, khusiane, zizaane, ainsi qu'une nouvelle molécule possédant un nouveau squelette, le 1,7-cyclogermacra-1(10),4-dien-15-al ;
- Fahed et al. (2016) isolèrent un nouveau sesquiterpène oxygéné : le santolinoidol, dans l'huile essentielle d'*Achillea santolinoides* ssp. *wilhelmsii* (K. Koch) Greuter après fractionnement par HPLC ;
- Tissandié et al. (2017) ont mis en évidence la présence de plusieurs 5,11- et 10,11-époxyguaïanes dans l'huile essentielle de bois de guaïac, au moyen de plusieurs étapes de chromatographie sur colonne et d'une étape de pc-GC afin de purifier les oxydes dans le but d'enregistrer leurs spectres RMN 1D et 2D ;
- la caractérisation de deux dérivés du guaïane : furanoguaïan-1,4-diène et furanoguaïan-1,3-diène ; et d'un composé linéaire le (8Z,11Z,14Z)-heptadec-8,11,14-trièn-2-ol dans l'huile essentielle de feuilles de *Xylopiya rubescens* de Côte d'Ivoire (Yapi et al. 2013) ;



- l'identification de plusieurs esters de thymyle et l'isolation d'un nouveau sesquiterpène : la modéphanone par Xu et al. (2015a), dans l'huile essentielle de racine de *Pulicaria mauritanica* Coss. d'Algérie ;
- ou encore tout récemment, la découverte d'une nouvelle acétogénine à 15 carbones : sagonenyne, dans l'extrait AcOEt de *Lauriencia obtusa* collectée sur les côtes de Corse (Esselin et al., 2017).

### III. Identification par RMN <sup>13</sup>C sans séparation préalable (voie C)

Les premiers travaux concernant l'utilisation de la RMN <sup>13</sup>C dans le domaine des mélanges complexes font état d'une technique de vérification utilisée en aval d'une autre technique spectroscopique (en général la GC-MS) (Formáček et Kubeczka, 1982 ; Kubeczka et Formáček, 1984).

L'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse a commencé à s'intéresser à l'identification en mélange par RMN <sup>13</sup>C il y a plus de vingt ans. Ainsi, une véritable méthode d'identification par RMN <sup>13</sup>C des constituants d'un mélange complexe est née (Ouattara et al., 2014 ; Tomi et al., 1995). Basée sur l'analyse informatisée du spectre RMN <sup>13</sup>C d'un mélange naturel, la méthode a pour but d'éviter à l'opérateur le travail fastidieux de comparaison manuel du spectre RMN <sup>13</sup>C du mélange avec les spectres des produits de références. Cette méthode ne concurrence en rien les méthodes plus classiques comme la GC-MS, mais elle complète l'analyse « classique » (voie A), permet dans certains cas la mise en évidence de problèmes analytiques (molécules thermosensibles, différenciation de diastéréoisomères par exemple) et constitue un outil remarquable pour repérer un composé non identifié, potentiellement nouveau, auquel la voie B devrait être appliquée.

#### III.1. Intérêt de la RMN <sup>13</sup>C

L'intérêt de la RMN <sup>13</sup>C n'est plus à prouver. En effet malgré sa faible abondance isotopique (environ 1%) et un rapport gyromagnétique environ 5700 fois moins sensible que celui du <sup>1</sup>H (Günther et al., 1994), le <sup>13</sup>C est le noyau privilégié pour l'analyse des mélanges organiques pour diverses raisons :

- l'atome de carbone est l'élément chimique constitutif des molécules organiques ;

- la gamme de résonance du  $^{13}\text{C}$  (240 ppm) est beaucoup plus large que celle du  $^1\text{H}$  (12 ppm), ce qui induit une dispersion spectrale bien plus grande et permet de minimiser le nombre de superpositions dans le cas de spectres en mélange (Günther et al. 1994) ;
- la fréquence de résonance des atomes de carbone est très sensible aux moindres variations d'environnement chimique. Il est ainsi assez rare que deux carbones d'une même molécule soient superposés. Dans la majorité des cas le spectre contient autant de raies, que les molécules contiennent de carbones. Cette particularité du  $^{13}\text{C}$  permet de différencier tous type de molécule, même les plus proches ;
- le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  peut être simplifié en procédant à une irradiation totale des noyaux d'hydrogène, ce qui permet de ne plus observer les couplages  $^1J$  avec les hydrogènes ( $^1J_{\text{C-H}}$ ) et de n'observer qu'une seule raie de résonance en lieu et place d'un signal pouvant correspondre à un doublet, triplet ou quadruplet (Williamson et Neuhaus, 1989) ;
- le temps de relaxation transversale  $T_2$  (temps de relaxation spin-spin) est plus important dans le cas du  $^{13}\text{C}$  que du  $^1\text{H}$ . La largeur du signal de résonance à mi-hauteur étant inversement proportionnelle à  $T_2$ , il en résulte un gain dans la finesse des signaux et ainsi une meilleure résolution, ce qui est un atout non négligeable dans l'analyse de spectre en mélange ;
- les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  sont enregistrés dans la majorité des cas à température ambiante, ce qui évite toutes éventuelles dégradations ou transpositions de molécules thermosensibles ;
- contrairement à d'autres techniques spectroscopiques la RMN est non destructive et permet donc la récupération de l'échantillon pour d'éventuelles analyses complémentaires.

### III.2. Identification de constituants en mélange par RMN $^{13}\text{C}$

L'identification des constituants d'un mélange par RMN  $^{13}\text{C}$  est faite par comparaison des déplacements chimiques ( $\delta$ ) du mélange avec ceux de composés de référence présents dans les bibliothèques de spectres. Pour identifier un composé en mélange, il faut être capable de pouvoir identifier les signaux qui lui appartiennent et de les individualiser. Ce travail n'en

sera que plus aisé si les conditions expérimentales sont optimisées et standardisées afin d'assurer une reproductibilité maximale des analyses.

### III.2.1. L'observation des signaux

L'observation des signaux correspondant aux carbones d'une molécule dépend de plusieurs facteurs : la concentration du produit, sa nature (viscosité, solubilité dans le solvant d'analyse) et la sensibilité de l'appareil (caractérisée par le rapport signal sur bruit S/B).

Le rapport S/B est dans l'immense majorité des spectres  $^{13}\text{C}$  améliorée via l'irradiation des noyaux d'hydrogènes ce qui entraîne une augmentation du rapport S/B d'un facteur 3 (Günther, 1994). Certains autres paramètres sont directement reliés à la sensibilité :

- le nombre d'acquisition. Il est proportionnel au carré du rapport S/B, plus leur nombre est important meilleure en sera la sensibilité. Il est cependant important de noter que l'augmentation du nombre d'acquisitions engendre inévitablement une augmentation du temps d'analyse ;
- le champ magnétique de la RMN, en effet plus il est important meilleure sera la sensibilité (l'appareil le plus puissant possède un champ magnétique de 23,5 Tesla qui permet au  $^1\text{H}$  de résonner à 1000 MHz) ;
- la nature de la sonde. En effet, l'utilisation d'une cryosonde permet de multiplier la sensibilité par un facteur 4 ;
- la nature des tubes RMN utilisés. Certains tubes comme les tubes à parois épaisses ou à restrictions permettent l'utilisation de quantité de solvant moindre, cela a pour incidence d'augmenter la concentration du mélange et donc d'obtenir un gain de sensibilité.

### III.2.2. L'individualisation des signaux

L'individualisation des signaux en RMN  $^{13}\text{C}$  est rarement problématique lors de l'analyse d'un composé pur (superposition de deux carbones très peu fréquente). Mais cela s'avère plus délicat dans le cas du spectre d'un mélange complexe car le nombre de constituants, et donc le nombre de signaux sont autant de facteurs qui augmentent les chances de superpositions.

L'individualisation des signaux est fonction de la résolution de l'appareil de RMN, elle-même fonction de la puissance de l'aimant. Le traitement des données avec l'application d'une fonction exponentielle de Lorentz-Gauss (qui consiste à multiplier l'interférogramme par deux fonctions exponentielles de signe opposé) effectuée sur la FID préalablement à la transformée de Fourier peut également accroître la résolution des spectres (Claridge, 1999 ; Günther, 1994 ; Hesse et al., 2008 ; Williamson et Neuhaus, 1989) ;

### III.2.3. L'attribution des signaux

Le considérable avantage de la RMN réside dans la grande sensibilité des atomes de carbones qui seront impactés par les moindres variations d'environnement au sein de la molécule.

Contrairement aux autres techniques spectroscopiques, la RMN  $^{13}\text{C}$  différenciera dans l'immense majorité des cas deux molécules, même très proches.

Chaque molécule est ainsi caractérisée par une série de déplacements chimiques qui lui est propre. C'est en quelque sorte son empreinte digitale, qui permet de l'identifier sans ambiguïté. Il est donc d'une importance primordiale de veiller à ce que les conditions d'enregistrement soient les plus reproductibles possibles et se rapprochent le plus des conditions dans lesquelles le composé de référence fut enregistré. Plusieurs paramètres sont à prendre en compte :

- la puissance du champ magnétique notée  $B_0$ , la nature des séquences impulsionnelles, les paramètres d'acquisition ainsi que le traitement du signal FID ;
- la nature du solvant et la concentration de l'échantillon. Ce dernier paramètre engendre dans le cas de molécules de type « base de Lewis », la formation de liaisons hydrogènes qui peuvent influencer les valeurs de déplacements chimiques. L'utilisation de spectromètre RMN de plus en plus puissant (jusqu'à 1000 MHz à l'heure actuelle) permet de travailler à des concentrations bien moindres et donc de diminuer considérablement ce phénomène.

La RMN  $^{13}\text{C}$  a été appliquée à l'analyse des constituants de plusieurs types de mélanges tels que les produits agroalimentaires, les extraits ou encore les huiles essentielles, dont voici quelques exemples :

- Ferreira et al. (2001) ont développé une méthode d'identification des constituants volatils par RMN  $^{13}\text{C}$ . Dans un premier temps, les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et leurs multiplicités, déterminées à l'aide des séquences DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) sont comparés avec les spectres de mono- et sesquiterpènes issus de la littérature qui ont été encodés dans le logiciel. Dans un second temps le logiciel SISCONST propose des molécules avec différentes concordances. Les auteurs appliquèrent cette méthode à l'analyse des huiles essentielles de *Piper cernuum* et *Piper regnellii*, et identifièrent 10 terpènes dans l'huile essentielle de la première espèce et cinq dans celle de la seconde. Ces identifications furent confirmées par des analyses GC-MS ;
- Lewis et al. (2007), proposèrent une méthode rapide (12 minutes) d'identification et de quantification via l'utilisation des corrélations  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  en HSQC. Méthode qu'ils validèrent par l'identification et la quantification des 40 constituants majoritaires d'un mélange d'extraits d'*Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Medicago sativa* et de composés de synthèse ;
- Fatope et al. (2008) différencièrent les chémotypes des huiles essentielles de deux espèces d'*Ocimum* (*Ocimum forskolei* et *Ocimum basilicum*) poussant en Oman par RMN  $^{13}\text{C}$ , ce qui fût confirmé par GC-FID et GC-MS ;
- Dar et al. (2011) identifièrent 17 constituants (représentant 97.8% de l'huile essentielle et dont les constituants majoritaires étaient la piperitone et le  $\beta$ -élémol) de l'huile essentielle des parties aériennes de *Cymbopogon jawarancusa* (originaire de la région du Cachemire) par combinaison de la GC-FID, GC-MS. Six d'entre eux furent identifiés également par RMN  $^{13}\text{C}$  dont l'(E)- $\beta$ -caryophyllène qui ne représentait qu'1,3% ;
- Wei et al. (2012) utilisèrent la RMN  $^{13}\text{C}$  pour enregistrer les spectres de six échantillons de café (extrait au  $\text{D}_2\text{O}$ ) grâce à l'évaluation du pourcentage de leurs 14 métabolites majoritaires avant de mettre en évidence leur classification par une analyse statistique ;
- très récemment, Bakiri et al. (2017) ont mis au point une méthode d'identification des constituants en mélange par RMN  $^{13}\text{C}$  grâce à la création d'un programme informatique basé sur la prédiction de molécules potentiellement présentes dans le mélange à partir des signaux  $^{13}\text{C}$  réellement présents dans ce mélange. Méthode qui

a fait ses preuves avec l'analyse sans aucune séparation d'un extrait de *Peumus boldus* et la mise en évidence de huit alcaloïdes : isocorydine, rogersine, boldine, reticuline, coclaurine, laurotetanine, N-methylcoclaurine et norisocorydine, ainsi que trois monoterpènes : *p*-cymène, 1,8-cinéole et  $\alpha$ -terpinène.

### III.3. Méthode d'analyse développée au laboratoire

#### III.3.1. Le principe de la méthode

Depuis la fin des années 1980, l'équipe « Chimie et Biomasse » a mis au point une méthode d'analyse des composés en mélange par RMN  $^{13}\text{C}$ . Le but étant d'identifier (voir de quantifier) les constituants d'un mélange grâce à son spectre RMN  $^{13}\text{C}$  sans aucune séparation préalable (ou le moins possible).

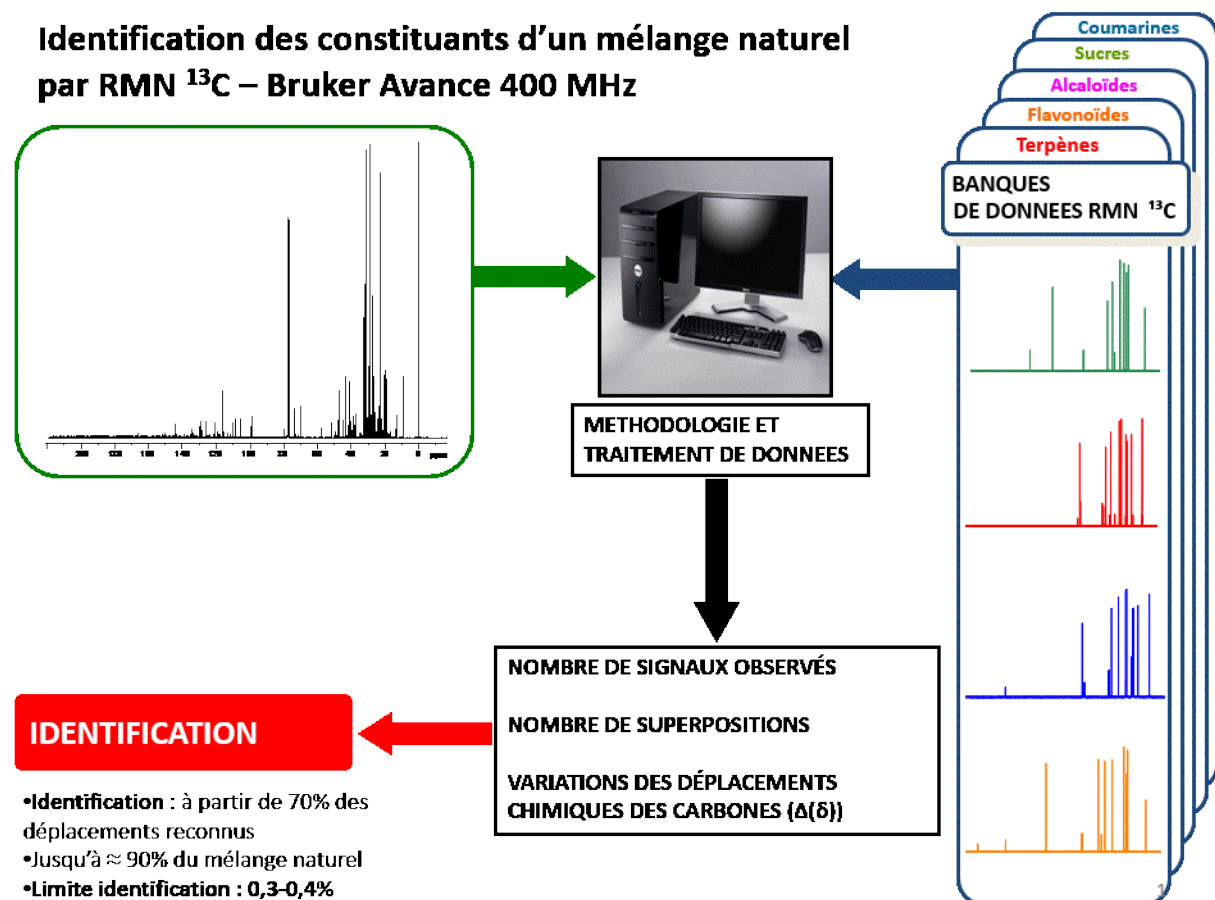


Figure 3. Identification des constituants d'un mélange complexe par RMN  $^{13}\text{C}$

L'intérêt de cette méthode réside dans son assistance par ordinateur, en effet à l'aide d'un logiciel développé au laboratoire, le travail de comparaison des déplacements chimiques du mélange avec ceux contenus dans les bibliothèques spectrales se fait avec une rapidité déconcertante (Figure 3). Pour assurer une comparaison des plus efficaces, les enregistrements des spectres des mélanges se font tant que possible dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les composés de références (Bighelli et Casanova, 2009 ; Tomi et al., 1995 ; Tomi et Casanova, 2006).

L'identification des constituants en mélange ne peut se faire sans prendre en considération plusieurs paramètres :

- le nombre de signaux observés par rapport au nombre de signaux attendus, et ce pour chacun des constituants du mélange ;
- le nombre de superpositions. Celles-ci pouvant se produire de manière totalement fortuite, ou bien plus prévisible dans le cas de molécules ayant une partie de leur squelette en commun (cela restant tout de même assez rare) ;
- les variations de déplacements chimiques notées  $\Delta(\delta)$  des carbones du mélange par rapport à ceux des composés issus des banques spectrales.

Cette méthode a été appliquée à l'analyse de diverses familles de molécules telles que les terpènes, les alcaloïdes, les sucres, les coumarines par exemple. Ce qui a conduit à la création d'autant de bibliothèques de spectres qui étaient au départ, constituées de données issues de la littérature (c'est ce que nous nommons les « banques littérature »). En parallèle, des « banques labo » furent créées et régulièrement enrichies grâce : à des produits commercialement disponibles, aux identifications faites dans les mélanges étudiés ou encore à des produits issus de la synthèse.

La bibliothèque de spectres la plus importante est, à l'heure actuelle, celle utilisée pour l'étude des huiles essentielles. Elle contient plus d'un millier de composés comme :

- des mono-, sesqui- et diterpènes ;
- des phénylpropanoïdes ;
- et tous autres molécules non-terpéniques retrouvées dans les huiles essentielles (composés linéaires, dérivés de chaînes grasses).

L'avantage de la RMN  $^{13}\text{C}$  réside dans le fait que pour chaque molécule caractérisée, nous disposons d'un spectre complet contenant l'ensemble de ces déplacements chimiques, contrairement à d'autres techniques spectroscopiques telles que l'infrarouge (IR), l'ultraviolet (UV) et la spectrométrie de masse (MS), où seules les raies d'absorption et les fragments majoritaires sont reportés. De plus, les appareils de RMN étant de plus en plus performants, ils permettent l'enregistrement de spectres à de très basses concentrations (1-2 mg de produit pur dans 0,5 mL de solvant suffisent à une acquisition), ce qui permet une meilleure reproductibilité.

De par sa fiabilité, sa rapidité, ainsi que sa complémentarité avec les techniques conventionnelles citées en voie A et B, cette méthode basée sur l'analyse en mélange par RMN  $^{13}\text{C}$  s'avère très intéressante. Elle a été appliquée avec succès à l'analyse de nombreuses substances naturelles, telles que les huiles essentielles, les extraits végétaux, les huiles végétales, et les résines. Après l'enregistrement de plusieurs milliers de spectres nous pouvons dresser le bilan suivant :

- la teneur minimale des composés identifiables avec notre spectromètre (9,4 T soit 400 MHz pour le  $^1\text{H}$ ) est comprise entre 0,3-0,4 % (Ouattara et al., 2014) ;
- en général tous les carbones des composés identifiés sont observés mis à part certains carbones quaternaires des composés minoritaires ;
- les superpositions sont assez rares et ne posent aucun problème pour l'identification des constituants ;
- les variations de déplacements chimiques  $\Delta(\delta)$  sont, dans la grande majorité des cas, et, en utilisant une « banque labo », inférieures à 0,1 ppm.

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

Lorsqu'elle est appliquée à l'analyse des mélanges volatils, la RMN  $^{13}\text{C}$  est complétée par des analyses en GC(RI) et GC-MS. Plus de 200 publications ont été réalisées ces vingt dernières années par l'équipe « Chimie et Biomasse » démontrant le potentiel de cette approche analytique. Nous reprenons ci-dessous quelques exemples récents de travaux menés au laboratoire sur l'application de la RMN  $^{13}\text{C}$  (en complément des analyses GC(RI) et GC-MS) pour l'analyse des huiles essentielles.



- Sutour et al. (2010) ont étudié l'huile essentielle de *Mentha suaveolens* ssp. *suaveolens* et ont identifié 37 constituants représentant 97,6%, dont certaines molécules telles que la piperitone et la neoiso-isopulegol ;
- Nam et al. (2016) ont identifié une trentaine de constituants dans les huiles essentielles d'aiguilles de *Pinus halepensis*, dont des molécules rarement rencontrées comme l'isovalérate de 2-phényléthyle et le 4-épi-isocembrol ;
- Nea et al. (2017) ont étudié les compositions chimiques des huiles essentielles (feuilles, fruits et fleurs) de *Lantana camara* de Côte d'Ivoire. Les composés majoritaires sont des sesquiterpènes oléfiniques : (*E*)- $\beta$ -caryophyllène,  $\alpha$ -humulène, bicyclogermacrène et germacrène D.

- **Combinaison de la chromatographie sur colonne et de la RMN <sup>13</sup>C**

Dans le cas d'huiles essentielles très complexes souvent constituées de sesquiterpènes oxygénés, une ou plusieurs étapes de chromatographie peuvent également être réalisées en amont des analyses GC(RI), GC-MS et RMN <sup>13</sup>C. Ceci dans le but d'identifier : i) les constituants présents à de très faibles teneurs (traces-0,3% dans l'huile essentielle), ii) des molécules nouvelles ou non présentes dans les banques de données, et de caractériser complètement l'huile essentielle. Nous pouvons citer les études des huiles essentielles suivantes :

- Bighelli et al. (2010) ont caractérisé à 88,5% l'huile essentielle d'*Angelica acutiloba* du Vietnam et ont montré la présence de plusieurs composés inhabituels : le 3-(*Z*)-butylidènephthalide, l'acétate de tridecyle, le (*Z*)-ligustilide et le 3-(*Z*)-butylidène-4,5,6,7-tetrahydro-*cis*-6,7-dihydroxyphthalide ;
- l'analyse des huiles essentielles de feuilles de *Myrtus communis* a conduit à l'identification de 30 constituants dont l' $\alpha$ -pinène et le 1,8-cinéole en tant que majoritaires mais aussi de quatre esters à chaînes courtes rarement décrits : l'isobutyrate d'isobutyle, le 2-méthylbutyrate d'isobutyle, l'isobutyrate de 2-méthylbutyle et le 2-méthylbutyrate de 2-méthylbutyle, alors que cette huile essentielle avait fait l'objet de nombreuses publications par le passé (Bazzali et al., 2012) ;
- l'étude de l'huile de feuilles de *Polyalthia longifolia* qui a permis l'identification de 70 constituants représentant 92,2% de la composition totale (Ouattara et al., 2014) ;

- la caractérisation de l'huile de bois de *Xanthocyparis vietnamiensis* qui contient de très nombreux sesquiterpènes rarement rencontrés dans les huiles essentielles (Bazzali et al., 2016).

- **Combinaison de l'hémisynthèse et de la RMN <sup>13</sup>C**

Il est parfois nécessaire d'avoir recours à l'hémisynthèse dans le cas de composés qui ne peuvent être concentrés/isolés (quantité trop faible ou difficultés de séparation), ou dont les données spectrales de RMN <sup>13</sup>C ne sont pas présentes dans la littérature. Il est ainsi courant, dans un premier temps, de synthétiser le composé suspecté à partir d'un composé chimiquement proche, puis dans un second temps de comparer les valeurs de RMN <sup>13</sup>C du produit synthétisé avec celles du composé présent dans le mélange et d'ainsi les confondre.

En voici deux exemples :

- l'étude menée par Liu et al. (2007) sur l'huile essentielle des parties aériennes de *Santolina corsica* a permis d'identifier le lyratol, le butyrate de lyratyle et l'isovalérate de lyratyle par comparaison de leurs valeurs de RMN <sup>13</sup>C avec celles des produits synthétisés par oxydation ou estérification du lyratol isolé à partir de l'huile ;
- Xu et al. (2015a) ont identifiés l'isobutyrate de carvacryle par comparaison de ses valeurs de RMN <sup>13</sup>C avec celles du composé préparé par estérification du carvacrol.

### III.3.3. Applications à d'autres familles chimiques

La méthode de RMN <sup>13</sup>C développée au laboratoire a également été appliquée à l'analyse des produits « lourds » (par opposition aux composés volatils des huiles essentielles), appartenant à diverses familles telles :

- les coumarines dans les huiles essentielles de feuilles et de racines de *Peucedanum paniculatum* (Vellutini et al., 2005) ;
- les sucres dans les miels de Corse et les extraits éthanoliques de *Pinus nigra* et *Albies alba* (Duquesnoy et al., 2008 ; Mazzoni et al., 1997) ;
- les lignanes dans l'oléorésines de *Cedrus atlantica* (Nam et al., 2011) ;

- des diterpènes (abiétanes), acides gras, stérols et composés phénoliques dans les extraits de trois espèces d'algues récoltées en Corse : *Chaetomorpha linum*, *Gracilaria dura* et *Hypnea musciformis* (Sutour et al., 2015b ; Xu et al., 2015b) ;
- des acétogénines et stérols dans l'extrait AcOEt de l'algue rouge *Laurencia obtusa* (Esselin et al., 2017).

### III.3.4. Etudes de variabilité chimique

La RMN  $^{13}\text{C}$  (en complément des analyses GC(RI) et GC-MS dans le cas de mélanges volatils) peut également être adaptée à la mise en évidence d'une variabilité intra ou interspécifique, puisqu'elle permet l'identification de composés jusqu'à des teneurs de 0,3-0,4%. En voici quelques exemples :

- une Analyse en Composante Principale (ACP) a permis de différencier les extraits au dichlorométhane de 38 échantillons de liège de *Quercus suber* de Corse et de Sardaigne en trois groupes en fonction de la teneur en six triterpènes : friédéline, 3- $\alpha$ -hydroxyfriédélan-2-one, bétuline, acide bétulinique,  $\beta$ -sitostérol, sitost-4-èn-3-one (Castola et al., 2002) ;
- Sutour et al. (2010) se sont intéressés à la variabilité des huiles essentielles de deux sous-espèces de menthes récoltées en Corse (*Mentha suaveolens* ssp. *insularis* et *Mentha suaveolens* ssp. *suaveolens*). Le traitement statistique des données (50 échantillons) permet de distinguer trois groupes. Le groupe 1 est composé de tous les échantillons de la sous-espèce *insularis* et caractérisé par l'association pulégone/*cis-cis-p*-menthenolide. Les échantillons de la sous-espèce *suaveolens* sont présents dans les deux autres groupes caractérisés, d'une part, par l'oxyde de pipériténone et, d'autre part, par la pipériténone et l'isopipériténone. Si la différenciation sur des critères phénotypiques demeure délicate, cette étude basée sur une approche chimique constitue une aide pour la taxonomie de ces deux sous-espèces ;
- l'analyse statistique des résines de 28 échantillons de résine de *Cedrus atlantica* (issus de plusieurs stations corses) a conduit à leur classification en trois groupes, dont le premier était caractérisé par la forte teneur en acides diterpéniques, le second par les acides diterpéniques et lignanes, tandis que le troisième ne contenait que des lignanes (Nam et al., 2011) ;
- Nam et al. (2016) ont soumis 47 échantillons d'huiles essentielles d'aiguilles de *Pinus halepensis*, espèce introduite en Corse, à des analyses statistiques et ont mis en évidence deux groupes basés sur l'absence ou la présence de diterpènes. Cette séparation est liée aux lieux de récoltes et semble être corrélée à l'âge des populations introduites.

### III.3.5. Résolution de plusieurs problèmes analytiques

La méthode basée sur la RMN  $^{13}\text{C}$  en mélange peut également permettre la résolution de plusieurs problèmes très souvent rencontrés lors de l'analyse des substances naturelles, qui sont : les co-élutions en GC, les molécules non éluées en GC, les molécules thermosensibles ou encore la différenciation de diastéréoisomères.

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

Il est fréquent de rencontrer des cas de co-élution lors de l'analyse GC d'un mélange volatil, c'est notamment le cas du limonène, du  $\beta$ -phéllandrène et du 1,8-cinéole qui co-éluent sur colonne DB-1 ; le  $\beta$ -phéllandrène et le 1,8-cinéole co-éluent également sur colonne DB-WAX ou encore le *trans*- $\alpha$ -bergamotène et le calarène qui co-éluent sur colonne DB-1.

Un autre exemple reporté très récemment par Ouattara et al. (2014) montre la co-élution de l'(*E*)- $\beta$ -caryophyllène et du 4,8- $\beta$ -époxy-caryophyllane à 1420 sur colonne DB-1. Ainsi, sur la base de l'analyse par GC-MS, seul le composé ultra majoritaire (le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène) est identifié. En l'absence de l'analyse complémentaire par RMN  $^{13}\text{C}$ , une erreur d'identification aurait été commise.

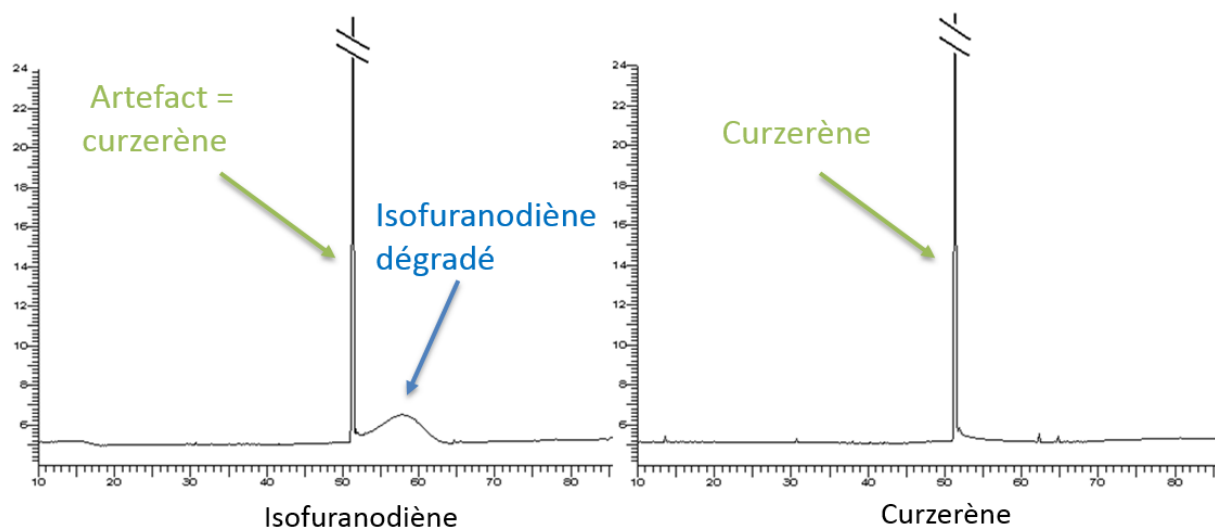
- **Identification de molécules non éluées en GC(RI) et GC-MS**

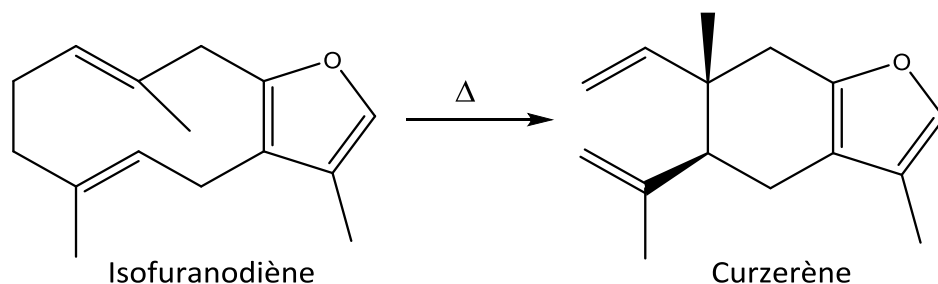
Bien que les huiles essentielles soient constituées en théorie de molécules volatiles, elles peuvent toutefois contenir des molécules qui ne peuvent pas être mise en phase gazeuse dans l'injecteur de la GC. Ces molécules (que l'on ne peut qualifier de « lourdes » mais de « moins volatiles ») ne sont pas éluées en GC(RI) et GC-MS. Dans le cas de l'huile essentielle de racines de *Pulicaria mauritanica* (Xu et al., 2015a), l'étude de la composition chimique par GC(RI) et GC-MS ne semblait poser problème. Cependant l'analyse du spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  montrait qu'une série de déplacements chimiques correspondant au 8-hydroxy-9,10-diisobutyryloxy thymol ne pouvait être attribuée à aucun composé présent sur le chromatogramme. Ce produit polyoxygéné n'a pu être volatilisé dans l'injecteur et a fortiori être élué avec nos conditions expérimentales. Dans ce cas, la RMN  $^{13}\text{C}$  a permis : i) l'identification d'un composé qui n'aurait pu être suspecté par GC(RI) et GC-MS et ii) de

proposer une quantification plus juste car la GC induit une surestimation des autres constituants du mélange.

- **Identification de molécules thermosensibles**

Les molécules thermosensibles sont un autre problème de taille lors de l'analyse en GC. Certaines molécules, dont celles affichant le squelette (*E,E*)-1,5-cyclodécadiénique peuvent se transposer sous l'effet de la chaleur, selon une réaction sigmatropique [3,3] (transposition de Cope). En cas de réarrangement partiel, il est alors fréquent d'identifier le composé réellement présent dans l'huile essentielle ainsi que le composé résultant du réarrangement qui constitue donc un artefact. La situation peut devenir plus compliquée en cas de réarrangement total où l'analyse par GC conduit à la disparition du composé présent à l'origine dans le mélange. C'est par exemple le cas du couple isofuranodiène/curzerène, en effet lors de l'injection en GC de l'isofuranodiène celui-ci se transforme en curzerène et la GC-MS propose le curzerène en lieu et place de l'isofuranodiène (Baldovini et al., 2001). Cela est illustré dans la figure ci-dessous où l'on peut voir que les chromatogrammes de l'isofuranodiène pur et du curzerène pur sont assez proches. Outre le problème d'identification, il y a aussi des problèmes de quantification puisque le ratio entre les deux composé changent (Figure 4).





**Figure 4.** Injection en GC de l'isofuranodiène et du curzerène.

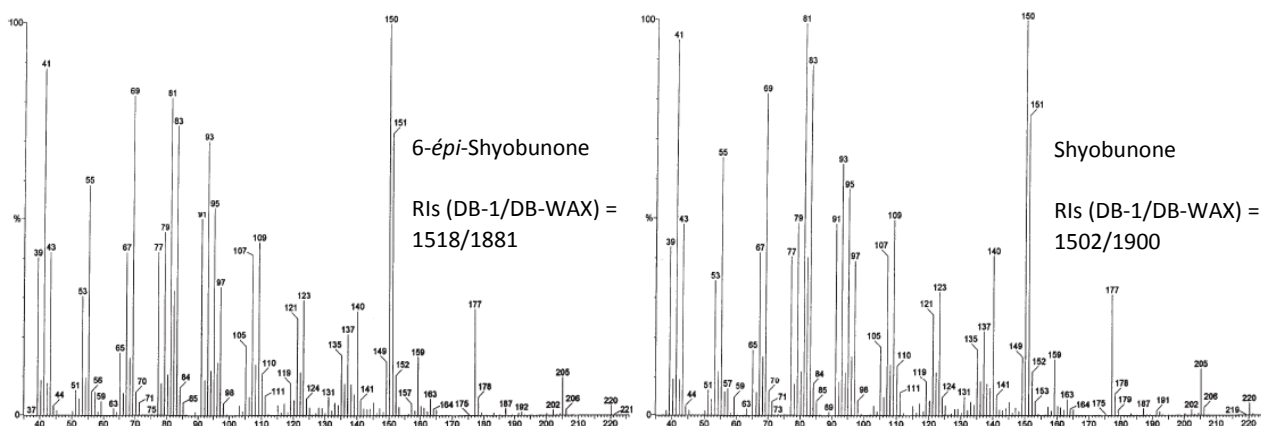
Nous pouvons également citer les germacrènes A, B et C qui transposent (totalement ou en partie) respectivement en  $\beta$ -,  $\gamma$ - et  $\delta$ -éléments sous l'effet de la chaleur (Ouattara et al., 2013). La RMN  $^{13}\text{C}$  a permis l'identification et la quantification de ces trois couples de composés thermolabiles grâce aux intensités de leurs signaux repérés sur le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$ .

D'autres composés n'ayant pas le squelette (*E,E*)-1,5-cyclodécadiénique peuvent également être impactés par la chaleur, c'est notamment le cas de l'ascaridole qui s'isomérisé en partie en isoascaridole lors de l'injection en GC. Cavalli et al. (2004) ont pu identifier et quantifier ces deux composés à l'aide de la RMN  $^{13}\text{C}$ .

- **Identification des stéréoisomères**

La RMN  $^{13}\text{C}$  constitue un outil performant pour la différenciation d'isomères (diastéréoisomères et isomères de position). Il est très souvent délicat de différencier des isomères, car leurs RIs sont souvent très proches (voire identiques) et leurs spectres de masse sont, dans la majorité des cas, quasiment similaires. Citons quelques exemples :

- la shyobunone et son épimère la 6-*épi*-shyobunone qui sont éluées à respectivement 1502/1900 et 1518/1881 (sur colonne DB-1/DB-WAX) et dont les spectres de masse sont extrêmement proches (Figure 5) (Gonny et al., 2004) ;



**Figure 5.** Spectre de masse de la 6-*épi*-shyobunone et de la shyobunone.

- Liu et al. (2007) identifient pour la première fois l'*épi*-isolyratol, un épimère de l'isolyratol dans l'huile essentielle de *Santolina corsica*, deux épimères dont les RIs sur colonne apolaire ne sont séparés que par 10 points ;
- Sutour et al. (2011) identifient dans l'huile essentielle de *Mentha aquatica* le menthofuro lactone et l'*épi*-menthofuro lactone, deux épimères aux spectres de masses identiques et aux RIs très proches (deux points sur la colonne DB-1 et non déterminés sur la DB-WAX) (Frérot et al. 2002) ;
- Yapi et al. (2012) ont identifié deux isomères : le 3,3-diméthyl-1-vinylcyclohexene (RIs : 980/1153) et le 4,4-diméthyl-2-vinylcyclohexene (RIs : 983/1167) présentant des spectres de masses assez similaires et des RIs très proches. Il était d'autant plus important de les différencier car le second est un nouveau composé (le premier est reporté pour la première fois dans une substance naturelle) et ils sont tous deux les constituants majoritaires de l'huile ;
- Yapi et al. (2013) identifient par RMN <sup>13</sup>C deux isomères présentant des RIs strictement identiques sur les deux colonnes (1691/2274), le furanoguaia-1,4-diène et le furanoguaia-1,3-diène, dans l'huile de *Xylopiya rubescens*. Leur différenciation était importante car ces deux nouveaux composés sont parmi les constituants majoritaires de l'huile essentielle ;
- Ouattara et al. (2014) différencient deux diastéréoisomères aux spectres de masse similaires et aux RIs très proches : le 4,8- $\alpha$ -époxy caryophyllane (1410/1564) et le 4,8- $\beta$ -époxy caryophyllane (1420/1580) ;
- l'identification par Nam et al. (2015) de deux épimères de la déodarone, la (4*R*,8*R*)-déodarone et la (4*R*,8*S*)-déodarone dans l'huile essentielle de *Cedrus atlantica*. Il est à noter que ces deux épimères co-éluent sur colonne apolaire à 1670 et ne sont séparés que par cinq points sur la colonne polaire. De plus leurs spectres de masse respectifs sont quasiment identiques (Villicco et al. 2001) ;
- Sutour et al. (2015a) différencient deux épimères sujet à controverse, le germacra-1(10),5-diène-4 $\alpha$ -ol et le germacra-1(10),5-diène-4 $\beta$ -ol dans les huiles essentielles de



feuilles de *Fortunella* sp.. En effet ces deux isomères avaient conduit à de nombreuses erreurs d'identification, ce qui s'avère compréhensible au vue de leurs spectres de masse tout à fait semblables. Cette étude a permis de clarifier ce point.

Ce chapitre introductif axé sur la description des méthodes et techniques analytiques utilisées pour l'analyse des mélanges complexes, nous a permis de mettre en évidence la complémentarité de la méthode de notre laboratoire (basée sur la RMN  $^{13}\text{C}$ ) avec celles plus généralement utilisées. En effet la méthode du laboratoire peut aussi bien être utilisée pour l'analyse de mélanges « classiques » (sans difficultés analytiques particulières), que des études de variabilités ou encore pour la résolution de divers problèmes analytiques.



# **Chapitre II :**

**Caractérisation d'huiles essentielles « sans  
difficultés analytiques particulières »**



Au cours du siècle dernier, l'ONF (Office National des Forêts) a introduit plusieurs espèces de conifères en Corse. Ces introductions ont été effectuées pour tester leurs potentiels d'adaptabilité aux conditions pédoclimatiques de Corse dans le but de trouver une ou plusieurs essences de substitution dans le cas d'éventuelles catastrophes telles : des ravages causés par des nuisibles, une pandémie ou encore des feux de forêts. Le laboratoire a par ailleurs déjà étudié certains conifères introduits comme le pin d'Alep (*Pinus halepensis*) qui fût planté dès le 19<sup>ème</sup> siècle dans trois stations : Saleccia (nord), Capo di Feno (côte ouest) et Tre Pradule (extrême sud). Les études menées sur les huiles essentielles (d'aiguilles et de cônes) de ce pin ont conduit à la mise en évidence d'une variabilité chimique basée sur la présence/absence de diterpènes liée à la provenance géographique des échantillons (Nam et al., 2014, 2016).

D'autres espèces de conifères ont fait l'objet d'introductions, nous pouvons en citer cinq appartenant à deux familles différentes, les Pinaceae : *Larix decidua*, *Pseudotsuga menziesii* et *Pinus ponderosa* ; et les Taxodiaceae : *Sequoiadendron giganteum* et *Cryptomeria japonica*. Ces introductions qui datent de quelques décennies ont connu au cours du temps des évolutions très variables. Si les plantations de *P. menziesii* sont au stade de la naturalisation et traduisent une parfaite adaptation aux conditions écologiques, celles de *L. decidua* semblent plus difficiles. En effet une des stations de *L. decidua* échantillonnées bien que limitée en superficie, était en voie de naturalisation, tandis que la seconde dépérissait et semblait vouée à disparaître rapidement avec moins d'une dizaine d'arbres disséminés dans une hêtraie. Cette espèce sensible à la chaleur et à l'humidité ne trouve, sans doute pas, dans les étés chauds et de plus en plus secs, les conditions favorables à son développement. Pour les trois autres espèces, il s'agit d'introductions plus récentes, qui demeurent encore au stade expérimental au sein d'une parcelle gérée par l'ONF.

#### ***Larix decidua* :**

Couramment appelé Mélèze d'Europe, *Larix decidua* est un conifère de la famille des Pinaceae. Il peut être rencontré dans les régions montagneuses et les régions froides d'Europe (Holm et Hiltunen, 1997). Peu d'auteurs se sont intéressés à la composition chimique des huiles essentielles de *L. decidua*. Kolesnikova et al. (1976) ont récolté du végétal à Voronezh (Russie) dont la composition chimique était dominée par : le  $\Delta$ -3-carène (20,8%), l' $\alpha$ -pinène (17,2%), le *p*-cymène (9,8%), le terpinolène (5,9%) et le  $\beta$ -pinène (5,5%).

Kubeczka et Schultze (1987) reportèrent la composition de *L. decidua* originaire de Würzburg (Allemagne). L'huile essentielle d'aiguilles était caractérisée par : l' $\alpha$ -pinène (28,6%), le  $\Delta$ -3-carène (19,2%), le  $\beta$ -pinène (11,9%) et le germacrène D (10,0%) ; tandis que celle de bois était dominée par : l' $\alpha$ -pinène (44,7%), le  $\beta$ -pinène (10,2%), le germacrène D (12,4%) et le  $\beta$ -phellandrène (6,1%).

### ***Pseudotsuga menziesii* :**

*Pseudotsuga menziesii* également connu sous le nom de sapin de Douglas est une espèce de conifère de la famille des Pinaceae. Cette espèce est très largement répandue sur la côte ouest de l'Amérique du Nord et en Europe (Erdtman et al., 1968 ; Jirovetz et al., 2000). Jirovetz et al. (2000) se sont intéressés au Sapin de Douglas poussant en Bulgarie et ont reporté la composition chimique de l'huile essentielle d'aiguilles dont les composés majoritaires étaient : le  $\beta$ -pinène (24,4%), le sabinène (22,2%) et le terpinolène (18,8%). Lors de cette étude, cette huile a démontré une activité antibactérienne vis-à-vis de plusieurs bactéries à Gram positif et négatif.

L'huile essentielle d'aiguilles de *P. menziesii* collectée en Basse-Autriche contenait : le sabinène (15,4%), le  $\beta$ -pinène (13,4%), le terpinène-4-ol (9,2%), le terpinolène (7,3%) et l' $\alpha$ -pinène (6,2%) comme constituants majoritaires (Buchbauer et al., 1994).

Aux USA, l'espèce *Pseudotsuga menziesii* est divisée en deux variétés : var. *menziesii* (type « Côtier ») et var. *glauca* (type « Montagnes Rocheuses »). La différence entre les deux variétés de sapin de Douglas n'est pas seulement géographique, elle est aussi chimique : le type « Montagnes Rocheuses » contient de l'acétate de bornyle en quantité significative dans ses huiles essentielles alors que le type « Côtier » est dépourvu d'acétate de bornyle ou en contient en très faible quantité ( $\leq 2$  %) (Snajberk et al., 1974 ; Kubeczka et Schultze, 1987).

Deux équipes ont comparé les compositions chimiques des huiles essentielles des deux variétés de *P. menziesii*. La première étude fut réalisée par Kubeczka et Schultze (1987) et a permis de comparer une huile essentielle de type « Montagnes Rocheuses » (originaire d'Allemagne), avec une huile de type « Côtier » (huile essentielle commerciale). Celle de type « Montagnes Rocheuses » était dominée par : le camphène (16,7%), l' $\alpha$ -pinène (13,0%), le  $\beta$ -pinène (11,6%), l'acétate de bornyle (10,0%) et le terpinolène (9,1%), tandis que celle de

type « Côtier » contenait : le  $\beta$ -pinène (21,9%), le sabinène (19,4%), le terpinolène (13,6%), l' $\alpha$ -pinène (13,2%) et le  $\Delta$ -3-carène (8,9%) comme constituants majoritaires.

Une quinzaine d'années plus tard, Adams et al. (2012) ont mené une étude similaire sur la composition chimique des huiles essentielles d'aiguilles des deux variétés de *P. menziesii* récoltées dans l'ouest des USA. Les constituants majoritaires de l'huile de var. *menziesii* (type « Côtier ») étaient : le  $\beta$ -pinène (25,0-38,0%), le terpinolène (9,5-14,6%), le terpinène-4-ol (10,1-12,1%) et le sabinène (4,0-12,9%), alors que l'huile essentielle de var. *glauca* (type « Montagnes Rocheuses ») était dominée par : l'acétate de bornyle (14,6-44,7%), le camphène (13,8-30,3%) et le  $\beta$ -pinène (2,5-12,3%).

Les huiles essentielles de bois et de cônes de sapin de Douglas n'ont à l'heure actuelle jamais été étudiées.

### ***Pinus ponderosa* :**

*Pinus ponderosa*, de son nom vernaculaire pin ponderosa est un des pins les plus communs d'Amérique du Nord. Son aire de répartition est assez large, originaire des Montagnes rocheuses, il s'étend de la Colombie-Britannique (Canada) jusqu'au Mexique (Adams et Edmunds Jr., 1989).

Deux publications ont décrit les compositions des huiles essentielles d'aiguilles de *P. ponderosa* récoltées en Europe. Krauze-Baranowska et al. (2002) étudièrent la composition d'une huile dont le végétal a été récolté à Gdańsk (Pologne), celle-ci était majoritairement constituée de  $\beta$ -pinène (45,7%),  $\alpha$ -pinène (10,2%),  $\Delta$ -3-carène (8,4%) et estragole (8,0%). Cette huile essentielle a également montré une forte activité antifongique contre trois espèces de *Fusarium* (*F. culmorum*, *F. solani* et *F. poae*). Adams et Edmunds Jr. (1989) reportèrent la composition d'une huile essentielle originaire de Russie dont les constituants majoritaires étaient similaires :  $\alpha$ -pinène (37,2%),  $\beta$ -pinène (30,0%) et  $\Delta$ -3-carène (5,4%). Cependant, nous remarquons une quantité importante de camphène (10,1%) et l'absence d'estragole identifié dans l'étude précédente sur le *P. ponderosa* de Pologne.

Concernant les pins ponderosa d'Amérique (Arizona, Californie), plusieurs auteurs ont signalé la composition d'huiles essentielles d'aiguilles dont les composés majoritaires étaient encore une fois : le  $\beta$ -pinène (38,2-70,2%), l' $\alpha$ -pinène (10,2-13,0%), le  $\Delta$ -3-carène (8,0-8,4%) et l'estragole (6,4-10,5%) (Zavarin et al., 1971 ; Kelkar et al., 2006 ; Kurose et al., 2007).

Cobb Jr. et al. (1972) ont reporté la composition d'une huile essentielle de Californie avec une très faible quantité de  $\Delta$ -3-carène ( $0,2\pm 0,3\%$ ) associée à une teneur en estragole plus élevée

( $25,7\pm 19,2\%$ ). Les autres constituants majoritaires étant le  $\beta$ -pinène ( $78,8\pm 5,1\%$ ), et l' $\alpha$ -pinène ( $15,6\pm 4,2\%$ ).

Adams et Edmunds Jr. (1989) ont comparé les huiles essentielles d'aiguilles de *P. ponderosa* de l'Etat de Washington (USA) et de Colombie-Britannique (Canada). Ces deux échantillons étaient chimiquement assez similaires mis à part au niveau de leurs teneurs en estragole :  $\beta$ -pinène (37,9 ; 55,0 %), le  $\Delta$ -3-carène (19,3 ; 10,0 %), l' $\alpha$ -pinène (9,1 ; 11,0 %), l' $\alpha$ -terpinéol (6,2 ; 10,0 %) et l'estrageole (1,8 ; 8,0 %). Il est intéressant de noter la présence à des teneurs appréciables de l' $\alpha$ -terpinéol qui était présent en très faible quantité dans les travaux précédemment cités.

Bien que nous puissions noter des différences, surtout quantitatives entre les huiles essentielles d'aiguilles européennes et Nord-Américaines, il est difficile, compte tenu de la faible importance des échantillonnages, de conclure à l'existence d'une variabilité chimique.

A notre connaissance l'huile essentielle de bois de *P. ponderosa* n'a jamais fait l'objet de publication.

### ***Sequoiadendron giganteum* :**

*Sequoiadendron giganteum* couramment nommé séquoia géant est un arbre de très grande taille appartenant à la famille des Taxodiaceae. Cette espèce se trouve principalement sur les pentes ouest de la Sierra Nevada en Californie. En France, les organismes de gestion des forêts ont créé des sites pilotes, pour étudier le séquoia géant en tant qu'essence de reboisement en Europe, spécialement dans les zones climatiques difficiles où cette espèce rustique serait susceptible de fournir une biomasse plus importante que les espèces communes comme le cèdre, les pins ou le sapin pectiné (Chalchat et al., 1988).

Plusieurs études ont été menées sur la composition chimique de diverses huiles volatiles obtenues par distillation au cyclohexane et à l' $\text{Et}_2\text{O}$  (Chalchat et al., 1988 ; Gregonis et al., 1968 ; Levinson et al., 1971). Il n'y a, à notre connaissance qu'une seule étude concernant l'huile essentielle de *S. giganteum*. Cette étude menée par Jerković et al. (2003) sur du végétal collecté en Croatie met en évidence la forte teneur en phénylpropanoïdes de cette huile essentielle. La composition chimique de l'huile essentielle du feuillage était



caractérisée par : l' $\alpha$ -pinène (45,1%), l'élémicine (21,5%), le myrcène (6,4%) et le méthyl eugénole (4,3%) comme constituants majoritaires ; alors que l'huile essentielle de bois contenait : l' $\alpha$ -pinène (44,5%),

le limonène (8,7%) et le myrcène (7,9%) et s'avère moins riche en phénylpropanoïdes (méthyl eugénole : 0.3% ; élémicine : absente).

Curieusement, aucune étude n'a été réalisée sur l'huile essentielle de séquoia géant poussant dans son habitat naturel (l'Amérique du Nord).

### ***Cryptomeria japonica* :**

*Cryptomeria japonica* (Taxodiaceae) appelée cèdre du Japon ou encore « Sugi » en japonais. Ce conifère, largement distribuée au Japon, constitue une des espèces d'arbre d'ornement les plus plantées à Taïwan. Ce cèdre est utilisé comme matériau de construction pour les maisons de style japonais ce qui lui confère une valeur économique et patrimoniale importante (Cheng et al., 2005).

Deux études ont démontré une activité insecticide significative de l'huile essentielle de feuilles de *C. japonica* contre les moustiques des espèces *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* (Cheng et al., 2009 ; Gu et al., 2009). Deux autres études ont mis en évidence les activités insecticides de cette huile essentielle contre un ravageur (le poisson d'argent : *Lepisma saccharina*) et contre une espèce de termite (*Coptotermes formosanus*) (Cheng et al., 2012 ; Wang et al., 2006).

L'huile essentielle de feuilles de *C. japonica* poussant à Taïwan a été décrite par de nombreux auteurs comme étant dominée par : le kaurène (11,6-29,7%), le  $\beta$ -élémol (13,9-19,0%) et le sabinène (3,8-10,8%) (Cheng et al., 2009 ; Cheng et al., 2012 ; Gu et al., 2009 ; Wang et al., 2006). Cependant, une autre étude menée par Cheng et al. (2005) sur le même organe de l'arbre et récolté dans la même localité a mis en évidence une composition différente avec la présence du kaurène (40,6%), et de sesquiterpènes oléfiniques tels que : le valencène (19,9%), l'eudesma-3,7(11)-diène (8,4%) et l' $\alpha$ -gurjunène (7,9%).

Les huiles essentielles de feuilles de *C. japonica* des Açores (Portugal) présentaient des compositions différentes des échantillons d'Asie. Elles étaient caractérisées par des teneurs importantes quoique variables en : kaurène (0,2-20,3%) et sabinène (0,5-19,9%) également identifiés dans les échantillons de Taïwan, mais aussi en  $\alpha$ -pinène (9,6-29,5%) et

phyllocladène (3,5-26,5%) qui eux n'ont pas été identifiés dans les huiles de Taiwan (Moiteiri et al., 2013).

Shieh et al. (1981) ont décrit les compositions chimiques de différents organes (feuilles, bois et cônes) de *C. japonica* du Japon. L'huile de feuilles était dominée par : le  $\beta$ -eudesmol (15,0%), l' $\alpha$ -eudesmol (14,7%), le  $\beta$ -élémol (11,6%), le 10(15)-cadinène-4-ol (10,8%) et le  $\gamma$ -eudesmol (10,2%). Celle de bois était caractérisée par la présence d' $\alpha$ -pinène (13,7%),  $\gamma$ -cadinène (6,8%),  $\delta$ -cadinène (6,6%),  $\tau$ -cadinol (5,4%) et  $\alpha$ -cadinol (5,2%). L'huile de cône était, quant à elle, composée majoritairement de : sabinène (25,6%),  $\alpha$ -pinène (11,6%),  $\beta$ -élémol (8,8%),  $\beta$ -eudesmol (8,5%) et  $\gamma$ -eudesmol (8,2%). Cette huile essentielle apparaît très différente de celles décrites à Taiwan et aux Açores avec une forte teneur en dérivés possédant les squelettes eudesmane et cadinane.

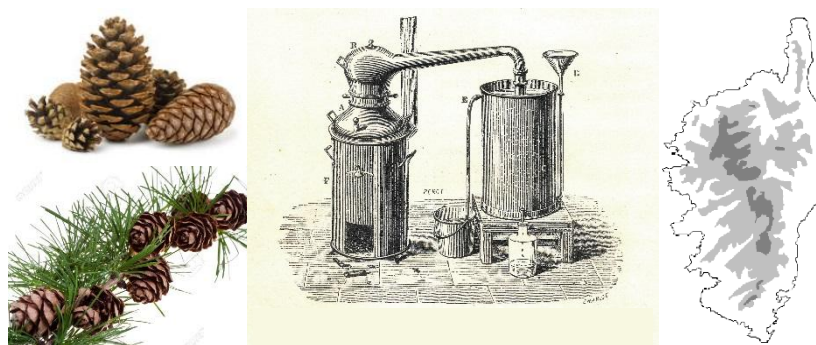
L'objectif de ce chapitre consiste à étudier les huiles essentielles de ces cinq conifères (*L. decidua*, *P. menziesii*, *P. ponderosa*, *S. giganteum* et *C. japonica*) récoltés en Corse afin de comparer leurs compositions chimiques avec celles de végétaux poussant dans d'autres régions du globe. Ainsi, nous souhaitons évaluer l'influence des conditions pédoclimatiques sur la production des métabolites secondaires

La seconde étude entreprise dans ce chapitre concerne la composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de *Melicope belaha*, espèce endémique de Madagascar. Cette espèce fait partie d'une série de plantes sélectionnées par le Dr. Delphin Rabehaja de l'Institut Malgache de Recherches Appliquées à Antananarivo (Madagascar), qui pourraient être valorisées sous forme d'huile essentielle.

Comme celles décrites ci-dessus pour les conifères, cette huile essentielle est majoritairement dominée par des monoterpènes et en particulier des monoterpènes oléfiniques. Par conséquent, l'association de la GC(RI), de la GC-SM et de la RMN  $^{13}\text{C}$  s'avère suffisante compte tenu de la faible complexité analytique. Nous avons tout de même réalisé une chromatographie sur colonne de silice afin de séparer les composés apolaires et polaires pour confirmer l'identification de certains constituants présents en faibles quantités.

## Article 1. Chemical compositions of essential oils of five introduced conifers in Corsica

Gabriel Garcia, Adrien Garcia, Marc Gibernau, Ange Bighelli, Félix Tomi



The aim of this survey was to determine the chemical composition of essential oils (EO) of five conifers acclimated in Corsica by GC(RI), GC-MS and  $^{13}\text{C}$ -NMR. *L. decidua* needle and wood EOs contained as majors components:  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinenes, germacrene D (needles) and bornyl acetate (wood). The EOs of needles, wood and cones of *P. menziesii* were characterized by  $\beta$ - and  $\alpha$ -pinenes, terpinen-4-ol, sabinene, terpinolene (needles and wood),  $\Delta$ -3-carene (wood) and limonene (cones). Needles and wood EOs of *P. ponderosa* contained as major components:  $\beta$ - and  $\alpha$ -pinenes,  $\Delta$ -3-carene (wood) and estragole (needles). *S. giganteum* EOs of foliage and wood were rather similar and dominated by  $\alpha$ -pinene, and safrole. The EOs of leaf, wood and cones from *C. japonica* were very similar, and exhibited  $\alpha$ -pinene, sabinene,  $\beta$ -elemol and kaurene as major constituents. It appeared that EO compositions of some species were different from reported literature data.

**Keywords:** *Larix decidua*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus ponderosa*, *Sequoiadendron giganteum*, *Cryptomeria japonica*, essential oils.

**Published article:** Nat. Prod. Res. 2017, 31, 1697-1703.

## 1. Introduction

During the last century, the National Forestry Office (“Office National des Forêts”) has introduced several coniferous species throughout Corsica. These introductions were made in order to test the growing abilities of these species outside their natural habitats. A previous study conducted in our laboratory on *Pinus halepensis* exhibited a chemical variability of the essential oil (EO) among its populations depending on the harvest sites in Corsica, probably in relation to differences in the population ages (Nam et al., 2016). In the same way, we present the chemical composition of EO from different organs of five other introduced coniferous species, namely: *Larix decidua*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus ponderosa*, *Sequoiadendron giganteum* and *Cryptomeria japonica*. *L. decidua* (Pinaceae) commonly named European Larch is distributed throughout the European mountainous and cold regions (Holm et Hiltunen, 1997). *P. menziesii* (Pinaceae) known under the common name Douglas fir is widely distributed in the mountainous ranges of the Pacific Coast from California to Oregon and further north, but also through Europe. Furthermore, EO of Douglas fir was reported as having an activity against several Gram-negative and Gram-positive bacteria (Jirovetz et al., 2000). *P. ponderosa* (Pinaceae), is one of the most common pines in North America, (Adams et Edmunds Jr., 1989), its EO exhibited an antifungal activity against several *Fusarium* species (Krauze-Baranowska et al., 2002). Whereas *S. giganteum* (Taxodiaceae) is a giant tree, found mainly on the western slopes of the Sierra Nevada in California (Chalchat et al., 1988). *C. japonica* (Taxodiaceae) is a widely distributed conifer known as “Sugi” in Japanese and an important plantation tree species in Taiwan. The EO of this tree has showed a strong activity against *Coptotermes formosanus* (Cheng et al., 2012). The aim of this survey was to compare the chemical composition of EOs of these five coniferous species acclimated in Corsica with those of samples from their natural areas. Thus we have studied whether the production of secondary metabolites in essential oils was influenced by environmental conditions.

## 2. Results and discussion

Corsican *L. decidua* produced the same metabolites as those reported in the literature except for  $\Delta$ -3-carene. This monoterpene present in significant amount in the mainland

European Larch was very weakly present ( $\leq 0.5\%$ ) in Corsican samples (Table 1); it is also known to be the marker differentiating needle EO (19.2%) or wood EO (2.8%) (Kubeczka et Schultze, 1987). Statistical analysis were carried out on the *L. decidua* EOs and exhibited two distinct groups: needles (germacrene D) and wood samples (bornyl acetate) (Figure 1). Two Douglas-fir varieties (*P. menziesii*) are chemically recognized: var. *glauca* (“Rocky Mountains type”) containing bornyl acetate in appreciable amounts in its EO while the var. *menziesii* (“Coastal type”) is devoid of bornyl acetate or in very low content ( $\leq 2\%$ ) (Kubeczka et Schultze, 1987). The chemical composition similarity and the very low amount in bornyl acetate (less than: 0.5%) determined in our samples of *P. menziesii* (Table 1) suggested that the trees introduced in Corsica were from the Coastal type (Adams et al., 2012 ; Kubeczka et Schultze, 1987). Furthermore, we described, for the first time, the compositions of wood and cone EOs of *P. menziesii* (Table 1). The composition of *P. ponderosa* needle oil (Table 1) was qualitatively in agreement with oil compositions described from Poland and the USA but presented some quantitative differences (Krauze-Baranowska et al., 2002; Kurose et al., 2007). For the first time, we described the composition of wood EO of *P. ponderosa*, which was differentiated of those of needle by a high amount in  $\Delta$ -3-carene and by the absence of estragole. The chemical compositions of the *S. giganteum* EO (Table 1), with safrole as a major compound, differed significantly from those of Croatia with no mention of this phenylpropanoid (Jerković et al., 2003). EOs from *C. japonica* (Table 1) were characterized by the association of  $\alpha$ -pinene, sabinene,  $\beta$ -elemol and kaurene, also reported in EOs from Taiwan (Cheng et al., 2012), Azores Islands (Moiteiri et al., 2013) and Japan (Shieh et al., 1981).

In conclusion, the effects of Corsican pedoclimatic conditions on the biosynthesis pathways of introduced coniferous trees appeared variable. For three species: *P. menziesii*, *P. ponderosa* and *C. japonica* chemical compositions were similar to those previously reported. Our results on *P. menziesii* indicated that trees planted in Corsica belong to the variety *menziesii*. Conversely for *L. decidua* and *S. giganteum* several chemical differences with the literature data were observed.

**Table 1.** Chemical compositions of essential oils of five conifers.

No	Components <sup>a</sup>	R1a <sup>b</sup>	R1p <sup>b</sup>	<i>L. decidua</i>						<i>P. menziesii</i>						<i>P. ponderosa</i>			<i>C. japonica</i>					<i>S. giganteum</i>					
				Needles (n=9)			Wood (n=9)			Needles (n=5)			Wood (n=5)			Cones	Needles	Wood	Leaf	Wood	Cones	Little cones	Foliage (n=3)			Wood (n=3)			
				Mean ± SD	Min	Max	Mean ± SD	Min	Max	Mean ± SD	Min	Max	Mean ± SD	Min	Max								%	%	%	%	%	%	Sg1
1	Tricyclene	921	1020	-	-	-	-	-	-	tr	-	0.1	0.1 ± 0.1	-	0.2	0.1	tr	0.1	0.4	0.2	0.1	0.3	0.2	0.1	0.2	tr	0.1	0.1	
2	α-Thujene	923	1023	-	-	-	-	-	-	1.1 ± 0.4	0.5	1.6	0.9 ± 0.6	0.1	1.7	1.1	tr	0.2	1.4	0.6	1.5	1.1	0.1	tr	0.1	tr	tr	tr	
3	<b>α-Pinene</b>	<b>931</b>	<b>1019</b>	<b>30.8 ± 6.6</b>	<b>17.6</b>	<b>40.5</b>	<b>26.1 ± 9.7</b>	<b>13.1</b>	<b>43.2</b>	<b>10.8 ± 4.4</b>	<b>6.1</b>	<b>15.3</b>	<b>12.5 ± 9.1</b>	<b>4.7</b>	<b>27.4</b>	<b>53.6</b>	<b>12.8</b>	<b>13.6</b>	<b>19.1</b>	<b>13.0</b>	<b>25.0</b>	<b>12.3</b>	<b>59.5</b>	<b>47.8</b>	<b>71.3</b>	<b>18.0</b>	<b>28.6</b>	<b>44.5</b>	
4	α-Fenchene	942	1058	tr	-	0.2	tr	-	tr	tr	0.1	tr	tr	0.1	-	0.1	tr	tr	tr	tr	0.1	tr	0.1	0.1	tr	tr	tr	tr	
5	Camphene	944	1068	1.8 ± 0.9	0.6	3.5	4.1 ± 2.2	1.2	7.1	0.6 ± 0.3	0.3	0.9	0.6 ± 0.3	0.3	1.0	0.9	0.4	0.3	3.1	1.3	0.5	2.2	0.3	0.3	0.3	0.1	0.1	0.2	
6	<b>Sabinene</b>	<b>965</b>	<b>1120</b>	tr	-	0.1	-	-	-	<b>5.9 ± 6.5</b>	<b>1.0</b>	<b>17.3</b>	<b>6.0 ± 5.6</b>	<b>0.6</b>	<b>14.2</b>	<b>13.5</b>	0.1	0.3	<b>19.6</b>	<b>9.4</b>	<b>13.3</b>	<b>17.2</b>	0.1	tr	0.1	0.1	tr	tr	
7	<b>β-Pinene</b>	<b>971</b>	<b>1114</b>	<b>16.1 ± 6.8</b>	<b>6.9</b>	<b>26.7</b>	<b>11.8 ± 5.3</b>	<b>5.0</b>	<b>18.0</b>	<b>34.6 ± 17.6</b>	<b>16.3</b>	<b>54.7</b>	<b>21.8 ± 11.7</b>	<b>9.6</b>	<b>40.9</b>	<b>9.3</b>	<b>55.7</b>	<b>29.9</b>	1.2	0.7	1.3	0.6	6.0	0.6	0.8	0.2	0.3	0.5	
8	Myrcene	979	1162	2.3 ± 1.0	0.8	4.1	0.9 ± 0.3	0.6	1.3	1.9 ± 0.4	1.6	2.5	3.1 ± 0.9	2.4	4.6	0.5	2.4	2.0	4.3	1.9	3.0	3.8	6.0	5.3	8.7	2.3	2.7	3.9	
9	p-Mentha-1,3,8-triene	994	-	-	-	0.2	0.2 ± 0.2	-	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	α-Phellandrene	996	1167	0.1 ± 0.2	-	0.5	tr	-	0.2	0.4 ± 0.2	0.2	0.7	0.2 ± 0.1	0.1	0.4	-	tr	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	-	-	-	-	-	-	
11	<b>Δ-3-Carene</b>	<b>1005</b>	<b>1150</b>	0.5 ± 0.5	-	1.3	tr	-	0.2	1.1 ± 0.8	0.2	1.9	<b>12.9 ± 9.0</b>	<b>2.7</b>	<b>21.8</b>	0.5	5.5	<b>32.2</b>	0.4	0.3	0.5	0.5	-	-	-	-	-	-	
12	α-Terpinene	1008	1182	tr	-	0.4	tr	-	0.1	3.0 ± 1.8	1.0	5.2	1.9 ± 1.3	0.2	3.6	-	0.1	0.3	2.0	0.6	1.0	1.6	0.1	0.1	0.1	tr	tr	tr	
13	p-Cymene	1011	1273	tr	-	0.1	0.6 ± 0.2	0.3	0.9	1.1 ± 1.0	0.1	2.2	2.0 ± 1.5	0.1	3.6	1.5	tr	0.2	0.2	0.2	0.6	0.1	tr	0.1	0.1	tr	tr	0.1	
14	<b>Limonene*</b>	<b>1020</b>	<b>1203</b>	1.4 ± 0.4	1.0	2.3	1.4 ± 0.4	0.7	1.9	2.0 ± 1.2	0.6	3.3	5.7 ± 5.3	1.0	13.0	<b>9.8</b>	1.5	4.0	9.0	3.3	1.1	5.2	tr	tr	0.1	tr	tr	tr	
15	β-Phellandrene*	1020	1213	4.9 ± 2.2	0.8	7.9	3.6 ± 1.1	1.8	5.3	1.6 ± 0.2	1.5	1.9	1.7 ± 0.4	1.2	2.1	0.2	1.4	1.1	0.6	0.3	0.7	0.3	0.9	0.8	1.1	0.4	0.4	0.7	
16	(Z)-β-Ocimene	1025	1235	-	-	-	-	-	-	0.3 ± 0.3	-	0.8	tr	-	0.1	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
17	(E)-β-Ocimene	1038	1252	-	-	-	-	-	-	0.1 ± 0.2	-	0.5	0.8 ± 1.2	-	2.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
18	γ-Terpinene	1047	1246	tr	-	0.1	tr	-	0.1	5.1 ± 3.1	1.6	9.0	3.2 ± 2.2	0.3	5.9	0.2	0.2	0.5	3.2	0.9	1.7	2.5	0.1	0.1	0.1	tr	tr	-	
19	trans-Sabinene hydrate	1053	1467	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	0.1	0.1	-	-	0.1	0.2	0.8	0.9	-	-	-	-	-	-	
20	p-Cymenene	1072	1440	tr	-	tr	0.3 ± 0.1	0.1	0.4	0.1 ± 0.1	-	0.2	0.2 ± 0.1	-	0.3	0.2	tr	0.2	tr	-	tr	-	tr	tr	0.1	tr	tr	-	
21	<b>Terpinolene</b>	<b>1079</b>	<b>1285</b>	0.8 ± 0.9	0.2	3.2	0.3 ± 0.2	-	0.7	<b>11.3 ± 6.5</b>	<b>3.2</b>	<b>18.0</b>	<b>8.5 ± 5.5</b>	<b>1.1</b>	<b>14.6</b>	0.6	1.2	4.8	1.3	0.4	0.7	1.1	0.6	0.5	0.4	0.1	0.1	-	
22	cis-Sabinene hydrate	1081	1544	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	1.0	-	-	-	-	0.0	-	-	
23	Linalool	1083	1547	tr	-	0.1	0.1 ± 0.2	-	0.5	0.2 ± 0.1	0.1	0.4	0.2 ± 0.3	0.1	0.7	-	0.1	2.3	0.1	-	0.5	-	0.7	0.7	0.4	1.8	1.1	1.4	
24	Fenchol	1099	1582	0.1 ± 0.2	-	0.5	0.2 ± 0.1	-	0.4	0.1 ± 0.1	-	0.2	tr	-	0.2	-	0.1	tr	-	-	-	-	tr	tr	-	-	-	-	
25	Campholenal A	1103	1481	-	-	-	0.9 ± 0.3	0.5	1.7	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
26	Nopinone	1107	1578	-	-	-	0.6 ± 0.2	0.3	0.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
27	Camphor	1120	1520	0.1 ± 0.1	-	0.2	0.3 ± 0.1	0.1	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	0.1	0.1	0.1	0.4	-	-	-	-	-	-	
28	trans-Pinocarveol	1122	1650	0.2 ± 0.2	-	0.6	4.6 ± 1.5	2.5	7.2	-	-	-	tr	-	0.1	0.6	tr	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
29	trans-p-Menth-2-en-1-ol	1125	-	-	-	-	-	-	-	0.1 ± 0.1	-	0.2	0.2 ± 0.1	-	0.3	-	-	-	0.2	0.1	0.2	0.4	-	-	-	-	-	-	
30	trans-Verbenol	1127	1680	tr	-	0.2	1.0 ± 0.7	-	2.0	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	
31	Citronellal	1130	1479	-	-	-	-	-	-	0.1 ± 0.2	-	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
32	Camphene hydrate	1131	1598	tr	-	0.1	0.2 ± 0.1	0.1	0.3	-	-	-	tr	-	0.1	-	0.1	tr	0.1	tr	-	0.4	-	-	-	-	-	-	-
33	Pinocarvone	1137	1572	tr	-	0.1	1.8 ± 0.7	1.1	2.9	-	-	-	tr	-	tr	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
34	trans-Pinocamphone	1139	1507	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.3	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	
35	p-Mentha-1,5-dien-8-ol	1145	1728	-	-	-	3.5 ± 1.4	1.3	5.7	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
36	Borneol	1149	1698	0.4 ± 0.4	tr	1.3	1.5 ± 0.9	0.3	3.6	tr	-	0.1	tr	-	0.1	tr	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	tr	tr	-	-	-	-	
37	p-Methylacetophenone	1151	-	-	-	-	0.1 ± 0.1	-	0.3	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	
38	Cryptone	1156	1661	tr	-	0.1	0.5 ± 0.3	-	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
39	Menth-1,8-dien-4-ol	1158	1677	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1 ± 0.2	-	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
40	p-Cymen-8-ol	1160	1803	0.1 ± 0.1	-	0.2	0.4 ± 0.2	0.2	0.8	tr	-	tr	-	-	0.4	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
41	<b>Terpinen-4-ol</b>	<b>1162</b>	<b>1597</b>	tr	-	0.2	0.2 ± 0.1	0.1	0.4	<b>9.9 ± 6.4</b>	<b>2.5</b>	<b>17.8</b>	<b>9.5 ± 5.3</b>	<b>0.6</b>	<b>15.0</b>	2.0	0.2	0.5	6.4	2.3	3.4	7.4	0.3	0.3	0.3	0.1	0.1	0.1	
42	Myrtenal	1170	1631	tr	-	0.1	2.6 ± 1.1	1.3	5.0	-	-	-	tr	-	0.1	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
43	α-Terpineol	1172	1698	3.0 ± 3.6	0.5	12.2	2.6 ± 1.7	1.2	6.5	2.5 ± 1.3	0.9	3.9	2.2 ± 0.8	1.3	3.5	0.5	2.8	1.3	0.3	0.2	0.3	0.3	1.4	1.4	1.4	0.3	0.2	0.2	
44	<b>Estragole</b>	<b>1173</b>	<b>1679</b>	tr	-	0.1	0.3 ± 0.2	tr	0.8	-	-	-	-	-	-	-	<b>12.6</b>	tr	-	-	-	-	0.5	0.7	0.1	<b>3.0</b>	<b>3.2</b>	<b>1.5</b>	
45	Myrtenol	1178	1789	tr	-	0.1	1.5 ± 0.5	0.9	2.4	-	-	-	tr	-	0.1	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
46	Verbenone	1181	1708	tr	-	0.1	3.5 ± 1.8	0.5	6.5	-	-	-	-	-	-	0.4	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
47	trans-Piperitol	1191	1747	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	-	0.1	-	-	-	0.1	tr	tr	0.1	-	-	-	-	-	-	
48	trans-Carveol	1196	1836	-																									





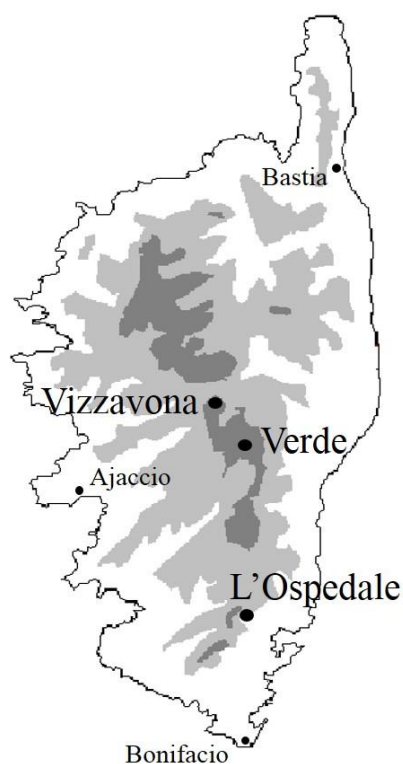


### 3. Experimental

#### 3.1. Plant material, isolation of essential oil

The essential oil samples have been isolated by hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus from different parts of individual tree (500 g; yields given in table 1) harvested on the experimental forest plot, in which each planted tree is individually numbered, of l’Ospedale – southeast of the Corsica (*P. menziesii*, *P. ponderosa*, *S. giganteum*, *C. japonica*), and the managed natural forests of Vizzavona– center of Corsica (*P. menziesii*) and Verde - center of Corsica (*L. decidua*) (Figure 2). Plant material was identified by Ms J. Gross, G. Paolacci and J.M. Morin foresters from the ONF (National Forestry Office) in charge of the sampled forests. Voucher specimens have been deposited at the Conservatoire Botanique National de Corse, (Corte, France), under accession numbers: GG2770 (*P. menziesii*), GG2772 (*P. ponderosa*), GG2773 (*S. giganteum*), GG2774 (*C. japonica*) for experimental forest and GG2771 (*P. menziesii*, Vizzavona), GG2775 (*L. decidua*, Verde), for managed natural forests.

**Figure 2.** Locations of harvest of coniferous.



### 3.2. Gas Chromatography

Analyses were performed on a Clarus 500 PerkinElmer (PerkinElmer, Courtaboeuf, France) system equipped with a FID and two fused-silica capillary columns (50m x 0.22 mm, film thickness 0.25  $\mu\text{m}$ ), BP-1 (polydimethylsiloxane) and BP-20 (polyethylene glycol). The oven temperature was programmed from 60 °C to 220 °C at 2 °C/min and then held isothermal at 220 °C for 20 min; injector temperature: 250 °C; temperature detector: 250 °C; carrier gas: helium (0.8 mL/min); split: 1/60; injected volume: 0.5  $\mu\text{L}$  (50  $\mu\text{L}$  in 350  $\mu\text{L}$  of  $\text{CHCl}_3$ ). The relative amounts of the oil constituents were expressed as percentages obtained by peak-area normalisation, without using correcting factors. Retention indices (RI) were determined relative to the retention times of a series of n-alkanes with linear interpolation (Target Compounds software from PerkinElmer).

### 3.3. Gas Chromatography-Mass Spectrometry in Electron Impact Mode

The essential oil sample was analyzed with a Perkin-Elmer TurboMass detector (quadrupole), directly coupled to a Perkin-Elmer Autosystem XL, equipped with a fused-silica capillary column (50 m x 0.22 mm i.d., film thickness 0.25  $\mu\text{m}$ ), BP-1 (polydimethylsiloxane). Carrier gas, helium at 0.8 mL/min; split: 1:74; injection volume: 0.5  $\mu\text{L}$ ; injector temperature: 250°C; oven temperature programmed from 60°C to 220°C at 2°C/min and then held isothermal at 220 °C for 20 min. Ion source temperature: 250°C; energy ionisation: 70 eV; electron ionisation mass spectra were acquired over the mass range 35-350 Da.

### 3.4. Nuclear Magnetic Resonance

All NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 (100.623 MHz for  $^{13}\text{C}$ ) equipped with a 5-mm probe, in deuterated chloroform ( $\text{CDCl}_3$ ), with all shifts referred to internal tetramethylsilane (TMS). The  $^1\text{H}$  NMR spectra were recorded with the following parameters, pulse width (PW), 4.3 ms; acquisition time, 2.6 s for 32 K data table with a spectral width (SW) of 6000 Hz (15 ppm).  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded with the following parameters: pulse width (PW), 4  $\mu\text{s}$  (flip angle 45°); acquisition time, 2.7 s for 128 K data table with a

spectral width of 24000 Hz (240 ppm); total repetition time, 2.8 s; CPD (composite pulse decoupling) mode decoupling; digital resolution, 0.183 Hz/point.

### **3.5. Identification and quantification of individual components**

Identification of individual components was based: i) on comparison of their GC retention indices (RI) on polar and apolar columns, with those of authentic compounds (König et al., 2001) ii) on computer search using digital libraries of mass spectral data and comparison with published data (Adams, 2007 ; König et al., 2001 ; McLafferty et Stauffer 1994) iii) on comparison of the signals in the  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of the mixtures with those of reference spectra compiled in the laboratory spectral library, with the help of a laboratory-made software (Bighelli et Casanova 2009 ; Tomi et Casanova, 2006).

### **3.6. Statistical analysis**

The principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering analysis (HCA; *Ward's method*) (Figure S2) were performed with PAST (3.02a), (Hammer et al., 2001).



## Article 2. Chemical composition of *Melicope belahe* (Baill.) T. G. Hartley (Rutaceae) leaf essential oil from Madagascar

Delphin J. R. Rabehaja\*, Gabriel Garcia\*, Julie-Marie Charmillon, Odile Désiré, Mathieu Paoli, Panja A.R. Ramanoelina, Félix Tomi

\* Gabriel Garcia and Delphin J. R. Rabehaja contributed equally to this work.



*Melicope belahe* (Baill.) T.G. Hartley (Rutaceae) is an endemic species to Madagascar. The chemical composition of leaf essential oil is reported for the first time. A sample was extracted by hydrodistillation and analysis was carried out by combination of chromatographic (GC), spectroscopic and spectrometric (MS,  $^{13}\text{C}$ -NMR) techniques. In total, 56 compounds have been identified. The chemical composition was dominated by  $\alpha$ -pinene (42.6%) followed by linalool (6.2%) and (*E*)- $\beta$ -caryophyllene (5.2%).

**Keywords:** *Melicope belahe*, leaf essential oil, Madagascar

**Published article:** Nat. Prod. Res. 2017, 31, 224-227.

## 1. Introduction

*Melicope belahe* (Rutaceae) is reported for the first time as *Euodia belahe* Baill. (Baillon, 1886) since all *Euodia* species growing wild in Madagascar and in the Mascarene Islands were transferred to *Melicope* (Matu, 2011). Hartley (2001) proposed a major revision, concerning all species of *Euodia* from Madagascar and the Mascarene Islands, all species belonging *Euodia*, *Evodia* and *Melicope* were integrated to the genus *Melicope*. A phylogenetic analysis sampled about 50% of the 235 accepted species of *Melicope* displayed that all species from Madagascar and the Mascarene Islands were part in clade 3 – section *Lepta* (Appelhans et al., 2014). *Melicope* is found from the Malagasy and Indo-Himalayan regions to Hawaiian and Marquesas Islands and New Zealand (Matu, 2011). Nineteen species occurred in the Indian Ocean islands whereas 11 species are endemic to Madagascar (Matu, 2011) including *M. belahe* (Hartley, 2001) investigated in this work.

The chemical composition *Melicope madagascariensis* leaf oil was characterised by limonene (50.1%) as major component followed by  $\gamma$ -terpinene (8.8%) and  $\beta$ -eudesmol (4.0%) (Hartley, 2001). Brophy et al. (2004) described the leaf oil compositions of 14 species of the genus *Euodia* and *Melicope*, growing in Australia, which exhibited several chemical compositions. The chemical composition of *Melicope obscura* (Cordem.) T.G. Hartley leaf essential oil growing in Reunion Island is characterised by high amounts of linalool (25.1–65.1%) and a rare oxygenated sesquiterpene, melicopenol (8.6–30.1%) (Smadja et al., 2010). A rare sesquiterpene ketone, zierone (22.49%), was identified in *Melicope denhamii* leaf oil (George et al., 2015).

In the course on ongoing work on the chemical study of medicinal and aromatic plants of Madagascar, we investigated the essential oil of *M. belahe* known as local name Belahy. To the best of our knowledge, the oil composition is not described in the literature.

## 2. Results and discussion

The chemical composition of leaf essential oil of *M. belahe* is described in Table 1. Essential oil and chromatographic fractions were analysed by combination of GC(RI), GC-MS and <sup>13</sup>C-NMR. Major components were identified by GC-MS and <sup>13</sup>C-NMR. In total, 56 components were identified and represented 92.4% of the whole composition (Table 1), which was

dominated by monoterpenes (53.8%).  $\alpha$ -Pinene (42.6%) was the major component, followed by linalool (6.2%), (*E*)- $\beta$ -caryophyllene (5.4%),  $\beta$ -elemene (4.4%), (*E*)- $\beta$ -ocimene and  $\beta$ -selinene (3.6% each). Various oxygenated sesquiterpenes were identified in appreciable contents: selin-11-en-4 $\alpha$ -ol (1.8%), and caryophyllene oxide (1.3%). Acyclic non terpene compounds were represented by hexan-1-ol (0.3%), (*Z*)-hex-3-en-1-ol (0.2%) and (*Z*)-hex-2-en-1-ol (0.1%). Considering the percentage of  $\alpha$ -pinene, leaf oil composition is close to those of *Melicope broadbentiana* ( $\alpha$ -pinene, 56.9%), *Melicope micrococca* ( $\alpha$ -pinene, 45.4%) and *Melicope vitifloral* ( $\alpha$ -pinene, 30.2%) oils from Australia (Brophy et al., 2004). Concerning linalool (6.2% in our oil), this compound was usually found in *Melicope* oils and similar percentages were found in leaf oil of *Melicope bonwickir* from Australia (7.2%) (Brophy et al., 2004). Moreover, melicopenol, identified for the first time in *M. obscura* oil from Reunion Island, was not identified herein (Smadja et al., 2010). Finally, and taking into account the percentages of  $\alpha$ -pinene and linalool, the chemical composition of leaf essential oil sample of *M. belahe* was very close to that of *M. broadbentiana* (56.9% of  $\alpha$ -pinene and 1.1% of linalool) (Brophy et al., 2004).

**Table 1.** Chemical composition of Malagasy *Melicope belahe* leaf essential oil.

No	Compounds	tr <sup>a</sup>	R <sub>1a</sub>	R <sub>1p</sub>	Percentage	Identification
1	( <i>Z</i> )-Hex-3-en-1-ol	13.28	833	1387	0.2	RI, MS
2	Hexan-1-ol	13.73	842	1353	0.3	RI, MS
3	( <i>Z</i> )-Hex-2-en-1-ol	13.88	846	1406	0.1	RI, MS
4	$\alpha$ -Pinene	18.40	932	1021	42.6	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
5	Camphene	19.16	944	1071	0.2	RI, MS
6	Sabinene	20.45	965	1127	0.1	RI, MS
7	$\beta$ -Pinene	20.80	971	1116	1.2	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
8	Myrcene	21.35	980	1165	1.7	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
9	<i>p</i> -Cymene	23.36	1012	1227	0.1	RI, MS
10	Limonene*	24.01	1021	1206	2.8	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
11	$\beta$ -Phellandrene*	24.01	1021	1216	0.2	RI, MS
12	( <i>Z</i> )- $\beta$ -Ocimene	24.23	1025	1236	1.3	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
13	( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimene	25.00	1036	1254	3.6	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
14	<i>cis</i> -Linalol oxide THF	26.64	1060	1440	tr	RI, MS
15	<i>p</i> -Cymenene	27.48	1072	1277	tr	RI, MS
16	Linalool	28.22	1083	1550	6.2	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
17	<i>trans</i> -Pinocarveol	31.03	1124	1647	0.1	RI, MS
18	<i>trans</i> -Verbenol	31.34	1129	1684	tr	RI, MS

19	Pinocarvone	32.17	1141	1578	tr	RI, MS
20	Terpinen-4-ol	33.67	1162	1600	0.1	RI, MS
21	$\alpha$ -Terpineol	34.37	1173	1693	0.2	RI, MS
22	Verbenone	35.03	1182	1702	tr	RI, MS
23	$\alpha$ -Campholenol	35.18	1184	1787	tr	RI, MS
24	<i>trans</i> -Carveol	36.09	1197	1839	tr	RI, MS
25	Geraniol	38.53	1233	1839	tr	RI, MS
26	Geranial	39.29	1244	1734	tr	RI, MS
27	Neryl acetate	45.75	1341	1727	0.1	RI, MS
28	$\alpha$ -Cubebene	46.27	1350	1462	0.1	RI, MS
29	$\alpha$ -Copaene	48.06	1377	1497	0.2	RI, MS
30	$\beta$ -Panasinsene	48.31	1381	1518	0.2	RI, MS
31	$\beta$ -Bourbonene	48.59	1385	1524	1.0	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
32	$\beta$ -Elemene	48.83	1389	1595	4.4	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
33	( <i>E</i> )- $\beta$ -Caryophyllene	50.77	1420	1603	5.2	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
34	$\beta$ -Copaene	51.30	1428	1583	0.2	RI, MS
35	<i>trans</i> - $\alpha$ -Bergamotene	51.61	1433	1578	0.1	RI, MS
36	$\alpha$ -Guaiene	51.82	1437	1588	0.5	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
37	Isogermacrene D	52.18	1443	1651	0.1	RI, MS
38	$\alpha$ -Humulene	52.79	1453	1676	3.1	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
39	<i>allo</i> -Aromadendrene	53.24	1460	1651	0.3	RI, MS
40	$\gamma$ -Muurolene	54.02	1472	1680	0.8	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
41	Selina-4,11-diene	54.22	1475	1670	0.1	RI, MS
42	Germacrene D	54.35	1478	1715	0.8	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
43	$\beta$ -Selinene	54.73	1484	1726	3.6	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
44	$\alpha$ -Selinene	55.06	1489	1720	0.4	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
45	Bicyclogermacrene	55.29	1493	1730	2.2	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
46	Germacrene A	55.79	1501	ND	1.3	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
47	$\gamma$ -Cadinene	56.20	1508	1765	0.3	RI, MS
48	$\delta$ -Cadinene	56.63	1515	1762	0.8	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
49	$\beta$ -Elemol	57.80	1535	2085	0.3	RI, MS
50	( <i>E</i> )-Nerolidol	58.53	1548	2040	0.1	RI, MS
51	Caryophyllene oxide	59.99	1572	1992	1.3	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
52	Humulene oxide II	61.4	1596	2049	0.7	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
53	(1,10)- <i>di-epi</i> -Cubenol	62.31	1612	2072	0.2	RI, MS
54	Selin-11-en-4 $\alpha$ -ol	63.83	1640	2260	1.8	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
55	$\beta$ -Eudesmol	63.99	1643	2237	0.9	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
56	( <i>E</i> )-Phytol	88.33	2098	2612	0.3	RI, MS
<b>Total identified</b>					<b>92.1</b>	

Notes: Order of elution and percentages of individual components are given on apolar capillary column (BP-1) except for compounds indicated by an asterisk \* (polar column BP20); tr<sup>a</sup>, Retention times (minutes) measured on apolar column; RI<sub>a</sub>, RI<sub>p</sub>: Retention indices measured on apolar and polar columns, respectively; tr = trace (<0.05%); ND: not detected.



### **3. Experimental**

#### **3.1. Plant collection**

Leaves of *M. belaha* were collected in Joffre-Ville, Northern Madagascar, in November 2014. The plant was identified by Rakotonandrasana Stéphan Richard. A voucher specimen was deposited in the Centre National de Recherche Pharmaceutique (CNARP, Antananarivo, Madagascar) under the accession ST1497.

#### **3.2. Botanical description**

*M. belaha* is a tree, 12 to 15m high; thick boughs, heavily streaked-costulae (5-10mm diameter at the ends) young stems, petioles, petiolules and ribs of the underside of the leaflets, warty-puberulous. Leaves opposite, trifoliate, somewhat leathery, green and almost homochromes on dry; petiole 3 to 10cm; long, narrowly channeled above; petiolules 1 to 10 mm long, the longest median that side; somewhat uneven leaflets obovate side (7.5-12 x 4-5,3cm) non-equilateral corners at the base, obovate-cuneate also the median, but larger (12-16 x 6-7cm) and equilateral all rounded at the top, with no trace of cusp or acumens; secondary ribs (nervure or veins) more visible below than above, few (7-9 pairs); direct, visible dark dots on the underside of the leaf blade; by transparency, citrus-like dots very fine and very dense. Axillary or terminal panicles, in very shaded parts of rain forest, around 900 to 1000m; flowers with 4 stamens (Baillon, 1886).

#### **3.3. Extraction and fractionation of essential oil**

The oil sample was isolated by hydrodistillation for 3h using a Clevenger-type apparatus from leaves (910 g). Yield, calculated on fresh mass basis (w/w), was 0.07%. *M. belaha* leaf oil (500 mg) was subjected to column chromatography (Silica gel 15 g, 63-200 µm) leading to a hydrocarbon fraction HF (387 mg) and an oxygenated fraction OF (95 mg).

### 3.4. Gas chromatography (GC)

Essential oil sample analysis was performed on Perkin-Elmer Clarus 500 gas chromatograph (FID) equipped two fused silica capillary columns (50 m x 0.22 mm, 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness) BP-1 (polydimethylsiloxane) and BP-20 (polyethylene glycol). The oven temperature was programmed as follow: 60-220°C at 2°C/min and then held isothermal at 220°C for 20 min. The carrier gas was hydrogen, at a flow of 1.0 mL/min; injector port and detector temperature were 250°C. Sample was injected by splitting and the split ratio was 1:60. The relative proportions of the oil constituents were expressed as percentages obtained by peak area normalisation, Retention indices (RI) were determined relative to the retention times of a series of n-alkanes (C7-C28) with linear interpolation ("Target Compounds" software from Perkin-Elmer). The relative proportions of the oil constituents were expressed as percentages obtained by peak area normalisation without using correcting factors.

### 3.5. Mass spectroscopy (GC-MS)

GC-MS analyses were carried out using a Agilent Technologie 7890A detector (quadrupole), directly coupled to a Agilent Technologie 5975C, equipped with a fused-silica capillary column (30 m x 0.25 mm i.d., film thickness 0.25  $\mu\text{m}$ ), HP-MS 5% phenylmethylsiloxane. Carrier gas, helium at 1.0 mL/min; split, 1:80; injection volume, 0.2  $\mu\text{L}$ . The injection port was set at 250°C; the oven temperature was programmed from 60°C to 250°C at 4°C/min. Significant quadrupole MS operating parameters: Ion source temperature, 150°C; electron impact ionisation at 70 eV with scan mass range of 33-350  $m/z$ .

### 3.6. $^{13}\text{C}$ Nuclear magnetic resonance (NMR)

$^{13}\text{C}$  NMR analyses (essential oil and CC fractions) were performed on a Bruker AVANCE 400 Fourier Transform spectrometer operating at 100.623 MHz for  $^{13}\text{C}$ , equipped with a 5 mm probe, in deuterated chloroform ( $\text{CDCl}_3$ ), with all shifts referred to internal tetramethylsilane (TMS).  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded with the following parameters: pulse width (PW), 4  $\mu\text{s}$  (flip angle 45°); acquisition time, 2.73 s for 128 K data table with a spectral width (SW) of 22 000 Hz (220 ppm); CPD mode decoupling; digital resolution 0.183 Hz/pt. The number of

accumulated scans was 3000 (50 mg of the mixture in 0.5 mL of CDCl<sub>3</sub>). Exponential line broadening multiplication (1.0 Hz) of the free induction decay was applied before Fourier transformation.

### **3.7. Identification of components**

Identification of individual components was based: (a) on comparison of their GC retention indices (RI) on polar and apolar columns, determined relative to the retention times of a series of *n*-alkanes with linear interpolation (Target Compounds software of Perkin-Elmer), with those of authentic compounds (b) on computer search using digital libraries of mass spectral data and comparison with published data (Adams, 2007 ; König et al., 2001 ; National Institute of Standards and Technology, 1999) (c) on comparison of the signals in the <sup>13</sup>C NMR spectra of essential oils and the two fractions of chromatography with those of reference spectra compiled in the laboratory spectral library, with the help of a laboratory-made software (Bighelli et Casanova, 2009 ; Tomi et Casanova, 2006).



# **Chapitre III :**

**Composés thermosensibles et  
différentiation de diastéréoisomères**



La composition chimique des huiles essentielles est, couramment obtenue par association de deux techniques analytiques. La première que l'on peut qualifier de « technique de quantification » est la GC-FID alors que la seconde que l'on qualifie de « technique d'identification » est la GC-MS. La GC possède un très haut pouvoir de résolution surtout si on utilise des colonnes capillaires de polarités orthogonales. Les constituants d'un mélange sont individualisés (sur la GC) selon leurs températures de vaporisation et leurs polarités, c'est ce dernier paramètre qui influence directement l'affinité que peut avoir chaque constituant avec les phases stationnaires. Le détecteur MS a pour but de fragmenter les constituants à la sortie des colonnes, les fragments obtenus constituent le spectre de masse de la molécule qui est ensuite comparé avec ceux contenus dans les bibliothèques spectrales.

Le passage en quelques microsecondes d'un mélange à l'état vapeur n'est pas une opération neutre et la présence de molécules thermosensibles génèrera des analyses erronées autant par l'aspect quantitatif que par l'aspect qualitatif avec l'apparition de « faux positifs ». L'identification de molécules possédant des spectres de masse insuffisamment différenciés associés à des indices de rétention voisins voire identiques sur les deux colonnes comme peuvent l'être ceux de diastéréoisomères est aussi une difficulté rencontrée lors de l'analyse des huiles essentielles.

Au cours de ce troisième chapitre, nous nous sommes consacrés à l'analyse des huiles essentielles de deux espèces endémiques de la flore malgache, qui illustrent ces difficultés analytiques.

*Vepris unifoliolata* dont l'huile d'écorces est constituée par la forte teneur en molécules ayant le squelette (*E,E*)-1,5-cyclodécadiénique. Ces molécules sont connues pour être thermosensibles, et se dégradent selon une transposition de Cope dans les injecteurs de la GC. Ce réarrangement induit inévitablement des erreurs de quantification mais affectent aussi l'identification des constituants. La combinaison de la RMN <sup>13</sup>C avec la GC(RI), a permis d'identifier les molécules réellement présentes dans le mélange et de proposer une approche quantitative plus réaliste. Cette approche permet aussi de s'assurer que les dérivés possédant le squelette élémène ou furanoélémane sont bien présents dans le mélange et ne constituent pas des artefacts apparus dans l'injecteur.

Les huiles essentielles de *Cinnamosma madagascariensis* constituent un exemple de la difficulté analytique créée par la présence de diastéréoisomères. Le cyclosativène et le

cyclocopacamphène sont épimères et présentent des RI et des spectres de masse très proches. Le premier, commercialement disponible, est très souvent signalé dans la composition chimique des huiles essentielles, le second est beaucoup moins connu (absent des banques MS et ses valeurs de RMN  $^{13}\text{C}$  ne sont pas reportées dans la littérature). Il est fort probable que la présence du cyclosativène associée à l'absence du cyclocopacamphène dans les banques de données conduisent à l'identification du cyclosativène en lieu et place du cyclocopacamphène. Nous reportons pour la première fois les données spectrales en RMN  $^{13}\text{C}$  du cyclocopacamphène.

L'utilisation de la RMN  $^{13}\text{C}$  en complément des analyses par GC(RI) et GC-MS, apporte incontestablement une plus grande fiabilité dans l'identification des composés mais aussi dans l'approche quantitative. L'enregistrement du spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  réalisé à température ambiante met immédiatement en évidence les incohérences du profil chromatographique d'une huile essentielle qui contient des molécules thermosensibles. Enfin, et parce que la moindre modification structurale se manifeste sur la série de déplacements chimiques d'un composé, la RMN  $^{13}\text{C}$  se révèle un outil efficace pour l'identification des diastéréoisomères.



### **Article 3. Chemical composition of leaf and bark essential oils of *Vepris unifoliolata* from Madagascar**

Gabriel Garcia, Julie-Marie Charmillon, Elodie Roux, Sylvain Sutour, Jean Bertieu Rakotozafy, Odile Desire, Mathieu Paoli, Felix Tomi, Delphin J. R. Rabehaja

The chemical composition of leaf essential oil of *Vepris unifoliolata* was characterized by hydrocarbon monoterpenes,  $\alpha$ -pinene (60.5%), myrcene (6.8%), limonene (5.1%), (*E*)- $\beta$ -ocimene (4.9%) and  $\beta$ -phellandrene (4.7%). The chemical composition of bark essential oil of *V. unifoliolata* was original and characterized by a high content in heat-sensitive compounds: isofuranodiene (43.9%) and germacrone (17.1%). These compounds bearing the (*E,E*)-1,5-cyclodecadiene structure were known to rearrange and degrade during the GC-FID and GC-MS. The true content of isofuranodiene/curzerene, germacrone/*trans*- $\beta$ -elemenone, germacrene A/ $\beta$ -elemene and germacrene B/ $\gamma$ -elemene was evaluated by combination of  $^{13}\text{C}$ -NMR data (intensities of signals of selected carbons) and GC-FID. Thus, a correct quantitative analysis of bark oil of *V. unifoliolata* was provided.

**Keywords:** *Vepris unifoliolata*, heat-sensitive compounds,  $^{13}\text{C}$ -NMR, isofuranodiene, germacrone

**Published article:** J. Essent. Oil Res. 2017, 29, 214-220.

## 1. Introduction

The genus *Vepris* (*Rutaceae*) includes around 80 species mainly occurring in the tropical areas of Africa, Arabia and India. Among them, 28 are endemic to Madagascar. The most well-known are *Vepris elliotii*, *Vepris madagascarica*, *Vepris macrophylla* and *Vepris unifoliolata*. In traditional medicine, these plants are used against several diseases such as pneumonia, eye troubles, to treat the rheumatism and the malaria, as an aphrodisiac or also to fight against the infertility. These different activities are due to the presence of limonoids and alkaloids (Imbenzi et al, 2014).

Several studies reported the alkaloid chemical composition of the *Vepris* genus. For example, Vaquette identified three alkaloids (masculine, skimmiamine and kokusaginine) in the petroleum spirit and the chloroform extract of the leaves of *V. unifoliolata* (Vaquette, 1974). Concerning the essential oils of *Vepris* genus, five species growing in Madagascar have been investigated. In 1973, *V. madagascarica* oil has been investigated by Billet et Favre-Bonvin (1973). Five components were identified by GC-MS:  $\alpha$ -pinene, *p*-cymene, eugenol, eugenol methyl and estragol (Billet et Favre-Bonvin, 1973). Furthermore, (*E*)-anethole was found as the major compound (78.2–84.6%) of the *V. madagascarica* leaf and trunk bark essential oil (Rabehaja et al., 2013). *V. elliotii* produced an essential oil with terpinolene (49.7%) and the (*E*)-anethole (23.5%) as major components (Poitou, 1995). The essential oil of *V. macrophylla* was characterized by three oxygenated monoterpenes: geranial (33.2%), neral (23.1%) and citronellol (14.5%) (Maggi et al., 2013). The main compounds of *V. leandriana* essential oils harvested in Mananara (North Eastern of Madagascar) were citronellol (33.2–33.6%), geranial (27.0–33.0%) and neral (19.5–21.8%) (Rakotondraibe et al., 2001). Finally,  $\beta$ -elemene was the unique identified compound reported by Vaquette in *V. unifoliolata* (syn: *Teclea unifoliolata*) essential oil (Vaquette, 1974).

From a botanical point of view, *V. unifoliolata* is an evergreen tree that can be up to 20 m high. The petiole is relatively short (1–2 cm long). The leaflet is more or less petiolate (1–5 mm long), oblong or oblong-lanceolate (9–17 cm x 2.7–5.5 cm), of variable size and shape but more or less attenuated to the two ends. Short corner at the base sometimes slightly acuminate or cusp at the top. The venation is dense and very fine, a little more visible and protruding upward. Leaflet punctuation is very dense and very fine, barely visible or not by direct light on the underside; more visible item of pale yellow by transparency. The male

inflorescences are axillary shorter than the leaf or matching it, blackish, glabrous or glabrescent, panicle more or less branched. The male flower has a wide calyx (1–5 mm), short lobe subvalvate and rounded. The petals are valvate (3.2 mm x 1.2 mm), obtuse, reflected at anthesis. The stamens are 3–4 mm long. The filaments are hairless. The anther is elliptical (1.4 mm x 0.8 mm), and introrse dorsifixe. The stigma has four small bumps. The carpel is sterile glabrous, narrowly shaped as an elongated bottle extended by a barely capitate, if any, style of 2 mm high. The female flowers are cyme paniculiform much shorter and less branched pauciflorous. The calyx is similar. The petals are longer and narrower. The four staminodes are as long as the ovary. The black ovary is hairless with some glandular points. The sessile stigma is peltate and as wide as the ovary. The fruit is ovoid or subglobose (7–10 mm x 6 mm), monospermous (Humbert, 1950).

The aim of the present work was to describe the chemical compositions of the leaf and bark essential oils of *V. unifoliolata*. The analyses were conducted by GC Retention Indices (RI), GC-MS combined with <sup>13</sup>C-NMR. We were challenged by the identification and quantification of thermolabile compounds, precisely, derivatives of germacrane. Indeed, it appeared in the analysis of the bark oil that the contents of a given derivative germacrane and its corresponding rearranged elemene derivative calculated by GC-FID was not in agreement with the relative intensities of the signals measured in the <sup>13</sup>C-NMR spectrum (Baldovini et al., 2001 ; Ouattara et al., 2013).

## 2. Results and discussion

### 2.1. Leaf essential oil

The composition of the leaf essential oil has been investigated by combination of GC(RI), GC MS and <sup>13</sup>C-NMR (Table 1). Twenty-nine compounds were identified accounting for 94.5% of the whole composition. The major components were monoterpene hydrocarbons:  $\alpha$ -pinene (60.5%), myrcene (6.8%), limonene (5.1%), (*E*)- $\beta$ -ocimene (4.9%),  $\beta$ -phellandrene (4.7%),  $\beta$ -pinene (1.8%) and sabinene (3.8%). In addition, linalool (1.8%) was present in an appreciable amount. This chemical composition was different with those reported in Madagascar Island and concerning other *Vepris* species. Indeed, the studied oil contained several monoterpene hydrocarbons, whereas phenylpropanoids and oxygenated monoterpenes were the major

components in *V. elliotii*, *V. madagascariensis*, *V. leandriana* and *V. macrophylla* oils (Billet et Favre-Bonvin, 1973 ; Maggi et al., 2013 ; Poitou, 1995 ; Rabehaja et al., 2013 ; Rakotondraibe et al., 2001).

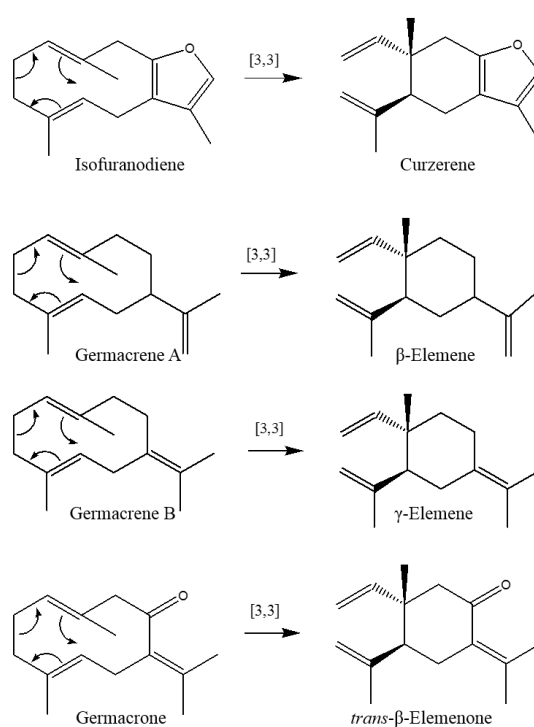
**Table 1.** Chemical composition of the leaf and bark essential oils from *V. unifoliolata*.

No	Components <sup>a</sup>	Rlit <sup>b</sup>	RI <sub>a</sub> <sup>c</sup>	RI <sub>p</sub> <sup>c</sup>	Leaf oil	Bark oil	Identification
1	α-Pinene	936	933	1020	60.5	-	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
2	Camphene	950	945	1069	0.5	-	RI, MS
3	Sabinene	973	967	1126	3.8	-	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
4	β-Pinene	978	972	1115	1.8	-	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
5	Myrcene	987	982	1164	6.8	-	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
6	p-Cymene	1015	1013	1276	0.1	-	RI, MS
7	Limonene*	1025	1022	1205	5.1	-	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
8	β-Phellandrene*	1023	1022	1215	4.7	-	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
9	(Z)-β-Ocimene	1029	1025	1235	0.5	-	RI, MS
10	(E)-β-Ocimene	1041	1037	1253	4.9	-	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
11	Linalool	1086	1084	1549	1.8	-	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
12	trans-Pinocarveol	1126	1122	1641	0.2	-	RI, MS
13	Pinocarpone	1137	1129	1561	tr	-	RI, MS
14	Terpinen-4-ol	1164	1164	1608	0.3	0.2	RI, MS
15	Methyl geraniate	1306	1301	1682	0.1	0.1	RI, MS
16	δ-Elementene	1340	1338	1476	0.3	1.1	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
17	β-Elementene**	1389	1390	1596	0.9	2.7	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
18	Cyperene	1402	1404	1534	-	0.2	RI, MS
19	(E)-β-Caryophyllene	1421	1421	1604	0.2	3.1	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
20	γ-Elementene**	1429	1430	1644	-	0.8	RI, MS
21	α-Humulene	1455	1454	1677	tr	0.5	RI, MS
22	Germacrene D	1479	1479	1717	1.2	4.8	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
23	Isofuranodiene**	-	-	-	-	43.9	<sup>13</sup> C NMR
24	Curzerene**	1485	1487	1880	tr	9.6	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
25	α-Selinene	1494	1490	1722	-	0.2	RI, MS
26	Bicyclogermacrene	1494	1495	1727	-	0.6	RI, MS
27	Germacrene A**	1503	1502	-	0.1	0.6	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
28	Germacrene B**	1552	1555	1837	0.2	5.3	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
29	Caryophyllene oxide	1578	1573	1993	0.2	0.2	RI, MS
30	trans-β-Elementone**	1589	1585	2099	-	0.5	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
31	Germacra-1(10),5-dien-4α-ol	1611 <sup>#</sup>	1610	2187	-	2.0	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
32	Alismol	1619	1614	2263	-	0.8	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
33	Isospathulenol	1625	1628	2233	0.1	0.2	RI, MS
34	Germacrone**	1684	1680	-	-	17.1	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>Total</b>					<b>94.3</b>	<b>94.4</b>	

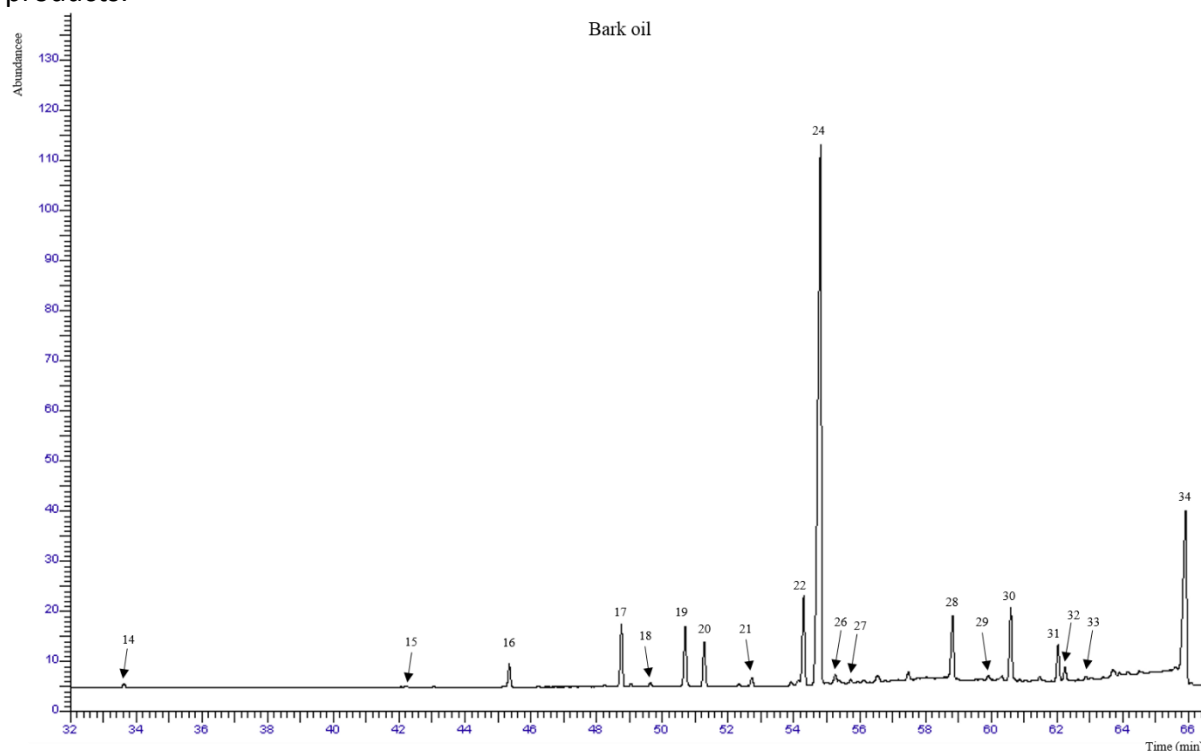
Notes: <sup>a</sup>Order of elution and relative percentages of individual components are given on apolar column (BP-1), excepted those with an asterisk (\*), percentages on polar column (BP 20); <sup>b</sup>Rlit: retention indices according to Tepenoids Library Website (König et al., 2001) otherwise stated; <sup>c</sup>RI<sub>a</sub>, RI<sub>p</sub> = retention indices measured on apolar and polar capillary columns, respectively; \*\*Percentages calculated by combination of <sup>13</sup>C-NMR and GC-FID; tr = trace level (<0.05%). <sup>#</sup>Retention index according to Sutour et al. (Sutour et al., 2015a).

## 2.2. Bark essential oil

The composition of the bark essential oil has been carried out by GC(RI), GC-MS, and  $^{13}\text{C}$ -NMR. Twenty-one components were identified (Table 1, Figure 2). However, a discrepancy appears when we compared the GC(RI) data with the  $^{13}\text{C}$ -NMR data about the thermosensitive components listed in Table 2. These sesquiterpenes bearing the (*E,E*)-1,5 cyclodecadiene structure known to undergo thermal rearrangement through a [3,3] sigmatropic reaction. Such a rearrangement was evidenced by comparing the contents of a given germacrane and the corresponding elemene calculated by GC-FID with the relative intensities of the signals of both molecules in the  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of the mixture, recorded at room temperature to avoid thermal rearrangement (Figure 3). We suggest to quantify these components using combination of  $^{13}\text{C}$ -NMR and GC-FID data. The data were reported in the Tables 1 and 2 and in Figures 1 and 3. Maggi et al. (2012 ; 2015) developed another method to quantify heat-sensitive compounds such as isofuranodiene/curzerene and germacrone based on HPLC-DAD. Isofuranodiene was the major constituent of *Smyrniium olusatrum* L. oil and reported in the literature as having several properties: a significant anticancer activity (Li et al., 2016 ; Quassinti et al., 2014), this compound was also neuroactive and allowed to fight against neurodegenerative diseases (Mustapha et al., 2016).



**Figure 1.** Structure of thermolabile compounds and the corresponding rearrangement products.



Note: Numbering of peaks of identified components (Table 1)

**Figure 2.** Gas chromatogram on apolar column (BP-1) of bark sample of *Vepris unifoliolata* essential oil.

### 2.2.1. Isofuranodiene/curzerene

In the case of isofuranodiene/curzerene, a discrepancy between, on the one hand, the GC FID analysis and, on the other hand, combination of GC-FID and  $^{13}\text{C}$ -NMR was very important. By GC-MS, curzerene (RIa/RIp = 1487/1880) was identified and accounted for 45.4% while isofuranodiene is not detected. The corrected percentage of isofuranodiene and curzerene was obtained taking into account the partial degradation of isofuranodiene described by Baldovini et al. (2001).

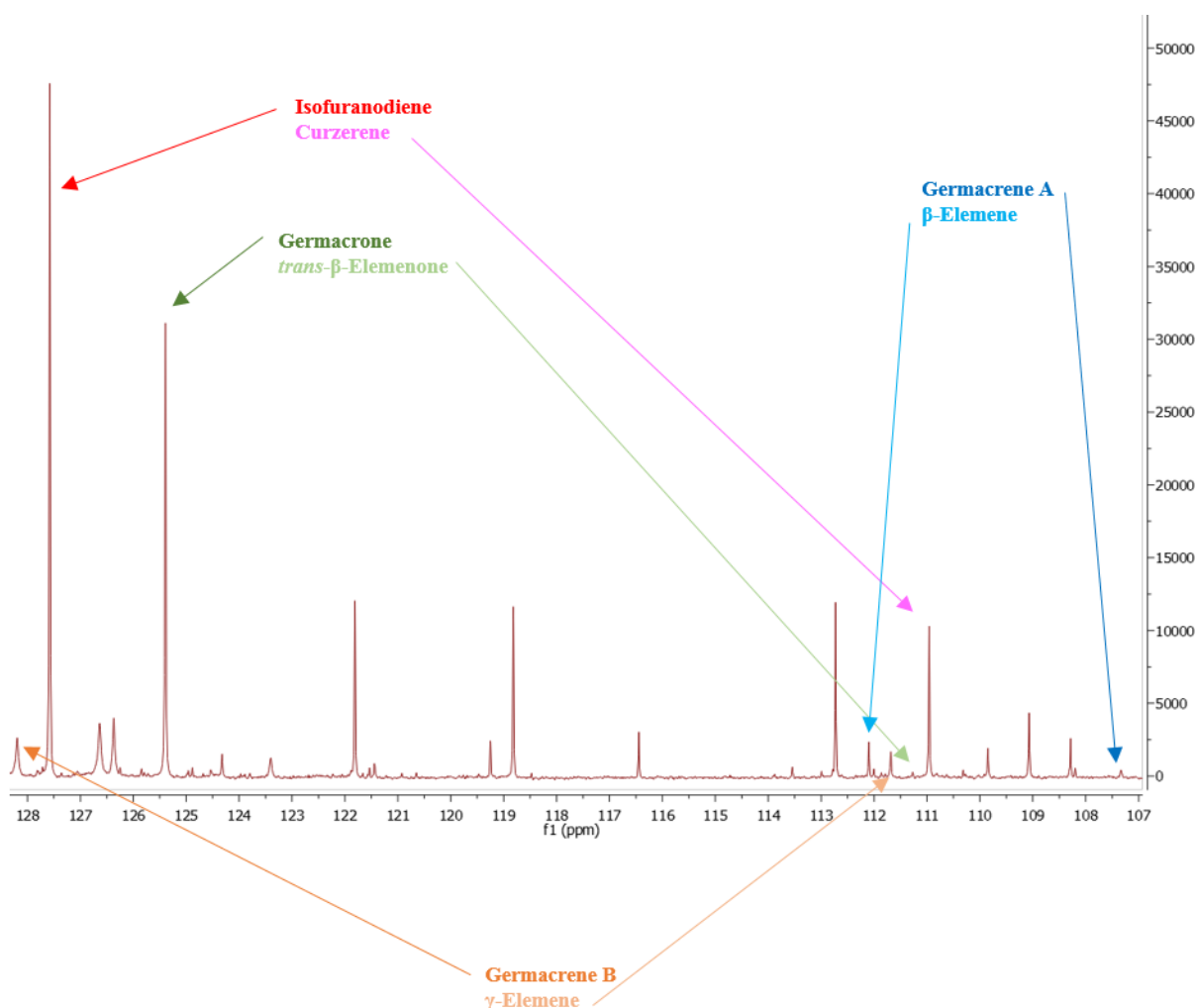
### 2.2.2. Germacrone/*trans*- $\beta$ -elemenone

The germacrone, a ketone, was derived from the germacrene B. During the GC-FID analysis, it was transformed into *trans*- $\beta$ -elemenone. Comparing the results obtained by GC(RI) and GC-MS (germacrone/*trans*- $\beta$ -elemenone: 16.2/4.5%) on one hand and by combination of  $^{13}\text{C}$ -NMR and GC-FID on the other hand (germacrone/*trans*- $\beta$ -elemenone: 17.1/0.5%), it was

evident that, under our GC experimental conditions, germacrone rearranged partially to *trans*- $\beta$ -elemenone and this last compound was over evaluated.

### 2.2.3. Germacrene A/ $\beta$ -elemene and germacrene B/ $\gamma$ -elemene

Germacrene A was detected with a low percentage (0.2%) by GC-FID and GC-MS. According to our quantification method, its percentage was under evaluated (0.6%), whereas  $\beta$ -elemene was over evaluated (3.7 vs. 2.7%). Germacrene B was also transformed into  $\gamma$ -elemene during the GC-FID analysis. In the same way, germacrene B was under estimated (4.3 vs. 5.3%), whereas the corresponding  $\gamma$ -elemene was highly over evaluated (2.7 vs. 0.8%). The chemical composition of bark essential oil appeared original and characterized by a high content of heat-sensitive components. Combined analysis including  $^{13}\text{C}$ -NMR, appeared efficient to identify and quantify germacrane/elemene derivatives in essential oils.



**Figure 3.** Part of  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of *V. unifoliolata* bark essential oil.



**Table 2.** Comparison of percentages obtained by GC and calculated by combination of GC and  $^{13}\text{C}$ -NMR

	% GC-FID <sup>a</sup>	% calculated <sup>b</sup>
Isofuranodiene	-	43.9
Curzerene	45.4	9.6
Germacrene A	0.2	0.6
$\beta$ -Elemene	3.7	2.7
Germacrene B	4.3	5.3
$\gamma$ -Elemene	2.7	0.8
Germacrone	16.2	17.1
<i>trans</i> - $\beta$ -Elemenone	4.5	0.5

<sup>a</sup> measured on GC-FID ; <sup>b</sup> by combination of  $^{13}\text{C}$ -NMR and GC-FID

### 3. Experimental

#### 3.1 Plant material

Two essential oil samples have been isolated by water distillation using a Clevenger-type apparatus from leaves and the bark of *V. unifoliolata* trees harvested in Joffreville (extreme north of Madagascar). The plant was identified by Rakotonandrasana Stephan Richard and a Voucher specimen was deposited in the Centre National de Recherche Pharmaceutique (CNARP, Antananarivo, Madagascar) under the accession ST1498. Yields, calculated on 100 g leaves and 218.9 g bark were, respectively 1.07 and 0.13%.

#### 3.2. Analytical GC

Analyses were performed on a Clarus 500 PerkinElmer (PerkinElmer, Courtaboeuf, France) system equipped with a FID and two fused-silica capillary columns (50 m x 0.22 mm, film thickness 0.25  $\mu\text{m}$ ), BP-1 (polydimethylsiloxane) and BP-20 (polyethylene glycol). The oven temperature was programmed from 60 to 220°C at 2°C/min and then held isothermal at 220°C for 20 minutes; injector temperature: 250°C; temperature detector: 250°C; carrier gas: helium (0.8 mL/min); split: 1/60; injected volume: 0.5  $\mu\text{L}$ . The relative proportions of the oil

constituents were expressed as percentages obtained by peak-area normalization, without using correcting factors. RI were determined relative to the retention times of a series of n alkanes with linear interpolation (Target Compounds software from PerkinElmer).

### 3.3. GC-MS analysis

Both oil samples were analyzed with an Agilent Technologie 7890 A spectrometer (quadrupole), directly coupled to an Agilent Technologie 5975C chromatograph, equipped with a fused-silica capillary column (30 m x 0.25 mm i.d. film thickness 0.25  $\mu\text{m}$ ), HP-MS 5% phenylmethylsiloxane. Carrier gas, helium at 1.0 mL/min; split, 1:80; injection volume, 0.2  $\mu\text{L}$ . The injection port was set at 250°C; the oven temperature was programmed from 60 to 250°C at 4°C/min. Significant quadrupole MS operating parameters: Ion source temperature, 150°C; electron impact ionization at 70 eV with scan mass range of 33–350 m/z.

### 3.4. $^{13}\text{C}$ -NMR analysis

All NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 (100.623 MHz for  $^{13}\text{C}$ ) equipped with a 5-mm probe, in deuterated chloroform ( $\text{CDCl}_3$ ), with all shifts referred to internal tetramethylsilane (TMS). The  $^1\text{H}$  NMR spectra were recorded with the following parameters, pulse width (PW), 4.3 ms; acquisition time, 2.6 seconds for 32 K data table with a spectral width (SW) of 6000 Hz (15 ppm).  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra were recorded with the following parameters: PW, 4 ms (flip angle 45°); acquisition time, 2.7 seconds for 128 K data table with a SW of 24,000 Hz (240 ppm); total repetition time, 2.8 seconds; CPD (composite pulse decoupling) mode decoupling; digital resolution, 0.183 Hz/point.

### 3.5. Quantification of components

Percentages given by the GC analysis about the heat-sensitive compounds were wrong because these compounds rearranged under the effect of heat. We suggested a more accurate quantification of these compounds by combination of  $^{13}\text{C}$ -NMR and GC-FID. The NMR spectrum was performed at room temperature to avoid any rearrangement. Thus, from the  $^{13}\text{C}$ -NMR data, we can correct the area given by the GC analysis and deduce the real percentage of these compounds. To determine the area of the each heat-sensitive

compound, we compared the mean intensity of the non-overlapped  $^{13}\text{C}$ -NMR signals of protonated carbons of each compounds with those of their associated compound (Figure 1). It was previously demonstrated that during GC analysis, the couple isofuranodiene/curzerene rearranged but also degraded which involved an under estimation of both compounds (Baldovini et al., 2001) and obviously, an over estimation of all others compounds present in the essential oil. In the Tables 1 and 2, we presented the percentage given by GC-FID and the corrected percentage using our method by combination of  $^{13}\text{C}$ -NMR and GC-FID for selected compounds.

## **Article 4. Integrated Analysis of the Bark Oil from *Cinnamosma madagascariensis* by GC(RI), GC-MS and NMR. <sup>13</sup>C-NMR data of Cyclocopacamphene and Cyclosativene**

Gabriel Garcia, Delphin Rabehaja, Julie-Marie Charmillon, Panja Ramanoelina, Joseph Casanova, Félix Tomi

The composition of leaf and bark oils of *Cinnamosma madagascariensis* has been investigated by a combination of GC (RI), GC-MS and <sup>13</sup>C-NMR. The leaf oil contained mainly monoterpenes: myrcene (17.9%), limonene (17.8%), β-phellandrene (15.3%) and linalool (12.2%). The bark oil, investigated for the first time, contained β-pinene (49.9%) and α-pinene (19.5%) as major components. Special attention was paid to the identification of cyclocopacamphene, an epimer of cyclosativene. <sup>13</sup>C-NMR data of both compounds have been provided.

**Keywords:** *Cinnamosma madagascariensis*, cyclocopacamphene, cyclosativene, leaf oil, bark oil, <sup>13</sup>C-NMR, 2D-NMR.

**Published article:** Nat. Prod. Commun. 2017, 12, 277-280.

## 1. Introduction

The genus *Cinnamosma* (Canellaceae), endemic to Madagascar Island, contains three species, *C. fragrans* Baillon, *C. macrocarpa* H. Perrier and *C. madagascariensis* Danguy (Harinantenaina et al., 2007). The three species, locally known as “mandravasarotra”, are traditionally used in the treatment of malaria, fatigue and muscular aches (Randrianarivelojosa et al., 2003).

*C. fragrans* leaf oils from Mariarano contained 1,8-cineole as its major component (45-55%) (Arnal-Schnebelen et al., 2007 ; Randrianarivelo et al., 2009 ; Tucker et al., 2008), whereas oil from Tsaramandroso contained mainly linalool (72.5%) (Randrianarivelo et al., 2009). Leaf oil samples from Katsepy and Tsaramandroso belonged to four chemotypes characterized by (i) linalool (90.5%), (ii) 1,8-cineole (56.4%), (iii) geranial (41.5%)/neral (30.6%) and (iv) geranic acid (48.8%) (Razafimamonjison, 2011). An EtOAc extract of *C. macrocarpa* led to the identification of ten components, including cinnamacrins A-D, cinnamodial, cinnamolide, bemadienolide, and isopolygodial (Harinantenaina et al., 2007). Concerning *C. madagascariensis*, thirteen components have been found in the EtOAc bark extract, including cinnamadin, cinnamodial, and cinnamonsmolide (Harinantenaina et al., 2008). Twenty oil samples isolated from leaves harvested in Tampolo and Ambohitantely belonged to two chemotypes, the first containing caryophyllene oxide (26.6%) and the second 1,8-cineole (30.9%) as major components (Razafimamonjison, 2011).

The aim of this work was to determine the chemical composition of essential oils (EOs) of *C. madagascariensis* isolated from leaves and bark harvested in northwestern Madagascar and separately subjected to hydrodistillation. Leaf and bark oils were obtained with yields of 0.45% and 0.19%, respectively. Special attention was paid to the identification of cyclocopacamphene, which is only rarely found in EOs.

## 2. Results and discussion

### 2.1. Leaf essential oil

The composition of the leaf oil has been investigated by a combination of GC (Retention indices, RI), GC-MS and <sup>13</sup>C-NMR (Table 1). Forty-two compounds were identified,

accounting for 96.9% of the whole composition. The major components were myrcene (17.9%), limonene (17.8%),  $\beta$ -phellandrene (15.3%) and linalool (12.2%).  $\alpha$ -Copaene (5.4%), (*E*)- $\beta$ -caryophyllene (4.0%),  $\delta$ -cadinene (3.3%)  $\beta$ -elemol (2.7%), caryophyllene oxide (2.1%),  $\beta$ -eudesmol (1.5%) and  $\alpha$ -eudesmol (1.2%) were the main sesquiterpenes. The chemical composition of our oil sample differed drastically from those reported in the literature, dominated by either caryophyllene oxide or 1,8-cineole. Our results confirmed the chemical variability previously observed for this plant (Razafimamonjison, 2011).

**Table 1.** Chemical composition of leaf and bark essential oils from *C. madagascariensis*.

No	Components <sup>a</sup>	RI lit <sup>b</sup>	RI <sub>a</sub> <sup>c</sup>	RI <sub>p</sub> <sup>c</sup>	RF <sup>d</sup>	Leaf oil <sup>e</sup>	Bark oil <sup>e</sup>	Identification
1	$\alpha$ -Thujene	932	923	1023	1.03	0.1	-	RI, MS
2	$\alpha$ -Pinene	936	933	1023	1.03	2.4	19.5	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
3	Camphene	950	946	1074	1.03	0.1	0.5	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
4	Sabinene	973	968	1129	1.03	0.9	0.5	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
5	$\beta$ -Pinene	978	974	1120	1.03	0.6	49.9	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
6	Myrcene	987	982	1167	1.03	17.9	0.2	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
7	Mentha-1(7),8-diene	997 <sup>#</sup>	997	1170	1.03	2.0	-	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
8	<i>p</i> -Cymene	1015	1014	1279	0.99	0.6	1.3	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
9	Limonene*	1025	1023	1208	1.03	17.8	2.1	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
10	$\beta$ -Phellandrene*	1023	1023	1217	1.03	15.3	2.1	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
11	( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimene	1041	1037	1249	1.03	0.2	-	RI, MS
12	<i>cis</i> -Linalool oxide THF <sup>†</sup>	1058	1059	1449	1.53	0.3	0.3	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
13	<i>trans</i> -Linalool oxide THF <sup>†</sup>	1072	1080	1469	1.53	0.2	0.4	RI, MS
14	Linalool	1086	1085	1551	1.30	12.2	1.6	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
15	<i>trans</i> -Pinocarveol	1126	1125	1652	1.30	-	0.2	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
16	Pinocarvone	1137	1141	1578	1.30	-	0.1	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
17	Borneol	1150	1151	1708	1.30	-	0.1	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
18	Cryptone	1160	1155	1664	1.30	0.4	-	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
19	<i>p</i> -Cymen-8-ol	1169	1161 <sup>‡</sup>	1806	1.30	-	0.1	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
20	Terpinen-4-ol	1164	1164 <sup>‡</sup>	1608	1.30	0.6	1.0	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
21	Myrtenal	1172	1172	1633	1.30	-	0.1	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
22	$\alpha$ -Terpineol	1176	1174	1695	1.30	0.4	0.7	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
23	Myrtenol	1178	1180	1799	1.30	-	0.1	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
24	Thymyl methyl oxide	1215	1210	1595	1.28	-	0.2	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
25	Carvacryl methyl oxide	1226	1226	1610	1.28	-	0.2	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
26	Bornyl acetate	1270	1271	1584	1.59	-	0.2	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
27	$\alpha$ -Terpinyl acetate	1335	1334	1681	1.59	-	0.2	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
28	$\alpha$ -Cubebene	1355	1351	1463	0.98	0.1	0.1	RI, MS
29	Cyclocopacamphene		1365	1479	0.98	0.2	2.0	RI, <sup>13</sup> C NMR
30	$\alpha$ -Copaene	1379	1373	1482	0.98	5.4	3.8	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
31	$\beta$ -Elemene	1389	1390	1595	0.98	0.4	0.4	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
32	<i>cis</i> - $\alpha$ -Bergamotene	1411	1411	1566	0.98	0.2	-	RI, MS
33	( <i>E</i> )- $\beta$ -Caryophyllene	1421	1421	1604	0.98	4.0	0.5	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
34	$\alpha$ - <i>trans</i> -Bergamotene	1434	1432	1584	0.98	0.1	0.8	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
35	$\alpha$ -Guaiene	1440	1434	1589	0.98	-	0.3	RI, MS
36	( <i>E</i> )- $\beta$ -Farnesene	1446	1447	1662	0.98	0.1	-	RI, MS

37	$\alpha$ -Humulene	1455	1454	1678	0.98	0.6	2.4	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
38	2- <i>epi</i> -( <i>E</i> )- $\beta$ -Caryophyllene	1467	1458	1641	0.98	0.4	-	RI, MS
39	$\gamma$ -Muuroolene	1474	1473	1686	0.98	0.2	0.5	RI, MS
40	Germacrene D	1479	1476	1703	0.98	0.2	-	RI, MS
41	$\beta$ -Selinene	1486	1486	1725	0.98	0.1	0.3	RI, MS
42	4- <i>epi</i> -Cubebol	1490	1490	1870	1.30	0.1	tr	RI, MS
43	$\alpha$ -Selinene	1494	1495	1718	0.98	-	0.4	RI, MS
44	$\alpha$ -Muuroolene	1496	1497	1725	0.98	0.3	0.4	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
45	$\alpha$ -Bulnesene	1503	1502	1721	0.98	-	0.5	RI, MS
46	$\gamma$ -Cadinene	1507	1506	1753	0.98	0.3	-	RI, MS
47	Calamenene <sup>+</sup>	1517	1512	1826	0.98	-	0.1	RI, MS
48	$\delta$ -Cadinene	1520	1517	1764	0.98	3.3	1.1	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
49	$\beta$ -Elemol	1541	1534	2074	1.30	2.7	-	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
50	( <i>E</i> )-Nerolidol	1553	1549	2044	1.30	0.2	0.2	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
51	Spathulenol	1572	1564	2114	1.30	0.3	-	RI, MS
52	Caryophyllene oxide	1578	1574	1993	1.53	2.1	0.2	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
53	Humulene oxide I	1593	1587	2009	1.53	-	0.1	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
54	Humulene oxide II	1602	1597	2050	1.53	0.3	0.8	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
55	$\gamma$ -Eudesmol	1618	1618	2159	1.30	0.7	-	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
56	$\beta$ -Eudesmol	1641	1635	2219	1.30	1.5	-	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
57	$\alpha$ -Eudesmol	1653	1640	2210	1.30	1.2	-	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
<b>Total</b>						<b>96.9</b>	<b>96.3</b>	

<sup>a</sup>Order of elution and relative percentages of individual components are given on apolar column (BP1), excepted those with an asterisk (\*), percentages on polar column (BP-20); <sup>b</sup>RI lit: retention indices according to König et al. (2001), otherwise stated. <sup>c</sup>RI<sub>a</sub>, RI<sub>p</sub> = retention indices measured on apolar and polar capillary columns, respectively. <sup>d</sup>Response factors according to Costa et al. (2008). <sup>e</sup>g/100g. <sup>13</sup>C NMR (*italic*) = compounds identified by NMR in CC fractions. tr = trace level (<0.05%). <sup>#</sup>Retention index according to Weyersthal et al. (1992). <sup>†</sup>Nomenclature *cis/trans* according to Meou et al. (1990). <sup>‡</sup>Order of elution confirmed by NMR of a CC fraction. <sup>†</sup>Correct isomer not determined.

## 2.2. Bark essential oil

The composition of the bark oil has been investigated as above (Table 1). Forty-two identified compounds accounted for 94.3% of the whole EO. The major compounds were  $\beta$ -pinene (49.9%) and  $\alpha$ -pinene (19.5%). However, a component (2.0% of the whole composition) was not identified and its identification is detailed bellow.

### 2.2.1. Identification of cyclocopacamphene

Retention indices of the unidentified component (RI<sub>a</sub>/RI<sub>p</sub> = 1365/1479) suggested a sesquiterpene hydrocarbon. Computer matching against commercial and laboratory-made MS libraries proposed cyclosativene and effectively the mass spectrum fitted perfectly with that of the compound. RIs on apolar and polar columns were close to those of cyclosativene (RI<sub>a</sub>/RI<sub>p</sub> = 1367/1479). In contrast, none of the signals of cyclosativene were observed in the

$^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of the EO. In order to elucidate its structure, we choose to concentrate this compound. The bark oil displayed a high content of monoterpene hydrocarbons ( $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -pinene and minor components, in total more than 76%). Monoterpene hydrocarbons were partially evaporated at reduced pressure and low temperature. Then, the remaining extract was subjected to column chromatography (CC) on silica gel (see Experimental) and hydrocarbons were separated from oxygenated compounds. Thereby, the percentage of the unknown component was increased until it formed 33.7% in a CC fraction. In that fraction, after assignment of the signals belonging to known compounds  $\alpha$ -copaene (16.1%),  $\gamma$ -muurolene (3.2%), *trans*- $\alpha$ -bergamotene (2.8%), and  $\alpha$ -muurolene (1.9%), a set of 15 signals with high intensities remained unassigned (DEPT spectrum: 4  $\text{CH}_3$ , 3  $\text{CH}_2$ , 6 CH, and 2 C, in agreement with a mass  $m/z = 204$ ). As expected, the  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of the CC fraction was complex. However, a signal at  $\delta$  0.67 ppm (d,  $J=5.3\text{Hz}$ ) led us to suspect a cyclopropane moiety in the framework of the molecule. This hypothesis was corroborated by the observation of specific carbon chemical shifts ( $\text{CH}_3$  at  $\delta$  10.4 ppm, C and CH at  $\delta$  19-23 ppm). Therefore, we oriented our research towards cyclocopacamphene an epimer of cyclosativene. Indeed, the RIa fitted with that reported (RI = 1361) in ref (Takeoka et al., 1989) and  $^1\text{H}$ -NMR signals picked up on the spectrum fitted with those reported in ref (Piers et al., 1975). Unfortunately, the  $^{13}\text{C}$ -NMR data were not reported. However, comparison of the  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shifts of our compound with those of cyclocopacamphan-12-ol (Weyerstahl et al., 2000) was informative. Indeed, 11 out of 15 carbon chemical shifts of our unidentified component were very close to those of cyclocopacamphan-12-ol; they differed by 0.0-0.2 ppm for 10 carbons, and 0.4 ppm for the last one. The expected differences in chemical shifts have been observed (Table 2): i) deshielding  $\alpha$ -effect on C12 = +43.8 ppm; ii) deshielding  $\beta$ -effect on C11 = +7.5 ppm; iii) shielding  $\gamma$ -effect on C10 and C13 = -4.9 and -4.6 ppm. We concluded that the unidentified component is cyclocopacamphene.

In order to confirm the *syn/anti* stereochemistry of the isopropyl group vs. the tricyclo[2.2.1.0<sup>2,6</sup>]heptane substructure, comparison of  $^{13}\text{C}$ -NMR data of cyclosativene with cyclocopacamphene should be informative. Although cyclosativene was isolated from *Abies magnifica* in 1968, and it is nowadays commercially available, its  $^{13}\text{C}$ -NMR data have not been reported. Therefore, carbon chemical shifts have been assigned using a full set of NMR sequences (Table 3). They displayed noticeable differences with those of cyclocopacamphene, obviously due to the presence of various steric  $\gamma$  effects of the

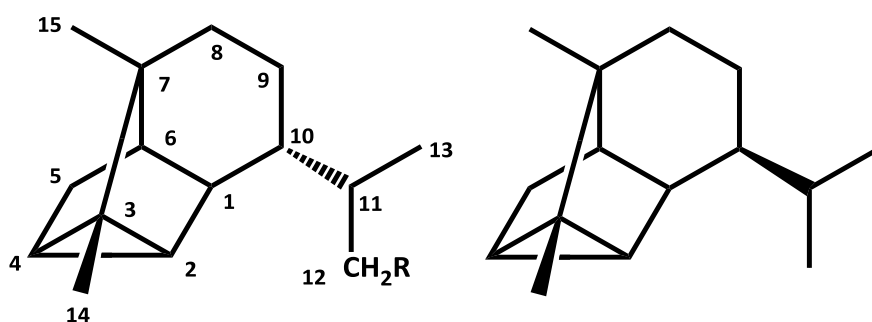


isopropyl group. For instance, C2 of cyclosativene was shielded by -3.74 ppm. In contrast, C6, C8 and C11 of cyclocopacamphene were shielded by -5.39, -4.26 and -3.51 ppm.

Cyclocopacamphene and cyclosativene have identical RIs on the polar column (RIp: 1479). A slight difference was observed on the apolar column. The order of elution was established by adding a small quantity of commercial cyclosativene to the hydrocarbon fraction of CC: cyclocopacamphene (RIa = 1365) was eluted just before cyclosativene (RIa = 1367). Cyclocopacamphene has been obtained by either decarboxylation of cyclocamphenic acids (Kido et al., 1969) or by a multi-steps synthesis (Piers et al., 1975). It has also been isolated (Andersen et Falcone, 1969) (without any detail) from vetiver EO. Finally, it has been identified in vetiver oil (Andersen, 1970) and among volatiles of pineapple (Takeoka et al., 1989).

### 2.2.2. Composition of bark oil from *Cinnamosma madagascariensis*

In total, 43 components, accounting for 96.3% of the whole composition, have been identified in *C. madagascariensis* bark oil (Table 1). Twenty-two compounds have been identified by GC(RI), GC-MS and  $^{13}\text{C}$ -NMR. Analysis of fractions of chromatography permitted the confirmation of 17 other components by NMR. Identification of cyclocopacamphene has been given in detail below. The composition of the bark oil was largely dominated by  $\beta$ -pinene (49.9%) and  $\alpha$ -pinene (19.5%) (Table 1). The contents of other monoterpenes varied between 0.2% and 2.1%. Various sesquiterpenes were present in appreciable amounts:  $\alpha$ -copaene (3.8%),  $\alpha$ -humulene (2.4%), cyclocopacamphene (2.0%) and  $\delta$ -cadinene (1.1%). *C. madagascariensis* bark oil differed from the leaf oil of the same plant containing mainly myrcene, limonene,  $\beta$ -phellandrene and linalool. It differed also from other leaf oils with compositions dominated either by caryophyllene oxide or by 1,8-cineole (Razafimamonjison, 2011).



**Figure 1.** Structure of cyclocopacamphene (left, R=H), cyclocopacamphan-12-ol (left, R=OH) and cyclosativene (right).

**Table 2.**  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts ( $\delta$ , ppm) of cyclocopacamphene (CCC) and cyclocopacamphan-12-ol (CCC-12-ol).

Carbons	CCC-12-ol R=OH (Weyerstahl et al., 2000)	CCC R=H
1	43.9	44.1
2	23.8	23.9
3	22.0	22.1
4	19.0	19.1
5	31.2	31.3
6	40.4	40.2
7	43.4	43.4
8	28.5	28.5
9	21.5	21.9
10	37.2	42.1
11	36.0	28.5
12	66.2	22.4
13	16.3	21.0
14	10.2	10.4
15	19.4	19.5

**Table 3.** NMR data of cyclosativene.

C	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm) by HSQC	COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$	HMBC H $\rightarrow$ C	NOESY
1	44.33	1	1.75 (s)	2, 5a, 8a, 8b, 9a, 9b, 10, 11, 14	2, 3, 5, 7, 9, 11, 15	12
2	20.14	2	0.69 (dm, $^3J=5.3$ Hz)	1, 4	1, 5, 6, 7, 14	11
3	22.19	-	-	-	-	-
4	19.16	4	0.82 (dm, $^3J=5.3$ Hz)	2	1, 2, 5, 6, 7	-
5	30.80	5a 5b	1.61 (dt, $^2J=10.4$ Hz; $^3J=1.6$ Hz) 1.03 (d, $^2J=10.4$ Hz)	1, 5b, 6 5a	1, 2, 4, 6 1, 3, 4, 6, 7	5b, 15 5a
6	45.55	6	1.13 (m)	5a, 8a, 8b, 9a, 9b, 10	2, 3, 4, 8, 9, 15	12
7	43.23	-	-	-	-	-
8	32.78	8a 8b	1.51 (m) 1.27 (m)	1, 6, 8b, 9b, 10 1, 6, 8a, 9a, 10	1, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 15 1, 3, 7, 9, 10, 11	8b 8a
9	24.69	9a 9b	1.48 (m) 1.27 (m)	1, 6, 8b, 9b, 10 1, 6, 8a, 9a, 10	1, 3, 5, 7, 8, 10, 11, 15 1, 3, 7, 8, 10, 11	9b 9a
10	43.61	10	1.13 (m)	1, 6, 8a, 8b, 9a, 9b, 11	2, 3, 4, 8, 9, 15	-
11	32.00	11	1.41 (m)	1, 10, 12, 13	2, 8, 9, 10, 12, 13	2, 12, 13
12	21.28*	12	0.90* (d, $^3J=6.7$ Hz)	11	2, 4, 10, 11, 13	1, 6, 11
13	20.88*	13	0.88* (d, $^3J=6.7$ Hz)	11	2, 10, 11, 12	11
14	10.16	14	0.98 (s)	1	2, 3, 4, 7	-
15	19.27	15	0.76 (s)	-	1, 3, 7, 8, 9, 11	5a

### 3. Experimental

#### 3.1. Plant material, isolation, chromatographic fractionation of EO

Leaves and bark of *C. madagascariensis* were harvested in Ambatomainty (northwestern Madagascar). The EO samples were isolated by water distillation using a Clevenger-type

apparatus from leaves (213 g) and bark (405 g). Volatile hydrocarbons contained in bark oil (714 mg) were evaporated under reduced pressure at ambient temperature. The remaining mixture was subjected to CC (silica gel, 15 g, 63-200  $\mu\text{m}$ ). Hydrocarbons (207 mg) were eluted

with *n*-pentane and oxygenated compounds (174 mg) with diethyl ether. Volatile monoterpene hydrocarbons were once again evaporated under vacuum yielding a sub-fraction (70 mg) that was used for NMR analysis.

### **3.2. Gas chromatography and nuclear magnetic resonance**

GC-FID analyses and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded as previously (Rabehaja et al., 2014). 2D NMR spectra of cyclosativene were recorded using Bruker microprograms.

### **3.3. Gas chromatography-mass spectrometry**

The essential oil sample was analyzed with a Perkin-Elmer TurboMass detector (quadrupole), directly coupled to a Perkin-Elmer Autosystem XL, equipped with a fused-silica capillary column (50 m x 0.22 mm i.d., film thickness 0.25  $\mu\text{m}$ ), BP-1 (polydimethylsiloxane). Carrier gas, helium at 0.8 mL/min; split: 1:74; injection volume: 0.5  $\mu\text{L}$ ; injector temperature: 250°C; oven temperature programmed from 60°C to 220°C at 2°C/min and then held isothermal at 220°C for 20 min. Ion source temperature: 250°C; energy ionization: 70 eV; electron ionization mass spectra were acquired over the mass range 35-350 Da.

### **3.4. Identification and quantification of individual components**

Identification of the individual components was based: i) on comparison of their GC retention indices (RI) on apolar and polar columns, with either those of authentic compounds or literature data (König et al., 2001) ii) on computer matching with a laboratory-made and commercial mass spectral libraries and comparison of spectra with literature data (Adams, 2007 ; Joulain et König, 1998 ; McLafferty et Stauffer, 1994), iii) on comparison of the signals in the  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of the mixtures with those of reference spectra compiled in the laboratory spectral library, with the help of laboratory-made software (Ouattara et al., 2014 ; Tomi et al., 1995). Quantitative determination was

according to Costa et al. (2008). Nonane was used as an internal reference; the percentage of each compound was calculated using response factors.





# **Chapitre IV :**

**Elucidation structurale de nouvelles  
molécules**





Le quatrième et dernier chapitre de ce travail regroupe les huiles essentielles dont la détermination de la composition chimique nécessite la mise en œuvre de techniques chromatographiques et spectroscopiques multiples. Il s'agit du cèdre à encens (*Calocedrus decurrens*), un conifère introduit en Corse et d'Antsoro (*Elionurus tristis*), une poacée endémique de Madagascar.

La stratégie analytique choisie est celle de la voie C avec l'association de nombreuses techniques comme la GC(RI), GC-MS et RMN  $^{13}\text{C}$ . Dès le début de l'analyse, cette dernière technique s'avère d'une importance cruciale pour repérer les séries de valeurs  $^{13}\text{C}$  des molécules non identifiées et pour orienter les fractionnements ultérieurs. Ensuite, plus classiquement la RMN  $^{13}\text{C}$  (associée à celle du  $^1\text{H}$ ) et la mise en œuvre de séquences de RMN 2D permettra de réaliser l'analyse structurale des molécules isolées (selon la voie B).

Les huiles essentielles (feuilles et branches) de *C. decurrens* contiennent comme très souvent pour les conifères une forte proportion de monoterpènes oléfiniques, mais présentent également plusieurs molécules inconnues de nos banques de données. Sur la base des valeurs de leurs RIs, il s'agit probablement de monoterpènes oxygénés. De multiples étapes de fractionnement ont été nécessaires pour isoler ces molécules (CC et pc-GC) identifiées comme : le pin-2-èn-8-ol, l'acétate de pin-2-èn-8-yle, le pin-2-èn-8-oate de méthyle et le pin-2-èn-8-al. Les données spectrales des deux premières n'ont été que partiellement décrites (RMN  $^1\text{H}$ ) et leurs présences n'ont jamais été reportées dans cette espèce, alors que les deux dernières sont des molécules nouvelles. Dans le cas du pin-2-èn-8-al, les nombreuses tentatives de purification par pc-GC ont échoué, du fait de la faible stabilité du composé, qui a tendance à s'oxyder très rapidement à température ambiante en son acide carboxylique correspondant (transformation fortement accélérée lors du chauffage durant la pc-GC). Ainsi, afin de caractériser cet aldéhyde nous avons procédé par oxydation (à température ambiante) du pin-2-èn-8-ol. Nous avons pu ensuite enregistrer très rapidement les données spectrales du produit formé avant qu'il ne s'oxyde en acide carboxylique.

Les huiles essentielles d'*E. tristis* (parties aériennes et racines), constituent un exemple d'huile que l'on peut qualifier de complexe. La composition chimique est caractérisée par une forte teneur en sesquiterpènes dont bon nombre ne sont présents ni dans les banques de données de spectres de masse ni dans la banque de données RMN  $^{13}\text{C}$  du laboratoire.

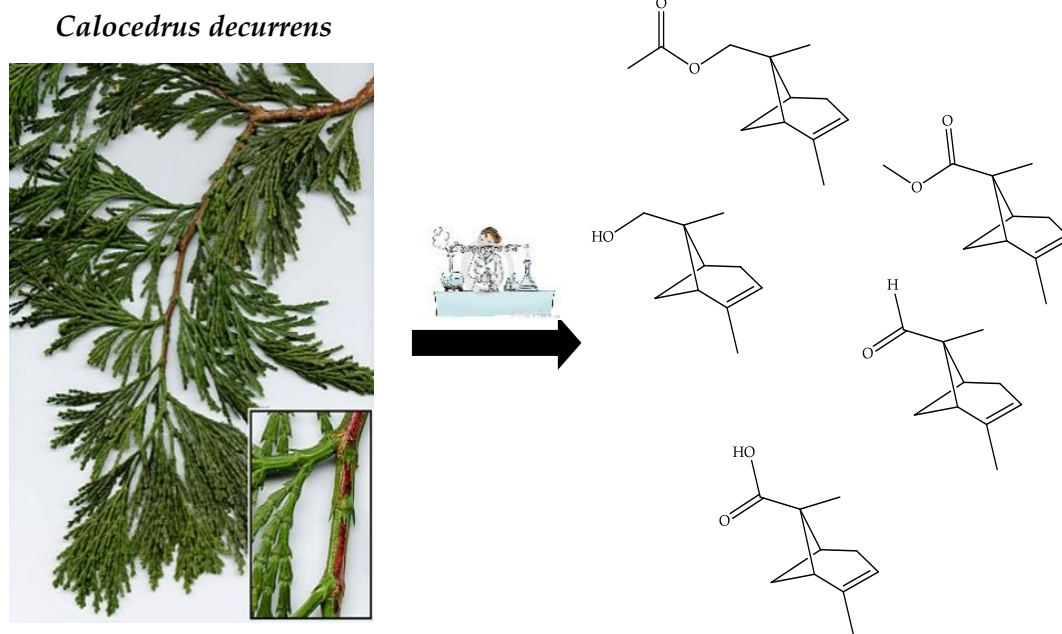
Après de nombreuses étapes de séparation, nous avons identifié, des composés très rarement rencontrés tels que : la 1(10)-aristolèn-2-one, l'aristolone, l'acorenone B et le 2-

*épi*-prezizaan-7-ol; ou encore quatre nouveaux sesquiterpènes oxygénés : le 7-*épi*-khusian-2-ol, la 4,8-di-*épi*-acorone, le 2-*épi*-ziza-5-en-2-ol et l'élionurone.

Le 7-*épi*-khusian-2-ol et la 4,8-di-*épi*-acorone sont deux nouveaux épimères respectivement du khusian-2-ol et de l'acorone. Le 2-*épi*-ziza-5-en-2-ol est un nouvel alcool possédant le squelette zizaane, squelette qui est fréquemment rencontré dans l'huile essentielle de vétiver. Le dernier composé, l'élionurone est le premier représentant d'un nouveau squelette terpénique que nous avons nommé élionurane. Au cours de cette étude nous avons soumis l'élionurone à plusieurs réactions chimiques dans le but de tester sa stabilité et ainsi de mieux comprendre son origine biosynthétique. Nous proposons d'ailleurs une voie de biosynthèse de cette molécule, qui s'avère liée à celle du squelette zizaane.

## Article 5. New Pinane Derivatives Found in Essential Oils of *Calocedrus decurrens*

Gabriel Garcia, Loïc Tissandié, Jean-Jacques Filippi, Félix Tomi



The main objective of this study was to determine the chemical composition of essential oils (EOs) obtained from leaf, old branches, and young branches of a coniferous species *Calocedrus decurrens* acclimated to Corsica. The analytical investigation was conducted by GC(RI), GC-MS, pc-GC, and NMR. *C. decurrens* leaf, old branches, and young branches EOs contained  $\alpha$ -pinene (11.2; 56.6; 22.3%), myrcene (13.4; 8.4; 9.7%),  $\Delta$ -3-carene (31.3; 5.2; 11.1%), limonene (6.4; 5.1; 5.5%), terpinolene (6.9; 1.5; 3.2%), and pin-2-en-8-ol (4.2; 4.5; 10.4%) as major components, respectively. Special attention was paid to purifying and identifying four unusual pinane derivatives: pin-2-en-8-ol, pin-2-en-8-yl acetate, pin-2-en-8-al, and methyl pin-2-en-8-oate. The last two are reported for the first time.

**Keywords:** *Calocedrus decurrens*, pin-2-en-8-al, methyl pin-2-en-8-oate, pin-2-en-8-yl acetate, pin-2-en-8-ol, 2D-NMR, structural elucidation

**Published article:** *Molecules* 2017, 22, 921-932.

## 1. Introduction

Over the last century, the French National Forest Office (“Office National des Forêts”) has introduced several coniferous species in Corsica. These introductions were made for the purposes of testing the growing abilities of these species out of their natural ecosystems. In the course of our studies, several essential oils from these introduced species such as *Pinus halepensis* (Nam et al., 2014 ; Nam et al., 2016), *Larix decidua*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus ponderosa*, *Sequoiadendron giganteum*, and *Cryptomeria japonica* (Garcia et al., 2017a) were investigated. However, another species formerly introduced in Corsica, *Calocedrus decurrens*, was still not studied.

*C. decurrens*, commonly known as incense cedar, is an aromatic conifer belonging to the Cupressaceae family, native to Oregon and California. Its natural area extends to 31° at 46° parallel of north latitude and it is found between 900 and 2500 m altitude. It is widely used in reforestation in the USA because of its rusticity and its adaptation in difficult sites (limestone, shallow, dry land). The bark of *Calocedrus* is thick, reaching 20 cm, and is an excellent protection against forest fires which are very frequent in its native area. Furthermore, *C. decurrens* wood is considered as precious wood, owing to its highly aromatic wood, and is often used for the manufacture of pencils. Its wood is also highly valued for its decorative appearance and durability in carpentry, interior cladding, and furniture (Alexandrian et Le Voyer, 1984 ; Veluthoor et al., 2011).

In France, this species was introduced around 1850. Since, it has been widespread in many parks and gardens, particularly in the Mediterranean area, for example, Gréoux-les-Bains and Châteauvert (Alexandrian et Le Voyer, 1984). By contrast, in Corsica, the *C. decurrens* species was introduced in 1989 in the forest of Ospedale.

There are already a few articles dealing with the chemical composition of *C. decurrens* essential oils. The first study, conducted in 1954 by Nakatsuka et Hirose (1954), reported the chemical composition of the phenolic fraction from wood EO, which contained as its major components carvacrol and an unknown constituent, most likely either *p*-methoxy-carvacrol or *p*-methoxy-thymol. Wood EO seemed to be mostly constituted by aromatic terpenes. That was corroborated with the study of Veluthoor et al. (2011), in which they reported a heartwood EO also exhibiting phenolic terpenes as its major constituents: thymoquinone (35.9%), carvacrol (29.2%), thymol methyl ether (11.0%), and carvacrol methyl ether (3.2%). In

contrast, the leaf EOs were qualitatively different. In 1981, Von Rudloff (1981) reported the composition of a leaf EO obtained from a vegetal harvested in Gasquet (Northern California). The main constituents were identified as limonene (31.3%),  $\Delta$ -3-carene (21.0%),  $\alpha$ -pinene (9.2%), myrcene (8.0%), and  $\alpha$ -terpenyl acetate (5.7%). A later study performed in 2006 by Adams et al. (2006) reported the chemical composition of leaf EOs of *C. decurrens* from Oregon and California, and described the presence of limonene (18.2–23.6%),  $\Delta$ -3-carene (15.2–20.2%),  $\alpha$ -pinene (8.7–15.8%), myrcene (6.2–8.2%),  $\alpha$ -fenchyl acetate (3.5–9.7%), and terpinolene (5.7–8.0%).

In this study, we focus on the analytical investigation of essential oils obtained from leaf, old branches, and young branches of *C. decurrens* acclimated to Corsica. We also give a comparison of their chemical compositions with EOs obtained from trees grown in their native areas. Special attention was paid to the identification of unusual pinane derivatives, such as pin-2-en-8-ol (**A**) and pin-2-en-8-yl acetate (**B**), and two additional compounds, pin-2-en-8-al (**C**) and methyl pin-2-en-8-oate (**D**), never reported so far in the literature.

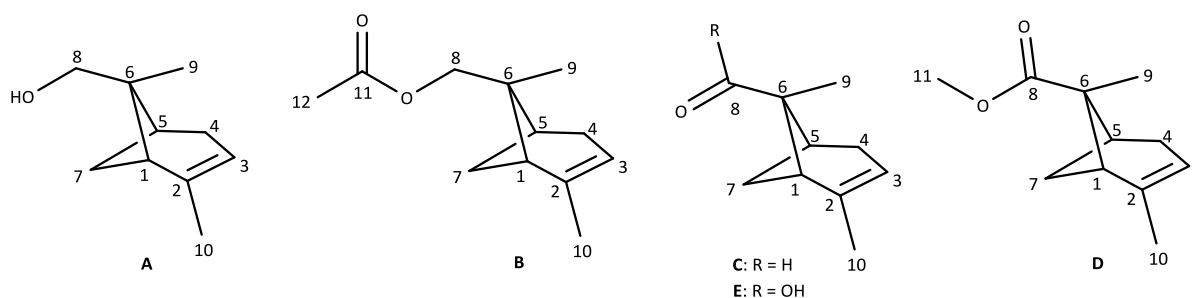
## 2. Results

### 2.1. Analysis of *C. decurrens* Leaf, Old Branches and Young Branches Essential Oils by GC(RI), GC-MS and $^{13}\text{C}$ -NMR

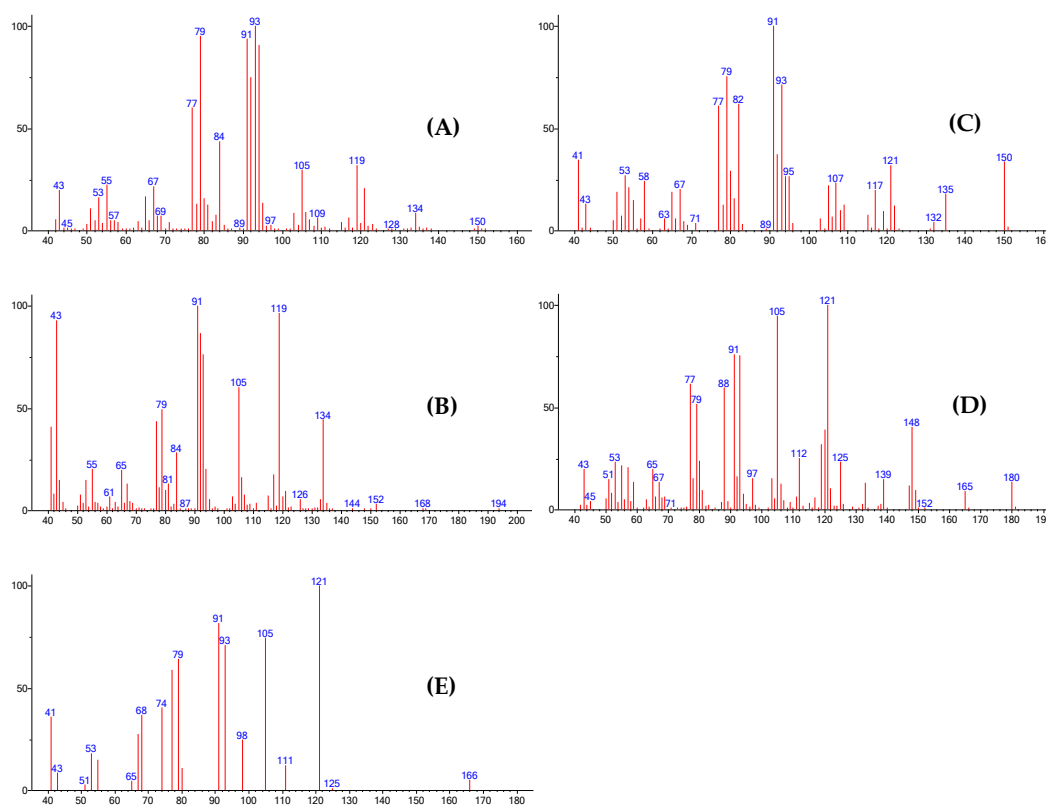
For quantitative purposes, essential oils of *C. decurrens* were analyzed by GC(RI). In combination with their retention indices (RI) determined by both polar and apolar stationary phases, volatile constituents were identified by means of GC-MS and  $^{13}\text{C}$ -NMR, following a computerized methodology developed in our laboratory (Tomi et al., 1995). The leaf essential oil contained monoterpene hydrocarbons as major constituents such as  $\Delta$ -3-carene (31.3%), myrcene (13.4%),  $\alpha$ -pinene (11.2%), terpinolene (6.9%), and limonene (6.4%), while the EO isolated from old branches was characterized by the preeminence of  $\alpha$ -pinene (56.6%), myrcene (8.4%),  $\Delta$ -3-carene (5.2%), and limonene (5.1%). The young branches oil contained mostly  $\alpha$ -pinene (22.3%), along with  $\Delta$ -3-carene (11.1%), myrcene (9.6%), and limonene (5.5%) (Table 1). Altogether, the three essential oils were qualitatively similar in terms of chemical composition, differing only by their respective content in major monoterpene hydrocarbons. In addition, we noticed the presence of monoterpene esters,

among which,  $\alpha$ -terpinyl acetate (1.0–2.4%) and the uncommon methyl myrtenate (1.6–3.5%). Sesqui- and diterpenes were always present in low amounts.

Surprisingly, four unidentified components (probably oxygenated according to their polar retentions indices) monoterpenes **A–D** (Figures 1 and 2) were present at appreciable amounts in the leaf (L), old branches (OB), and young branches (YB) essential oils: (i) compound **A** accounting for 4.2% (L), 4.5% (OB), and 10.3% (YB); (ii) **B**: 0.6%, 0.6% and 1.4%; (iii) **C**: 1.6%, 0.8% and 2.0%; and (iv) **D**: 3.0%, 1.8%, and 3.6%. The structural elucidation of these four compounds is reported below (Figure S1).



**Figure 1.** Structure of compounds **A–E**.



**Figure 2.** EI-MS spectra of compounds **A–E**.

**Table 1.** Chemical composition of essential oils of *Calocedrus decurrens* from Corsica.

No.	Compounds	R <sub>1a</sub>	R <sub>1p</sub>	RRF Calculated	L EO	OB EO	YB EO	Identification
1	1-(2-Methylene cyclopropyl) cyclopentene	870	1054	0.789	0.9	0.1	0.3	RI, MS
2	Tricyclene	920	1015	0.765	0.1	0.3	0.2	RI, MS
3	$\alpha$ -Thujene	922	1015	0.765	0.1	0.1	0.1	RI, MS
4	$\alpha$ -Pinene	932	1015	0.765	11.2	56.6	22.3	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
5	$\alpha$ -Fenchene	941	1047	0.765	0.7	0.2	0.2	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
6	Camphene	943	1063	0.765	0.2	0.5	0.2	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
7	Sabinene	964	1122	0.765	0.1	0.3	0.2	RI, MS
8	$\beta$ -Pinene	970	1110	0.765	0.4	1.2	0.6	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
9	2-Pentylfuran	976	-	0.912	-	tr	-	RI, MS
10	Myrcene	981	1159	0.765	13.4	8.4	9.6	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
11	1,3,8- <i>p</i> -Menthatriene	995	-	0.779	-	tr	-	RI, MS
12	$\alpha$ -Phellandrene	996	1163	0.765	0.1	0.1	0.1	RI, MS
13	<i>p</i> -Methylanisole	998	1452	0.838	-	tr	-	RI, MS
14	$\Delta$ -3-Carene	1005	1146	0.765	31.3	5.2	11.1	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
15	$\alpha$ -Terpinene	1009	1178	0.765	0.2	0.1	0.2	RI, MS
16	<i>p</i> -Cymene	1011	1269	0.698	0.3	0.2	0.2	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
17	Sylvestrene	1017	1199	0.765	0.5	0.1	0.2	RI, MS
18	Limonene *	1021	1200	0.765	6.4	5.1	5.5	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
19	$\beta$ -Phellandrene *	1021	1209	0.765	1.7	1.2	1.4	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
20	$\gamma$ -Terpinene	1048	1243	0.765	0.3	0.2	0.2	RI, MS
21	Methyl phenylethyl ether	1058	-	0.821	-	0.1	0.1	RI, MS
22	Fenchone	1068	1401	0.887	tr	0.1	0.1	RI, MS
23	<i>p</i> -Cymenene	1072	1434	0.709	0.3	0.1	0.2	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
24	Terpinolene	1078	1280	0.765	6.9	1.5	3.2	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
25	Linalool	1083	1543	0.869	0.2	tr	0.2	RI, MS
26	Perillene	1086	1419	0.907	-	tr	tr	RI, MS
27	Pin-2-en-8-al (C)	1102	1460	0.907	1.6	0.8	2.0	RI, MS, 2D-NMR
28	Camphre	1120	1513	0.887	0.1	0.2	0.3	RI, MS
29	<i>trans</i> -Pinocarveol	1123	1650	0.876	-	0.1	-	RI, MS
30	<i>trans-p</i> -Menth-2-en-1-ol	1125	-	0.869	-	-	tr	RI, MS
31	<i>trans</i> -Verbenol	1128	1680	0.876	0.1	tr	0.1	RI, MS
32	Camphene hydrate	1132	1591	0.869	0.1	0.3	0.4	RI, MS
33	<i>trans</i> -Pinocamphone	1133	1507	0.887	-	-	tr	RI, MS
34	Myrtenyl methyl ether	1145	1380	0.868	tr	0.2	0.2	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
35	Borneol	1150	1698	0.869	0.1	-	0.3	RI, MS
36	Isopinocamphone	1153	1547	0.887	-	-	tr	RI, MS
37	<i>p</i> -Methylacetophenone	1155	1776	0.839	0.1	-	-	RI, MS
38	<i>p</i> -Cymen-8-ol	1159	1803	0.809	0.2	0.2	0.3	RI, MS
39	Terpinen-4-ol	1161	1598	0.869	1.0	0.6	1.1	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
40	( <i>E</i> )-Dec-4-enal	1170	1537	0.869	0.7	0.2	0.6	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
41	$\alpha$ -Terpineol	1172	1692	0.869	0.2	0.3	0.3	RI, MS
42	Myrtenol	1178	1787	0.887	-	-	tr	RI, MS
43	Verbenone	1181	1708	0.907	0.3	0.4	0.6	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
44	$\alpha$ -Campholenol	1186	1782	0.887	0.1	0.3	0.5	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
45	Pin-2-en-8-ol (A)	1189	1800	0.887	4.2	4.5	10.3	RI, MS, 2D-NMR
46	Methyl pin-2-en-8-oate (D)	1207	1543	1.006	3.0	1.8	3.6	RI, MS, 2D-NMR

47	Thymyl methyl ether	1213	1589	0.798	-	-	tr	RI, MS
48	Carvone	1214	1733	0.907	0.1	0.3	0.5	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
49	Methyl campholenate	1222	1576	0.985	0.2	0.2	0.5	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
50	Carvacryl methyl ether	1225	1601	0.798	-	-	tr	RI, MS
51	Piperitone	1226	1730	0.887	0.3	0.3	0.5	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
52	(Z)-Dec-4-en-1-ol	1240	1789	0.852	-	-	tr	RI, MS
53	Bornyl acetate	1269	1576	0.958	0.4	0.5	0.7	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
54	Methyl myrtenate	1273	1685	1.006	2.3	1.6	3.5	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
55	(E,E)-Deca-2,4-dienal	1288	-	0.887	0.2	-	0.2	RI, MS
56	Myrtenyl acetate	1305	1680	0.976	-	-	tr	RI, MS
57	Pin-2-en-8-yl acetate ( <b>B</b> )	1310	1683	0.976	0.6	0.6	1.4	RI, MS, 2D-NMR
58	α-Terpinyol acetate	1332	1690	0.958	2.4	1.0	2.1	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
59	β-Elementene	1387	1589	0.751	-	0.5	0.3	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
60	(E)-β-Caryophyllene	1417	1596	0.751	-	0.1	0.2	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
61	Thujopsene	1428	1617	0.751	-	0.2	0.3	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
62	Prezizaene	1444	1630	0.751	-	0.1	0.1	RI, MS
63	α-Humulene	1447	1667	0.751	-	tr	tr	RI, MS
64	Selina-4,11-diene	1470	1670	0.751	-	tr	tr	RI, MS
65	β-Selinene	1481	1712	0.751	-	0.4	0.3	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
66	α-Selinene	1490	1718	0.751	-	0.3	0.2	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
67	β-Bisabolene	1500	1720	0.751	-	0.1	0.2	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
68	γ-Cadinene	1506	1750	0.751	-	tr	0.1	RI, MS
69	γ-Cuprenene	1523	-	0.751	-	-	tr	RI, MS
70	β-Elemol	1534	2073	0.819	-	0.1	tr	RI, MS
71	Caryophyllene oxide	1569	1981	0.830	-	tr	0.1	RI, MS
72	Cedrol	1588	2105	0.819	0.2	0.6	1.1	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
73	γ-Eudesmol	1617	2158	0.819	-	tr	-	RI, MS
74	T-Cadinol	1625	2163	0.819	-	-	tr	RI, MS
75	β-Eudesmol	1634	2218	0.819	-	0.1	tr	RI, MS
76	Eudesm-11-en-4α-ol	1637	-	0.819	-	-	0.2	RI, MS
77	α-Eudesmol	1639	2209	0.819	-	0.1	tr	RI, MS
78	(Z)-Heptadec-8-ene	1676	-	0.723	-	-	tr	RI, MS
79	Manool oxide	1983	2334	0.795	-	0.1	tr	RI, MS
80	(E)-Biformene	2003	2377	0.744	-	0.2	0.1	RI, MS
81	Abietatriene	2035	2486	0.751	-	0.3	0.1	RI, MS
82	Sandaracopimarinal	2157	2789	0.810	-	0.2	0.1	RI, MS
83	Dehydroabietal	2222	-	0.774	-	0.3	0.1	RI, MS
<b>Total</b>					<b>93.8</b>	<b>99.8</b>	<b>89.9</b>	

Order of elution and percentages are given on apolar column; except for those with an asterisk (\*), percentages on polar column. RI<sub>a</sub>, RI<sub>p</sub>: retention indices measured on apolar (DB-1) and polar (DB-WAX) columns, respectively. L EO = Leaf EO; OB EO = Old Branches EO; YB EO = Young Branches EO. The relative proportions of each constituent were expressed in g/100 g. tr: traces (<0.05%); <sup>13</sup>C-NMR (italic) = compounds identified in fractions of chromatography. 2D-NMR = 2D-NMR spectrum are provided in Figure S1 (on the website of the journal).

## 2.2. Structure Elucidation of Unidentified Compounds

### 2.2.1. Identification of Pin-2-en-8-ol (A)

The first unknown constituent named **A** was identified neither by computer matching against commercial and lab-constructed SM libraries, nor by NMR using our in-house <sup>13</sup>C-NMR databases. As determined by GC(RI) and GC-MS, the compounds **A**, accounted for



4.2%, 4.5% and 10.3% in the leaf, old branches, and young branches essential oils of *C. decurrens*. RI values measured for this compound, 1189/1800 (RI<sub>a</sub>/RI<sub>p</sub>), suggested a monoterpene alcohol.

The young branches essential oil containing 10.3% of **A** was subjected to column chromatography (CC) on silica gel using a gradient of solvents (pentane/Et<sub>2</sub>O). Fraction F3 (eluted at 100% Et<sub>2</sub>O), contained 51.8% of the unknown compound. Compound **A** was finally isolated from F3 by means of preparative capillary-gas chromatography (pc-GC), with 95% purity (GC).

The <sup>13</sup>C-NMR spectrum of the isolated compound displayed 10 signals. Taken altogether, MS and NMR data, especially those provided by the DEPT spectra (2 C, 3 CH, 3 CH<sub>2</sub> and 2 CH<sub>3</sub>) and by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR (occurrence of C=CH and methylene alcohol function at 69.00 ppm), suggested the formula C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O.

By taking into account the degree of unsaturation and the multiplicity of carbon signals, compound **A** corresponded to a bicyclic unsaturated monoterpene alcohol. Moreover, from characteristic chemical shifts and signals multiplicity of H-7a/7b (Table 2), we deduced the occurrence of bicyclic unsaturated monoterpene alcohol having a pinane skeleton.

The CH<sub>2</sub> at 69.00 ppm indicated a primary alcohol, potentially located on carbons 8, 9 or 10. The possibility of a hydroxy group on C-10 was immediately discarded because the <sup>13</sup>C-NMR values of adjacent carbons 2 and 10 remained close to those of α-pinene (Coxon et al., 1983) (Table 2). The lack of HMBC correlations between hydrogens at 3.50–3.54 ppm (H-8b/8a) and C-2 confirmed the previous observation.

The <sup>13</sup>C-NMR data of pin-2-en-9-ol are available in the literature (Bessiere et al., 1978), and did not match with that of compound **A** (Table 2). Compound **A** was thus identified as pin-2-en-8-ol (**A**). In the case of α-pinene, methyl-8 and methyl-9 strongly differ in their respective <sup>13</sup>C-NMR chemical shifts, due to the presence of a γ-steric effect between C-9 and C-2 (Coxon et al., 1983). The structure was further corroborated by examination of the NOESY spectrum, (i) showing no correlation between hydrogens at 3.50–3.54 ppm (H-8b/8a) and the olefinic proton H-3; and (ii) by the presence of a clear correlation between methyl-9 (0.95 ppm) and H-3. The total assignment of compound **A** was finally achieved by the detailed examination of 2D-NMR data (Table 2). We noticed that the compound **A** was partially described over thirty years ago by De Pascual Teresa et al. (1983), with a partial

description of  $^1\text{H}$ -NMR chemical shifts. In the course of this investigation, we reported for the first time the  $^{13}\text{C}$ -NMR values, along with an assignment of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shifts.

**Table 2.** NMR data of pin-2-en-8-ol (**A**).

C	<sup>13</sup> C δ (ppm)	<sup>1</sup> H	<sup>1</sup> H δ (ppm) by HSQC	COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H	HMBC H → C	NOESY <sup>a</sup>
1	43.02	1	1.96 (td, <sup>3</sup> J, <sup>4</sup> J = 5.8 Hz; <sup>4</sup> J = 1.2 Hz)	3, 4b, 5, 7b	2, 3, 5, 6, 7, 8, 10	5, <u>8a</u> , <u>8b</u> , <u>10</u>
2	144.08	-	-	-	-	-
3	117.22	3	5.21 (m, J = 1.5 Hz)	1, 4a, 4b, 10	1, 5, 10	4a, 4b, <u>9</u> , 10
4	31.18	4a ( <i>anti</i> ) 4b ( <i>syn</i> )	2.21 (dm, <sup>2</sup> J = 17.1 Hz; J = 2.4 Hz) 2.08 (dm, <sup>2</sup> J = 17.1 Hz; J = 2.4 Hz)	3, 4b, 5, 10 1, 3, 4a, 5, 10	- 2, 3	3, 4b, 5, <u>7a</u> 3, 4a, 5, <u>9</u>
5	36.72	5	2.06 (m)	1, 4a, 4b, 7b	1	1, 4a, 4b, 7b, <u>8a</u> , <u>8b</u>
6	43.75	-	-	-	-	-
7	31.88	7a ( <i>endo</i> ) 7b ( <i>exo</i> )	1.23 (d, <sup>2</sup> J = 8.7 Hz) 2.16 (dt, <sup>2</sup> J = 8.7 Hz; <sup>3</sup> J = 5.8 Hz)	7b 1, 5, 7a	1, 2, 4, 5, 6, 9 1, 2, 4, 5	<u>4a</u> , 7b 5, 7a, <u>8a</u> , <u>8b</u>
8	69.00	8a 8b	3.54 (d, <sup>2</sup> J = 10.6 Hz) 3.50 (d, <sup>2</sup> J = 10.6 Hz)	8b, 9 8a, 9	1, 5, 9 1, 5, 9	<u>1</u> , <u>5</u> , <u>7b</u> , 9 <u>1</u> , <u>5</u> , <u>7b</u> , 9
9	16.03	9	0.95 (s)	8a, 8b	1, 5, 6, 8	<u>3</u> , <u>4b</u> , 8a, 8b, <u>10</u>
10	23.06	10	1.61 (m, J = 1.9 Hz)	3, 4a, 4b	1, 2, 3	<u>1</u> , 3, 9

<sup>a</sup> Pure NOE correlations appear underlined.

### 2.2.2. Identification of Pin-2-en-8-yl Acetate (**B**)

Compound **B** is the second unknown component of SM libraries and <sup>13</sup>C-NMR databases, which was present at 0.6, 0.6, and 1.4% in leaf, old branches, and young branches essential oils, respectively. Retention indices for **B** (RIa/RIp = 1310/1683) suggested an ester. The presence of common odd-electron ions (OE<sup>•+</sup>: 84, 92, 134 *m/z*) in both mass spectra of **A** and **B** indicated a possible structural relationship between the two compounds. Moreover, the presence of OE<sup>•+</sup> at *m/z* = 134 potentially indicated a [M<sup>•+</sup> – AcOH] loss from the molecular ion observed at *m/z* = 194 (Figure 2). Compound **B** was finally isolated from a fraction of the young branches essential oil. Fraction F2 (eluted with 95/5 pentane/Et<sub>2</sub>O) contained 8.0% of **B**, which was subsequently isolated by pc-GC with 76% purity (GC).

The <sup>13</sup>C-NMR spectrum of **B** displayed twelve signals. Multiple DEPT experiments allowed for differentiating of three quaternary carbons, three CH, three CH<sub>2</sub>, and three CH<sub>3</sub>. Moreover, the quaternary carbon at 170.48 ppm and the methylene at 70.58 ppm confirmed the presence of an ester. The presence of a singlet at 1.72 ppm in the <sup>1</sup>H spectrum correlated to a methyl signal at 20.53 ppm in the HSQC spectrum suggested an acetate group. This was confirmed by the correlation between H-12 and C-11 in the HMBC spectrum. Altogether, MS and NMR data permitted to envisage a pinane ester having the formula C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>. By comparison of its <sup>13</sup>C-NMR data with that of pin-2-en-8-ol (**A**), we noted that only C-8 and C-6 were impacted by the presence of the acetate. C-8 moved upfield by 1.58 ppm, and C-6 moved downfield by 1.76 ppm. Such variations of chemical shifts are commonly encountered when alcohols are compared to their corresponding acetates (Bradesi et al., 1994).

As final proof, the examination of the NOESY spectrum allowed us to notice correlations between hydrogen at 0.96 ppm (H-9) with H-3, and the absence of a correlation between hydrogens at 4.26–4.32 ppm (H-8b/8a) and H-3, thus confirming the orientation of the acetate in exo-position to the main cycle. All these data permitted the identification of compound **B** as pin-2-en-8-yl acetate (Table 3). As with compound **A**, **B** was partially described by De Pascual Teresa et al. (1983), with some <sup>1</sup>H-NMR chemical shifts and MS data. Herein, we detail a full set NMR data, among which includes: (i) a complete <sup>1</sup>H-NMR spectrum; (ii) <sup>13</sup>C-NMR values (described for the first time); and (iii) full 2D-NMR data. Interestingly, Adams et al. (2006) reported the chemical composition of a leaf essential oil from *C. decurrens*. In their study, the authors mentioned an unidentified component at RI = 1330 (DB-5). Although its RI value is shifted 20 points compared to our value, owing to the difference of stationary phase, the MS fragmentation previously reported is very similar to that we observed for **B**.

**Table 3.** NMR data of pin-2-en-8-yl acetate (**B**).

C	<sup>13</sup> C δ (ppm)	<sup>1</sup> H	<sup>1</sup> H δ (ppm) by HSQC	COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H	HMBC H → C	NOESY <sup>a</sup>
1	43.28	1	1.98 (td, <sup>3</sup> J, <sup>4</sup> J = 5.7 Hz; <sup>4</sup> J = 1.2 Hz)	3, 5, 7b	2, 3, 5, 8, 10	5, <u>7a</u> , 7b, <u>8a</u> , <u>8b</u>
2	143.57	-	-	-	-	-
3	117.29	3	5.17 (m, J = 1.5 Hz)	1, 4a, 4b, 10	-	4b, <u>9</u> , 10
4	30.94	4a ( <i>anti</i> ) 4b ( <i>syn</i> )	2.16 (dm, <sup>2</sup> J = 17.4 Hz; J = 2.5 Hz) 2.03 (dm, <sup>2</sup> J = 17.4 Hz; J = 2.5 Hz)	3, 4b, 5, 10 3, 4a, 5, 10	-	4b, 10 3, 4a, 5, <u>9</u> , 10
5	37.08	5	2.10 (m)	1, 4a, 4b, 7b	-	1, 4b, 7b, <u>8a</u> , <u>8b</u> , <u>12</u>
6	41.99	-	-	-	-	-
7	31.73	7a ( <i>endo</i> ) 7b ( <i>exo</i> )	1.21 (d, <sup>2</sup> J = 8.9 Hz) 2.25 (dt, <sup>2</sup> J = 8.9 Hz; <sup>3</sup> J = 5.7 Hz)	7b 1, 5, 7a	1, 2, 4, 5, 6, 9 1, 2, 4, 5	<u>1</u> , 7b 1, 5, 7a, <u>8a</u> , <u>8b</u> , <u>12</u>
8	70.58	8a 8b	4.32 (d, <sup>2</sup> J = 11.1 Hz) 4.26 (d, <sup>2</sup> J = 11.1 Hz)	8b, 9 8a, 9	1, 5, 6, 9, 11 1, 5, 6, 9, 11	<u>1</u> , <u>5</u> , <u>7b</u> , <u>9</u> <u>1</u> , <u>5</u> , <u>7b</u> , <u>9</u>
9	16.40	9	0.96 (s)	8a, 8b	1, 5, 6, 8	<u>3</u> , <u>4b</u> , <u>8a</u> , <u>8b</u> , <u>12</u>
10	22.95	10	1.57 (m, J = 1.9 Hz)	3, 4a, 4b	1, 2, 3, 4	3, 4a, 4b
11	170.48	-	-	-	-	-
12	20.53	12	1.72 (s)	-	8, 11	<u>5</u> , <u>7b</u> , <u>9</u>

<sup>a</sup> Pure NOE correlations appear underlined.

### 2.2.3. Identification of Pin-2-en-8-al (C)

A third compound (**C**), having RI values at 1102/1460 (RIa/RIp), could not be identified by GC-MS and <sup>13</sup>C-NMR analysis, even by using all of the computerized commercial MS libraries at our disposal, as well as our laboratory-built <sup>13</sup>C-NMR data library—it was unknown from our MS and <sup>13</sup>C-NMR databases. This component was present in leaf, old branches, and young branches EO of *C. decurrens* in 1.6%, 0.8%, and 2.0%, respectively. The examination of the MS spectrum showed a M<sup>•+</sup> at m/z = 150, suggesting the possible presence of an

aldehyde function. However, despite our many tests, any attempt of purification by pc-GC failed, since the isolated product was never pure, prompting us to adopt another strategy.

Thus, the pyridinium chlorochromate (PCC) oxidation of pin-2-en-8-ol (**A**) available in F3 at 51.8% yielded an aldehyde (45.6% in oxidized F3 named F3'), perfectly corresponding with both the RI values and MS data observed for compound **C**. The compound was further purified by means of column chromatography (CC) on silica gel using the following gradient of solvents pentane/Et<sub>2</sub>O 95/5 to yielded F3'-1 (11.6 mg) containing 80% of pin-2-en-8-al (**C**). However, we noticed a rapid oxidation of this aldehyde between GC (directly recorded after CC) and NMR/GC-MS analysis (recording after 2 hours). The compound **C** seemed to oxidize under atmospheric conditions—indeed, GC-MS and NMR analysis indicated the formation of corresponding acid: pin-2-en-8-oic acid (**E**) (Figure 2 and Table 4).

The <sup>13</sup>C-NMR spectrum displayed ten signals with strong intensity corresponding at the compound **C**. Subsequent DEPT experiments allowed us to determine the multiplicity of the different carbon signals, and suggested from NMR values, once more, a component having the pinane skeleton (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O). The methine (CH) observed at 204.19 ppm confirmed the presence of the aldehyde. Additionally, the <sup>13</sup>C chemical shifts of the two olefinic carbons were similar to those of pin-2-en-8-ol (**A**), and a comparison with the chemical shifts reported for pin-2-en-9-al (Bessiere et al., 1978) confirmed we had isolated its epimer. Finally, after examination of all 2D-NMR data, compound **C** was unambiguously identified as pin-2-en-8 al (**C**) (Table 4).

Herein again, pin-2-en-8-al (**C**) might correspond to an unknown compound reported by Adams et al. (2006). Both the RI value (1120) and MS data published by the authors are in fair concordance with our results, thus suggesting it is probably the same molecule.

**Table 4.** NMR data of pin-2-en-8-al (**C**) and pin-2-en-8-oic acid (**E**).

<b>C</b>	<sup>13</sup> C δ (ppm) of <b>C</b>	<sup>1</sup> H of <b>C</b>	<sup>1</sup> H δ (ppm) by HSQC of <b>C</b>	<sup>13</sup> C δ (ppm) of <b>E</b>
1	42.86	1	2.29 (td, <sup>3</sup> J, <sup>4</sup> J = 5.7 Hz; <sup>4</sup> J = 1.4 Hz)	45.31
2	142.26	-	-	142.08
3	117.99	3	5.12 (m, J = 1.6 Hz)	117.21
4	30.27	4a ( <i>anti</i> )	2.08 (dm, <sup>2</sup> J = 17.8 Hz; J = 2.5 Hz)	30.25
		4b ( <i>syn</i> )	1.85 (dm, <sup>2</sup> J = 17.8 Hz; J = 2.5 Hz)	
5	36.77	5	2.40 (md, <sup>4</sup> J = 1.2 Hz)	39.35
6	53.25	-	-	49.14
7	30.76	7a ( <i>endo</i> )	1.10 (d, <sup>2</sup> J = 8.7 Hz)	32.06
		7b ( <i>exo</i> )	2.06 (dt, <sup>2</sup> J = 8.7 Hz; <sup>3</sup> J = 5.7 Hz)	
8	204.19	8	9.62 (s)	184.91
9	12.24	9	0.73 (s)	16.20

10

22.70

10

1.49 (m,  $J = 2.0$  Hz)

22.77

---

#### 2.2.4. Identification of Methyl Pin-2-en-8-oate (D)

A fourth compound (**D**) respectively present in 3.0%, 1.8% and 3.6% in leaf, old branches, and young branches oils remained unknown from our MS and  $^{13}\text{C}$ -NMR database. Its RI values, 1207/1543 (RIa/RIp), suggested an oxygenated monoterpene. Fraction F2 (eluted at 95/5 pentane/Et<sub>2</sub>O) obtained from the young branches EO contained 17.8% of compound **D**. This compound was isolated from F2 by means of pc-GC, giving **D** in 91% purity (GC).

The MS spectrum indicated an  $\text{M}^{+\bullet}$  at  $m/z = 180$ . The  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum exhibited eleven signals having the following multiplicities: three quaternary carbons, three CH, two CH<sub>2</sub>, and three CH<sub>3</sub>. The two chemical shifts at 51.47 ppm (CH<sub>3</sub>-O) and 178.28 ppm indicated the presence of a methyl ester. Here again, the degree of unsaturation calculated from the formula C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub> suggested a pinane derivative. Interestingly, by comparison of chemical shifts of the compound **D** with those of pin-2-en-8-ol (**A**), we noticed that only C-6, C-8, and C-11 were impacted by the presence of the ester. The comparison with  $^{13}\text{C}$ -NMR values of pin-2-en-8-oic acid (**E**) was even more revealing—indeed, all chemical shifts are very similar excepted: (i) C-8, which was moved downfield by 6.63 ppm (indicating an ester function) and (ii) C-11, which was not present in (**E**) and being characteristic of methoxy group. As described above for others compounds, the analysis of the NOESY spectrum indicated that the ester function is positioned on C-8 (Table 5). According to the HMBC spectrum, the signal at 51.47 ppm, characteristic of a methoxy group, was correlated with C-8, thus confirming the presence of a methyl ester.

**Table 5.** NMR data of methyl pin-2-en-8-oate (**D**).

C	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm) by HSQC	COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$	HMBC H $\rightarrow$ C	NOESY <sup>a</sup>
1	45.44	1	2.77 (td, $^3J$ , $^4J = 5.6$ Hz; $^4J = 1.4$ Hz)	3, 5, 7b	2, 3, 5, 6, 7, 8, 10	5, 7b, <u>10</u>
2	142.22	-	-	-	-	-
3	117.19	3	5.14 (m, $J = 1.5$ Hz)	1, 4a, 4b, 10	-	4a, 4b, <u>9</u> , 10
4	30.32	4a ( <i>anti</i> ) 4b ( <i>syn</i> )	2.15 (dm, $^2J = 17.6$ Hz; $J = 2.4$ Hz) 2.03 (dm, $^2J = 17.6$ Hz; $J = 2.4$ Hz)	3, 4b, 5, 10 3, 4a, 5, 10	1, 2, 5, 6 2, 3, 5, 6, 7	3, 4b, <u>7a</u> , 10 3, 4a, <u>9</u> , 10
5	39.46	5	2.87 (md, $^4J = 1.2$ Hz)	1, 4a, 4b, 7b	-	1, 7b
6	49.05	-	-	-	-	-
7	32.05	7a ( <i>endo</i> ) 7b ( <i>exo</i> )	1.23 (d, $^2J = 8.6$ Hz) 2.16 (dt, $^2J = 8.6$ Hz; $^3J = 5.6$ Hz)	7b 1, 5, 7a	1, 2, 4, 5, 6, 9 1, 2, 4, 5, 6	<u>4a</u> , 7b 1, 5, 7a, <u>11</u>
8	178.28	-	-	-	-	-
9	16.24	9	1.11 (s)	-	1, 5, 6, 8	<u>3</u> , <u>4b</u> , <u>10</u>
10	22.85	10	1.57 (m, $J = 1.9$ Hz)	3, 4a, 4b	1, 2, 3	<u>1</u> , 3, 4a, 4b, <u>9</u>
11	51.47	11	3.43 (s)	-	8	<u>7b</u>

<sup>a</sup> Pure NOE correlations appear underlined

### 3. Discussion

The combined use of GC-MS and  $^{13}\text{C}$ -NMR for the analysis essential oils obtained from leaf, old branches, and young branches of *Calocedrus decurrens* led to the identification of 45, 68 and 77 components. These accounted for 93.8%, 99.8% and 89.9% of the respective essential oil compositions. The major monoterpene constituents identified in leaf, old branches, and young branches EOs were  $\alpha$ -pinene (11.2; 56.6; 22.3%), myrcene (13.4; 8.4; 9.6%),  $\Delta$ -3-carene (31.3; 5.2; 11.1%), limonene (6.4; 5.1; 5.5%), and terpinolene (6.9; 1.5; 3.2%). Other components present at appreciable amounts were pin-2-en-8-ol (**A**) (up to 10.3% in young branches oil); and pin-2-en-8-yl acetate (**B**) (up to 1.4% in young branches oil), whose presence was previously reported in *Aristolochia longa* EO (De Pascual Teresa et al., 1983). Hence, the  $^{13}\text{C}$ -NMR data for both compounds are reported here for the first time. Additionally, two new compounds, pin-2-en-8-al (**C**) (up to 2.0% in young branches oil) and methyl pin-2-en-8-oate (**D**) (up to 3.6% in young branches oil) were isolated and fully characterized. Furthermore, we reported the  $^{13}\text{C}$ -NMR values of pin-2-en-8-oic acid (**E**), which is the oxidation product of pin-2-en-8-al (**C**).

The essential oils obtained from the different parts of *Calocedrus decurrens* from Corsica are qualitatively close in terms of chemical composition, but they present significant differences related to their content of each major monoterpene. Taken altogether, these EOs are qualitatively close to that described by Adams et al. (2006) and Von Rudloff (1981). Even if it was difficult to make any further comparison since the old and young branches were studied for the first time, we can nevertheless note the total absence of phenolic compounds in our samples.

From an ecological point of view, the *C. decurrens* species seems to be adaptable to the hard conditions in Corsica, and could be a good alternative for reforestation in some areas, due to its strong resistance against the forest fire.



## 4. Materials and Methods

### 4.1. Plant Material, Isolation of Essential Oils

The experimental Ospedale forest (southeast of the Corsica) located at 960 m altitude (GPS coordinates: 41°39,578' N, 009°11,413' E) was created by the French National Forest Office ("Office National des Forêts") in 1989 (Groupe Arboretum, 1993). Thus, these trees are about thirty years old.

We harvested leaf, old branches (parts of branches previously growing), and young branches (parts of branches actually growing), that we will sometimes refer to as, respectively: L, OB, and YB.

The essential oil samples (L EO = 4.8 g; OB EO = 298.1 mg; YB EO = 307.4 mg) were obtained by water distillation (during 3 hours) using a Clevenger-type apparatus from leaf (997.4 g), old branches (160.5 g), and young branches (78.5 g) of *C. decurrens*.

A voucher specimen was deposited at the Conservatoire Botanique National de Corse, (Corte, France), under accession numbers GG2776.

### 4.2. Fractionation of the Young Branches Essential Oil

The essential oil obtained from the young branches of *Calocedrus decurrens* (296.0 mg) was separated into three fractions F1-3 by column chromatography (CC) on silica gel (60–200  $\mu\text{m}$ , 60 Å, 23.2 g) using the following gradient of solvents: pentane/Et<sub>2</sub>O 100/0 (F1 = 80.2 mg), 95/5 (F2 = 45.7 mg), and 0/100 (F3 = 76.2 mg).

Fraction F2 contained compounds **B** (8.0%), **C** (7.2%), and **D** (17.8%); Fraction F3 contained compound **A** (51.8%). F2 and F3 were directly used in preparative capillary-gas chromatography (pc-GC) for the isolation of the target compounds **A**, **B**, **C** (attempts failed), and **D**. Sub-fractions F2-1 contained **B** (76%), F2-2 contained **D** (91%), and F3-1 contained **A** (95%). The three sub-fractions were subjected to spectroscopic analysis for structure elucidation.

### 4.3. Preparation of pin-2-en-8-al (**C**)

In a 50 mL round bottom flask equipped with a reflux condenser, 225.6 mg (1.05 mmol) of pyridinium chlorochromate (PCC) and 31.1 mg (0.23 mmol) of sodium acetate were suspended in 2 mL of anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Fraction F3 (76.2 mg) containing 51.8% of **A** (39.5 mg, 0.26 mmol of **A**) was diluted in 3 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and added to the PCC solution under stirring in one portion. After 7 hours, 20 mL of dry Et<sub>2</sub>O was added and the supernatant decanted from the black gum. The insoluble residue was washed thoroughly 3 times with 10 mL portions of anhydrous Et<sub>2</sub>O whereupon it became a black granular solid. The combined organic layers were passed through a short pad of Florisil, and the solvent was evaporated to yield fraction F3' (42.1 mg) containing 45.6% of compound **C**. The compound was further purified by means of column chromatography on silica gel (60–200 μm, 60 Å, 30 g) using the following gradient of solvents: pentane/Et<sub>2</sub>O 95/5 to yield F3'-1 (11.6 mg) containing 80% of pin-2-en-8-al (**C**).

#### 4.4. Gas Chromatography

Analyses were performed on a Clarus 500 PerkinElmer (PerkinElmer, Courtaboeuf, France) system equipped with a FID and two fused-silica capillary columns (50 m × 0.22 mm, film thickness 0.25 μm), DB-1 (polydimethylsiloxane) and DB-WAX (polyethylene glycol). The oven temperature was programmed from 60 °C to 220 °C at 2 °C/min and then held isothermal at 220 °C for 20 min; injector temperature: 250 °C; temperature detector: 250 °C; carrier gas: helium (0.8 mL/min); split: 1/60; injected volume: 0.5 μL. Retention indices (RI) were determined against a series of n-alkanes with linear interpolation (Target Compounds software from PerkinElmer). The quantification method is according to Tissot et al. (2012), (i) methyl octanoate was used as an internal reference; (ii) relative response factors (RRF) were calculated for each compound; and (iii) the relative proportions of each constituent were deduced using the formula detailed in the article previously cited and expressed in g/100 g.

#### 4.5. Gas Chromatography-Mass Spectrometry in Electron Impact Mode

Essential oils samples were analyzed with a Perkin-Elmer TurboMass detector quadrupole (Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France), directly coupled to a Perkin-Elmer Autosystem XL, equipped with a fused-silica capillary column (50 m × 0.22 mm i.d., film

thickness 0.25  $\mu\text{m}$ ), DB-1 (polydimethylsiloxane). Carrier gas, helium at 0.8 mL/min; split: 1/74; injection volume: 0.5  $\mu\text{L}$ ; injector temperature: 250  $^{\circ}\text{C}$ ; oven temperature programmed from 60  $^{\circ}\text{C}$  to 220  $^{\circ}\text{C}$  at 2  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  and then held isothermal at 220  $^{\circ}\text{C}$  for 20 min. Ion source temperature: 250  $^{\circ}\text{C}$ ; energy ionisation: 70 eV; electron ionisation mass spectra were acquired over the mass range 35–350 Da.

#### 4.6. Preparative Capillary-Gas Chromatography

Isolation of compounds **A**, **B** and **D** were performed using an Agilent 6890 Plus gas chromatograph coupled to a Gerstel preparative fraction collector (PFC) (Agilent, Santa Clara, CA, USA), operated under Chemstation Rev A.10.02/Gerstel Maestro 1.3.8.14. The GC was equipped with a Phenomenex ZB-5 megabore capillary column (30 m  $\times$  0.53 mm; 3.0  $\mu\text{m}$  film thick). A Graphpack effluent splitter was connected to the column outlet, and additionally mounted with 0.1 mm and 0.32 mm deactivated fused-silica capillary restrictors (1 m each), to provide an FID/PFC ratio of  $\sim 1/9$ . The transfer line and the PFC were maintained at 230  $^{\circ}\text{C}$ . The injected volume was 1  $\mu\text{L}$  in splitless mode. The oven temperature was increased from 70 to 120  $^{\circ}\text{C}$  at 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , then from 120  $^{\circ}\text{C}$  to 250  $^{\circ}\text{C}$  at 20  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . The system was operated in constant pressure mode at 35 kPa. Compounds were trapped at 5–10  $^{\circ}\text{C}$  in Gerstel U-type glass tubes by programming cutting times into the operating software, allowing for accurate automated operation. The isolation of any unknown compound in amounts sufficient for NMR analysis required 150–400 GC runs, and to avoid all contamination, each product was collected directly in a NMR tube.

#### 4.7. Gas Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry

High-resolution EI-mass spectra were recorded using an Agilent 7200 GC-QTOF system (Agilent, Santa Clara, CA, USA), equipped with a Agilent J&W, VF-waxMS capillary column (30 m  $\times$  0.25 mm; 0.25  $\mu\text{m}$  film thick). The mass spectrometer was operated at 70 eV with an acquisition rate of 2 GHz over a 35–450  $m/z$  range, affording a resolution of  $\sim 8000$ . Injection volume 1  $\mu\text{L}$ ; split ratio 1/20; inlet temperature 250  $^{\circ}\text{C}$ , detector temperature 230  $^{\circ}\text{C}$ ; column flow (He) 1.2 mL/min; temperature program for oven 60  $^{\circ}\text{C}$  (5 min isotherm) to 240  $^{\circ}\text{C}$  at 5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (10 min final isotherm).



## 4.8. Nuclear Magnetic Resonance

NMR spectra for compounds **A**, **B**, **C**, **D** and **E** were recorded in C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> at 298 K on a Bruker Avance DRX 500 spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) operating at 500.13 MHz for <sup>1</sup>H, and 125.75 MHz for <sup>13</sup>C. In order to increase sensitivity, <sup>13</sup>C-NMR spectra, such as broadband-<sup>13</sup>C, DEPT 135, and DEPT 90, were run with a direct probe head (5 mm PADUL <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H Z-GRD). 1D- and 2D-NMR spectra such as <sup>1</sup>H, COSY, NOESY, HSQC, HMBC were run with an inverse probe head (5 mm PHTXI <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N Z-GRD). Spectrum calibration was performed by using the C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> signal as internal reference (7.16 ppm for <sup>1</sup>H-NMR, 128.06 ppm for <sup>13</sup>C-NMR). Chemical shifts ( $\delta$ ) are expressed in parts per million (ppm) and coupling constants ( $J$ ) in hertz. All NMR experiments were carried out using pulse sequences supplied by the spectrometer manufacturer (Bruker Topspin™, Bruker, Wissembourg, France) and processed via Mestrelab MestreNOVA software (Version 6.0.2-5475).

Other spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 (100.623 MHz for <sup>13</sup>C) (Bruker, Wissembourg, France) equipped with a 5-mm probe, in deuterated chloroform (CDCl<sub>3</sub>), with all shifts referred to 7.26 ppm for <sup>1</sup>H and 77.16 ppm for <sup>13</sup>C. The <sup>1</sup>H-NMR spectra were recorded with the following parameters: pulse width (PW) 4.3 ms; acquisition time 2.6 s for 32 K data table with a spectral width (SW) of 6000 Hz (15 ppm). <sup>13</sup>C-NMR spectra were recorded with the following parameters: PW 4  $\mu$ s (flip angle 45°); acquisition time 2.7 s for 128 K data table with a spectral width of 24,000 Hz (240 ppm); total repetition time 2.8 s; CPD (composite pulse decoupling) mode decoupling; digital resolution 0.183 Hz/point.

## 4.9. Identification and Quantification of Individual Components

Identification of individual components was based: (a) on a comparison of their GC retention indice (RI) values on both polar and apolar stationary phases, with the literature (König et al., 2001); (b) on computer searches using digital libraries of mass spectral data and comparison with published data (Adams, 2007 ; König et al., 2001 ; McLafferty et Stauffer, 1994); (c) on a comparison of the signals in the <sup>13</sup>C-NMR spectra of the mixtures with those of reference spectra compiled in the laboratory spectral library, with the help of laboratory-made software (Tomi et al., 1995).

## 4.10. Spectral Data

*Pin-2-en-8-ol (A)*:  $C_{10}H_{16}O$ ; HREIMS:  $m/z$  152.1194 (calcd. for  $C_{10}H_{16}O$ , 152.1207); EI-MS 70 eV,  $m/z$  (rel. int.): 152 (1,  $M^{*+}$ ), 150 (2), 134 (8,  $M^{*+} - H_2O$ ), 121 (20), 119 (30), 105 (29), 94 (90), 93 (100), 92 (75), 91 (93), 84 (43), 79 (95), 77 (60), 67 (21), 65 (16), 55 (22), 53 (16), 43 (19).  $^1H$ -NMR ( $C_6D_6$ , 500 MHz) and  $^{13}C$ -NMR ( $C_6D_6$ , 125 MHz): see Table 2.

*Pin-2-en-8-yl acetate (B)*:  $C_{12}H_{18}O_2$ ; HREIMS:  $m/z$  134.1086 ( $[M^{*+} - AcOH]$ ) (calcd. for  $C_{10}H_{14}$ , 134.1101); EI-MS 70 eV,  $m/z$  (rel. int.): 194 (1,  $M^{*+}$ ), 152 (3), 134 (44,  $M^{*+} - AcOH$ ), 119 (96), 105 (60), 93 (76), 92 (86), 91 (100), 84 (28), 79 (49), 77 (43), 65 (19), 55 (20), 43 (93), 41 (41).  $^1H$ -NMR ( $C_6D_6$ , 500 MHz) and  $^{13}C$ -NMR ( $C_6D_6$ , 125 MHz): see Table 3.

*Pin-2-en-8-al (C)*:  $C_{10}H_{14}O$ ; HREIMS:  $m/z$  150.1034 (calcd. for  $C_{10}H_{14}O$ , 150.1050); EI-MS 70 eV,  $m/z$  (rel. int.): 150 (33,  $M^{*+}$ ), 135 (18), 121 (29,  $M^{*+} - CHO$ ), 117 (20), 107 (23), 105 (22), 95 (26), 93 (71), 92 (37), 91 (100), 82 (62), 80 (29), 79 (75), 77 (61), 67 (20), 65 (19), 58 (24), 54 (21), 53 (27), 41 (34).  $^1H$ -NMR ( $C_6D_6$ , 500 MHz) and  $^{13}C$ -NMR ( $C_6D_6$ , 125 MHz): see Table 4.

*Methyl pin-2-en-8-oate (D)*:  $C_{11}H_{16}O_2$ ; HREIMS:  $m/z$  180.1137 (calcd. for  $C_{11}H_{16}O_2$ , 180.1156); EI-MS 70 eV,  $m/z$  (rel. int.): 180 (13,  $M^{*+}$ ), 165 (9,  $M^{*+} - CH_3$ ), 148 (40,  $M^{*+} - MeOH$ ), 139 (15), 133 (13), 125 (23), 121 (100), 120 (39), 119 (32), 112 (25), 105 (94), 93 (75), 91 (75), 88 (59), 79 (51), 77 (61), 65 (20), 53 (23), 43 (20).  $^1H$ -NMR ( $C_6D_6$ , 500 MHz) and  $^{13}C$ -NMR ( $C_6D_6$ , 125 MHz): see Table 5.

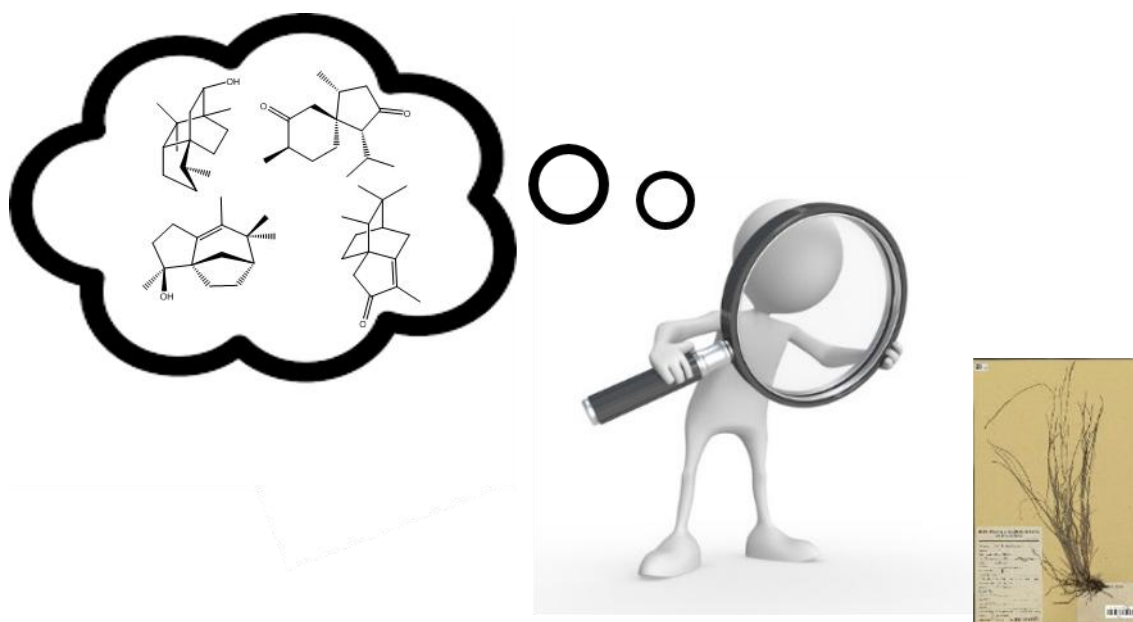
*Pin-2-en-8-oic acid (E)*:  $C_{10}H_{14}O_2$ ; RI (DB-1/DB-WAX) 1288/2286; EI-MS 70 eV,  $m/z$  (rel. int.): 166 (4,  $M^{*+}$ ), 121 (100), 111 (18), 105 (76), 98 (25), 93 (69), 91 (73), 80 (11), 79 (61), 77 (62), 74 (41), 68 (35), 67 (28), 65 (6), 55 (13), 53 (16), 51 (5), 43 (14), 41 (36).  $^{13}C$ -NMR ( $C_6D_6$ , 125 MHz): see Table 4.

**Supplementary Materials:** The following are available online, Figure S1: 1D- and 2D-NMR data for pin-2-en-8-ol (A), pin-2-en-8-yl acetate (B), pin-2-en-8-al (C) and methyl pin-2-en-8-oate (D).



## Article 6. New sesquiterpenes including a novel skeleton (Elionurane) from *Elionurus tristis* oils

Gabriel Garcia, Delphin Rabehaja, Loïc Tissandié, Jean-Jacques Filippi, Félix Tomi



Chemical composition of essential oils from aerial parts and roots of *Elionurus tristis* were investigated by GC(RI), GC-MS, pc-GC and NMR. The major constituents in both aerial parts and roots EOs were:  $\alpha$ -pinene (1.7; 7.3% respectively), camphene (4.0; 13.6%), *trans*- $\alpha$ -bergamotene (7.0; 3.3%) and calarene (2.1; 12.7%). Moreover, we identified several unusual sesquiterpenes and four new molecules: (i) 7-*epi*-khusian-2-ol and 4,8-di-*epi*-acorone (respectively two new epimers of khusian-2-ol and acorone); (ii) 2-*epi*-ziza-5-en-2-ol and elionurone (two new sesquiterpenes). The last one exhibits a novel natural sesquiterpenic skeleton.  $^{13}\text{C}$ -NMR data are provided for several uncommon compounds and the new compounds were isolated and fully characterized by MS, 1D- and 2D-NMR. Furthermore, the formation pathway of the novel skeleton is discussed.

**Keywords:** elionurone, 2-*epi*-ziza-5-en-2-ol, elionurane skeleton, biosynthesis pathway, 7-*epi*-khusian-2-ol, 4,8-di-*epi*-acorone, cyclocopacamphene, structural elucidation



**This article is not yet submitted**

## 1. Introduction

The genus *Elionurus* sometimes spelled *Elyonurus* belonging to *Poaceae* family (syn: *Gramineae*) is widespread in the tropical and subtropical regions of America, Africa and Australia (Renvoize, 1978).

There are a few articles dealing with the chemical composition of *Elionurus* species. Hefendehl and Fonseca (1976) have reported the essential oil (EO) composition of *E. viridulus* containing neral (53.0%) and geranial (31.3%) as major components.

Three papers reported the chemical composition of *E. muticus* EO. Scramin et al. (2000) described the chemical composition of the leaf EO of *E. muticus* harvested in Brazil, having as major compounds: spathulenol (18.6%), (*E*)- $\beta$ -caryophyllene (17.9%) and camphene (11.5%). Chagonda et al. (2000, 2012) reported the chemical composition of *E. muticus* EO from Zimbabwe. Aerial parts EOs were characterized by geranial (29.6-44.7%), neral (20.2-35.4%) and geranyl acetate (1.8-18.8%) as major compounds, while roots EO was dominated by 1-(10)-aristolene-2-one (72.1%).

EO of *E. elegans* native to Burkina-Faso was dominated by camphenone (43.0%), caryophyllene oxide (4.9%) and bisabolone (4.9%) in the case of aerial parts, whereas the roots one was characterized by camphenone (39.0%) and *epi*- $\beta$ -santalene (12.0%) (Mevy et al., 2002).

Two papers described the EO of *E. hensii* from Republic of Congo. The first one was reported by Silou et al. (2006) and concerned the chemical composition of three parts: leaves/flowers, stems and roots. The leaves/flowers and stems EOs contained mainly: *trans*-mentha-1(7),8-dien-2-ol (16.8; 15.7% respectively), *cis*-mentha-1(7),8-dien-2-ol (13.3; 13.8%) and 2-undecanone (9.4; 9.4%); and roots EO was characterized by aristolone (49.3%), *p*-cymene (13.1%), intermedeol (7.3%) and 2-undecanone (6.0%). The latter reported the composition of aerial parts of *E. hensii* being very close to that cited above with: *trans*-mentha-1(7),8-dien-2-ol (17.5 $\pm$ 1.0%), *cis*-mentha-1(7),8-dien-2-ol (12.4 $\pm$ 2.1%) and 2-undecanone (10.4 $\pm$ 0.8%); while the composition of roots EO was different: limonene (30.4 $\pm$ 10.65%), calarene (19.6 $\pm$ 6.5%), aristolone (8.6 $\pm$ 6.5%) and 2-undecanone (7.3 $\pm$ 2.5%) (Yang et al., 2013).

As for *Elionurus tristis*, it is an aromatic grass endemic to Madagascar widespread in the highlands. In traditional medicine, *E. tristis* chewed or drunk in decoction is used against

colic and as antipyretic (Chazan, 1969). The first paper concerning the *E. tristis* EO dates back more than forty years, and reported summary informations about the chemical composition such as the presence of an unsaturated sesquiterpenic ketone named antsorenone. Its structure that the author himself described as a mere hypothesis was determined from UV, IR and <sup>1</sup>H-NMR and would deserves a revisiting (Chazan, 1969). Recently another team investigated the *E. tristis* EO and reported a composition dominated by calarene (18.4%), neoclovene (15.8%) and nootkatone (10.4%) (Yedomon, 2017).

In this study, we wish to bring more details regarding to the chemistry of *E. tristis* through the investigation of aerial parts and roots EOs. Emphasis has been placed for identifying several unusual compounds such: 1(10)-aristolene-2-one (**A**), aristolone (**B**), acorenone B (**C**), cyclocopacamphene (**D**), 2-*epi*-prezizaene (**E**), 2-*epi*-prezizaan-7-ol (**F**), 7-*epi*-khusian-2-ol (**G**), 4,8-di-*epi*-acorone (**H**), 2-*epi*-ziza-5-en-2-ol (**I**) and elionurone (**J**). The last four are reported for the first time.

## 2. Results and discussion

### 2.1. Analysis of *E. tristis* aerial parts and roots essential oils by GC(RI), GC-MS and <sup>13</sup>C-NMR

EOs of *E. tristis* were analyzed by GC(RI) on both apolar and polar stationary phases. Constituents were identified by means of GC-MS and <sup>13</sup>C-NMR. The <sup>13</sup>C-NMR methodology developed in our laboratory allows to identify the constituents in mixture by comparison of their <sup>13</sup>C-NMR values with those of the compounds present in our home-made libraries taking into account several parameters (Ouattara et al., 2014; Tomi et al., 1995).

The identified major constituents in both aerial EOs were  $\alpha$ -pinene (1.7; 7.3% respectively), camphene (4.0; 13.6%), *trans*- $\alpha$ -bergamotene (7.0; 3.3%) and calarene (2.1; 12.7%) (Table 1). Interestingly, we noticed the presence of ten unidentified compounds (by GC(RI) and GC-MS) in appreciable amounts in aerial parts (AP) and roots (R) EOs: i) compound **A** accounting for: 1.3 (AP); 6.4% (R); ii) **B**: 0.6; 3.1%; iii) **C**: 17.6; 7.2%; iv) **D**: 1.6; 2.2%; v) **E**: 4.0; 6.3%; vi) **F**: 5.1; 1.8%; vii) **G**: 3.5; 1.5%; viii) **H**: 3.1; 0.2%; ix) **I**: 1.0; 1.3%; x) **J**: 15.4; 5.6% (Figure 1).

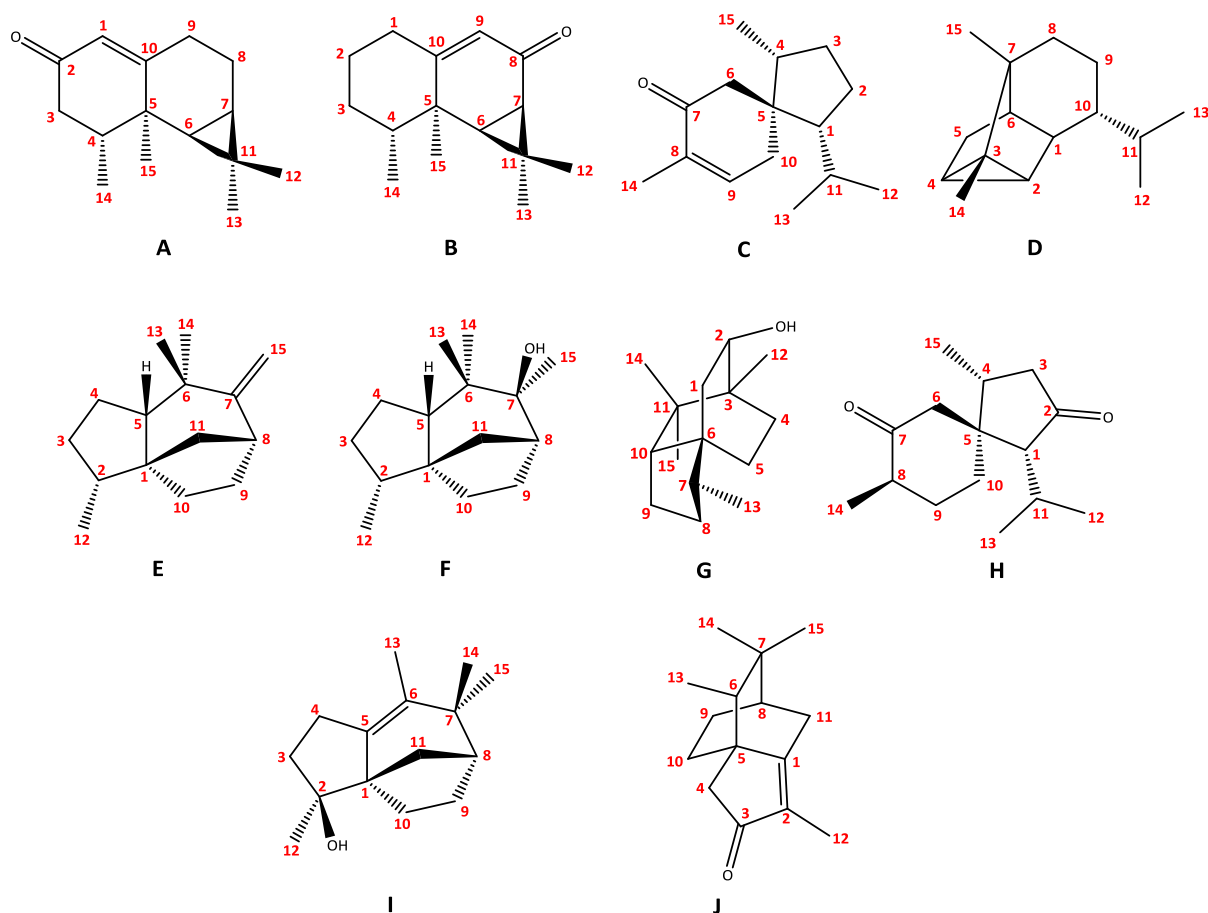


Figure 1. Structures of compounds A–J.

Table 1. Chemical compositions of essential oils of *Elionurus tristis*.

No.	Compounds	R <sub>1a</sub>	R <sub>1p</sub>	RRF calculated	Aerial Parts	Roots	Identification
1	Tricyclene	919	1013	0.765	1.0	3.8	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
2	α-Thujene	927	1013	0.765	tr	0.1	RI, MS
3	α-Pinene	929	1013	0.765	1.7	7.3	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
4	Camphene	942	1066	0.765	4.0	13.6	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
5	6-Methyl-hept-5-en-2-one	959	1337	0.917	0.1	0.1	RI, MS
6	Sabinene	963	1122	0.765	tr	0.2	RI, MS
7	β-Pinene	969	1110	0.765	tr	0.2	RI, MS
8	Myrcene	979	1163	0.765	0.5	0.3	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
9	p-Cymene	1010	1274	0.698	0.3	0.7	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
10	Limonene*	1019	1203	0.765	0.5	1.6	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
11	1,8-Cineole*	1019	1213	0.869	1.0	3.2	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
12	Camphenilone	1056	-	0.912	0.1	-	RI, MS
13	Nonanal	1080	1392	0.870	tr	-	RI, MS
14	Linalool	1082	1548	0.869	0.4	-	RI, MS
15	Perillene	1084	1419	0.907	tr	-	RI, MS
16	Campholenal A	1104	1481	0.887	tr	-	RI, MS
17	Camphor	1119	1519	0.887	0.1	0.2	RI, MS
18	trans-Pinocarveol	1122	1650	0.876	tr	0.1	RI, MS
19	trans-Verbenol	1128	1680	0.876	0.1	tr	RI, MS
20	Camphene hydrate	1130	1596	0.869	tr	0.1	RI, MS
21	p-Mentha-1,5-dien-8-ol	1147	1728	0.887	0.2	-	RI, MS

22	Borneol	1151	1701	0.869	0.3	0.4	RI, MS
23	<i>p</i> -Methylacetophenone	1152	1779	0.839	tr	0.2	RI, MS
24	Cryptone	1153	1661	0.912	0.2	0.2	RI, MS
25	<i>p</i> -Cymen-8-ol	1158	1803	0.809	0.1	0.1	RI, MS
26	Terpinen-4-ol	1160	1597	0.869	0.1	0.3	RI, MS
27	Myrtenal	1167	1627	0.907	tr	tr	RI, MS
28	$\alpha$ -Terpineol	1170	1697	0.869	0.3	0.5	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
29	Verbenone	1179	1708	0.907	0.2	0.2	RI, MS
30	Decanal	1182	1499	0.852	0.1	-	RI, MS
31	Octyl acetate	1195	1473	0.974	0.1	-	RI, MS
32	<i>cis</i> -Carveol	1213	1835	0.887	0.1	-	RI, MS
33	Carvone	1214	1739	0.907	tr	0.1	RI, MS
34	Piperitone	1224	1728	0.887	0.1	0.1	RI, MS
35	Decanol	1253	1760	0.836	0.2	-	RI, MS
37	Bornyl acetate	1267	1581	0.958	2.7	3.3	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
38	<i>trans</i> -Pinocarvyl acetate	1289	1648	0.976	0.1	0.1	RI, MS
39	Cyclocopacamphene ( <b>D</b> )	1365	1479	0.751	1.6	2.2	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
40	Cyclocosativene	1367	1479	0.751	tr	0.1	RI, MS
41	$\alpha$ -Ylangene	1373	1472	0.751	0.2	-	RI, MS
42	$\alpha$ -Funebrene	1384	1500	0.751	0.2	-	RI, MS
43	7- <i>epi</i> -Sesquithujene	1390	1527	0.751	tr	-	RI, MS
44	Sativene	1392	1523	0.751	tr	-	RI, MS
45	$\alpha$ -Cedrene	1415	1566	0.751	1.8	1.6	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
46	( <i>E</i> )- $\beta$ -Caryophyllene	1418	1571	0.751	0.1	-	RI, MS
47	<i>trans</i> - $\alpha$ -Bergamotene*	1430	1584	0.751	7.0	3.3	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
48	Calarene*	1430	1591	0.751	2.1	12.7	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
49	Sesquisabinene A	1433	1647	0.751	1.5	0.6	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
50	Prezizaene	1442	1630	0.751	0.8	1.3	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
52	2- <i>epi</i> -Prezizaene ( <b>E</b> )	1447	1636	0.751	4.0	6.3	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
53	$\beta$ -Santalene	1452	1646	0.751	0.7	0.8	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
54	Dauca-5,8-diene	1465	1654	0.751	-	0.2	RI, MS
55	$\alpha$ -Curcumene	1467	1773	0.707	1.1	0.6	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
56	$\alpha$ -Amorphene	1471	1686	0.751	0.5	0.8	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
57	<i>trans</i> - $\beta$ -Bergamotene	1476	1682	0.751	1.6	0.7	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
58	$\beta$ -Bisabolene	1497	1720	0.751	0.1	tr	RI, MS
59	$\beta$ -Curcumene	1499	1734	0.751	0.1	-	RI, MS
60	$\alpha$ -Alaskene	1505	-	0.751	-	0.2	RI, MS
61	$\gamma$ -( <i>Z</i> )-Bisabolene	1505	1732	0.751	0.5	-	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
62	<i>cis</i> -calamenene	1506	1826	0.707	0.2	0.2	RI, MS
63	7- <i>epi</i> - $\alpha$ -Selinene	1512	1760	0.751	-	0.1	RI, MS
64	$\delta$ -Cadinene	1512	1748	0.751	0.6	-	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
65	Sesquiphellandrene B	1514	1773	0.751	0.7	0.5	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
66	$\alpha$ -Calacorene	1525	-	0.715	0.1	0.1	RI, MS
67	( <i>E</i> )-Nerolidol	1545	2037	0.819	1.1	-	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
68	Caryophyllene oxide	1566	1980	0.830	4.0	0.7	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
69	2- <i>epi</i> -Ziza-5-en-2-ol ( <b>I</b> )	1582	2103	0.830	1.0	1.3	RI, MS, 2D-NMR
70	1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol	1614	2054	0.819	0.2	0.3	RI, MS
71	2- <i>epi</i> -Prezizaan-7-ol ( <b>F</b> )	1640	2176	0.819	5.1	1.8	RI, MS, 2D-NMR
72	$\beta$ -Bisabolol	1652	2142	0.819	0.6	-	RI, MS
73	Acorenone B* ( <b>C</b> )	1665	2192	0.830	17.6	7.2	RI, MS, 2D-NMR

74	7- <i>epi</i> -Khusian-2-ol* ( <b>G</b> )	1665	2313	0.819	3.5	1.5	RI, MS, 2D-NMR
75	Acora-3,7(11)-dien-8-one	1695	-	0.841	0.2	-	RI, MS
76	Bisabolone	1715	-	0.830	0.2	-	RI, MS
77	Aristolone ( <b>B</b> )	1727	2427	0.841	0.6	3.1	RI, MS, 2D-NMR
78	1(10)-Aristolon-2-one ( <b>A</b> )	1730	2395	0.841	1.3	6.4	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
79	Elionurone ( <b>J</b> )	1749	2433	0.841	15.4	5.6	RI, MS, 2D-NMR
80	4,8-di- <i>epi</i> -Acorone ( <b>H</b> )	1765	2553	0.913	3.1	0.2	RI, MS, 2D-NMR
<b>Total</b>					<b>93.8</b>	<b>97.2</b>	

Order of elution and percentages are given on apolar column; except for those with an asterisk (\*), percentages on polar column. RI<sub>a</sub>, RI<sub>p</sub>: retention indices measured on apolar (DB-1) and polar (DB-WAX) columns, respectively. The relative proportions of each constituent were expressed in g/100 g. tr: traces (<0.05%); 2D-NMR = 2D-NMR spectra are provided in Figure S1 (on the website of the journal).

## 2.2. Identification of unusual compounds

Four unusual compounds, for which we did not have any consistent responses in GC-MS, were identified using <sup>13</sup>C-NMR computerized methodology developed in our laboratory: compounds **A**, **B**, **C** and **D**. Moreover, two uncommon molecules which were not present in our <sup>13</sup>C-NMR libraries have been identified after several fractionation steps, and compared to data from literature (compounds **E** and **F**) (see Experimental).

### 2.2.1. 1(10)-Aristolon-2-one (**A**), Aristolone (**B**), Acorenone B (**C**) and Cyclocopacamphene (**D**)

In the case of **A**, we have increased its content up to 56.9% in F<sub>R</sub>5-2 subfraction, and its <sup>13</sup>C-NMR values matched perfectly with those of 1(10)-aristolon-2-one previously observed and characterized in *Aristologia longa* EO (Rücker et al., 1984) (Figure 1, Table 2).

**Table 2.**  $^{13}\text{C}$ -NMR data of 1(10)-Aristolone-2-one (**A**), Cyclocopacamphene (**D**) and 2-*epi*-Prezizaene (**E**).

C	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm) of A	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm) of D	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm) of E
1	125.09	44.09	52.92
2	199.07	23.88	39.06
3	42.51	22.07	30.93
4	36.46	19.08	21.34
5	38.69	31.31	59.07
6	33.38	40.16	37.80
7	19.37	43.42	163.35
8	20.19	28.52	47.32
9	30.64	21.88	29.93
10	174.18	42.14	20.73
11	19.19	28.49	42.84
12	17.27	22.36	14.38
13	29.23	20.95	31.98
14	15.40	10.44	26.99
15	21.72	19.54	105.45

The compound **B** identified in mixture as aristolone by  $^{13}\text{C}$ -NMR home-made method was purified by means of several column chromatographies (CC) on silica gel yielding **B** with 82.5% purity. The full 2D-NMR permitted to correct two inversions made by Su et al. (2009) in the assignment of aristolone  $^{13}\text{C}$ -NMR values. The two methyls C-14 and C-15 and the two methylenes C-2 and C-3 were inversed (Figure 1, Table 3).

**Table 3.** NMR data of Aristolone (**B**).

C	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm) by HSQC	COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$	HMBC H $\rightarrow$ C	NOESY <sup>a</sup>
1	33.21	1a ( <i>anti</i> ) 1b ( <i>syn</i> )	2.43 (dtd, $^2J=14.5$ Hz; $J=14.1$ Hz; $J=2.1$ Hz) 2.22 (dm, $^2J=14.5$ Hz)	1b, 2a, 2b, 3b, 9 1a, 2a, 2b, 3a, 3b	2, 3, 9, 10 2, 3, 5, 9, 10	1b, 2b, <u>15</u> 1a, 2b, <u>9</u>
2	26.17	2a ( <i>anti</i> ) 2b ( <i>syn</i> )	1.31-1.36 (m) 1.75-1.82 (m)	1a, 1b, 2b, 3a 1a, 1b, 2a, 3a, 3b	1, 3, 4, 10 1, 3, 4, 10	2b 1a, 1b, 2a, 3a, <u>12</u>
3	30.57	3a ( <i>anti</i> ) 3b ( <i>syn</i> )	1.52 (dm, $^2J=11.5$ Hz) 1.34-1.38 (m)	1b, 2a, 2b, 3b, 4 1a, 1b, 2b, 3a, 4	1, 2, 14 1, 2, 4, 5, 14	2b, 3b, 4, <u>14</u> 3a
4	38.72	4	1.75-1.82 (m)	3a, 3b, 14	1, 2, 3, 5, 10, 14, 15	3a, 14
5	39.64	-	-	-	-	-
6	39.27	6	1.36 (d, $^3J=7.9$ Hz)	7	2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15	7, <u>13</u> , <u>14</u> , <u>15</u>
7	35.55	7	1.70 (dd, $^3J=7.9$ Hz; $J=1.3$ Hz;)	6, 9	5, 8, 9, 11, 13	6, <u>13</u> , <u>15</u>
8	196.68	-	-	-	-	-
9	124.21	9	5.68 (m)	1a, 7	1, 5, 7, 15	<u>1b</u>
10	168.07	-	-	-	-	-
11	24.55	-	-	-	-	-
12	16.51	12	1.22 (s)	-	6, 7, 11, 13	<u>2b</u>
13	29.74	13	1.17 (s)	-	6, 7, 8, 11, 12	<u>6</u> , <u>7</u>
14	16.33	14	1.03 (d, $^3J=6.9$ Hz)	4	3, 4, 5	<u>3a</u> , 4, <u>6</u> , <u>15</u>
15	22.61	15	1.15 (s)	-	4, 5, 6, 10	<u>1a</u> , <u>6</u> , <u>7</u> , <u>14</u>

<sup>a</sup>Pure NOE correlations appear underlined.

**C** was unambiguously identified as acorenone B by means of our laboratory's  $^{13}\text{C}$ -NMR method according to Kutschan et al. (1977), which was purified up to 89.9% (in  $F_{\text{AP}3}$ ) in order to provide an accurate assignment through 2D-NMR spectra (Figure 1, Table 4).

**Table 4.** NMR data of Acorenone B (**C**).

<b>C</b>	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm) by HSQC	COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$	HMBC H $\rightarrow$ C	NOESY <sup>a</sup>
1	56.94	1	1.26-1.32 (m)	2a, 11	2, 3, 5, 6, 10, 11, 12, 13	2a, <u>3b</u> , <u>4</u> , <u>6a</u> , <u>6b</u> , 11, <u>12</u> , <u>13</u>
2	25.32	2a ( <i>anti</i> )	1.67-1.74 (m)	1, 2b, 3a	1, 3, 5, 11	1, 2b, 3a, <u>9</u> , <u>12</u> , <u>15</u>
		2b ( <i>syn</i> )	1.30-1.37 (m)	2a, 3b	1, 3, 4, 11	2a, 3b, <u>12</u> , <u>13</u>
3	29.81	3a ( <i>anti</i> )	1.16-1.24 (m)	2a, 3b, 4	1, 2, 4, 15	2a, 3b, <u>10b</u> , <u>15</u>
		3b ( <i>syn</i> )	1.67-1.75 (m)	2b, 3a	1, 2, 4, 5	<u>1</u> , 2b, 3a
4	46.18	4	1.62 (m)	3a, 15	1, 2, 3, 5, 15	<u>1</u> , <u>6b</u> , 15
5	48.37	-	-	-	-	-
6	49.45	6a	2.69 (d, $^2J=16.6$ Hz)	6b	1, 4, 5, 7, 10	<u>1</u> , 6b, <u>11</u> , <u>13</u>
		6b	2.21 (dd, $^2J=16.6$ Hz; $^4J=1.0$ Hz)	6a	1, 4, 5, 7, 8, 9, 10	<u>1</u> , <u>4</u> , <u>6a</u> , <u>15</u>
7	200.81	-	-	-	-	-
8	135.40	-	-	-	-	-
9	144.51	9	6.64 (tt, $^3J=4.9$ Hz; $J=1.4$ Hz)	10a, 10b, 14	5, 7, 8, 10, 14	<u>2a</u> , 10a, 10b, 14, <u>15</u>
10	25.97	10a	2.28 (dm, $^2J=19.1$ Hz)	9, 10b, 14	8, 9	9, 10b, <u>11</u> , <u>12</u> , <u>13</u>
		10b	2.04 (dm, $^2J=19.1$ Hz)	9, 10a, 14	4, 5, 6, 8, 9	<u>3a</u> , 9, 10a, <u>11</u> , <u>15</u>
11	29.25	11	1.61 (heptuplet, $^3J=6.7$ Hz)	1, 12, 13	1, 2, 3, 5, 12, 13	1, <u>6a</u> , <u>10a</u> , <u>10b</u> , 12, 13
12	21.42	12	0.84 (d, $^3J=6.6$ Hz)	11, 13	1, 11, 13	<u>1</u> , <u>2a</u> , <u>2b</u> , <u>10a</u> , 11, 13
13	24.17	13	0.93 (d, $^3J=6.6$ Hz)	11, 12	1, 11, 12	<u>1</u> , <u>2b</u> , <u>6a</u> , <u>10a</u> , 11, 12
14	15.65	14	1.74 (m, $J=1.8$ Hz)	9, 10a, 10b	7, 8, 9	9
15	17.18	15	0.75 (d, $^3J=6.6$ Hz)	4	3, 4, 5	<u>2a</u> , <u>3a</u> , 4, <u>6b</u> , <u>9</u> , <u>10b</u>

<sup>a</sup>Pure NOE correlations appear underlined.

RIs and MS spectrum of compound **D** were identical to those of cyclosativene. However the  $^{13}\text{C}$ -NMR analysis indicated the presence of its epimer, cyclocopacamphene, which was previously described previously by Garcia et al. (2017b). A 3D representation of both cyclosativene and cyclocopacamphene allowed to explain from the steric  $\gamma$  effects, the differences between C-2, C-6, C-8 and C-11 chemical shifts of cyclosativene and cyclocopacamphene. Indeed, in the case of cyclosativene only one steric  $\gamma$  effect is observed between C-2 and C-11, while we observed two steric  $\gamma$  effects between i) C-6 and C-11; and ii) between C-8 and C-11, in the case of cyclocopacamphene (Figure 1, Table 2).

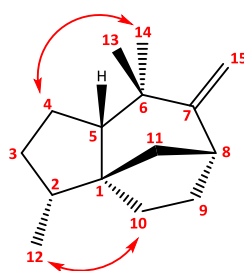
## 2.2.2. Identification of 2-*epi*-Prezizaene (**E**) and 2-*epi*-Prezizaan-7-ol (**F**)

### 2-*epi*-Prezizaene (**E**)

Compound **E** possessed the same RI (1447/1636) and MS spectrum than prezizaene. However, its chemical shifts did not appear in the  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum. RIs very close and identical MS spectra oriented our research towards epimers of prezizaene. In order to increase it, we carried out a CC on silica gel on AP EO to yield  $F_{\text{AP}1}$ , which contained 13.0% of **E**. After the assignment of all others  $^{13}\text{C}$ -NMR signals into  $F_{\text{AP}1}$ , one series of high intensity



containing 15 signals was isolated. From DEPT 135 and DEPT 90 NMR sequences, we deduced respective multiplicities of each carbons (3 C, 3 CH, 6 CH<sub>2</sub> and 3 CH<sub>3</sub>). Among them, only three were substantially different to those of prezizaene. C-5 was moved upfield by 4.77 ppm, whereas C-10 and C-12 were moved downfield respectively by 11.87 ppm and 5.62 ppm. These previous informations suggested the presence of an epimer of prezizaene and **E** was identified as 2-*epi*-prezizaene by comparison of its <sup>13</sup>C-NMR values with those reported by Weyerstahl et al. (2000). As previously described in the case of cyclocopacamphene, the accurate study of steric γ effects allowed to understand the difference between these two epimers (Figure 1 and 3, Table 2).



**Figure 3.** Key NOE for 2-*epi*-Prezizaene (**E**).

### 2-*epi*-Prezizaan-7-ol (**F**)

Compounds **F** (eluted on both apolar and polar columns at 1640/2176) remained identified neither by GC(RI), GC-MS nor by home-made <sup>13</sup>C-NMR database. In order to increase its content, AP oil was submitted to CC to yield F<sub>AP</sub>4 containing 18.8% of **F**, which was further purified up to 95% by means of preparative capillary-gas chromatography (pc-GC). The GC-MS analysis showed a molecular ion at *m/z* 222. <sup>13</sup>C-NMR and DEPT analysis displayed 15 carbons (3 C, 3 CH, 5 CH<sub>2</sub> and 4 CH<sub>3</sub>) and a detailed examination of HSQC, HMBC and COSY spectra permitted to establish the prezizaane structure of the molecule. The tetrasubstituted carbon at 76.30 ppm confirmed the alcohol function, which is positioned on C-7 according to the HMBC correlation between H-13, H-14 and H-15 with C-7. Furthermore, the stereochemistry of C-7 was determined thanks to the NOESY correlation between H-9 and H-15. The compound **F** was thus identified as 2-*epi*-prezizaan-7-ol, which was previously reported by Weyerstahl et al. (2000) in the Haitian vetiver oil. The full 2D-NMR allowed us to correct the inversion made by Weyerstahl et al. (2000) between the methyl C-13 and C-15 (Figure 1, Table 5).

**Table 5.** NMR data of 2-*epi*-Prezizaan-7-ol (**F**).

C	<sup>13</sup> C δ (ppm)	<sup>1</sup> H	<sup>1</sup> H δ (ppm) by HSQC	COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H	HMBC H → C	NOESY <sup>a</sup>
1	52.71	-	-	-	-	-
2	39.39	2	1.77-1.81 (m)	3a, 12	-	3a, 12
3	31.37	3a ( <i>anti</i> ) 3b ( <i>syn</i> )	1.10-1.16 (m) 1.78-1.85 (m)	2, 3b, 4 3a, 4	1, 2, 4, 5 2	2, 3b, 4, <u>12</u> , <u>14</u> 3a, 4
4	22.01	4	1.42-1.51 (m)	3a, 3b, 5	1, 2, 3, 5	3a, 3b, <u>14</u>
5	55.70	5	1.71-1.79 (m)	4	1, 4, 6, 10, 11, 13, 14	<u>13</u>
6	40.07	-	-	-	-	-
7	76.30	-	-	-	-	-
8	50.53	8	1.83-1.89 (m)	9, 11a	1, 6, 7, 9, 10, 11, 15	9, 11a, <u>15</u>
9	26.54	9	1.47-1.54 (m)	8, 10	7, 8, 10, 11	8, 10, <u>11a</u> , <u>14</u> , <u>15</u>
10	21.39	10	1.12-1.21 (m)	9	1, 5, 8, 9, 11	9, <u>12</u>
11	38.26	11a ( <i>exo</i> ) 11b ( <i>endo</i> )	1.30 (dd, <sup>2</sup> J=10.7 Hz; <sup>3</sup> J=4.6 Hz) 1.69-1.76 (m)	8, 11b 11a	1, 2, 5, 7, 8, 9, 10 5, 8, 9, 10	8, 9, 11b, <u>12</u> 11a, <u>13</u>
12	14.73	12	0.86 (d, <sup>3</sup> J=6.5 Hz)	2	1, 2, 3	2, <u>3a</u> , <u>10</u> , <u>11a</u>
13	27.29	13	0.91 (s)	-	5, 6, 7, 14	<u>5</u> , <u>11b</u>
14	21.20	14	0.81 (s)	-	5, 6, 7, 13	<u>3a</u> , <u>4</u> , <u>9</u>
15	24.21	15	1.02 (s)	-	6, 7, 8, 14	<u>8</u> , <u>9</u>

<sup>a</sup>Pure NOE correlations appear underlined.

## 2.3. Identification of new compounds

### 2.3.1. Structure Elucidation of 7-*epi*-Khusian-2-ol (**G**) and 4,8-di-*epi*-Acorone (**H**)

The unidentified compounds **G** and **H** exhibited RIs and MS data close to those of khusian-2-ol and acorone respectively. However, the analysis by <sup>13</sup>C-NMR of the crude EOs did not identify this two oxygenated sesquiterpenes. Thus, we submitted the AP EO to a CC. F<sub>AP4</sub> contained **G** with 16.2%, while F<sub>AP5-3</sub> contained 54.8% of **H**. **G** and **H** were isolated from F<sub>AP4</sub> and F<sub>AP5-3</sub> using pc-GC with respectively 96% and 82% purity (see Experimental).

#### 7-*epi*-Khusian-2-ol (**G**)

The molecular ion peak at *m/z* 222.1979 in HREIMS mode corresponds to the molecular formula: C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O. The <sup>13</sup>C-NMR spectrum displayed 15 chemical shifts whose multiplicities were obtained by DEPT 135 and 90 (3 C, 3 CH, 5 CH<sub>2</sub> and 4 CH<sub>3</sub>). The only characteristic <sup>13</sup>C-NMR value is a methine at 70.49 ppm. Taken altogether, MS and NMR data, indicated that **G** is a tricyclic sesquiterpene alcohol. **G** exhibited <sup>13</sup>C-NMR values very close to those of khusian-2-ol with the exception of C-1, C-5 and C-13 (Δδ) > 3 ppm (Weyerstahl et al., 2000). These three differences could be explained by the modifying of the C-7 stereochemistry. Indeed, in the case of khusian-2-ol, the steric γ effect is formed between C-1 and C-13; while it seemed to be made between C-5 and C-13 for the compound **G**. The C-7 stereochemistry switching was confirmed by the absence of NOESY correlation between H-2 and H-13 and the spot between H-5 and H-13. Therefore, we concluded that **G** was 7-*epi*-khusian-2-ol. The

$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR total assignments of this molecule were achieved by means of 2D-NMR (Figure 1 and 4, Table 6).

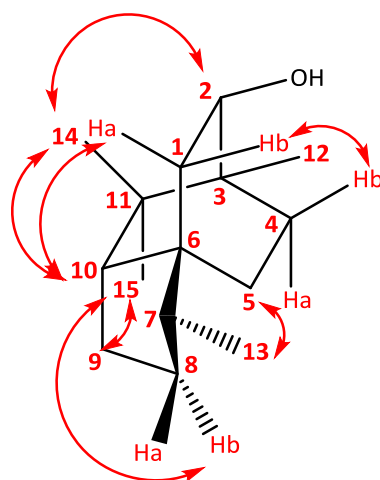


Figure 4. Key NOE for 7-*epi*-Khusian-2-ol (**G**).

Table 6. NMR data of 7-*epi*-Khusian-2-ol (**G**).

C	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm) by HSQC	COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$	HMBC H $\rightarrow$ C	NOESY <sup>a</sup>
1	45.11	1a ( <i>anti</i> ) 1b ( <i>syn</i> )	1.47-1.52 (m) 1.36 (dd, $^2J=12.9$ Hz; $^3J=5.4$ Hz)	1b, 2, 5 1a, 2	2, 3, 5, 6 2, 5, 6, 10	2, <u>10</u> <u>4b</u>
2	70.49	2	3.78 (ddd, $^3J=9.6$ Hz; $^3J=5.4$ Hz; $^4J=2.2$ Hz)	1a, 1b, 4b	4	1a, <u>12</u> , <u>14</u>
3	39.93	-	-	-	-	-
4	23.53	4a ( <i>anti</i> ) 4b ( <i>syn</i> )	1.64-1.70 (m) 1.15-1.21 (m)	4b, 5 2, 4a, 5	2, 3, 5, 11 2, 5	4b, 5, <u>12</u> <u>1b</u> , 4a, <u>12</u>
5	20.44	5	1.00-1.08 (m)	1a, 4a, 4b	1, 4, 6, 7, 10	4a, <u>13</u>
6	43.18	-	-	-	-	-
7	42.74	7	1.31-1.36 (m)	8a, 8b, 13	5, 6, 8, 13	8a, 13
8	32.17	8a 8b	1.70-1.78 (m) 1.13-1.19 (m)	7, 8b, 9 7, 8a, 9	7, 9, 10 6, 7, 9, 10, 13	7, 8b, 9 8a, <u>15</u>
9	22.64	9	1.39-1.47 (m)	8a, 8b, 10	8, 10, 11	8a, <u>15</u>
10	54.34	10	1.12-1.19 (m)	9	1, 5, 6, 9, 11, 14, 15	<u>1a</u> , <u>14</u>
11	34.87	-	-	-	-	-
12	16.47	12	0.72 (s)	-	2, 3, 4, 11	<u>2</u> , <u>4a</u> , <u>4b</u>
13	14.58	13	0.77 (d, $^3J=6.9$ Hz)	7	6, 7, 8	<u>5</u> , 7
14	26.78	14	0.78 (s)	-	3, 10, 11, 15	<u>2</u> , <u>10</u>
15	21.67	15	0.80 (s)	-	3, 10, 11, 14	<u>8b</u> , <u>9</u>

<sup>a</sup>Pure NOE correlations appear underlined.

#### 4,8-di-*epi*-Acorone (**H**)

HREIMS for **H** showed a molecular ion peak at  $m/z$  236.1772 indicating the following formula:  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$ . The unknown compound **H** displayed 15 chemical shifts on the  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum with the following multiplicities established by DEPT 135 and 90: 3 C, 4 CH, 4  $\text{CH}_2$  and 4  $\text{CH}_3$ . Both  $^{13}\text{C}$  chemical shifts at 209.70 ppm and 215.48 ppm informed on the presence of two ketone function.  $^{13}\text{C}$ -NMR values of **H** were similar to those of acorone, 1,8-di-*epi*-acorone (wide named *epi*-acorone) and 1-*epi*-acorone (commonly named



### 2.3.2. Structure Elucidation of 2-*epi*-Ziza-5-en-2-ol (I) and Elionurone (J)

These two molecules eluted respectively at 1582/2103 and 1749/2433 on both apolar and polar column on GC(RI) did not match with any constituents of our databases (RI, MS and  $^{13}\text{C}$ -NMR). In order to identify them, we submitted the AP oil to several chromatography techniques (see Experimental).

#### 2-*epi*-Ziza-5-en-2-ol (I)

Aerial parts EO containing 1.0% of I was chromatographed to yield  $F_{\text{AP}4}$  (containing 3.7% of I), which was finally subjected to pc-GC to purify I with 85% purity (GC). The difference of 500 points between the both RIs of I suggested a sesquiterpenic alcohol. HREIMS showing a molecular ion at  $m/z$  220.1821 was in agreement with this hypothesis since the molecular formula is  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$ .

By taking into account the degree of unsaturation and the multiplicity of carbon signals, compound I corresponded to an unsaturated tricyclic sesquiterpene alcohol. NMR data, especially those provided by the DEPT spectra (5 C, 1 CH, 5  $\text{CH}_2$  and 4  $\text{CH}_3$ ) and by  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR (occurrence of tetrasubstituted double bond at 141.62 ppm/129.23 ppm and a tertiary alcohol function at 80.27 ppm) informed us about the functions bore by the molecule. Due to the similarities between our EOs with those of vetiver, and the presence of some derivatives prezizaane into our samples, we oriented our research toward an alcohol with the prezizaane or zizaane skeleton. We found in the literature two molecules displaying the zizaane skeleton: *epi*-isozizaene and 12-norisoziza-5-ene, whose six out fifteen  $^{13}\text{C}$ -NMR values (C-7, C-8, C-9, C-13, C-14 and C-15) are very similar to those of unknown I (Filippi, 2014; Lin et al., 2006). The carbons C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-10, C-11 and C-12 were correctly impacted by the  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  electronic effects due to the addition of alcohol function on C-2, and its position was corroborated by 2D-NMR correlation. Thus, unambiguously we identified the compound I as: 2-*epi*-ziza-5-en-2-ol (Figure 1 and 6, Table 8).

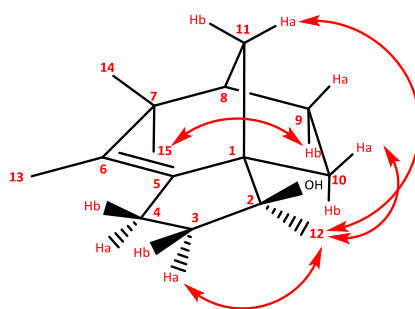


Figure 6. Key NOE for 2-*epi*-Ziza-5-en-2-ol (I)

Table 8. NMR data of 2-*epi*-Ziza-5-en-2-ol (I).

C	<sup>13</sup> C δ (ppm)	<sup>1</sup> H	<sup>1</sup> H δ (ppm) by HSQC	COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H	HMBC H → C	NOESY <sup>a</sup>
1	58.18	-	-	-	-	-
2	80.27	-	-	-	-	-
3	38.87	3a ( <i>anti</i> ) 3b ( <i>syn</i> )	1.55 (m) 1.67 (m)	3b, 4a, 4b 3a, 4a	4 1, 2, 4, 5	4a, 4b, <u>10a</u> , <u>12</u> 4a
4	25.70	4a ( <i>anti</i> ) 4b ( <i>syn</i> )	2.35 (dd, <sup>2</sup> J=17.0 Hz; <sup>3</sup> J=9.2 Hz) 2.12 (dd, <sup>2</sup> J=17.0 Hz; <sup>3</sup> J=9.2 Hz)	3a, 3b, 4b, 13 3a, 4a, 13	5 2, 5, 6	3a, 3b, 4b, 13 3a, 4a
5	141.62	-	-	-	-	-
6	129.23	-	-	-	-	-
7	40.81	-	-	-	-	-
8	47.80	8	1.81-1.86 (m)	9b, 10b, 11b	1, 6, 7, 10, 11	10b, 11b, <u>14</u> , <u>15</u>
9	25.52	9a ( <i>exo</i> ) 9b ( <i>endo</i> )	1.80-1.85 (m) 1.56-1.63 (m)	9b, 10b, 11a, 11b 8, 9a, 10a, 10b, 11a, 11b	1, 7, 8, 10, 11, 14 -	9b, 10b 9a, 10b, <u>15</u>
10	32.38	10a ( <i>exo</i> ) 10b ( <i>endo</i> )	1.77-1.83 (m) 1.27-1.33 (m)	9b, 10b, 11a, 11b 8, 9a, 9b, 10a, 11b	8, 9, 11 1, 5, 7, 8, 12	<u>3a</u> , 10b, <u>12</u> 8, 9a, 9b, 10a
11	34.74	11a ( <i>exo</i> ) 11b ( <i>endo</i> )	1.32-1.38 (m) 1.15-1.22 (m)	9a, 9b, 10a, 11b 8, 9a, 9b, 10a, 10b, 11a	1, 5, 7, 9 14	11b, <u>12</u> 8, 11a
12	22.27	12	1.13 (s)	-	1, 2, 3	<u>3a</u> , <u>10a</u> , <u>11a</u>
13	13.34	13	1.46 (s)	4a, 4b	5, 6, 7	4a, <u>14</u> , <u>15</u>
14	28.58	14	1.05 (s)	-	6, 7, 8, 15	<u>8</u> , <u>13</u>
15	25.33	15	0.99 (s)	-	6, 7, 8, 14	<u>8</u> , <u>9b</u> , <u>13</u>

<sup>a</sup>Pure NOE correlations appear underlined.

## Elionurone (J)

*E. tristis* AP EO was fractionated several time by CC to yield F<sub>AP5-2</sub> containing J at 75.7%, which was concentrated up to 90% by pc-GC. This pc-GC fraction was analyzed by HREIMS and NMR. The unknown compound J whose RIs are 1749/2433 displayed a molecular ion at *m/z* 218.1668 indicating the following molecular formula C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O, which indicated that there is five degrees of unsaturation in the molecule. <sup>13</sup>C-NMR values allowed to affirm that the compound contained a carbonyl function (C-3 at 209.23 ppm) and a double bond (C-1 at 182.27 ppm and C-2 at 130.89 ppm). These two functions accounted for two centers of unsaturation. The 12 other <sup>13</sup>C-NMR signals (between 7.61 ppm and 45.48 ppm) did not indicate the presence of another function. So, we oriented us toward a tricyclic sesquiterpene. The vinyl carbons C-1 has a very deshielded <sup>13</sup>C-NMR value. It is common in the case of an α,β-unsaturated ketone. The mesomeric effect of the α,β-unsaturated ketone

induces a very deshielded carbon in  $\beta$  position (C-1). However, in general an  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketone has a  $^{13}\text{C}$  value less than 200 ppm excepted in the case of 2-cyclopenten-1-one, in which the carbonyl  $^{13}\text{C}$ -NMR value is: 209.14 ppm (Pretsch et al., 2009). Our carbonyl value (C-3) at 209.23 ppm oriented us toward the 2-cyclopenten-1-one pattern. H-4 correlates in HMBC spectrum with C-1, C-2, C-3 and C-5, this observation confirmed we had the 2-cyclopenten-1-one pattern. Interestingly, C-12 displayed  $^{13}\text{C}$ -NMR value very shielded: 7.61 ppm, we believed it could be the methyl in  $\beta$  position of the ketone. That was confirmed by the HMBC correlation between H-12 and C-3 and by the  $^1\text{H}$ -NMR value of H-12 (1.64 ppm), which indicates that C-12 is directly linked to the double bond.

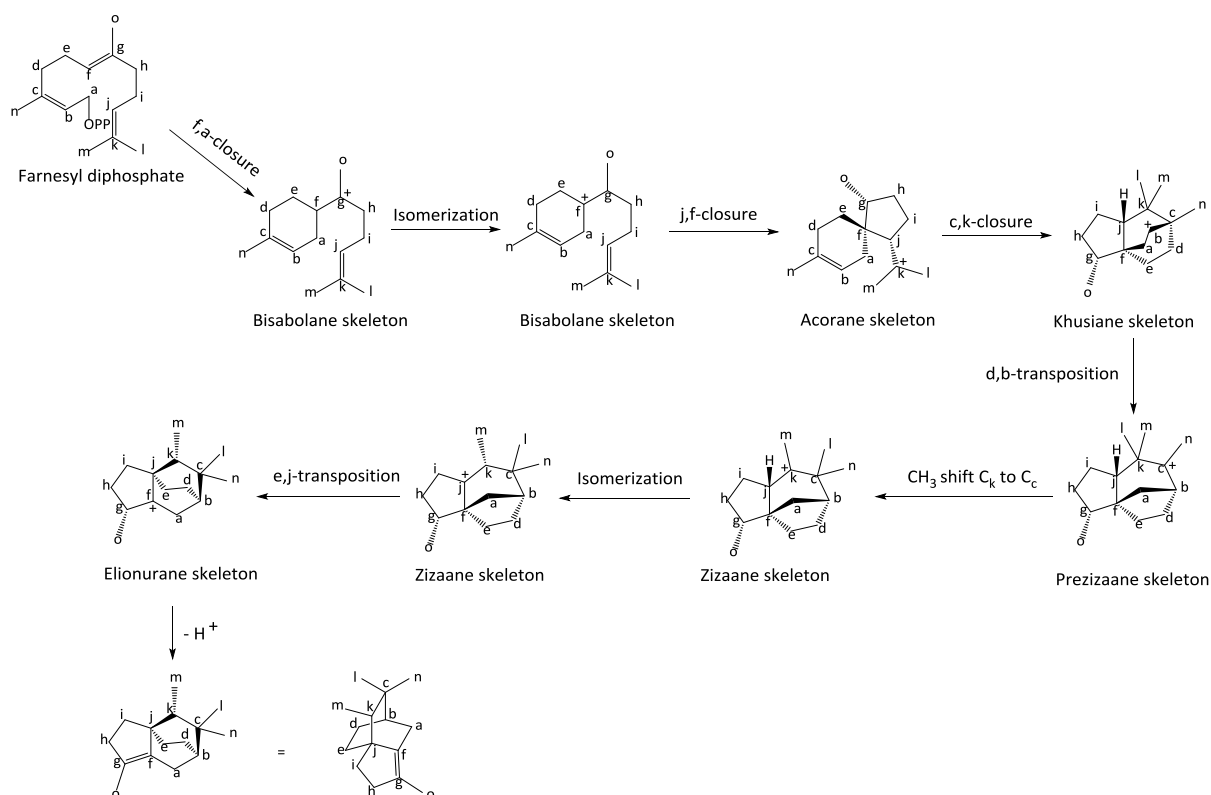
The  $^1\text{H}$ -NMR values of H-11a/11b indicate the allylic position for C-11, and the HMBC coupling between H-11b and C-1 confirms this hypothesis. COSY spectrum permitted to follow the sequence of proton H-11a/11b, H-8, H-9a/9b, H-10a/10b, and the HMBC analysis allowed to connect C-10 to C-5 forming a cyclohexane ring. The quaternary carbon C-5 is linked to C-6 according to HMBC correlation between H-6 and C-5. We can see on the COSY spectrum that C-6 is linked to methyl C-13, and the HMBC correlation between H-6 and C-7 also allowed to connect C-6 to the quaternary carbon C-7. HMBC correlation between H-8 and C-7 confirm the existence of C-7/C-8 bond. C-7 is also linked to the two methyl singlets at 0.99 and 0.95 respectively C-14 and C-15. The relative stereochemistry was deduced by NOESY spectral data. NOE correlation between H-9a and H-14, and the one between H-10a, H-13 and H-14 indicate that methyl C-13 and C-14 are on the same side of the molecule. The NOE correlation between H-11a and H-15 indicates that the methyl C-15 is located on the other side of the molecule. Hence, **J** can be named 2-methylnigriten-3-one, in reference to the norsesquiterpene: nigritene (Filippi, 2014). Filippi (2014), demonstrated that both nigritene and 6-*epi*-nigritene are formed by the thermal degradation of zizanoic acid. On the contrary, in our case, the molecule **J** did not yield by any degradation but it would seem to come from the continuity of the zizaane biosynthesis pathway. Thus, we could consider this compound as the first molecule with the new natural skeleton named elionurane, and consequently we proposed the name: elionurone for **J** (Figure 1 and 7, Table 9, Scheme 1).

We think that the compound Chazan tried to elucidate in 1969 was this one. However, analytical techniques used forty years ago did not permitte to him to determinate with accuracy the structure of the molecule. Indeed, the skeleton suggested by him was incorrect and looked like capnellane and hirsutane skeletons (Chazan, 1969).





skeleton. Indeed, the two skeletons only differ by one cycle junction, the e,j-transposition allow to rearrange the zizaane skeleton into the elionurane skeleton. We can make the hypothesis that this novel skeleton be the end of the zizaane biosynthesis path. Furthermore, it is very important to note that if we fix on the biosynthesis pathway, the stereochemistry of the quaternary carbon in position f, the methyl in g and the isopropyl group in j on the acorane skeleton (stereochemistry of acorenone B (**C**) and 4,8-di-*epi*-acorone (**H**)), when the c,k-closure forms the khusiane skeleton, this one displays the stereochemistry 7-*epi* (stereochemistry of 7-*epi*-khusian-2-ol (**G**)). We continue with the formation of prezizaane skeleton, and the methyl in position g is oriented downward (like the stereochemistry of 2-*epi*-prezizaene (**E**) and 2-*epi*-prezizaan-7-ol (**F**)). The CH<sub>3</sub> shift C<sub>k</sub> to C<sub>c</sub> allows to turn the prezizaane skeleton into zizaane skeleton whose the stereochemistry is in agreement with that of 2-*epi*-ziza-5-en-2-ol (**I**). To conclude the zizaane skeleton is converted into elionurane skeleton (stereochemistry of elionurone (**J**)). This relationship between all molecules is interesting and gives more credibility to our hypothesis that the elionurane skeleton be the end of the zizaane skeleton biosynthesis path (Scheme 1).



**Scheme 1.** Possible Biosynthesis Pathway of Elionurane Skeleton

### 3. Conclusion

We reported for the first time the EOs obtained from two different parts of *Elionurus tristis*, which are qualitatively close in terms of chemical composition, but they present significant differences related to their content of each major constituents.

The combined using of GC(RI), GC-MS and  $^{13}\text{C}$ -NMR for the analysis of essential oils led to the identification of 93.8% and 97.2% of the entire EOs, which are constituted respectively by 76 and 59 components. The major constituents of the both EOs were:  $\alpha$ -pinene (1.7; 7.3% respectively), camphene (4.0; 13.6%), *trans*- $\alpha$ -bergamotene (7.0; 3.3%) and calarene (2.1; 12.7%). Taken altogether, these EOs are quite different to that described in the literature. We can nevertheless note the presence of two compounds encountered in our EO samples, which were also reported in other *Elionurus* species: 1(10)-aristolene-2-one (**A**) in *E. muticus* and aristolone (**B**) in *E. hensii* and *E. elegans* EOs, (Chagonda et al., 2012; Silou et al., 2006; Yang et al., 2013).

Although the study of these EOs, we highlighted the usefulness of NMR analysis. In the case of 1(10)-aristolene-2-one (**A**), aristolone (**B**) and acorenone B (**C**) the  $^{13}\text{C}$ -NMR allowed to identify these unusual compounds absent of MS databases. In the case of cyclocopacamphene (**D**), 2-*epi*-prezizaene (**E**), 7-*epi*-khusian-2-ol (**G**) and 4,8-di-*epi*-acorone (**H**), the  $^{13}\text{C}$ -NMR brought a usefully help to correct the identification errors made by GC-MS apparatus, which misidentified this four compounds as their respective best-known epimers. Moreover, the description of these four epimers could be very useful in the future in order to differentiate these molecules, which were certainly confused in the past. As for 2-*epi*-prezizaan-7-ol (**F**), 2-*epi*-ziza-5-en-2-ol (**I**) and elionurone (**J**), these compounds were all unknown from MS databases and home-made  $^{13}\text{C}$ -NMR library, so the use of NMR was indispensable to derminate their structures.

We noticed that the *E. tristis* oils exhibited a same set of acorane, khusiane, prezizaane and zizaane skeletons previously identified in vetiver oil (Weyerstahl et al. 2000). All of compounds having the skeleton cited above display the same stereochemistry, thus we can think that the stereochemistry remains the same during the entire biosynthesis pathway. The discovery of the first molecule with the elionurane skeleton and the discussion concerning the origin of its biosynthesis pathway was interesting and will be perhaps usefully to the future investigations about vetiver oil.

From this chemical investigation, we think Yedomon et al. (2017) had misidentified cyclocopacamphene, 2-*epi*-prezizaene, aristolone or 1(10)-aristolen-2-one and elionurone as respectively cyclosativene, neoclovene, zierone and nootkatone.

## 4. Experimental

### 4.1. Plant material, isolation of essential oils

The essential oil samples are light yellow (Aerial Part EO = 771.3 mg; Roots EO = 998.3 mg) and have been obtained by water distillation (during 4 hours) using a Clevenger-type apparatus from Aerial Parts (235.5 g) and Roots (481.5 g) of *Elionurus tristis* harvested at Lazaina Avaradrano (Madagascar center). A voucher specimen was deposited at the Malagasy Institute of Applied Research, (Antananarivo, Madagascar), under accession numbers: LHE015.

### 4.2. Oils fractionation

Aerial Parts oil: the essential oil obtained from the aerial parts of *Elionurus tristis* (771.3 mg) was separated into five fractions  $F_{AP1}$ -  $F_{AP5}$  by CC on silica gel (60–200  $\mu\text{m}$ , 60  $\text{\AA}$ , 49.6 g) using the following gradient of solvents: pentane/ $\text{Et}_2\text{O}$  100/0 ( $F_{AP1}$ =159.9 mg), 95/5 ( $F_{AP2}$ =86.4 mg), 90/10 ( $F_{AP3}$ =157.8 mg), 80/20 ( $F_{AP4}$ =151.1 mg) and 0/100 ( $F_{AP5}$ =212.6 mg).

Fraction  $F_{AP1}$  contained **D** and **E** with the following contents: 5 and 13%.

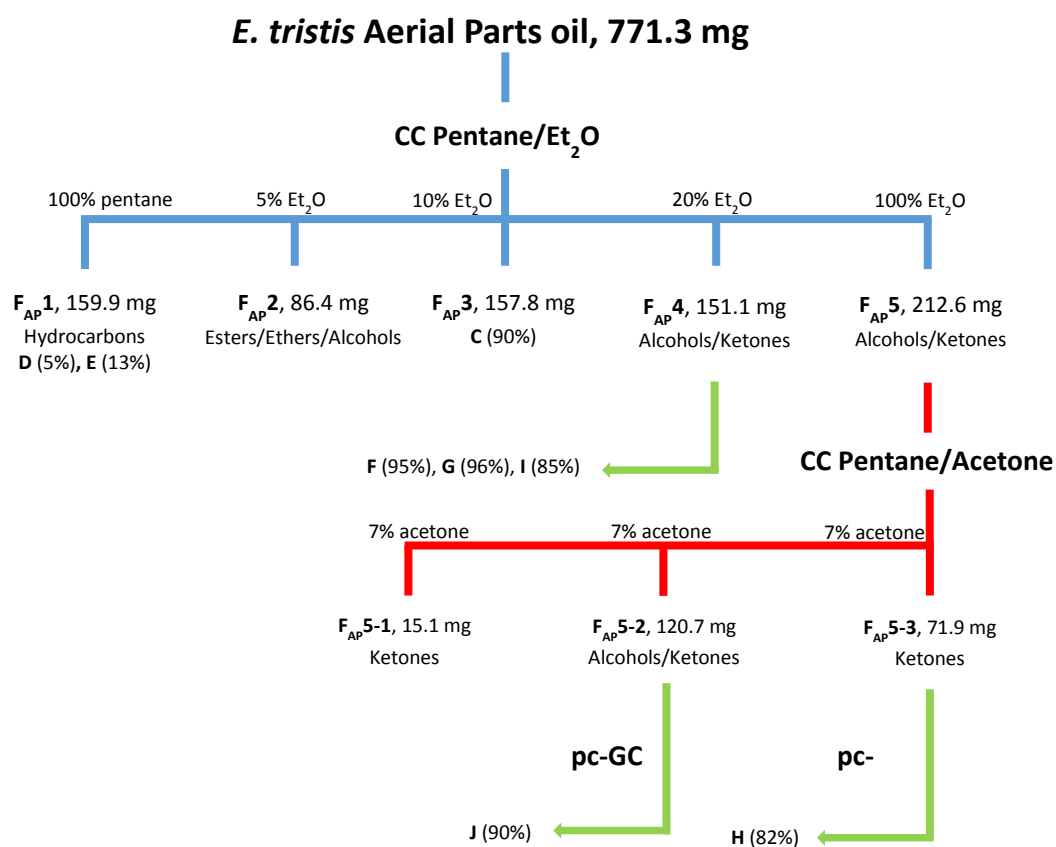
Fraction  $F_{AP3}$  contained **C** with 89.9% purity.

Fraction  $F_{AP4}$  containing compounds **F** (18.8%), **G** (16.2%) and **I** (3.7%) were directly used in pc-GC to purify the targeted compounds: **F** (95%), **G** (96%), **I** (85%). This three compounds were subjected to spectroscopic analysis for structure elucidation.

$F_{AP5}$ , it was further fractionated by CC on silica gel finer (35–70  $\mu\text{m}$ , 60  $\text{\AA}$ , 22.4 g) using pentane/acetone (93/7) to yield three fractions:  $F_{AP5-1}$ =15.1 mg,  $F_{AP5-2}$ =120.7 mg and  $F_{AP5-3}$ =71.9 mg, whose the last two contained respectively 75.7% of **J** and 54.8% of **H**. Amounts of **J** and **H** were increased by pc-GC respectively until 90% and 82% (Scheme 2).

Roots oil: the roots EO (998.3 mg) was subjected to the same procedure that used for the AP EO to provide in the first time:  $F_{R1}$ =347.4 mg,  $F_{R2}$ =66.3 mg,  $F_{R3}$ =151.7 mg,  $F_{R4}$ =226.2 mg,

F<sub>R5</sub>=129.7 mg; and in a second time: F<sub>R5-1</sub>=45.1 mg, F<sub>R5-2</sub>=78.7 mg and F<sub>R5-3</sub>=4.1 mg, whose the first two contain respectively 82.5% of **B** and 56.9% of **A**.



**Scheme 2.** Chromatographic strategy of *Elionurus tristis* Aerial Parts oil.

### 4.3. Acidification of Elionurone (J)

Our acidification attempts were performed using a fraction F<sub>AP5-2</sub> containing 75.7% of **J**, which was submitted to four assays with different acid (Brönsted and Lewis acids) with increasing strength: (i) formic acid 98%, (ii) TFA 99%, (iii) *p*TsOH 99%, and (iv) a mixture 50/50 (v/v) *p*TsOH 99% with BF<sub>3</sub> 14% in MeOH.

Each of the four tests was realized as follow: in a 50 mL round bottom flask equipped with a reflux condenser, 10 mg of F<sub>AP5-2</sub> was mixed with 2-3 drops of the pure acid and heat to reflux during 6 hours with magnetic stirring. Then, the acid was evaporated under reduced pressure. The residue was thus recovered by adding 3 mL of anhydrous Et<sub>2</sub>O, which is washed by addition of NaHCO<sub>3</sub> until pH 7-8. The aqueous phase was eliminated and the

organic phase was dried using MgSO<sub>4</sub>. Then, anhydrous organics phase obtained for each of the four assay were injected in GC(RI) and GC-MS.

#### **4.4. Gas Chromatography**

Analyses were performed on a Clarus 500 PerkinElmer (PerkinElmer, Courtaboeuf, France) system equipped with a FID and two fused-silica capillary columns (50m x 0.22 mm, film thickness 0.25 µm), DB-1 (polydimethylsiloxane) and DB-WAX (polyethylene glycol). The oven temperature was programmed from 60 °C to 220 °C at 2 °C/min and then held isothermal at 220 °C for 20 min; injector temperature: 250 °C; temperature detector: 250 °C; carrier gas: helium (0.8 mL/min); split: 1/60; injected volume: 0.5 µL. Retention indices (RI) were determined against a series of n-alkanes with linear interpolation (Target Compounds software from PerkinElmer). The quantification method is according to Tissot et al. (2012), (i) methyl octanoate was used as an internal reference; (ii) relative response factors (RRF) were calculated for each compound; and (iii) the relative proportions of each constituent were deduced using the formula detailed in the article previously cited and expressed in g/100 g.

#### **4.5. Gas Chromatography-Mass Spectrometry in Electron Impact Mode**

Essential oils samples were analyzed with a Perkin-Elmer TurboMass detector (quadrupole), directly coupled to a Perkin-Elmer Autosystem XL, equipped with a fused-silica capillary column (50 m x 0.22 mm, film thickness 0.25 µm), DB-1 (polydimethylsiloxane) and DB-WAX (polyethylene glycol). Carrier gas, helium at 0.8 mL/min; split: 1:74; injection volume: 0.5 µL; injector temperature: 250°C; oven temperature programmed from 60°C to 220°C at 2°C/min and then held isothermal at 220 °C for 20 min. Ion source temperature: 250°C; energy ionisation: 70 eV; electron ionisation mass spectra were acquired over the mass range 35-350 Da.

#### **4.6. Gas Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry**

High-resolution EI-mass spectra were recorded using an Agilent 7200 GC-QTOF system (Agilent, Santa Clara, CA, USA), equipped with a Agilent J&W, DB-1 capillary column (30 m x 0.25 mm; 0.25 µm film thick). The mass spectrometer was operated at 70 eV with an

acquisition rate of 2 GHz over a 35-450  $m/z$  range, affording a resolution of  $\sim 8000$ . Injection volume 1  $\mu\text{L}$ ; split ratio 1/20; inlet temperature 250  $^{\circ}\text{C}$ , detector temperature 230  $^{\circ}\text{C}$ ; column flow (He) 1.2 mL/min; temperature program for oven 60  $^{\circ}\text{C}$  (5 min isotherm) to 230  $^{\circ}\text{C}$  at 5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (5 min final isotherm).

#### 4.7. Preparative capillary-Gas Chromatography

Isolation of compounds **F**, **G**, **H**, **I** and **J** were performed using an Agilent 6890 Plus gas chromatograph coupled to a Gerstel preparative fraction collector (PFC) operated under Chemstation Rev A.10.02/Gerstel Maestro 1.3.8.14. **F**, **G** and **I** were isolated on Phenomenex ZB-5 megabore capillary column (30 m  $\times$  0.53 mm; 3.0  $\mu\text{m}$  film thick.). The oven temperature was ramped from 120 to 250  $^{\circ}\text{C}$  at 8  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . **H** and **J** were isolated on Supelcowax megabore capillary column (30 m  $\times$  0.53 mm; 0.5  $\mu\text{m}$  film thick) with the following oven temperature programming: 140 to 250  $^{\circ}\text{C}$  at 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . A Graphpack effluent splitter was connected to the column outlet, and additionally mounted with 0.1 mm and 0.32 mm deactivated fused-silica capillary restrictors (1 m each) to provide an FID/PFC ratio of  $\sim 1/9$ . The transfer line and the PFC were maintained at 230  $^{\circ}\text{C}$ . The injected volume is 1  $\mu\text{L}$  in splitless mode. The system was operated in constant pressure mode at 35 kPa. Compounds were trapped at room temperature in Gerstel U-type glass tubes by programming cutting times into the operating software allowing accurate automated operation. The isolation of any unknown compound in amounts sufficient for NMR analysis required 150–400 GC runs, and to avoid any contaminations, each product was collected directly in a NMR tube.

#### 4.8. Nuclear Magnetic Resonance

NMR spectra for compounds: (i) **F**, **G**, **H**, **I** were recorded in  $\text{C}_6\text{D}_6$ ; (ii) **J** were recorded in  $\text{CDCl}_3$ ; at 298 K on a Bruker Avance DRX 500 spectrometer operating at 500.13 MHz for  $^1\text{H}$  and 125.75 MHz for  $^{13}\text{C}$ . In order to increase sensitivity,  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra such as broadband- $^{13}\text{C}$ , DEPT 135 and DEPT 90 were run with a direct probe head (5 mm PADUL  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  Z-GRD). 1D- and 2D-NMR spectra such as  $^1\text{H}$ , COSY, NOESY, HSQC, HMBC were run with an inverse probe head (5 mm PHTXI  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  ZGRD). Spectrum calibration was performed by using the  $\text{C}_6\text{D}_6$  signal (7.16 ppm for  $^1\text{H}$ -NMR, 128.06 ppm for  $^{13}\text{C}$ -NMR) or  $\text{CDCl}_3$  signal (7.26 ppm

for  $^1\text{H}$ -NMR, 77.16 ppm for  $^{13}\text{C}$ -NMR) as internal reference. Chemical shifts ( $\delta$ ) are expressed in parts per million (ppm) and coupling constants ( $J$ ) in hertz. All NMR experiments were carried out using pulse sequences supplied by the spectrometer manufacturer (Bruker Topspin<sup>TM</sup>) and processed via Mestrelab MestreNOVA software (Version 6.0.2-5475).

Other spectra (**A**, **B**, **C**, **D**, **E**) were recorded on a Bruker AVANCE 400 (100.623 MHz for  $^{13}\text{C}$ ) equipped with a 5-mm probe (DUL  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  Z-GRD Z8246/0066), in  $\text{CDCl}_3$ . The  $^1\text{H}$ -NMR spectra were recorded with the following parameters, pulse width (PW), 4.3 ms; acquisition time, 2.6 s for 32 K data table with a spectral width (SW) of 6000 Hz (15 ppm).  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded with the following parameters: pulse width (PW), 4  $\mu\text{s}$  (flip angle  $45^\circ$ ); acquisition time, 2.7 s for 128 K data table with a spectral width of 24000 Hz (240 ppm); total repetition time, 2.8 s; CPD (composite pulse decoupling) mode decoupling; digital resolution, 0.183 Hz/point.

#### 4.9. Identification and quantification of individual components

Identification of individual components was based: a) on a comparison of their GC retention indice (RI) values on both polar and apolar stationary phases, with the literature (König et al., 2001). b) on computer search using digital libraries of mass spectral data and comparison with published data (Adams, 2007; McLafferty and Stauffer, 1994). c) on comparison of the signals in the  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of the mixtures with those of reference spectra compiled in the laboratory spectral library, with the help of a laboratory-made software (Ouattara et al., 2014; Tomi et al., 1995).

#### 4.10. Spectral data

1(10)-Aristolon-2-one (**A**):  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$ ; RI (DB-1/DB-WAX) 1730/2395; EI-MS 70 eV,  $m/z$  (rel. int.): 218 (8,  $\text{M}^{*+}$ ), 203 (30,  $\text{M}^{*+} - \text{CH}_3$ ), 185 (37), 177 (10), 176 (77), 175 (66), 162 (16), 161 (97), 157 (8), 148 (16), 147 (68), 145 (11), 143 (16), 135 (26), 134 (18), 133 (67), 131 (18), 121 (31), 120 (13), 119 (60), 117 (20), 115 (20), 107 (32), 106 (17), 105 (100), 103 (12), 95 (10), 93 (29), 92 (11), 91 (77), 81 (12), 79 (34), 78 (12), 77 (46), 69 (41), 67 (29), 65 (28), 55 (36), 53 (25), 51 (13), 43 (25), 41 (70).  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) and  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz): see Table 2.

Aristolone (**B**):  $C_{15}H_{22}O$ ; RI (DB-1/DB-WAX) 1727/2427; EI-MS 70 eV,  $m/z$  (rel. int.): 218 (40,  $M^{*+}$ ), 204 (15), 203 (84,  $M^{*+} - CH_3$ ), 185 (6), 175 (42), 162 (20), 161 (41), 149 (15), 148 (17), 147 (100), 145 (21), 135 (23), 134 (20), 133 (52), 131 (19), 122 (31), 121 (32), 119 (79), 117 (23), 115 (21), 109 (44), 108 (31), 107 (36), 105 (60), 96 (22), 95 (23), 93 (32), 91 (77), 81 (25), 79 (45), 77 (47), 69 (17), 67 (25), 65 (26), 55 (37), 53 (28), 43 (25).  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz) and  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz): see Table 3.

Acorenone B (**C**):  $C_{15}H_{24}O$ ; RI (DB-1/DB-WAX) 1665/2192; EI-MS 70 eV,  $m/z$  (rel. int.): 220 (10,  $M^{*+}$ ), 205 (3,  $M^{*+} - CH_3$ ), 191 (3), 177 (41,  $M^{*+} - C_3H_7$ ), 163 (7), 150 (17), 149 (30), 136 (41), 135 (82), 123 (26), 122 (20), 121 (61), 109 (100), 108 (37), 95 (26), 93 (53), 91 (35), 82 (67), 81 (38), 79 (33), 77 (26), 69 (49), 67 (22), 55 (40), 54 (25), 53 (23), 43 (27), 41 (56).  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz) and  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz): see Table 4.

Cyclocoacamphene (**D**):  $C_{15}H_{14}$ ; RI (DB-1/DB-WAX) 1365/1479; EI-MS 70 eV,  $m/z$  (rel. int.): 204 (18,  $M^{*+}$ ), 189 (14,  $M^{*+} - CH_3$ ), 175 (3), 162 (15), 161 (75,  $M^{*+} - C_3H_7$ ), 147 (10), 135 (17), 134 (20), 133 (41), 122 (18), 121 (28), 120 (43), 119 (81), 107 (45), 106 (25), 105 (100), 95 (21), 94 (45), 93 (49), 92 (24), 91 (66), 81 (21), 79 (35), 77 (29), 69 (19), 67 (17), 65 (13), 55 (28), 53 (15), 43 (18), 41 (42).  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz) and  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz): see Table 2.

2-*epi*-Prezizaene (**E**):  $C_{15}H_{14}$ ; RI (DB-1/DB-WAX) 1447/1636; EI-MS 70 eV,  $m/z$  (rel. int.): 204 (4,  $M^{*+}$ ), 189 (22,  $M^{*+} - CH_3$ ), 175 (8), 161 (24), 147 (21), 134 (35), 133 (93), 120 (19), 119 (51), 117 (21), 108 (43), 107 (39), 105 (46), 95 (32), 93 (59), 91 (100), 81 (35), 79 (41), 77 (29), 69 (21), 67 (30), 65 (14), 55 (31), 53 (18), 43 (10), 41 (32).  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz) and  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz): see Table 2.

2-*epi*-Prezizaan-7-ol (**F**):  $C_{15}H_{26}O$ ; RI (DB-1/DB-WAX) 1640/2176; EI-MS 70 eV,  $m/z$  (rel. int.): 222 (5,  $M^{*+}$ ), 207 (3,  $M^{*+} - CH_3$ ), 204 (6,  $M^{*+} - H_2O$ ), 189 (19), 179 (28), 177 (8), 175 (8), 165 (4), 162 (5), 161 (27), 151 (8), 148 (9), 147 (8), 138 (11), 137 (34), 135 (23), 134 (10), 133 (22), 123 (21), 122 (11), 121 (25), 120 (9), 119 (53), 111 (9), 109 (48), 108 (14), 107 (32), 105 (24), 96 (12), 95 (50), 94 (15), 93 (39), 91 (34), 84 (14), 83 (17), 82 (48), 81 (34), 79 (33), 77 (22), 71



(100), 70 (14), 69 (34), 67 (51), 65 (10), 59 (12), 55 (36), 53 (15), 43 (91), 41 (35).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 125 MHz): see Table 5.

7-*epi*-Khusian-2-ol (**G**):  $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$ ; RI (DB-1/DB-WAX) 1665/2313; HREIMS:  $m/z$  222.1979 (calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$ , 222.1984); EI-MS 70 eV,  $m/z$  (rel. int.): 222 (12,  $\text{M}^{+\bullet}$ ), 207 (9,  $\text{M}^{+\bullet} - \text{CH}_3$ ), 204 (3,  $\text{M}^{+\bullet} - \text{H}_2\text{O}$ ), 191 (6), 189 (9), 179 (13), 178 (25), 177 (100), 166 (9), 165 (7), 163 (17), 161 (28), 153 (9), 151 (24), 147 (13), 138 (21), 137 (12), 136 (11), 135 (29), 134 (8), 133 (19), 123 (25), 122 (55), 121 (50), 119 (50), 111 (22), 109 (43), 108 (16), 107 (69), 105 (31), 96 (38), 95 (54), 93 (46), 91 (36), 84 (21), 83 (33), 82 (30), 81 (49), 79 (34), 77 (23), 71 (24), 70 (12), 69 (44), 67 (36), 65 (11), 57 (23), 55 (67), 53 (20), 43 (52).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 125 MHz): see Table 6.

4,8-di-*epi*-Acorone (**H**):  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$ ; RI (DB-1/DB-WAX) 1765/2553; HREIMS:  $m/z$  236.1772 (calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$ , 236.1776); EI-MS 70 eV,  $m/z$  (rel. int.): 236 (8,  $\text{M}^{+\bullet}$ ), 221 (3,  $\text{M}^{+\bullet} - \text{CH}_3$ ), 203 (8), 193 (13,  $\text{M}^{+\bullet} - \text{C}_3\text{H}_7$ ), 175 (4), 166 (25), 165 (12), 161 (4), 152 (14), 151 (100), 147 (14), 138 (74), 137 (26), 136 (12), 133 (6), 124 (20), 123 (53), 121 (12), 111 (23), 110 (17), 109 (45), 107 (11), 96 (12), 95 (35), 93 (13), 91 (12), 85 (8), 83 (21), 82 (14), 81 (43), 79 (22), 77 (14), 69 (68), 67 (42), 57 (11), 55 (44), 53 (22), 43 (35), 42 (25).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 125 MHz): see Table 7.

2-*epi*-Ziza-5-en-2-ol (**I**):  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$ ; RI (DB-1/DB-WAX) 1582/2103; HREIMS:  $m/z$  220.1821 (calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$ , 220.1827); EI-MS 70 eV,  $m/z$  (rel. int.): 220 (4,  $\text{M}^{+\bullet}$ ), 206 (5), 205 (36), 202 (8,  $\text{M}^{+\bullet} - \text{H}_2\text{O}$ ), 188 (7), 187 (51), 177 (6), 160 (12), 159 (89), 149 (7), 147 (10), 145 (10), 133 (16), 131 (11), 129 (6), 128 (6), 121 (6), 120 (10), 119 (100), 117 (10), 115 (10), 107 (8), 105 (20), 95 (6), 93 (15), 91 (27), 81 (7), 79 (12), 77 (13), 69 (6), 67 (7), 65 (7), 55 (11), 53 (7), 43 (33).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 125 MHz): see Table 8.

Elionurone (**J**):  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$ ; RI (DB-1/DB-WAX) 1749/2433; HREIMS:  $m/z$  218.1668 (calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$ , 218.1671); EI-MS 70 eV,  $m/z$  (rel. int.): 218 (32,  $\text{M}^{+\bullet}$ ), 203 (16,  $\text{M}^{+\bullet} - \text{CH}_3$ ), 189 (6), 176 (6), 175 (23), 162 (16), 161 (20), 149 (18), 148 (100), 147 (90), 134 (18), 133 (35), 130 (12), 122 (14), 121 (12), 120 (50), 119 (43), 117 (14), 115 (12), 110 (12), 109 (34), 108 (13), 106 (17), 105 (65), 97 (7), 93 (10), 92 (17), 91 (60), 79 (23), 78 (11), 77 (30), 71 (28), 69 (12),

67 (14), 65 (17), 57 (8), 55 (43), 53 (20), 51 (8), 43 (36).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz): see Table 9.

**Supplementary Materials:** The following are available online, Figure S1: MS data for 1(10)-Aristolen-2-one (**A**), Cyclocopacamphene (**D**) and 2-*epi*-Prezizaene (**E**); and MS, 1D- and 2D-NMR data for Aristolone (**B**), Acorenone B (**C**), 2-*epi*-Prezizaan-7-ol (**F**), 7-*epi*-Khusian-2-ol (**G**), 4,8-di-*epi*-Acorone (**H**), 2-*epi*-Ziza-5-en-2-ol (**I**) and Elionurone (**J**).





# Conclusion



Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre des recherches auxquelles se consacre, depuis plus d'une vingtaine d'années, l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse-Pascal Paoli. Il s'inscrit dans le projet « Ressources Naturelles » dont l'équipe « Chimie et Biomasse » est chargée de la valorisation des produits naturels tels que : les huiles essentielles, hydrolat, extraits.

Le secteur des PAM (Plantes Aromatiques et Médicinales) est un secteur en plein essor. La demande en huile essentielle est en constante augmentation. Au-delà des acheteurs historiques que sont les parfumeurs, il y a une demande toujours plus importante de la part du grand public, notamment depuis l'avènement de la tendance « bio ».

La valorisation de ces produits naturels, quel que soit leur secteur d'application (parfumerie, cosmétique, aromathérapie), passe obligatoirement par une étape de caractérisation chimique afin de déterminer précisément leurs compositions.

Deux stratégies d'analyses sont couramment utilisées :

- la voie A constitue le moyen le plus rapide d'analyse des huiles essentielles et repose principalement sur l'association de la GC(RI) et GC-MS ;
- la voie B consiste en une démarche de purification en vue de réaliser l'analyse structurale de molécules nouvelles. Cette voie se déroule donc en deux étapes bien distinctes. La première consiste à fractionner le mélange via un panel de techniques chromatographiques pour isoler le composé d'intérêt. La seconde est l'étape d'analyse structurale afin d'identifier le composé par comparaison de ses données spectrales avec des données issues de la littérature.

Les travaux dans le domaine de la chimie des huiles essentielles sont pour la plupart menés selon la voie A, c'est-à-dire à l'aide du couplage GC-MS qui possède pour principal avantage « la rapidité ». Toutefois, sa « facilité » d'utilisation et le fait que l'interrogation des bibliothèques MS propose toujours une réponse peuvent conduire à des erreurs d'identification. La voie B, bien que plus longue, est utilisée surtout en cas de difficultés analytiques rencontrées en particulier pour des huiles essentielles riches en composés sesquiterpéniques et plus particulièrement oxygénés.

Parallèlement, une troisième voie (voie C), basée sur l'utilisation de la RMN du  $^{13}\text{C}$  est développée au laboratoire depuis une vingtaine d'années. Cette technique a pour but

d'identifier les constituants d'un mélange, sans séparation préalable, à partir de son spectre RMN  $^{13}\text{C}$ . Cette méthode se situe à mi-chemin entre les voies A et B, elle est presque aussi « rapide » que la voie A (grâce à la comparaison informatisée du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du mélange avec ceux contenus dans les bibliothèques spectrales) et présente une fiabilité d'identification qui se rapproche de celle de la voie B.

Cette méthode ne concurrence en rien les méthodes plus classiques comme la GC-MS, mais elle complète l'analyse « classique » (voie A), permettant la mise en évidence de problèmes analytiques (coélutions sur une, voire deux colonnes, molécules thermosensibles, molécules présentant des spectres de masse trop peu différenciés et/ou des RIs trop proches). Elle constitue aussi un outil remarquable pour repérer un composé non identifié, potentiellement nouveau, avant d'y appliquer la voie B.

Ces différentes stratégies analytiques ont été développées dans un premier chapitre introductif, dans le but de mieux appréhender les objectifs de cette thèse :

- contribuer à la caractérisation de plantes originaires de Madagascar à travers la composition chimique de leurs huiles essentielles, dans le cadre d'une collaboration que notre équipe mène depuis une dizaine d'années avec l'université d'Antananarivo. En raison de la complexité des mélanges, la stratégie analytique a été adaptée, afin d'identifier avec certitude un maximum de constituants des huiles essentielles, mais aussi d'isoler et de réaliser l'analyse structurale de nouvelles molécules ;
- contribuer à la caractérisation chimique d'huiles essentielles de conifères introduits en Corse par l'ONF. Ces introductions ont été effectuées pour tester le potentiel d'adaptabilité aux conditions pédoclimatiques de Corse, dans le but de trouver une ou plusieurs essences de substitution dans le cas d'éventuelles catastrophes telles que : des ravages causés par des nuisibles, une pandémie, ou encore des feux de forêts. Ces introductions qui sont parfaitement connues et répertoriées n'avaient, à notre connaissance, jamais fait l'objet d'investigations.

Ainsi le deuxième chapitre de cette thèse a été consacré à l'étude par GC(RI), GC-MS et RMN  $^{13}\text{C}$  des huiles essentielles :



- de différents organes (aiguilles, feuilles, bois, cônes et feuillage) de cinq conifères introduits en Corse (*Larix decidua*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus ponderosa*, *Sequoiadendron giganteum* et *Cryptomeria japonica*) ;
- de feuilles de *Melicope belahe*, plante endémique de Madagascar qui n'a fait jusqu'à présent l'objet d'aucune étude.

L'analyse des huiles essentielles de *L. decidua* a permis la mise en évidence des composés caractéristiques des deux organes du végétal. Le germacrène D marqueur des huiles d'aiguilles et l'acétate de bornyle marqueur de celles de bois. En effet les huiles d'aiguilles et de bois sont dominées par : l' $\alpha$ -pinène (30,8 $\pm$ 6,6% et 26,1 $\pm$ 9,7% respectivement), le  $\beta$ -pinène (16,1 $\pm$ 6,8 ; 11,8 $\pm$ 5,3%), le germacrène D (17,0 $\pm$ 5,4 ; 0,2 $\pm$ 0,1%) et l'acétate de bornyle (1,9 $\pm$ 1,4 ; 13,5 $\pm$ 6,8%). Il est important de noter que la différence de composition entre les deux organes de ce végétal basée sur le germacrène D et l'acétate de bornyle est décrite pour la première fois.

Les huiles essentielles d'aiguilles et de bois de *P. menziesii* contiennent majoritairement les monoterpènes suivant :  $\beta$ -pinène (34,6 $\pm$ 17,6 et 21,8 $\pm$ 11,7% respectivement),  $\alpha$ -pinène (10,8 $\pm$ 4,4 ; 12,5 $\pm$ 9,1%), terpinolène (11,3 $\pm$ 6,5 ; 8,5 $\pm$ 5,5%), terpinèn-4-ol (9,9 $\pm$ 6,4 ; 9,5 $\pm$ 5,3%) et sabinène (5,9 $\pm$ 6,5 ; 6,0 $\pm$ 5,6%). La différence notable réside dans leur teneur en  $\Delta$ -3-carène, plus élevée dans les huiles essentielle de bois (12,9 $\pm$ 9,0%) que dans celles d'aiguilles (1,1 $\pm$ 0,8%). L'huile essentielle de cône est, elle aussi dominée par les monoterpènes oléfiniques :  $\alpha$ -pinène (53,6%), sabinène (13,5%), limonène (9,8%) et  $\beta$ -pinène (9,3%).

La très faible teneur en l'acétate de bornyle ( $\leq$  0,5%) de nos échantillons suggère que les arbres introduits par l'ONF appartiendraient à la variété *menziesii* (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*) et non à la variété *glauca*.

Les constituants majoritaires des huiles essentielles d'aiguilles et de bois de *P. ponderosa* sont : le  $\beta$ -pinène (55,7 et 29,9% respectivement), l' $\alpha$ -pinène (12,8 ; 13,6%), le  $\Delta$ -3-carène (5,5 ; 32,2%) et l'estragole (12,6% ; tr). Le  $\Delta$ -3-carène est très abondant dans l'huile essentielle de bois, tandis que l'estragole l'est dans celle d'aiguilles.

Les huiles de feuillage et de bois de *S. giganteum* sont qualitativement très proches et ne diffèrent que par la teneur de leurs constituants majoritaires :  $\alpha$ -pinène (59,6 $\pm$ 11,7 et 30,4 $\pm$ 13,3% respectivement), safrole (21,3 $\pm$ 10,3 ; 43,8 $\pm$ 9,9%), élémicine (3,3 $\pm$ 1,6 ; 6,8 $\pm$ 1,5%), méthyl eugénol (1,1 $\pm$ 0,7 ; 2,9 $\pm$ 1,2%) et estragole (0,4 $\pm$ 0,3 ; 2,6 $\pm$ 0,9%). Les compositions

chimiques décrites ici avec la présence du safrole comme composé majoritaire différent de celles décrites dans la littérature.

Concernant le *C. japonica*, la composition chimique varie peu en fonction de l'organe choisi : feuilles, bois, cônes et petits cônes et associe mono-, sesqui- et diterpènes :  $\alpha$ -pinène (19,1 ; 13,0 ; 25,0 et 12,3% respectivement), sabinène (19,6 ; 9,4 ; 13,3 ; 17,2%),  $\beta$ -élémol (10,7 ; 26,7 ; 12,6 ; 19,9%) et kaurène (6,5 ; 13,3 ; 5,2 ; 9,6%). Il est intéressant de préciser que les huiles essentielles que nous avons étudiées sont chimiquement plus proches de celles de Taiwan (mais présentent quelques différences notamment sur la teneur en  $\alpha$ -pinène) que de celles provenant du Japon et de l'archipel des Açores (Portugal).

Concernant *Melicope belahe*, espèce endémique de Madagascar qui n'avait jamais été étudiée, nous avons caractérisé son huile essentielle de feuille par l'identification de 56 constituants représentant 92,4% de la composition totale. L' $\alpha$ -pinène (42,6%), le linalol (6,2%), l'(*E*)- $\beta$ -caryophyllène (5,2%) et le  $\beta$ -élémolène (4,4%) sont les composés majoritaires de cette huile. Il faut également noter la présence de plusieurs sesquiterpènes et diterpènes en quantités plus faibles mais non négligeables, comme : l' $\alpha$ -humulène (3,1%), le  $\beta$ -sélinène (3,6%), le sélin-11- $\alpha$ -ol (1,8%), le  $\beta$ -eudesmol (0,9%) et le (*E*)-phytol (0,3%) ; ainsi que celle de quelques composés non terpéniques comme : l'hexan-1-ol (0,3%), le (*Z*)-hex-3- $\alpha$ -ol (0,2%) et le (*Z*)-hex-2- $\alpha$ -ol (0,1%).

Le troisième chapitre fut consacré à l'analyse des huiles essentielles de deux espèces malgaches qui présentaient des spécificités analytiques :

- les huiles essentielles de *Vepris unifoliolata* (feuilles et d'écorces), dont celle d'écorces était caractérisée par une forte teneur en molécules thermosensibles : isofuranodiène (43,9%), germacrone (17,1%), curzerène (9,6%) ou encore germacrène B (5,3%). La RMN  $^{13}\text{C}$  en combinaison avec la GC nous a permis d'identifier et de quantifier ces molécules qui se réarrangent lors des analyses GC(RI) et GC-MS. L'huile de feuille était pour sa part, constituée majoritairement de monoterpènes :  $\alpha$ -pinène (60,5%), myrcène (6,8%) et (*E*)- $\beta$ -ocimène (4,9%) ;
- les huiles essentielles de *Cinnamosma madagascariensis*. Au cours de l'analyse de l'huile essentielle de feuilles de *C. madagascariensis* nous avons mis en évidence une nouvelle composition chimique dominée par des monoterpènes : myrcène (17,9%), limonène (17,8%),  $\beta$ -phéllandrène (15,3%) et linalol (12,2%). L'huile essentielle

d'écorces dominée par le  $\beta$ -pinène (49,9%) et l' $\alpha$ -pinène (19,5%), nous a permis de différencier par RMN  $^{13}\text{C}$ , deux épimères présentant des RIs et des spectres de masse très proches : le cyclosativène et le cyclocopacamphène (2,0%). Il faut souligner que seul le cyclosativène est commercial et ainsi intégré dans toutes les bibliothèques de spectres de masse. De ce fait, ce composé est toujours identifié dans les études faites par GC-MS, alors que le cyclocopacamphène n'est jamais signalé, ce qui paraît pour le moins étonnant. Nous reportons pour la première fois les valeurs de RMN  $^{13}\text{C}$  du cyclocopacamphène, et nous espérons que les données fournies permettront une meilleure différenciation de ces deux épimères.

Le quatrième et dernier chapitre de ce travail regroupe les huiles essentielles dont la composition chimique est la plus complexe. Il s'agit de *Calocedrus decurrens* (feuilles et branches), cupressacée introduite en Corse et d'*Elionurus tristis* (parties aériennes et racines), poacée endémique de Madagascar.

- Les huiles essentielles de feuilles, vieilles branches et jeunes branches de calocèdre contenaient l' $\alpha$ -pinène (11,2 ; 56,6 ; 22,3% respectivement), le myrcène (13,4 ; 8,4 ; 9,7%), le  $\Delta$ -3-carène (31,3 ; 5,2 ; 11,1%), le limonène (6,4 ; 5,1 ; 5,5%), et le terpinolène (6,9 ; 1,5 ; 3,2%) comme constituants majoritaires. Cependant quatre composés non identifiés ont été repérés. De multiples étapes de fractionnement ont été nécessaires à l'isolation de ces molécules (CC et pc-GC) qui ont été identifiées comme : le pin-2-èn-8-ol (4,2 ; 4,5 ; 10,3%), l'acétate de pin-2-èn-8-yle (0,6 ; 0,6 ; 1,4%), le pin-2-èn-8-oate de méthyle (3,0 ; 1,8 ; 3,6%), et le pin-2-èn-8-al (1,6 ; 0,8 ; 2,0%). Les deux premières n'ont été, par le passé, que partiellement décrites en RMN  $^1\text{H}$  et leurs présences n'ont jamais été reportées dans cette espèce, alors que les deux dernières sont des molécules nouvelles. Même si les monoterpènes oléfiniques constituent la fraction majoritaire, la présence de nombreux composés oxygénés et en particulier des esters confère à ces huiles essentielles des odeurs très agréables qui s'éloignent de celles des conifères (à odeur de résines) et qui justifie le nom commun de « cèdre à encens » à cette espèce.
- Les huiles essentielles des parties aériennes et des racines d'*E. tristis* sont des mélanges très complexes. Outre leur teneurs importantes en  $\alpha$ -pinène (1,7 ; 7,3% respectivement), camphène (4,0 ; 13,6%), *trans*- $\alpha$ -bergamotène (7,0 ; 3,3%) et

calarène (2,1 ; 12,7%), elles contiennent entre autre une forte proportion de sesquiterpènes et principalement de sesquiterpènes oxygénés. Nous avons pu identifier des composés très rarement rencontrés tels que : la 1(10)-aristolèn-2-one (1,3 ; 6,4%), l'aristolone (0,6 ; 3,1%), l'acorénone B (17,6 ; 7,2%), le cyclocopacamphène (1,6 ; 2,2%), le 2-*épi*-prézizaène (4,0 ; 6,3%), et le 2-*épi*-prézizaan-7-ol (5,1 ; 1,8%). Après plusieurs chromatographies successives, nous sommes parvenus à isoler et identifier quatre nouveaux sesquiterpènes oxygénés : le 7-*épi*-khusian-2-ol (3,5 ; 1,5%), la 4,8-di-*épi*-acorone (3,1 ; 0,2%), le 2-*épi*-ziza-5-èn-2-ol (1,0 ; 1,3%), et l'élionurone (15,4 ; 5,6%). Le 7-*épi*-khusian-2-ol et la 4,8-di-*épi*-acorone sont de nouveaux épimères respectivement du khusian-2-ol et de l'acorone. Le 2-*épi*-ziza-5-èn-2-ol est un nouvel alcool à squelette zizaane. Le dernier composé, l'élionurone étant à ce jour la seule et unique molécule avec le nouveau squelette terpénique que nous avons nommé elionurane. Au cours de cette étude nous avons soumis l'élionurone à plusieurs réactions chimiques dans le but de tester sa stabilité afin de mieux comprendre son origine. Nous proposons d'ailleurs une voie de biosynthèse de cette molécule, qui semble directement liée à celle du squelette zizaane.

Ainsi, ce travail de thèse a eu pour but d'apporter des informations quant à la composition chimiques de plusieurs conifères (introduits en Corse) qui n'avaient jamais fait l'objet d'études. Mais aussi de participer à la valorisation de la biodiversité malgache à travers l'analyse de plusieurs huiles essentielles de plantes endémiques peu ou pas décrites. De plus, à travers ces exemples intéressants (regroupant des problèmes analytiques fréquemment rencontrés au cours de l'analyse des matrices volatiles) nous avons montré l'intérêt de la méthode d'analyse des mélanges basée sur la RMN <sup>13</sup>C.





# **Références bibliographiques**





- Adams, R.P., Edmunds Jr., G.F., 1989. A Re-examination of the Volatile Leaf Oils of *Pinus Ponderosa* Dougl. Ex. P. Lawson using Ion Trap Mass Spectroscopy. *Flavour Frag. J.* 4, 19-23.
- Adams, R.P., Nguyen, S., Hsieh, C.F., Kaiyun, G., 2006. The Leaf Essential Oils of the Genus *Calocedrus*. *J. Essent. Oil Res.* 18, 654–658.
- Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th ed. Allured Publishing Corporation Company, Carol Stream, IL, USA.
- Adams, R.P., Vargas-Hernández, J.J., González Elizondo, M.S., Hunter, G., 2012. Geographic Variation in Leaf Essential Oils of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*). *Phytologia* 94, 199-218.
- Alexandrian, D., Le Voyer, B., 1984. Choix des essences et techniques de reboisement, 2ème rencontres de Forêt Méditerranéenne. Valorisation des patromaines forestiers méditerranéens. *Forêt Méditerr.* 6, 89–122.
- Andersen, N.H., Falcone, M.S., 1969. The identification of sesquiterpene hydrocarbons from gas-liquid chromatography retention data. *J. Chromatogr.* 44, 52-59.
- Andersen, N.H., 1970. On the co-occurrence of levojunenol and zizanene [(+)- $\alpha$ -amorphene]. *Tetrahedron Lett.* 11, 4651-4652
- Appelhans, M.S., Wen, J., Wagner, W.L., 2014. A molecular phylogeny of *Acronychia*, *Euodia*, *Melicope* and relatives (Rutaceae) reveals polyphyletic genera and key innovations for species richness. *Mol. Phylogenet. Evol.* 79, 54–68.
- Arnal-Schnebelen, B., Behra, O., Rakotoarison, C., Escoubas, J., Danthu, P., 2007. Applications en gynécologie de l'huile essentielle de *Cinnamosma fragrans* Baillon (commercialisée sous le nom « Saro ». *Phytothérapie* 5, 73-75.
- Baillon, H., 1886. Rutaceae, *Euodia belaha*. Paris: Bulletin Mensuel de la Société linnéenne de Paris.
- Bakiri, A., Hubert, J., Reynaud, R., Lanthony, S., Harakat, D., Renault, J.H., Nuzillard, J.M., 2017. Computer-Aided  $^{13}\text{C}$  NMR Chemical Profiling of Crude Natural Extracts without Fractionation. *J. Nat. Prod.* 80, 1387-1396.
- Baldovini, N., Tomi, F., Casanova, J., 2001. Identification and quantitative determination of furanodiene, a heat-sensitive compound, in essential oil by  $^{13}\text{C}$ -NMR. *Phytochem. Anal.* 12, 58–63.
- Bazzali, O., Tomi, F., Casanova, J., Bighelli, A., 2012. Occurrence of C8-C10 esters in Mediterranean *Mytus comunis* L. leaf essential oil. *Flavour Frag. J.* 27, 335-340.
- Bazzali, O., Thai, T.H., Hoi, T.M., Khang, N.S., Hien, N.T., Casanova, J., Bighelli, A., Tomi, F., 2016. Integrated Analysis of the Wood Oil from *Xanthocyparis vietnamiensis* Farjon & Hiep. By Chromatographic and Spectroscopic Techniques. *Molecules* 21, 840-850.
- Bessiere, Y., Grison, C., Boussac, G., 1978. Transpositions thermiques de dérivés d' $\alpha$ -pinène. *Tetrahedron* 34, 1957–1963
- Bicchi, C., Liberto, E., Matteodo, M., Sgorbini, B., Mondello, L., d'Acampora Zellner, B., Costa, R., Rubiolo, P., 2008. Quantitative analysis of essential oils: a complex task. *Flavour. Fragr. J.* 23, 382–391.
- Bighelli, A., Casanova, J., 2009. Analytical methods for *Cymbopogon* oils. in: Akhila, A. (Eds.), *Essential Oil Bearing Grasses, The genus Cymbopogon*, first ed. Taylor & Francis, London, pp. 195-215.

- Bighelli, A., Lesueur, D., Casanova, J., Bang, B.T., Van, Y.P., 2010. Combined Analysis of *Angelica acutiloba* Kitagawa Seed Oil by GC(RI), GC/MS and <sup>13</sup>C-NMR. *J. Essent. Oil Res.* 22, 217-219
- Billet, D., Favre-Bonvin, J., 1973. Constituents de l'huile essentielle de *Vepris madagascariensis*. *Phytochemistry*, 12, 1194.
- Bradesi, P., Tomi, F., Terriaga, I., Casanova, J., 1994. Identification of dihydrocarveol stereoisomers and their acetates using carbon-13 NMR spectroscopy. *Spectrosc. Lett.* 27, 921-933.
- Brophy, J.J., Goldsack, R.J., Forster, P.I., 2004. Composition of the leaf oils of the Australian species of *Euodia* and *Melicope* (Rutaceae). *J. Essent Oil Res.* 16, 286-293.
- Buchbauer, G., Jirovetz, L., Wasicky, M., Nikiforov, A., 1994. Comparative Investigation of Douglas Fir Headspace Samples, Essential Oils, and Extracts (Needles and Twigs) Using GC-FID and GC-FTIR-MS. *J. Agric. Food Chem.* 42, 2852-2854.
- Castola, V., Bighelli, A., Rezzi, S., Melloni, G., Gladiali, S., Desjobert, J.M., Casanova, J., 2002. Composition and chemical variability of the triterpene fraction of dichloromethane extracts of cork (*Quercus suber* L.). *Ind. Crop. Prod.* 15, 15-22.
- Cavalli, J.F., Tomi, F., Bernardini, A.F., Casanova, J., 2004. Combined Analysis of the Essential Oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and <sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy: Quantitative Determination of Ascaridole, a Heat-sensitive Compound. *Phytochem. Anal.* 15, 275-279.
- Chagonda, L.S., Makanda, C., Chalchat, J.C., 2000. The essential oils of wild and cultivated *Cymbopogon validus* (Stapf) Stapf ex Burtt Davy and *Elionurus muticus* (Spreng.) Kunth from Zimbabwe. *Flavour Frag. J.* 15, 100-104.
- Chagonda, L.S., Chalchat, J.C., Bessière, J.M., 2012. Constituents of the Roots Essential Oil of Cultivated *Elionurus muticus* (Spreng.) Kurth from Zimbabwe. *Anal. Chem. Lett.* 2, 177-181.
- Chalchat, J.C., Gary, R.P., Michet, A., 1988. Constituents of *Sequoiadendron giganteum* Buchh. Leaf Oils (Giant Sequoia). *Flavour Frag. J.* 3, 69-72.
- Chazan, J.B., 1969. L'Antsorenone, cétone sesquiterpénique de l'huile essentielle d'*Elionurus tristis*. Rapport d'activité, Tananarive: ORSTOM 29-31.
- Cheng, S.S., Lin, H.Y., Chang, S.T., 2005. Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oils from Different Tissues of Japanese Cedar (*Cryptomeria japonica*). *J. Agric. Food Chem.* 53, 614-619.
- Cheng, S.S., Chua, M.T., Chang, E.H., Huang, C.G., Chen, W.J., Chang, S.T., 2009. Variations in insecticidal activity and chemical compositions of leaf essential oils from *Cryptomeria japonica* at different ages. *Bioresource Technol.* 100, 465-470.
- Cheng, S.S., Lin, C.Y., Chung, M.Y., Chen, W.J., Chang, S.T., 2012. Chemical Composition and Antitermitic Activity against *Coptotermes formosanus* Shiraki of *Cryptomeria japonica* Leaf Essential Oil. *Chem. Biodivers.* 9, 352-358.
- Claridge, T.D.W., 1999. High-Resolution NMR techniques in organic chemistry, third ed. Elsevier, Oxford.
- Cobb Jr., F.W., Zavarin, E., Bergot, J., 1972. Effect of air pollution on the volatile oil from leaves of *Pinus ponderosa*. *Phytochemistry* 11, 1815-1818.
- Costa, R., d'Acampora Zellner, B., Crupi, M.L., De Fina, M.R., Valentino, M.R., Dugo, P., Dugo, G., Mondello, L., 2008. GC-MS, GC-O and enantio-GC investigation of the essential oil of *Tarchonanthus camphoratus* L. *Flavour Frag. J.* 23, 40-48.

- Coxon, J.M., Hydes, G.J., Steel, P.J., 1984. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Pinane Monoterpenoids. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* 1351–1355.
- Dar, M.Y., Shah, W.A., Rather, M.A., Qurishi, Y., Hamid, A., Qurishi, M.A., 2011. Chemical composition, in vitro cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil and major constituents of *Cymbopogon jawarancusa* (Kashmir). *Food Chem.* 129, 1606-1611.
- De Pascual Teresa, J., Urones, J.G., Fernandez, A., 1983. Monoterpene derivatives from the essential oil of *Aristolochia Longa*. *Phytochemistry* 22, 2753–2754.
- Duquesnoy, E., Castola, V., Casanova, J., 2008. Identification and quantitative determination of carbohydrates in ethanolic extract of two conifers using  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 343, 893-902.
- Erdtman, H., Kimland, B., Norin, T., Daniels, P., 1968. The Constituents of the “Pocket Resin” from Douglas Fir *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. *Acta Chem. Scand.* 22, 938-942.
- Esselin, H., Sutour, S., Liberal, J., Cruz, M.T., Salgueiro, L., Siegler, B., Freuze, I., Castola, V., Paoli, M., Bighelli, A., Tomi, F., 2017. Chemical Composition of *Laurencia obtusa* Extract and Isolation of a New  $\text{C}_{15}$ -Acetogenin. *Molecules* 22, 779-789.
- Fahed, L., El Beyrouthy, M., Ouaini, N., Eparvier, V., Stien, D., 2016. Isolation and characterization of santolinoidol, a bisabolene sesquiterpene from *Achillea santolinoides* subsp *wilhelmsii* (K. Koch) Greuter. *Tetrahedron Lett.* 57, 1892-1894.
- Fatope, M.O., Marwah, R.G., Al Hadhrami N.M., Onifade, A.K., Williams, J.R., 2008. Identification of the chemotypes of *Ocimum forskolei* and *Ocimum basilicum* by NMR spectroscopy. *Chem. Biodivers.* 5, 2457-2463.
- Ferreira, M.J.P., Costantin, M.B., Sartorelli, P., Rodrigues, G.V., Limberger, R., Henriques, A.T., Kato, M.J., Emerenciano, V.P., 2001. Computer-aided method for identification of components in essential oils by  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* 447, 125–134.
- Filippi, J.J., 2014. Norsesquiterpenes as markers of overheating in Indonesian vetiver oil. *Flavour Frag. J.* 29, 137-142.
- Formáček, V., Kubeczka, K.H., 1982.  $^{13}\text{C}$  NMR analysis of essential oils. in: Margaris, N., Koedam, A., Vokou, D. (Eds.), *Aromatic Plants: Basic and Applied Aspects*, first ed. SpringerLink, La Hayes, pp. 177-181.
- Frérot, E., Bagnoud, A., Vuilleumier, C., 2002. Menthofurolactone: a new p menthane lactone in *Mentha piperita* L.: analysis, synthesis and olfactory Properties. *Flavour Fragr. J.* 17, 218-226.
- Garcia, G., Garcia, A., Gibernau, M., Bighelli, A., Tomi, F., 2017a. Chemical compositions of essential oils of five introduced conifers in Corsica. *Nat. Prod. Res.* 31, 1697-1703.
- Garcia, G., Rabehaja, D., Charmillon, J.M., Ramanoelina, P., Casanova, J., Tomi, F., 2017b. Integrated Analysis of the Bark oil from *Cinnamosma madagascariensis* by GC(RI), GC-MS and NMR.  $^{13}\text{C}$  NMR data of Cyclocopacamphene and Cyclosativene. *Nat. Prod. Commun.* 12, 277-280.
- Garneau, F.X., Collin, G., Gagnon, H., Bélanger, A., Lavoie, S., Savard, N., Pichette, A., 2008. Aromas from Quebec. I. Composition of the essential oil of the rhizomes of *Acorus calamus* L. *J. Essent. Oil Res.* 20, 250-254.
- George, S., Nair, S.A., Venkataraman, R., Baby, S., 2015. Chemical composition, antibacterial and anticanceractivities of volatile oil of *Melicope denhamii* leaves. *Nat. Prod. Res.* 29, 1959–1962.

- Goda, Y., Shimizu, T., Kato, Y., Nakamura, M., Maitani, T., Yamada, T., Terahara, N., Yamaguchi, M., 1997. Two acylated anthocyanins from purple sweet potato. *Phytochemistry* 44, 183-186.
- Gonny, M., Bradesi, P., Casanova, J., 2004. Identification of the components of the essential oil from wild Corsican *Daucus carota* L. using  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy. *Flavour Fragr. J.* 19, 424-433
- Gregonis, D.E., Portwood, R.D., Davidson, W.H., Durfee, D.A., Levinson, A.S., 1968. Volatile oil from foliage of coast redwood and big tree. *Phytochemistry* 7, 975-981.
- Groupe Arboretum, 1993. Les arboretums méditerranéens. Plan de situation. *Forêt Méditerr.* 14, 74-99.
- Gu, H.J., Cheng, S.S., Lin, C.Y., Huang, C.G., Chen, W.J., Chang, S.T., 2009. Repellency of Essential oils of *Cryptomeria japonica* (Pinaceae) against Adults of the Mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Agric. Food Chem.* 57, 11127-11133.
- Günther, H., Ourisson, G., Suffert, J., Suffert, J.J., 1994. La spectroscopie de RMN. Principes de base, concepts et applications de la spectroscopie de resonance magnétique nucléaire du proton et du carbone-13 en chimie, first ed. Elsevier Masson, Paris.
- Hammer, Ø., Harper, D., Ryan, P., 2001. PAST: PATEontological STatistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electronica*.
- Hartley, T.G., 2001. On the taxonomy and biogeography of *Euodia* and *Melicope* (Rutaceae). *Allertonia* 8, 1-328.
- Harinantenaina, L., Asakawa, Y., De Clercq, E., 2007. Cinnamacrins A-C, cinnafragrin D, and cytostatic metabolites with r-glucosidase inhibitory activity from *Cinnamosma macrocarpa*. *J. Nat. Prod.* 70, 277-282.
- Harinantenaina, L., Matsunami, K., Otsuka, H., Kawahata, M., Yamaguchi, K., Asakawa, Y., 2008. Secondary metabolites of *Cinnamosma madagascariensis* and their  $\alpha$ -glucosidase inhibitory properties. *J. Nat. Prod.* 71, 123-126.
- Hefendehl, F.W., Fonseca, L.R., 1976. Analysis of the essential oil of *Elyonurus viridulus*. *Planta Med.* 30, 135-140.
- Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B., 1999. Spectroscopic methods in organic chemistry, second ed. Thieme, New-York.
- Holm, Y., Hiltuken, R., 1997. Variation and Inheritance of Monoterpenes in *Larix* Species. *Flavour Fragr. J.* 12, 335-339.
- Humbert, H., 1950. 104e famille: Rutaceae. in: Raven, P.H. Library (Eds.), Flore de Madagascar et des Comores, first ed. Missouri Botanical Garden, pp. 27-66.
- Imbenzi, P.S., Osoro, E.K., Aboud, N.S., Ombito, J.O., Cheplogoi, P.K., 2014. A review on chemistry of some species of genus *Vepris* (Rutaceae family). *J. Sci. Inn. Res.* 3, 357-362.
- Jerković, I., Mastelić, J., Milos, M., 2003. Volatile oil from foliage of coast redwood and big tree. *J. Essent. Oil Res.* 15, 36-38.
- Jirovetz, L., Puschmann, C., Stojanova, A., Metodiev, S., Buchbauer, G., 2000. Analysis of the essential oil volatiles of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) from Bulgaria. *Flavour Fragr. J.* 15, 434-437.
- Joulain, D., König, W.A., 1998. The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons, first ed. EB-Verlag, Hamburg.
- Kelkar, V.M., Geils, B.W., Becker, D.R., Overby, S.T., Neary, D.G., 2006. How to recover more value from small pine trees: Essential Oils and resins. *Biomass Bioenerg.* 30, 316-320.

- Kido, F., Sakuma, R., Uda, H., Yoshikoshi, A., 1969. Minor acidic constituents of vetiver oil. Part II. Cyclocamphenic and epi-cyclocamphenic acids. *Tetrahedron Lett.* 10, 3169-3172.
- Kolesnikova, R.D., Latysh, V.G., Krasnoboyarova, L.V., Deryuzhkin, R.I., Chernodubov, A.I., 1976. The Chemical Composition of the Essential Oil of the Larch. *Chem. Nat. Prod.* 12, 402-407.
- König, W.A., Hochmuth, D.H., Joulain, D., 2001. Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils; Library of MassFinder 2.1; Institute of Organic Chemistry: Hamburg, Germany.
- Krauze-Baranowska, M., Madarowicz, M., Wiwart, M., Pobłocka, L., Dynowska, M., 2002. Antifungal Activity of the Essential Oils from Some Species of the Genus *Pinus*. *Z. Naturforsch. C.* 57, 478-482.
- Kubeczka, K.H., Formáček, V., 1984. Application of direct carbone-13 NMR spectroscopy in the analysis of volatiles. in: Schreier, P. (Eds.), *Analysis of Volatiles*, first ed. De Gruyter, Berlin, pp. 219-230.
- Kubeczka, K.H., Schultze, W., 1987. Biology and Chemistry of Conifer Oils. *Flavour Frag. J.* 2, 137-148.
- Kurose, K., Okamura, D., Yatagai, M., 2007. Composition of the essential oils from the leaves of nine *Pinus* species and the cones of three of *Pinus* species. *Flavour Frag. J.* 22, 10-20.
- Kutschan, R., Schiebel, H.M., Schröder, N., Wolf, H., 1977. Stereoisomere Acorenone. PFT-13C-NMR-Spektren und massenspektroskopische Untersuchungen. *Chem. Ber.* 110, 1615-1622.
- Levinson, A.S., Lemoine, G., Smart, A.G., 1971. Volatile oil from foliage of *Sequoiadendron giganteum*: change in composition during growth. *Phytochemistry* 10, 1087-1094.
- Lewis, I.A., Schommer, S.C., Hodis, B., Robb, K.A., Tonelli, M., Westler, W.M., Sussman, M.R., Markley, J.L., 2007. Method for Determining Molar Concentrations of Metabolites in Complex Solutions from Two-Dimensional  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  NMR Spectra. *Anal. Chem.* 79, 9385-9390.
- Li, W., Shi, J., Papa, F., Maggi, F., Chen, X., 2016. Isofuranodiene, the main volatile constituent of wild celery (*Smyrniolum olusatrum* L.), protects D-galactosamin/lipopolysaccharide-induced liver injury in rats. *Nat. Prod. Res.* 30, 1162-1165.
- Lin, X., Hopson, R., Cane, D.E., 2006. Genome Mining in *Streptomyces coelicolor*: Molecular Cloning and Characterization of a New Sesquiterpene Synthase. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 6022-6023.
- Liu, K., Rossi, P.G., Ferrari, B., Berti, L., Casanova, J., Tomi, F., 2007. Composition, irregular terpenoids, chemical variability and antibacterial activity of the essential oil from *Santolina corsica* Jordan et Fourr. *Phytochemistry* 68, 1698-1705.
- Maggi, F., Barboni, L., Papa, F., Caprioli, G., Ricciutelli, M., Sagratini, G., Vittori, S., 2012. A forgotten vegetable (*Smyrniolum olusatrum* L., Apiaceae) as a rich source of isofuranodiene. *Food Chem.* 135, 2852-2862.
- Maggi, F., Fortuné Randriana, R., Rasoanaivo, P., Nicoletti, M., Quassinti, L., Bramucci, M., Lupidi, G., Petrelli, D., Vitali, L.A., Papa, F., Vittori, S., 2013. Chemical composition and in vitro biological activities of the essential oil of *Vepris macrophylla* (BAKER) I.VERD. *Chem. Biodivers.* 10, 356-366.

- Maggi, F., Papa, F., Giuliani, C., Maleci Bini, L., Venditti, A., Bianco, A., Nicoletti, M., Iannarelli, R., Caprioli, G., Sagratini, G., Cortese, M., Ricciutelli, M., Vittori, S., 2015. Essential oil chemotypification and secretory structures of the neglected vegetable *Smyrniololusatum* L. (Apiaceae) growing in central Italy. *Flavour Fragr. J.* 30, 139–159.
- Matu, E.N., 2011. *Melicope madagascariensis* (Baker) T.G. Hartley. <http://www.prota4u.org/search.asp>.
- Mazzoni, V., Bradesi, P., Tomi, F., Casanova, J., 1997. Direct qualitative and quantitative analysis of carbohydrate mixtures using <sup>13</sup>C NMR spectroscopy: application to honeys. *Magn. Reson. Chem.* 35, 81-90.
- McLafferty, W., Stauffer, D.B., 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th ed.; Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM, Version 3.10d; Palisade: Newfield, UK.
- Méou, A., Bouanah, N., Archelas, A., Zhang, X.M., Guglielmetti, R., Furstoss, R., 1990. Synthesis of all four stereoisomers of enantiomerically pure *cis*- and *trans*-linalyl oxides. *Synthesis* 752-753.
- Mevy, J.P., Bessiere, J.M., Dherbomez, M., Viano, J., 2002. Composition and Some Biological Activities of the Essential Oils from an African Pasture Grass: *Elionurus elegans* Kunth. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4240-4243.
- Moiteiri, C., Esteves, T., Ramalho, L., Rojas, R., Alvarez, S., Zacchino, S., Bragança, H., 2013. Essential Oil Characterization of Two Azorean *Cryptomeria japonica* Populations and Their Biological Evaluations. *Nat. Prod. Commun.* 8, 1785-1790.
- Mustafa, A.M., Maggi, F., Papa, F., Kaya, E., Dikmen, M., Ozturk, Y., 2016. Isofuranodiene: A neurotogenic compound isolated from wild celery (*Smyrniololusatum* L., Apiaceae). *Food Chem.* 192, 782–787.
- Nakatsuka, T., Hirose, Y., 1954. The essential oil from the wood of incense cedar, on the phenolic substances. *J. Jpn. For. Soc.* 36, 280–283.
- Nam, A.M., Paoli, M., Castola, V., Casanova, J., Bighelli, A., 2011. Identification and quantitative determination of lignans in *Cedrus atlantica* resins using <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Nat. Prod. Commun.* 6, 379-385.
- Nam, A.M., Casanova, J., Tomi, F., Bighelli, A., 2014. Composition and Chemical Variability of the Corsican *Pinus halepensis* Cone Oil. *Nat. Prod. Commun.* 9, 1361–1364.
- Nam, A.M., Bighelli, A., Ghanmi, M., Satrani, B., Casanova, J., Tomi, F., 2015. Deodarone Isomers in *Cedrus atlantica* Essential Oils and Tar Oils. *Nat. Prod. Commun.* 10, 1905-1906.
- Nam, A.M., Tomi, F., Gibernau, M., Casanova, J., Bighelli, A., 2016. Composition and Chemical Variability of the Needle Oil from *Pinus halepensis* growing in Corsica. *Chem. Biodivers.* 13, 380-386.
- National Institute of Standards and Technology, 1999. PC Version 1.7 of the Mass Spectral Library. Saint Quentin, Perkin-Elmer Corporation.
- Nawamaki, K., Kuroyanagi, M., 1996. Sesquiterpenoids from *Acorus calamus* as germination inhibitors. *Phytochemistry* 43, 1175-1182.
- Nea, F., Tanoha, E.A., Yapi, T.A., Garcia, G., Tomi, F., Tonzibo, Z.F., 2017. Chemical Investigation on Leaf, Flower and Fruit Oils of *Lantana camara* from Côte d'Ivoire. *Nat. Prod. Commun.* 12, 607-610.

- Ouattara, Z.A., Boti, J.B., Ahibo, A.C., Casanova, J., Tomi, F., Bighelli, A., 2013. Analysis of *Cleistopholis patens* leaf and trunk bark oils using combined GC-flame ionization detection, GC-retention index, GC-MS and <sup>13</sup>C-NMR. *Phytochem. Anal.* 24, 574–580.
- Ouattara, Z.A., Boti, J.B., Ahibo, A.C., Sutour, S., Casanova, J., Tomi, F., Bighelli, A., 2014. The key role of <sup>13</sup>C NMR analysis in the identification of individual components of *Polyalthia longifolia* leaf oil. *Flavour Frag. J.* 29, 371-379.
- Piers, E., Geraghty, M.B., Smillie, R.D., Soucy, M., 1975. Stereoselective total synthesis of Copa and Ylango sesquiterpenoids: (-)-Copacamphene, (-)-cyclocopacamphene, (+)-sativene, (+)-cyclosativene. *Can. J. Chem.* 53, 2849-2864.
- Poitou, F., 1995. Chemical composition of *Vepris elliotii* essential oil. *J. Essent. Oil Res.* 7, 447–449.
- Pretsch, E., Bühlmann, P., Baderyscher, M., 2009. *Structure Determination of Organic Compounds*, fourth ed. Springer, Berlin.
- Quassinti, L., Maggi, F., Barboni, L., Ricciutelli, M., Cortese, M., Papa, F., Garulli, C., Kalogris, C., Vittori S., Bramucci, M., 2014. Wild celery (*Smyrniololus olusatrum* L.) oil and isofuranodiene induce apoptosis in human colon carcinoma cells. *Fitoterapia* 97, 133–141.
- Rabehaja, D.J.R., Ihandriharison, H., Ramanoelina, P.A.R., Ratsimamanga-Urveg, S., Bighelli, A., Casanova, J., Tomi, F., 2013. Leaf oil from *Vepris madagascariensis* (Rutaceae), source of (*E*)-anethole. *Nat. Prod. Commun.* 8, 1165–1166.
- Rabehaja, D.J.R., Ihandriharison, H., Ramanoelina, P.A.R., Benja, R., Ratsimamanga-Urveg, S., Bighelli, A., Casanova, J., Tomi, F., 2014. Chemical composition of the essential oil from *Croton kimosorum*, an endemic species to Madagascar. *Nat. Prod. Commun.* 9, 129-132.
- Rakotondraibe, L.H.R., Rakotovo, M., Ramanandraibe, V., 2001. Composition and antimicrobial activity of leaf oils of *Vepris leandriana* H. Perr. *J. Essent. Oil Res.* 13, 467–469.
- Randrianarivelo, R., Sarter, S., Odoux, E., Brat, P., Lebrun, M., Romestand, B., Menut, C., Andrianoelisoa, H.S., Rahehimandimby, M., Danthu, P., 2009. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. *Food Chem.* 114, 680-684.
- Randrianarivelojosia, M., Rasidimanana, V.T., Rabarison, H., Cheplogoi, P.K., Ratsimbason, M., Mulholland, D.A., Maucière, P., 2003. Plants traditionally prescribed to treat razao (malaria) in the eastern region of Madagascar. *Malaria J.* 2, 1-9.
- Razafimamonjison, D.E.N.G., 2011. Variabilités chimiques et activités antimicrobiennes des huiles essentielles de *Cinnamosma* spp. (Alternative aux antibiotiques en aquaculture de crevette). Thèse de Doctorat, Université d'Antananarivo, Madagascar.
- Renvoize, S.A., 1978. Studies in *Elionurus* (Gramineae). *Kew Bull.* 32, 665-673.
- Rücker, G., Mayer, R., Breitmaier, E., Will, G., Kirfel, A., El Kordy, M., 1984. Oxidized aristolane sesquiterpenes from *Aristolochia debilis*. *Phytochemistry* 23, 1647-1649.
- Scramin, S., Saito, M.L., Pott, A., Mayo Marques, M.O., 2000. Essential Oil of *Elyonurus muticus* (Sprengel) O.Kuntze (Gramineae). *J. Essent. Oil Res.* 12, 298-300.
- Shieh, B., Iizuka, Y., Matsubara, Y., 1981. Monoterpenoid and Sesquiterpenoid Constituents of the Essential Oil of Sugi (*Cryptomeria japonica* D. DON.). *Agric. Biol. Chem.* 45, 1493-1495.
- Silou, T., Loubaki, L., Figuéredo, G., Chalchat, J.C., 2006. Study of Essential Oil Composition of *Elyonurus hensii* Schum from Congo. *J. Essent. Oil Res.* 18, 518-520.

- Smadja, J., Strasberg, D., Legoff, G., Gauvin-Bialecki, A., 2010. Volatile compounds from *Melicope obscura*. Chem. Biodivers. 7, 467–475.
- Snajberk, K., Lee, C.J., Zavarin, E., 1974. Chemical Composition of Volatiles from Cortical Oleoresin of *Pseudotsuga menziesii*. Phytochemistry 13, 185-188.
- Su, H., Shi, D.Y., Li, J., Li, L.L., Yuan, Z.H., Zhu, X.B., 2009. Sesquiterpenes from *Laurencia similis*. Molecules 14, 1889-1897.
- Sutour, S., Bradesi, P., Casanova, J., Tomi, F., 2010. Composition and Chemical Variability of *Mentha suaveolens* ssp. *suaveolens* and *M. suaveolens* ssp. *insularis* from Corsica. Chem. Biodivers. 7, 1002-1008.
- Sutour, S., Tomi, F., Bradesi, P., Casanova, J., 2011. Chemical Composition of the Essential Oil from Corsican *Mentha aquatica* - Combined Analysis by GC(RI), GC-MS and <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy. Nat. Prod. Commun. 6, 1479-1782.
- Sutour, S., Bradesi, P., Luro, F., Casanova, J., Tomi, F., 2015a. Germacra-1(10),5-dien-4 $\alpha$ -ol in *Fortunella* sp. Leaf oils. Flavour Fragr. J. 30, 445–450.
- Sutour, S., Xu, T., Casabianca, H., Paoli, M., de Rocca-Serra, D., Tomi, F., Garrido, M., Pasqualini, V., Aiello, A., Castola, V., Bighelli, A., 2015b. Chemical Composition of Extracts From *Chaetomorpha linum* (Miller) Kütz. A Potential Use in the Cosmetic Industry. Int. J. Phytocos. Nat. Ingrid. 2, 5.
- Takeoka, G., Butter, R.G., Flath, R.A., Teranishi, R., Wheeler, E.L., Wieczorek, R.L., Guentert, M., 1989. Volatile constituents of pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.). in: Teranishi, R., Buttery, R.G., Shahidi, F. (Eds.), Flavor Chemistry. Trends and Developments, American Chemical Society, Washington, DC, 223-237.
- Tissandié, L., Gaysinski, M., Brévard, H., Meierhenrich, U.J., Filippi J.J., 2017. Revisiting the Chemistry of Guaiacwood Oil: Identification and Formation Pathways of 5,11- and 10,11-Epoxyguaianes. J. Nat. Prod. 80, 526-537.
- Tissot, E., Rochat, S., Debonneville, C., Chaintreau, A., 2012. Rapid GC-FID quantification technique without authentic samples using predicted response factors. Flavour. Fragr. J. 27, 290–296.
- Tomi, F., Bradesi, P., Bighelli, A., Casanova, J., 1995. Computer-aided identification of individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy. J. Magn. Reson. Anal. 1, 25–34.
- Tomi, F., Casanova, J., 2006. <sup>13</sup>C-NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from Labiatae. Acta Hort. 723, 185-192.
- Tucker, A.O., Maciarello, M.J., Brown, R., 2008. A commercial essential oil of Mandravasarotra (*Cinnamosma fragrans* Baill., Canellaceae) from Madagascar. J. Essent. Oil Res. 20, 259-260.
- Van Den Dool, H., Kratz, P.D., 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. J. Chromatogr. 11, 463-471.
- Vaquette, J., 1974. Contribution a la chimiotaxonomie des Rutacees : etude de *Zanthoxylum decaryi* H.Perr, étude de *Teclea boiviniana* (Baillon) H.Perr, et de *Teclea unifoliolata* Baillon. Thèse de Doctorat, Université de Paris-Sud, France.
- Vellutini, M., Baldovini, N., de Rocca Sera, D., Tomi, F., Casanova, J., 2005.  $\beta$ -Cyclolanvandulyl and  $\beta$ -isocyclolanvandulyl ester from *Peucedanum paniculatum* L., an endemic species to Corsica. Phytochemistry 66, 1956-1962.



- Veluthoor, S., Kelsey, R.G., González-Hernández, M.P., Panella, N., Dolan, M., Karchesy, J., 2011. Composition of the heartwood essential oil of incense cedar (*Calocedrus decurrens* Torr.). *Holzforschung* 65, 333–336.
- Verma, R.S., Padalia, R.C., Chauhan, A., Yadav, A., Chanotiya, C.S., 2015. Essential oil composition of Himalayan Peony (*Paeonia emodi* Royle). *J. Essent. Oil Res.* 27, 477–480.
- Villecco, M.B., Hernández, L.R., Guzmán, M.I., Catalán, C.A.N., Bucio, M.A., Joseph-Nathan, P., 2001. Synthesis, stereochemistry and absolute configuration of deodarols and deodarones. *Tetrahedron: Asymmetr.* 12, 2947–2953.
- Von Rudloff, E., 1981. The leaf oil terpene composition of incense cedar and coast redwood. *Can. J. Chem.* 59, 285–287.
- Wang, S.Y., Lai, W.C., Chu, F.H., Lin, C.T., Shen, S.Y., Chang, S.T., 2006. Essential oils from the leaves of *Cryptomeria japonica* acts as a silverfish (*Lepisma saccharina*) repellent and insecticide. *J. Wood Sci.* 52, 522–526.
- Wei, F., Furihata, K., Koda, M., Hu, F., Kato, R., Miyakawa, T., Tanokura, M., 2012. <sup>13</sup>C NMR-Based Metabolomics for the Classification of Green Coffee Beans According to Variety and Origin. *J. Agric. Food Chem.* 60, 10118–10125.
- Weyersthal, P., Christiansen, C., Gundidza, M., Mavi, S., 1992. Constituents of the essential oil of *Heteropyxis natalensis*. *J. Essent. Oil Res.* 4, 439–445.
- Weyerstahl, P., Marschall, H., Splittgerber, U., Wolf, D., 2000. 1,7-Cyclogermacrene-1(10),4-dien-15-al, a sesquiterpene with a novel skeleton, and other sesquiterpenes from Haitian vetiver oil. *Flavour Frag. J.* 15, 61–83.
- Williamson, M.P., Neuhaus, D., 1989. *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, second ed. Wiley-VCH, New-York.
- Xu, T., Gherib, M., Bekhechi, C., Atik-Bekkara, F., Casabianca, H., Tomi, F., Casanova, J., Bighelli, A., 2015a. Thymyl esters derivatives and a new natural product modhephanone from *Pulicaria mauritanica* Coss. (Asteraceae) root oil. *Flavour Frag. J.* 30, 83–90.
- Xu, T., Sutour, S., Casabianca, H., Tomi, F., Paoli, M., Garrido, M., Pasqualini, V., Aiello, A., Castola, V., Bighelli, A., 2015b. Rapid Screening of Chemical Compositions of *Gracilaria dura* and *Hypnea musciformis* (Rhodophyta) From Corsican Lagoon. *Int. J. Phytocos. Nat. Ingrid.* 2, 8.
- Yang, Y., De Cian, M.C., Nsikabaka, S., Tomi, P., Silou, T., Costa, J., Paolini, J., 2013. Volatile Fraction Composition and Total Phenolic and Flavonoid Contents of *Elionurus hensii*—Antioxidant Activities of Essential Oils and Solvent Extracts. *Nat. Prod. Commun.* 8, 655–661.
- Yapi, T.A., Boti, J.B., Attioua, B.K., Ahibo, A.C., Bighelli, A., Casanova, J., Tomi, F., 2012. Three New Natural Compounds from the Root Bark Essential Oil from *Xylopiya aethiopica*. *Phytochem. Anal.* 23, 651–656.
- Yapi, T.A., Boti, J.B., Ahibo, A.C., Bighelli, A., Casanova, J., Tomi, F., 2013. Combined analysis of *Xylopiya rubescens* Oliv. leaf oil using gas chromatography with flame ionization detection, gas chromatography with mass spectrometry and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance: structure elucidation of new compounds. *Flavour Frag. J.* 28, 373–379.
- Yedomon, B.H., Saves, I., Mtimet, N., Raelison, E.G., Constant, P., Daffé, M., Bouajila, J., 2017. *Elionurus tristis* Essential Oil: GC-MS Analysis and Antioxidant and Antituberculosis Activities. *Nat. Prod. Commun.* 12, 615–618.

Zavarin, E., Cobb Jr., F.W., Bergot, J., Barber, H.W., 1971. Variation of the genus *Pinus ponderosa* needle oil with season and needle age. *Phytochemistry* 10, 3107-3114.



# Annexes

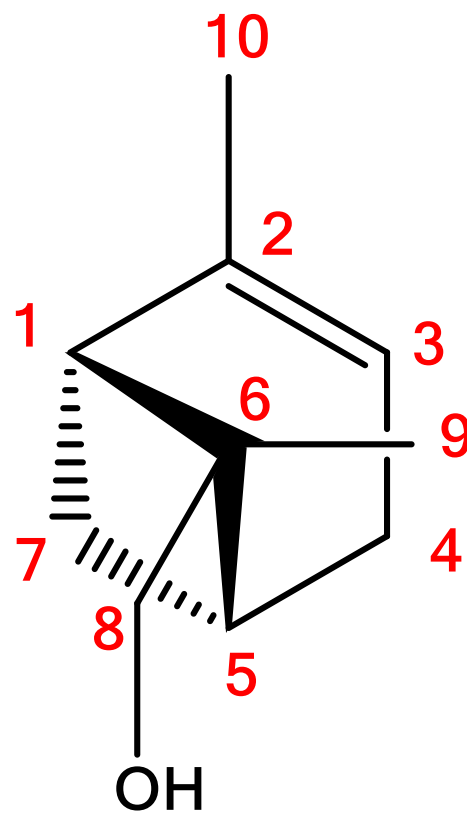


## **Annexes de l'article 5. New Pinane Derivatives Found in Essential Oils of *Calocedrus decurrens***

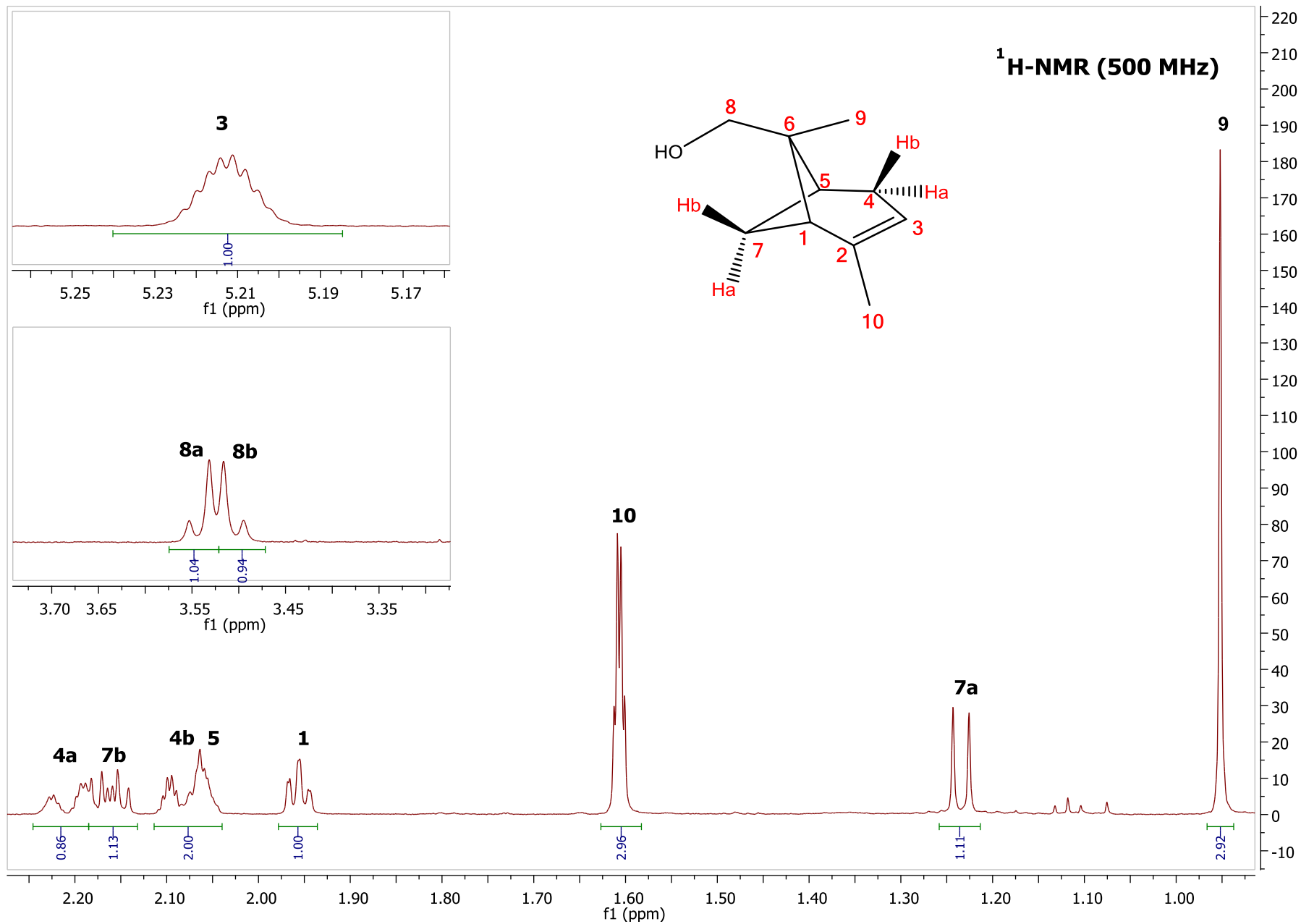
Les données spectrales de RMN 1D et 2D sont disponibles dans le Supplementary Material de l'article sur le site web du journal « *Molecules* »

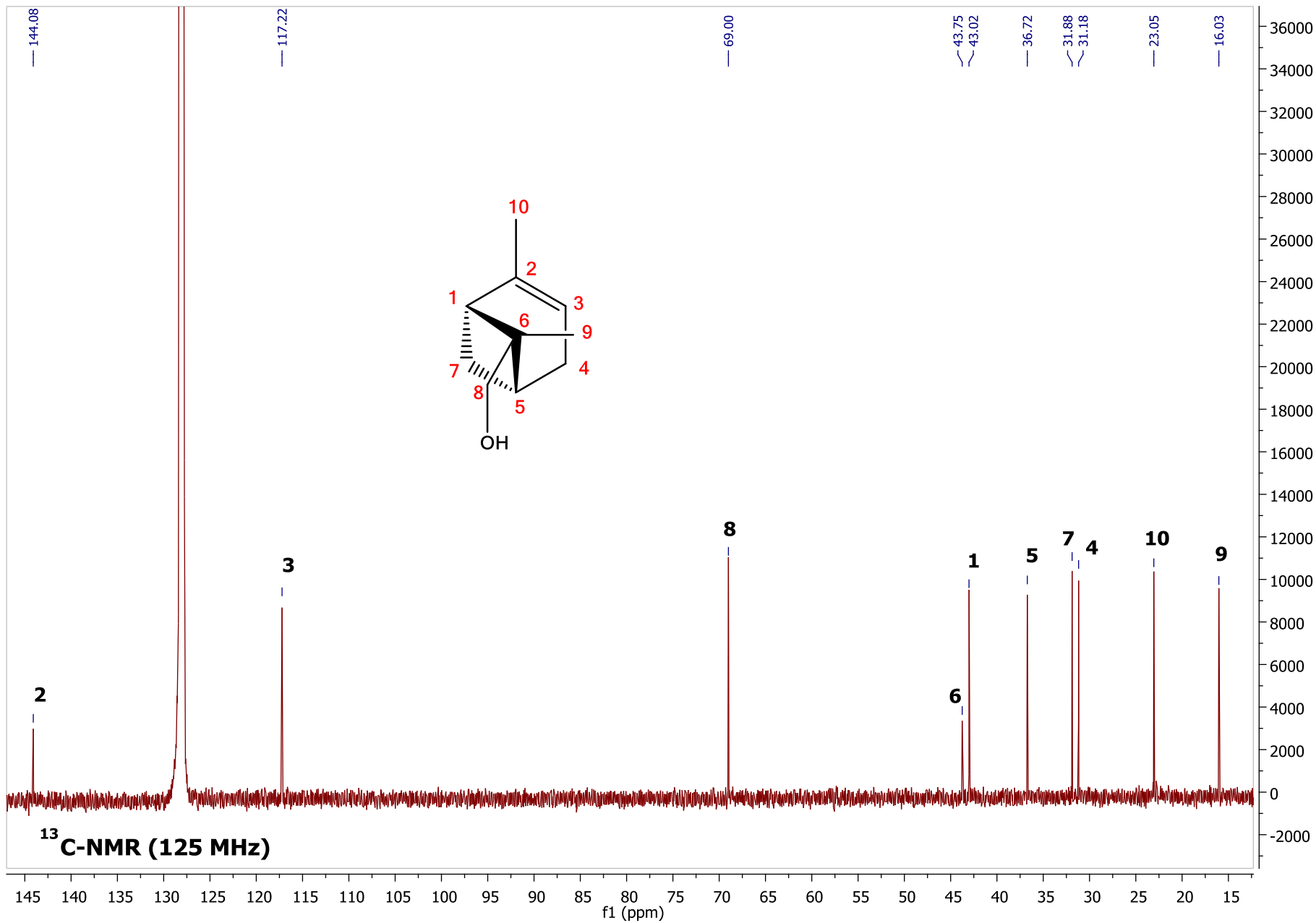


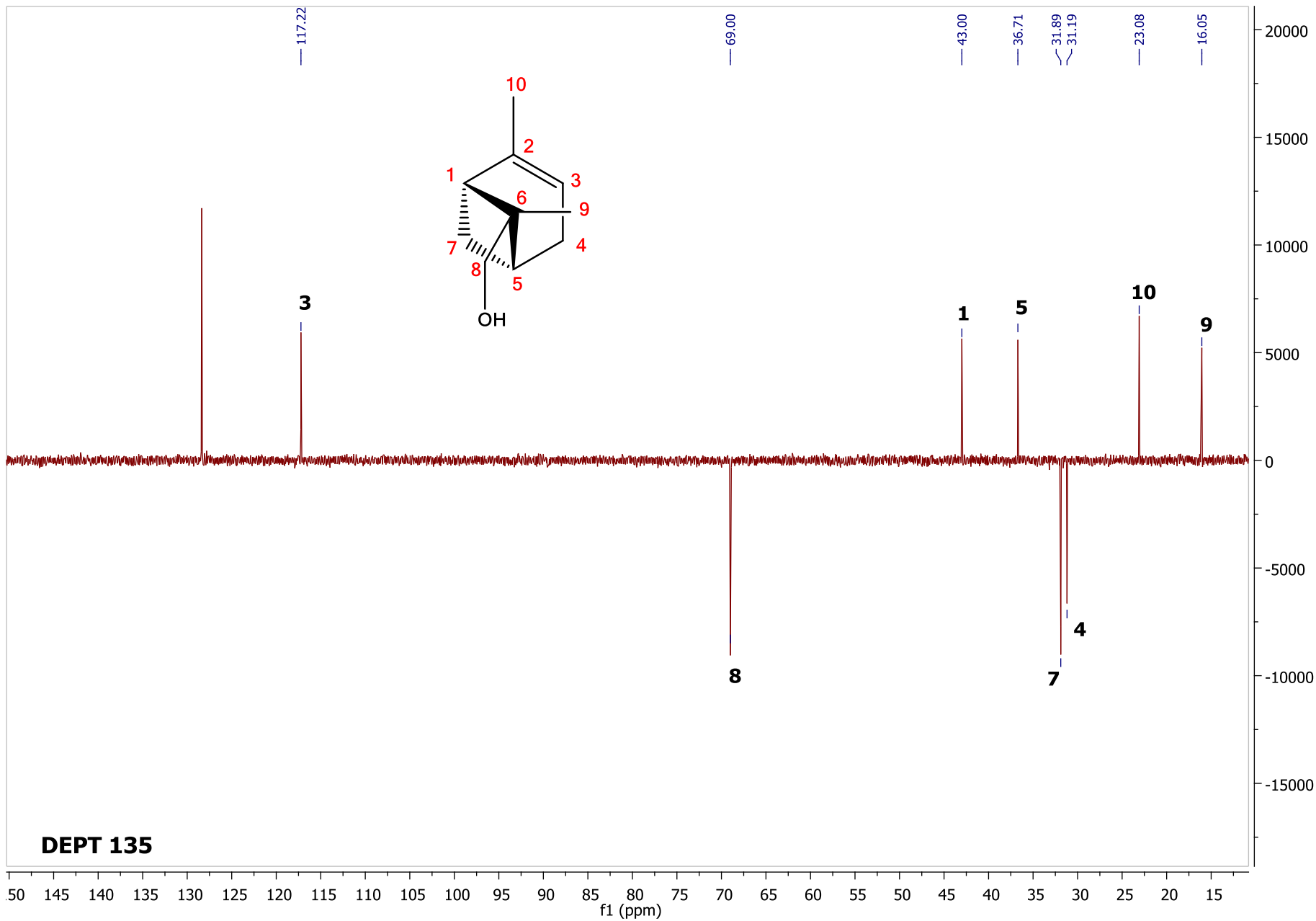
Annexe 1 : RMN 1D du Pin-2-èn-8-ol (A)

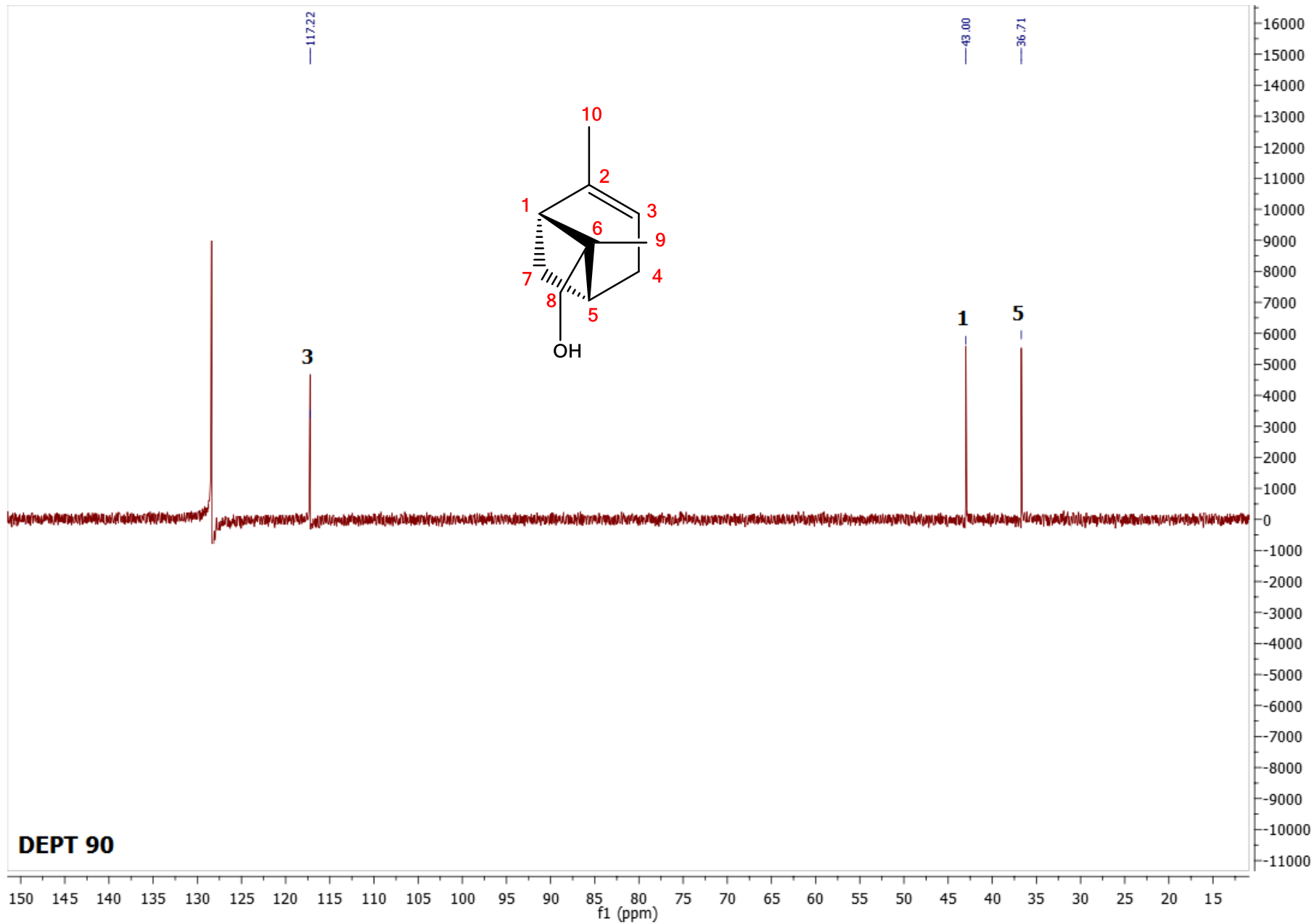






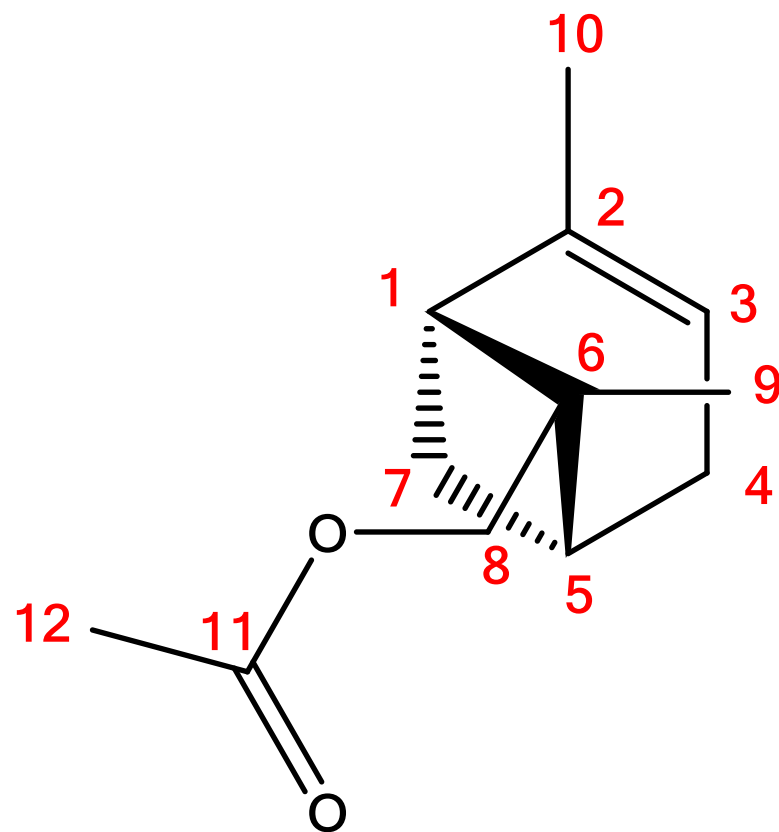


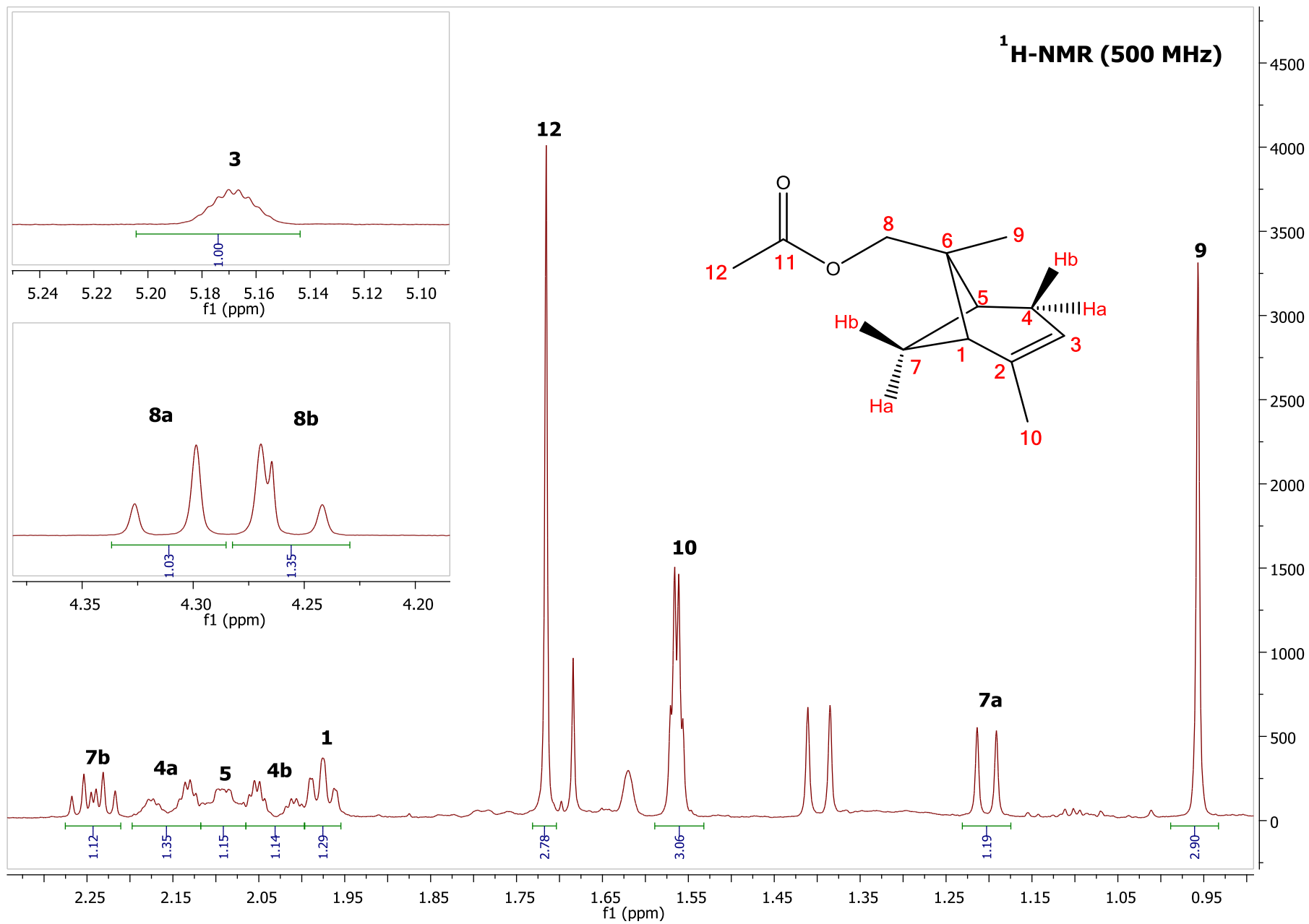


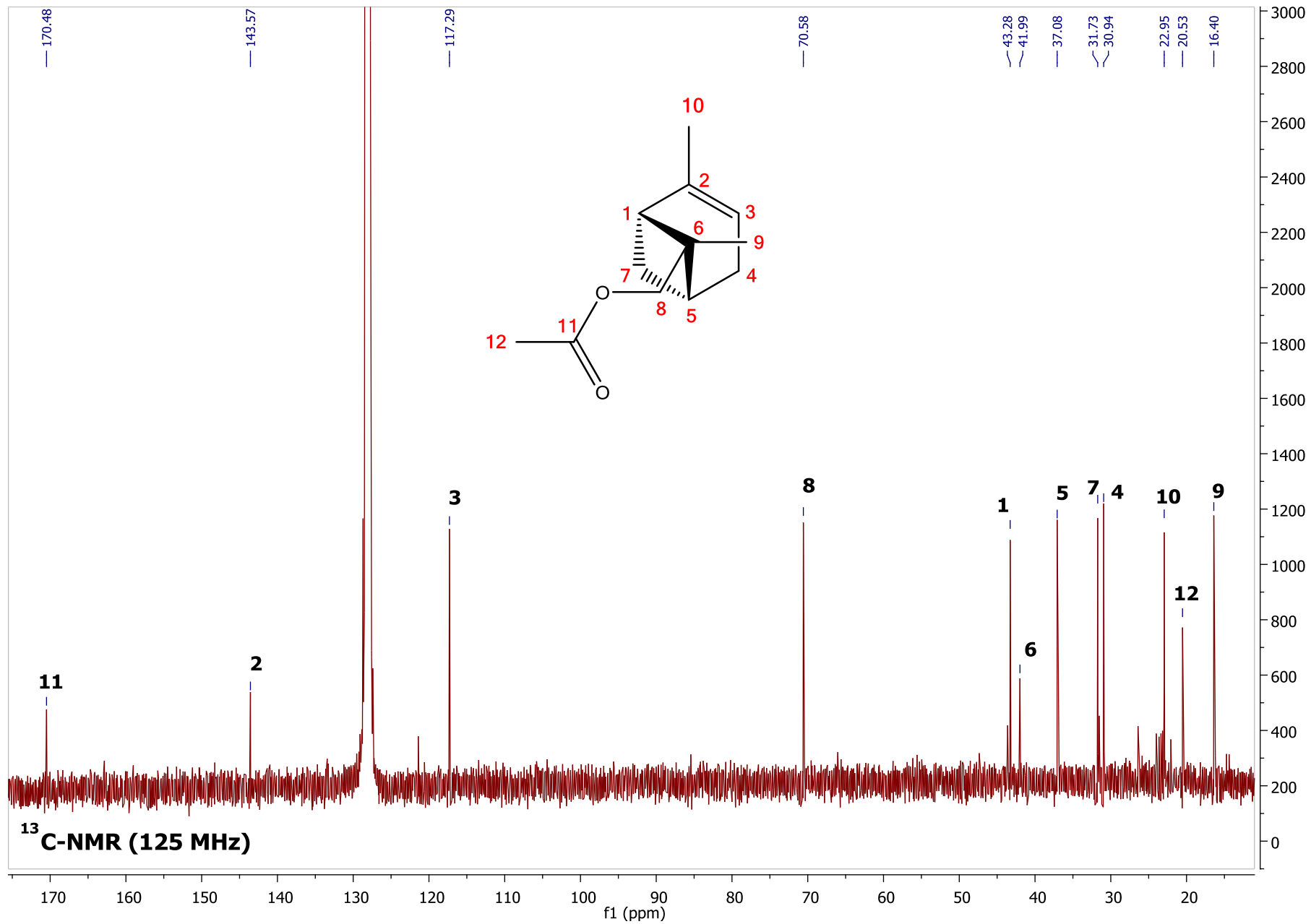




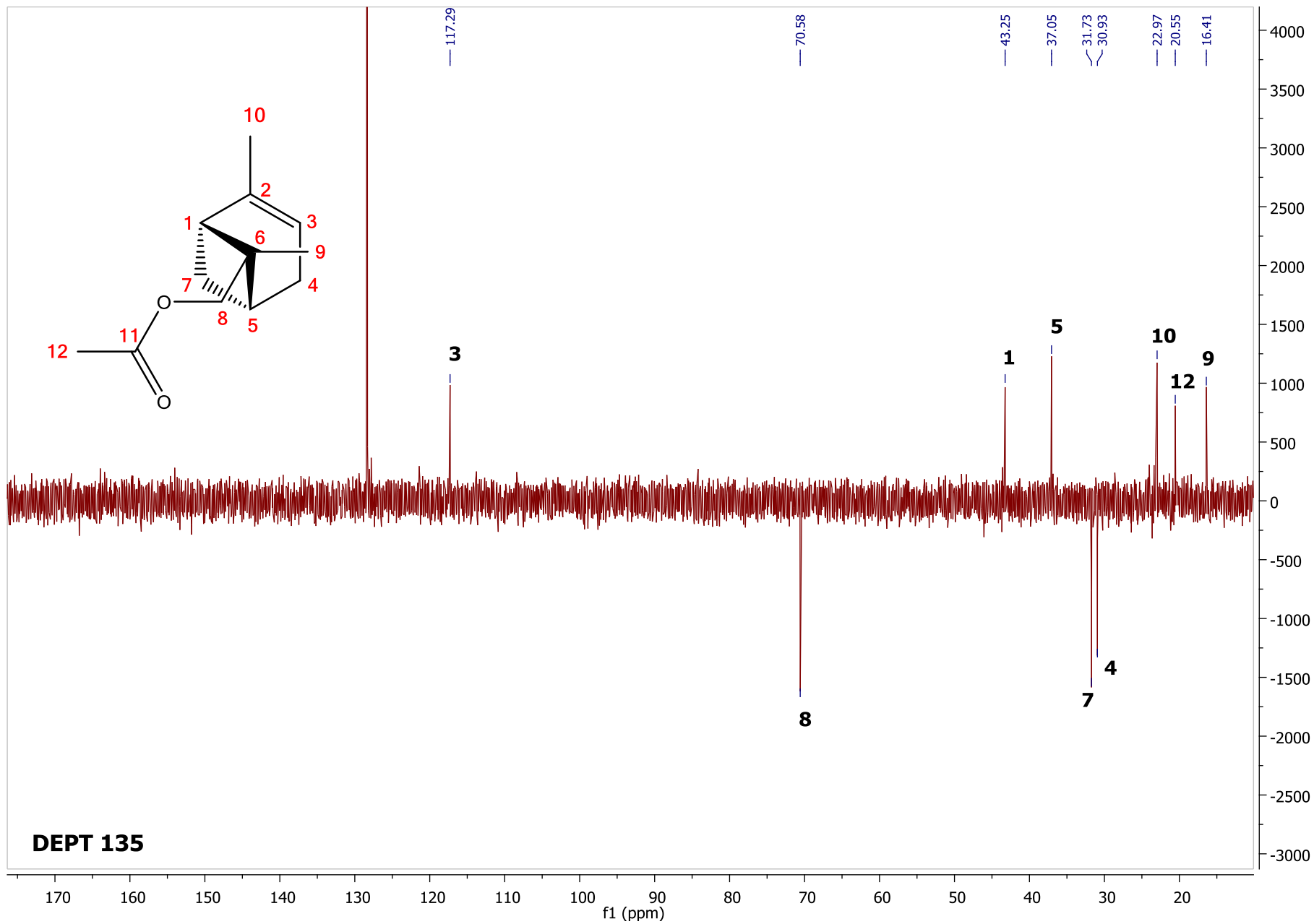
Annexe 2 : RMN 1D de l'Acétate de Pin-2-èn-8-yle (B)

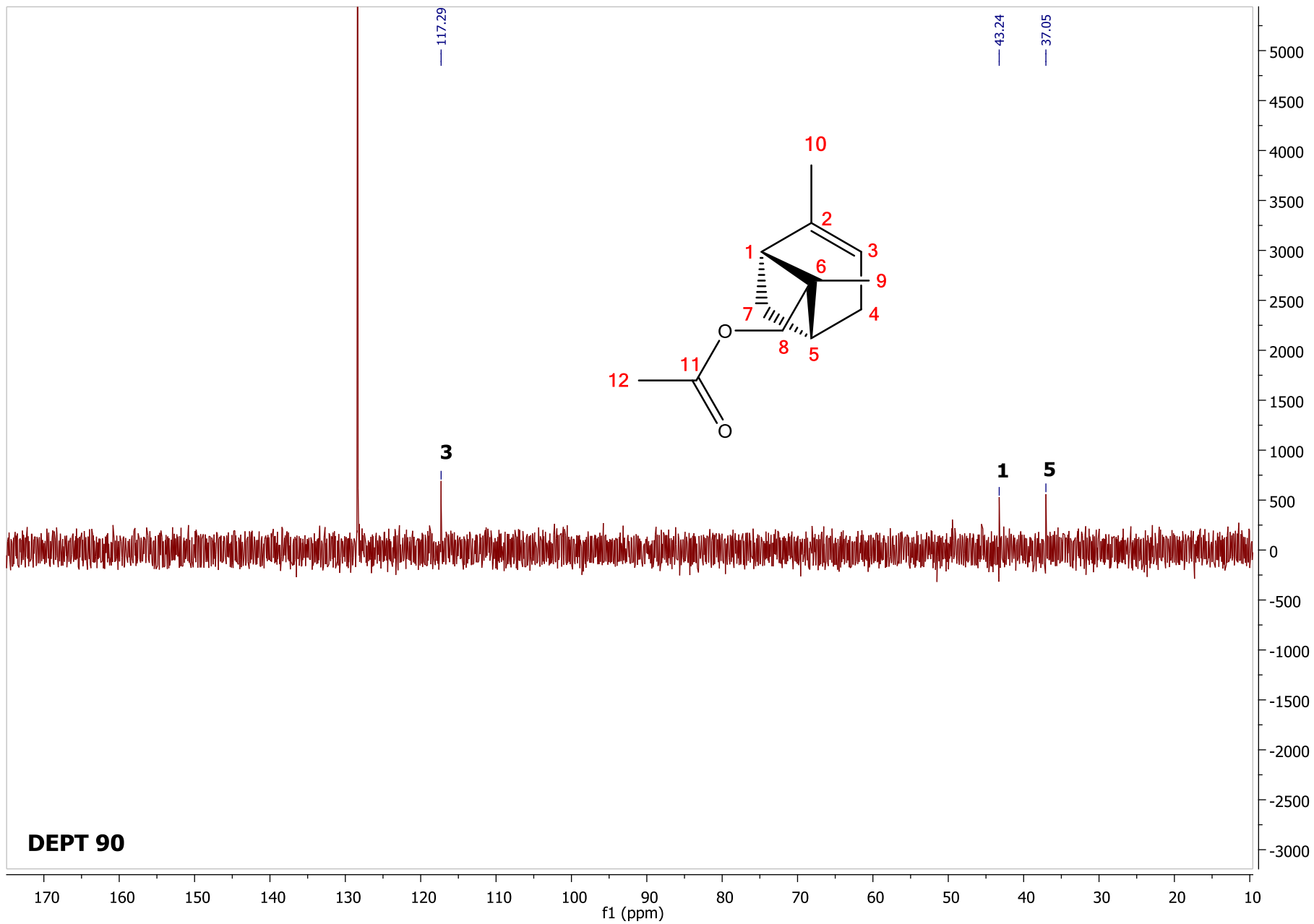






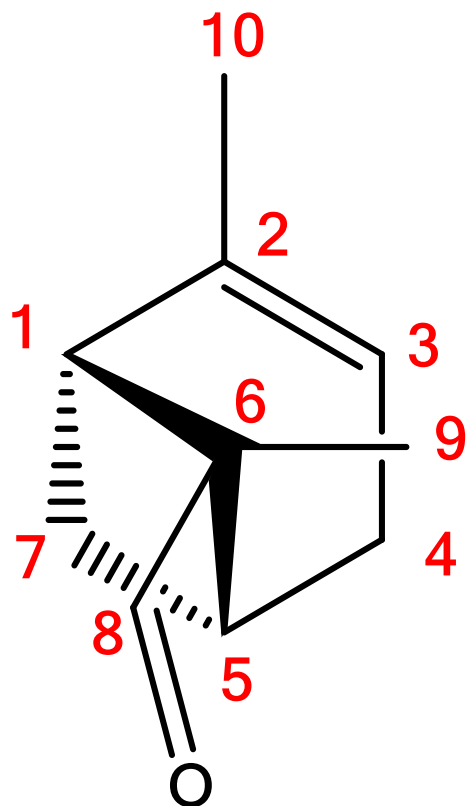


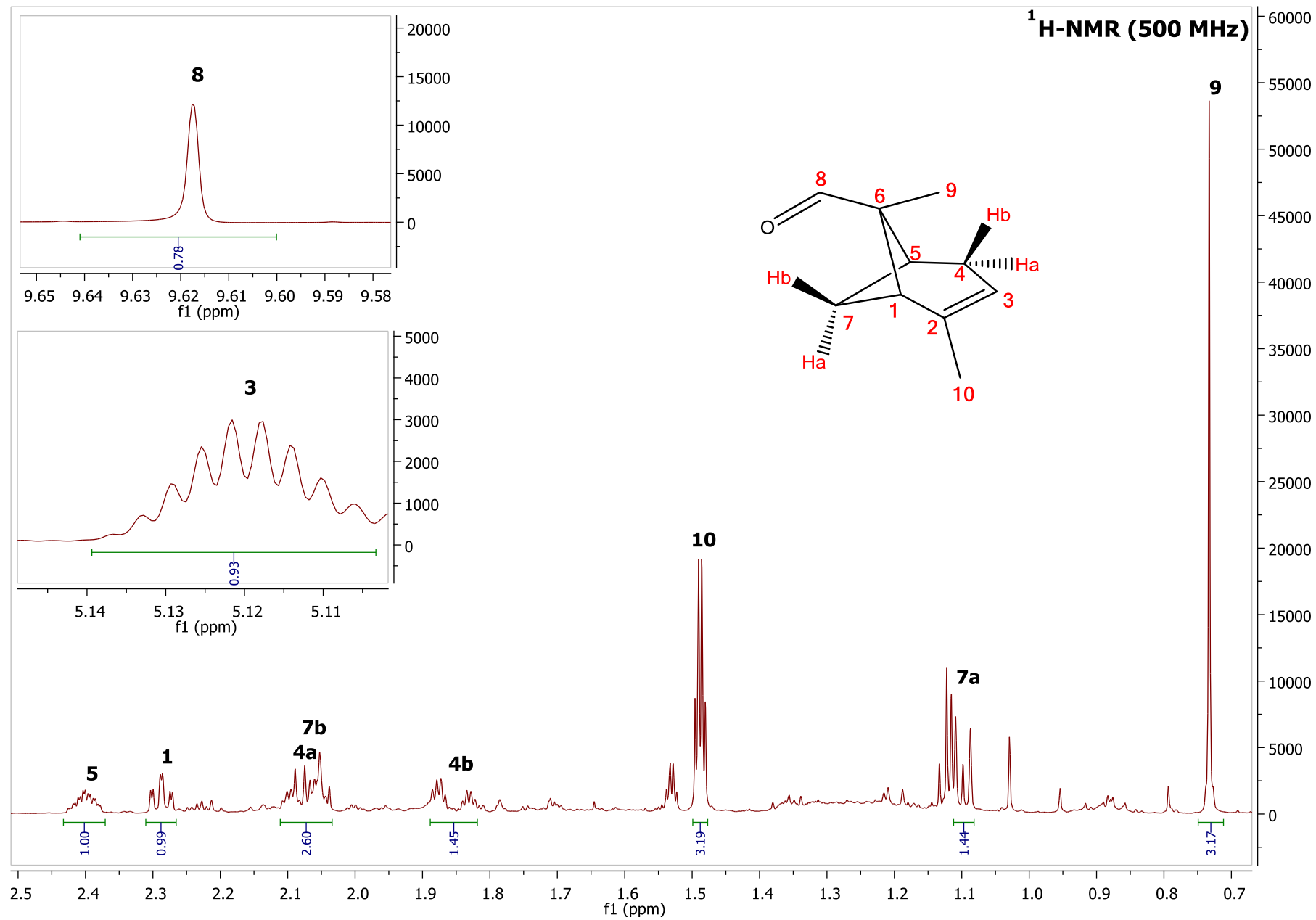


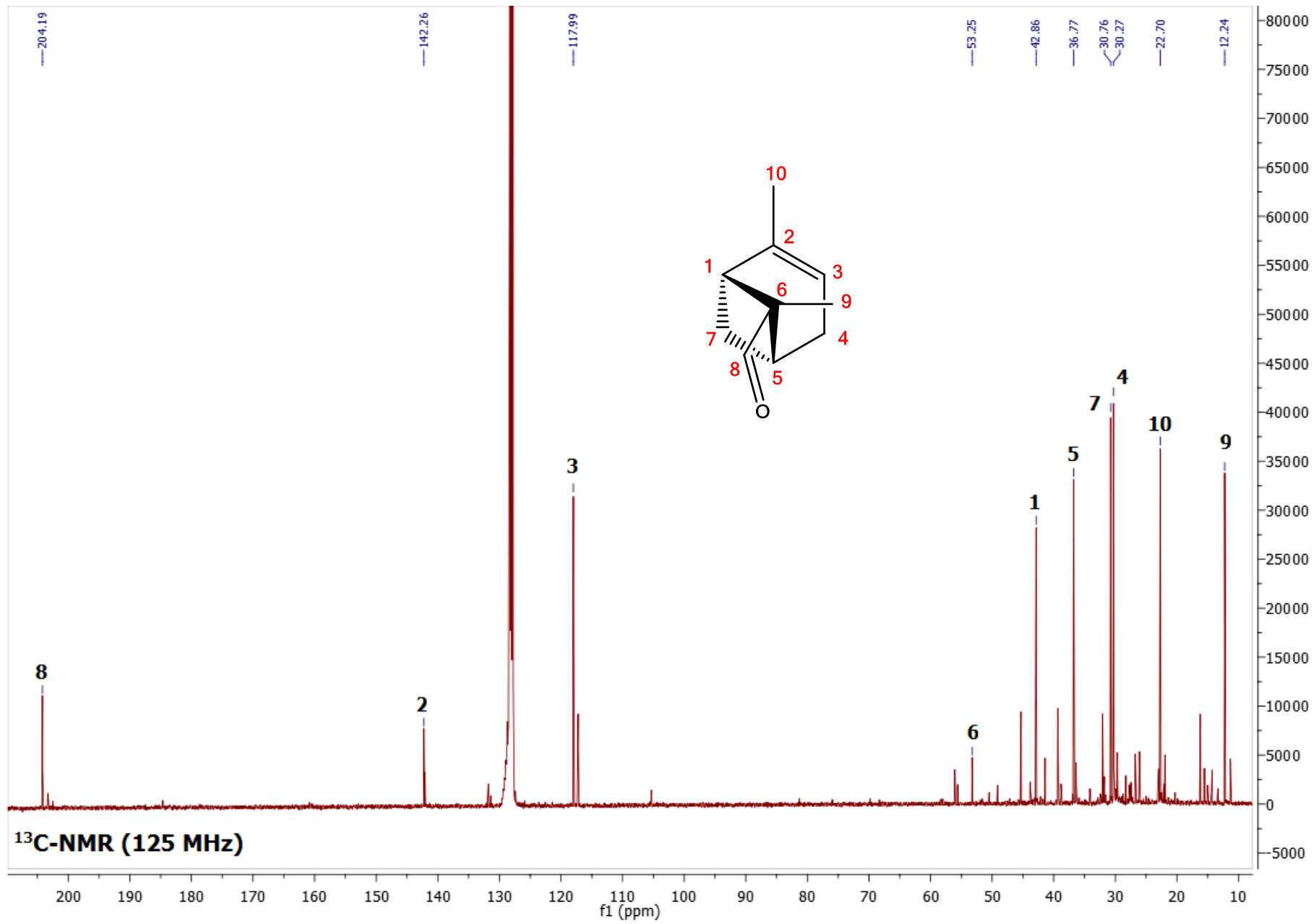


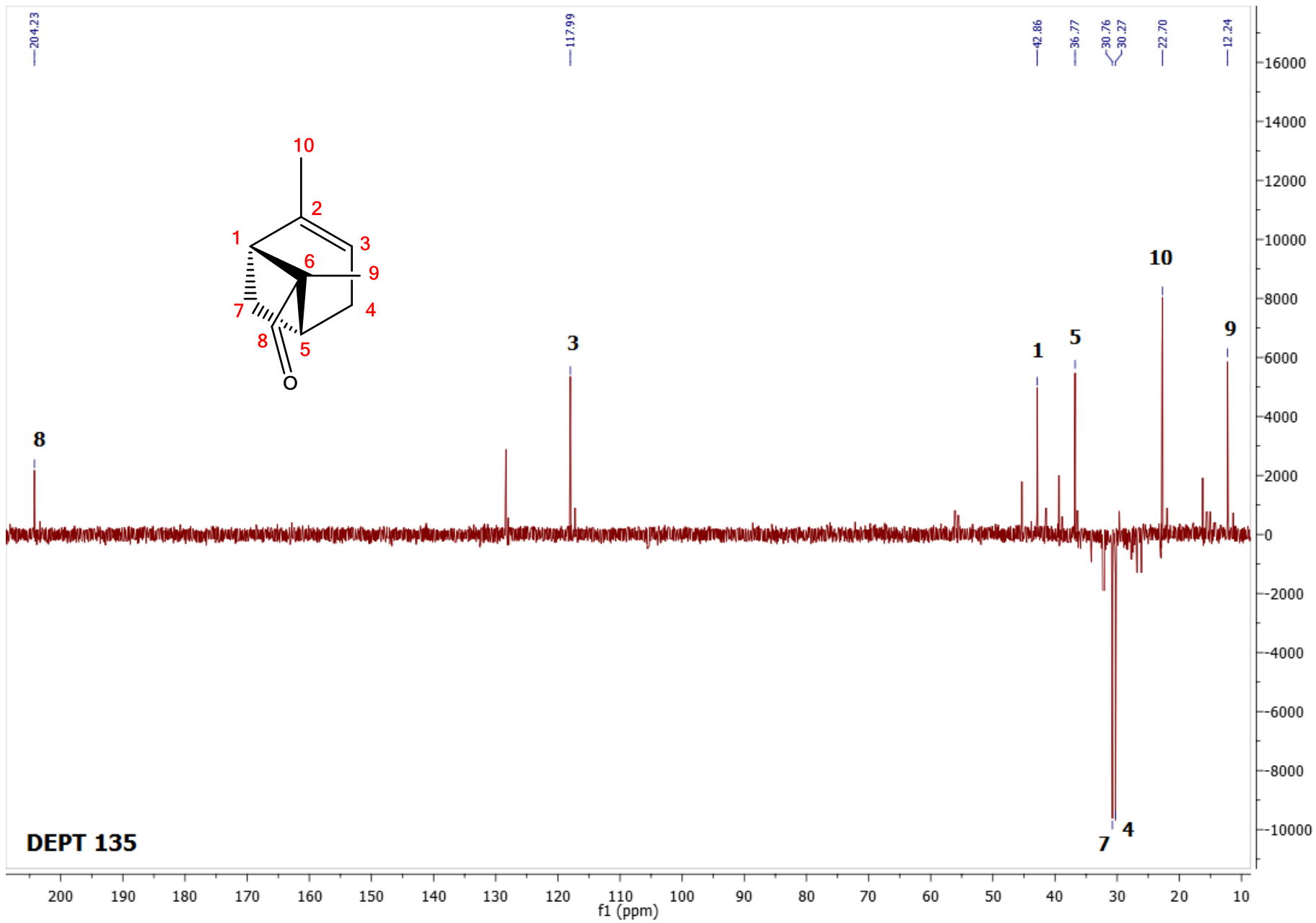


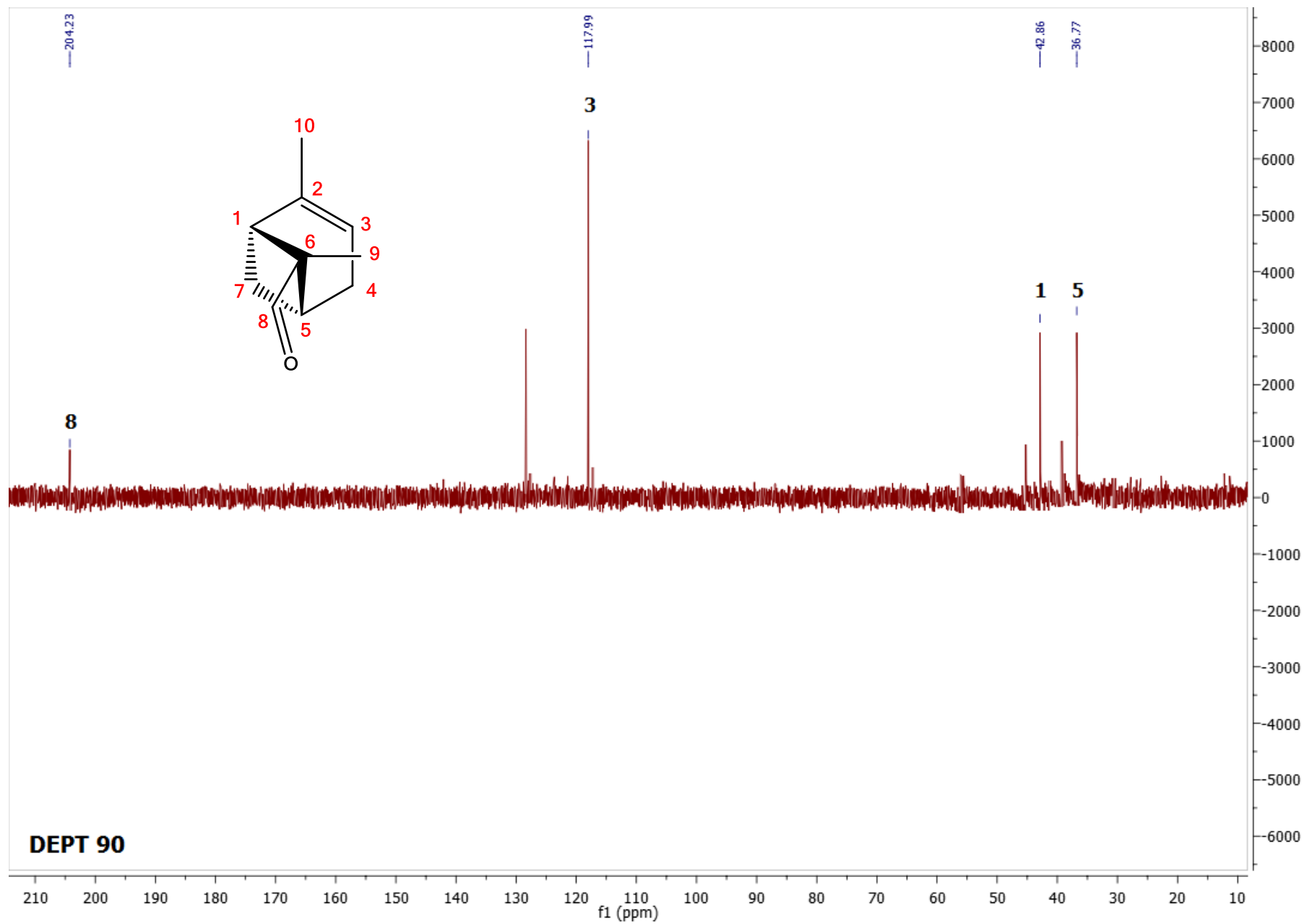
Annexe 3 : RMN 1D du Pin-2-èn-8-al (C)







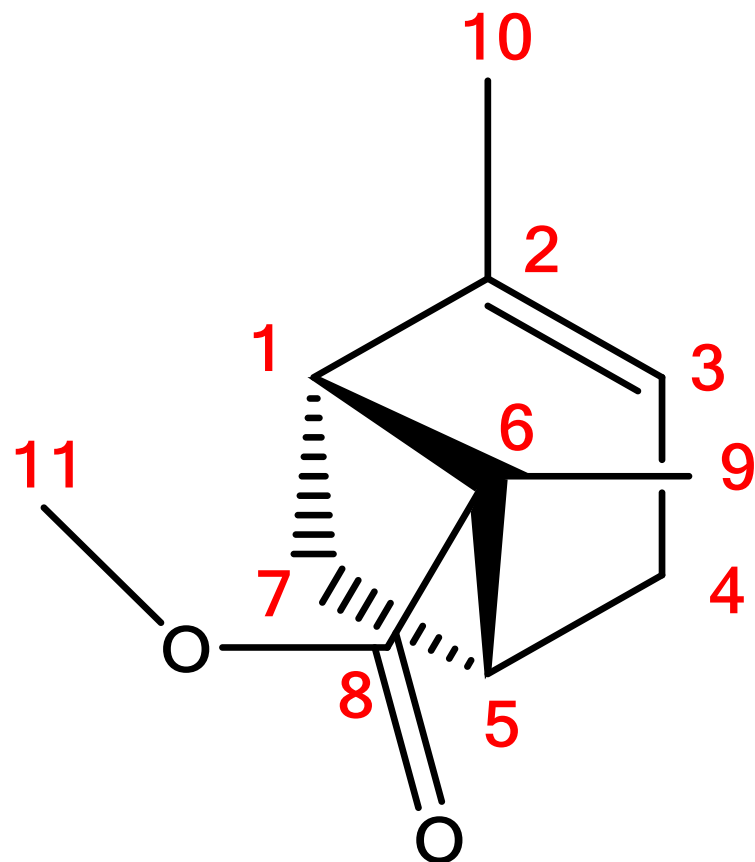


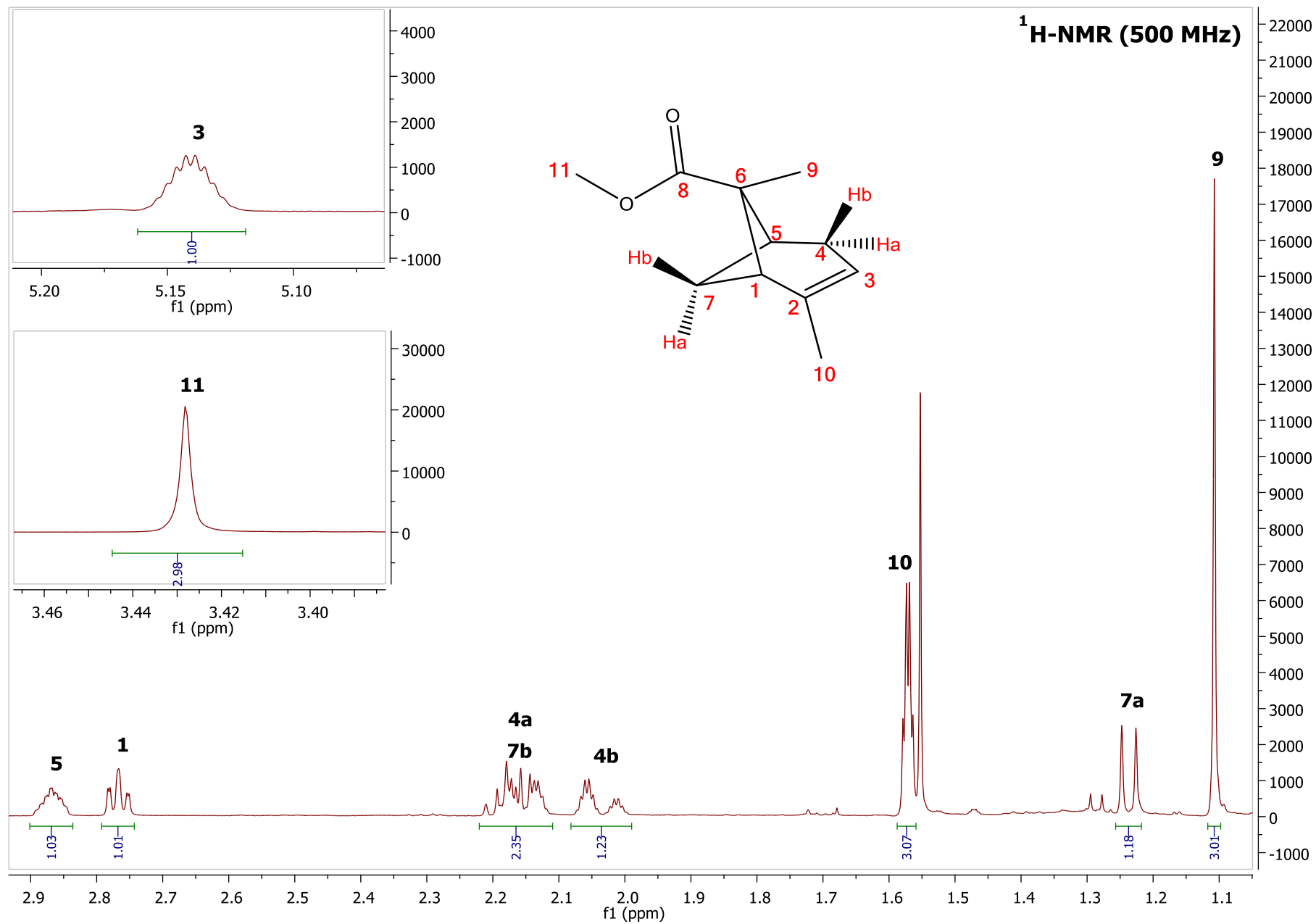


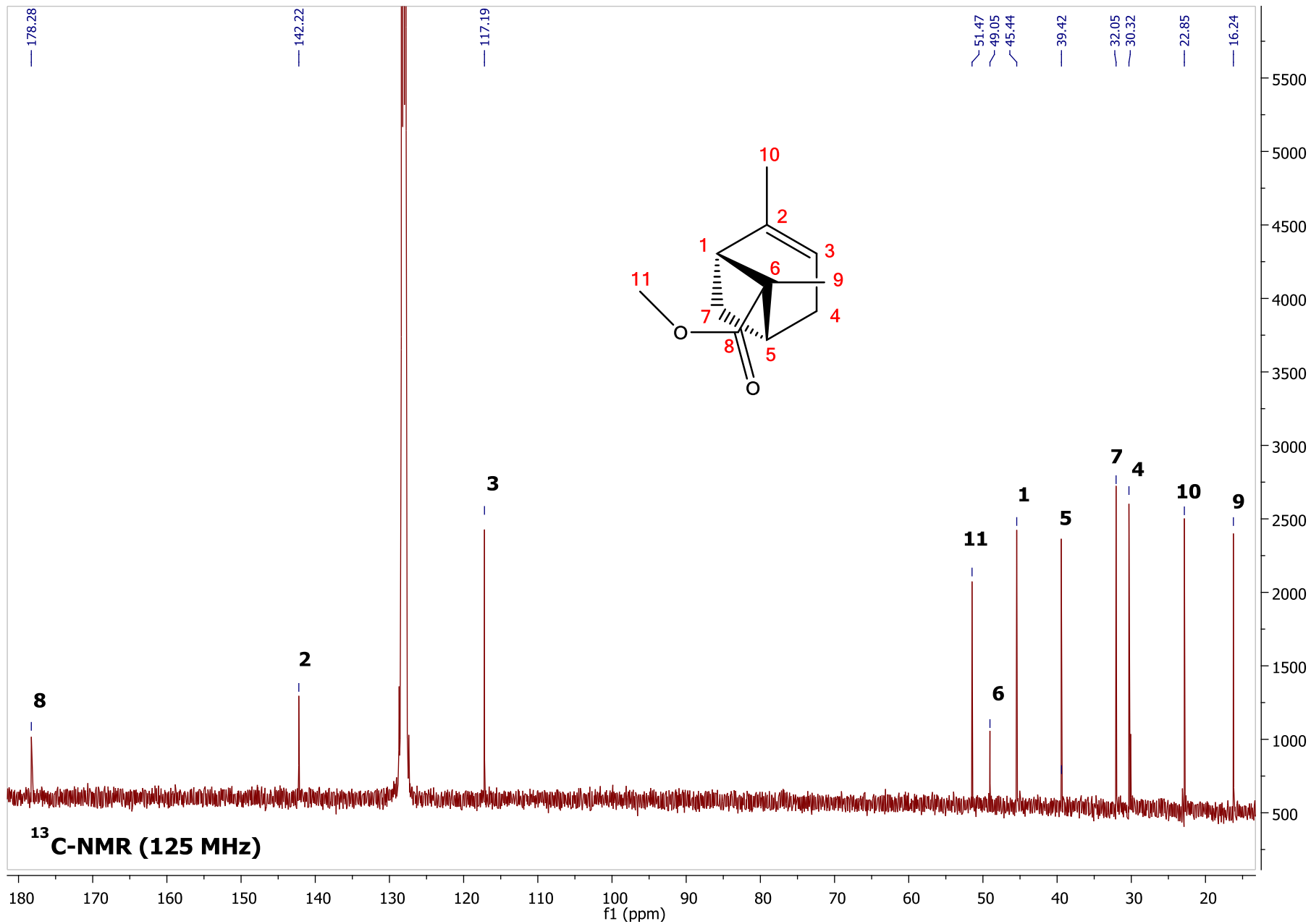


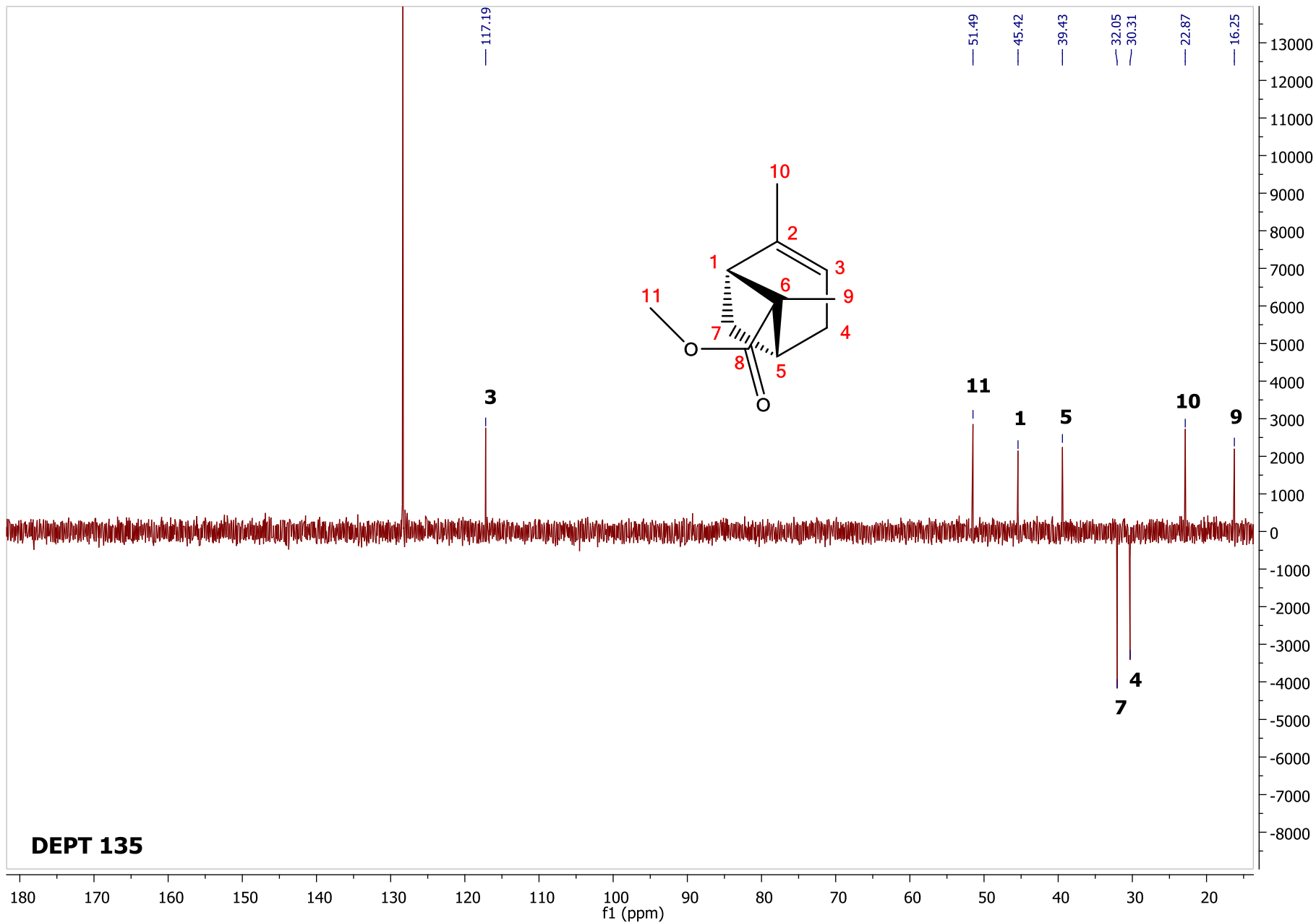


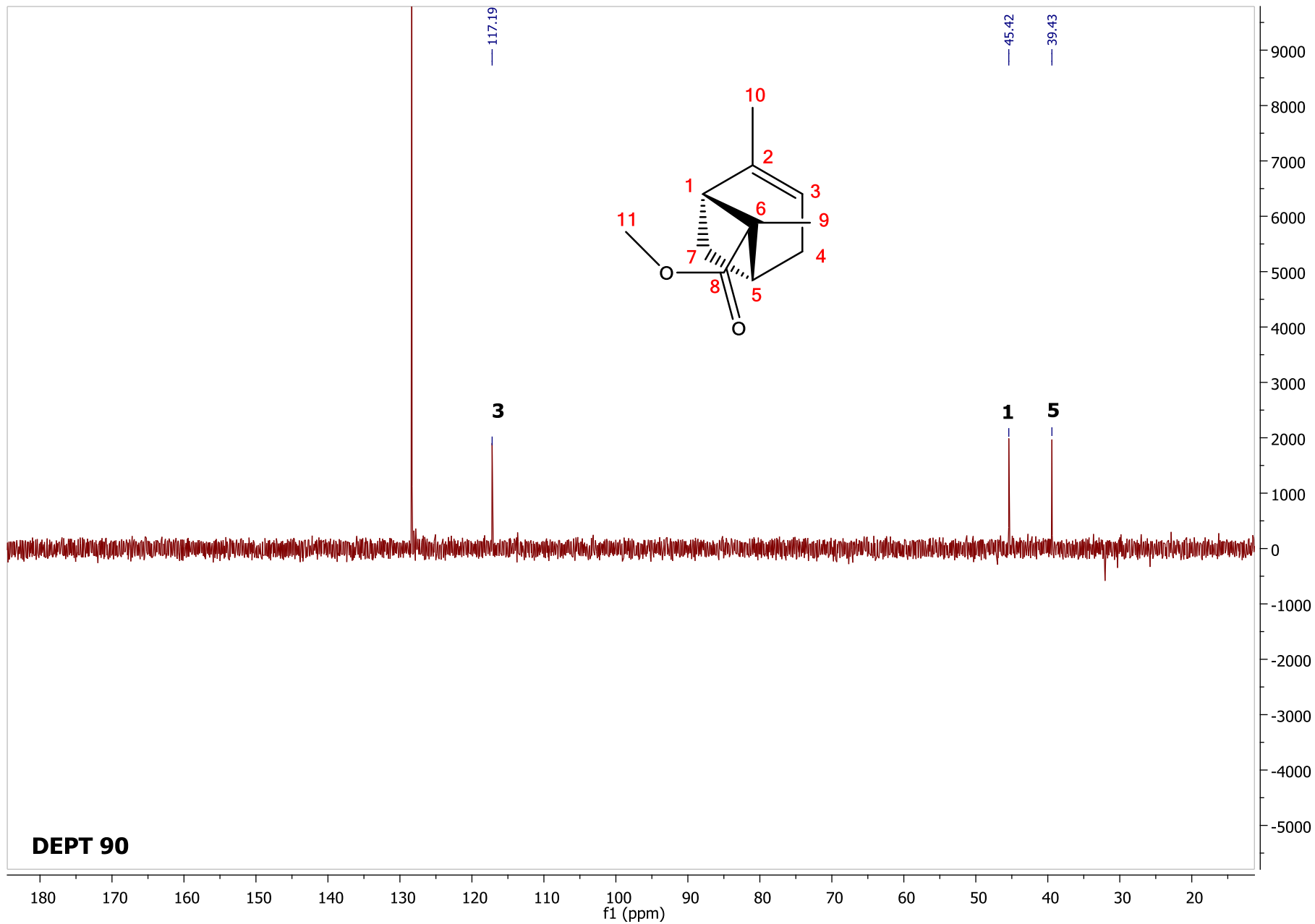
Annexe 4 : RMN 1D du Pin-2-èn-8-oate de Méthyle (D)











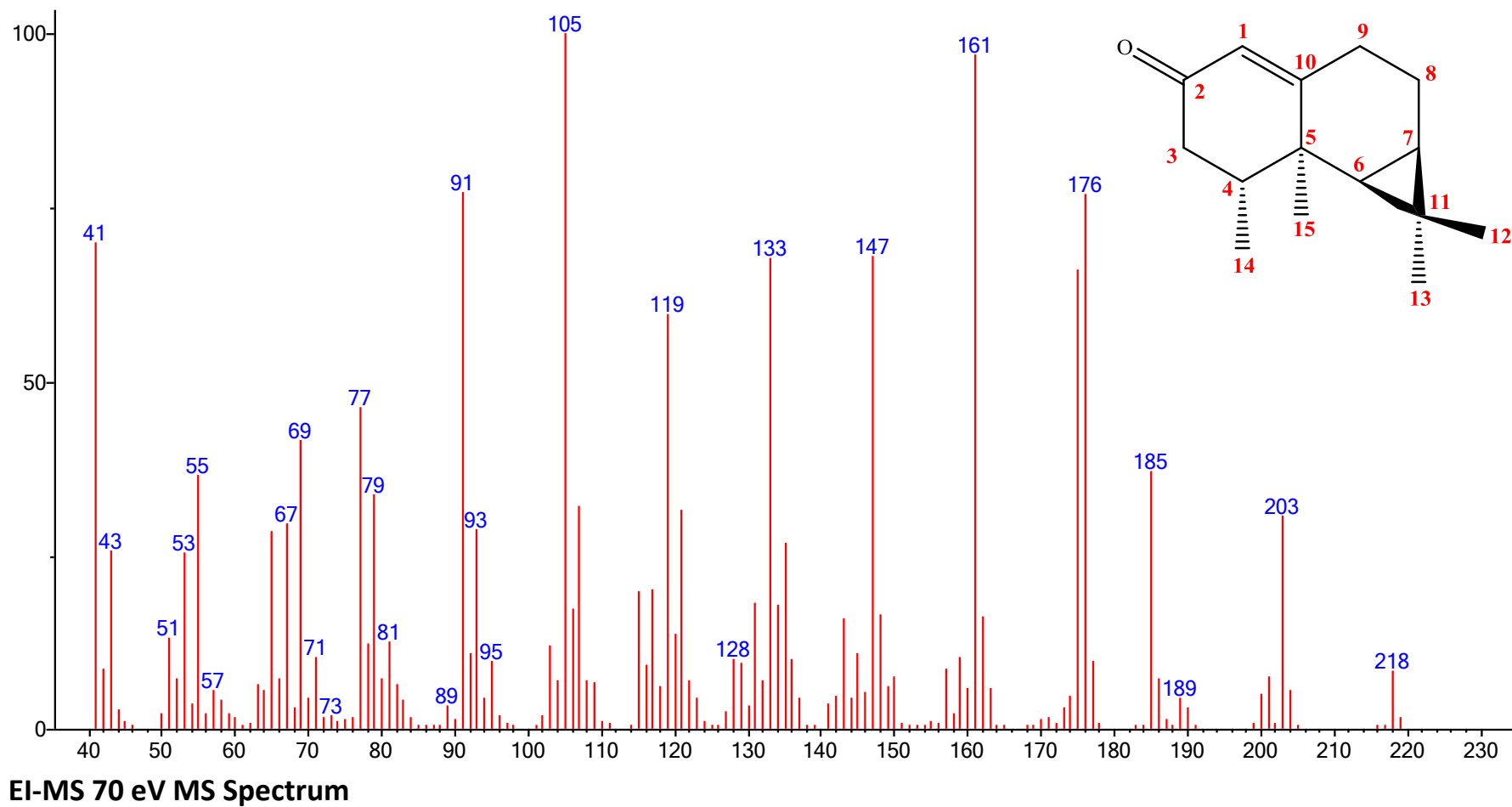


**Annexes de l'article 6. New sesquiterpenes including a novel skeleton (Elionurane) from *Elionurus tristis***

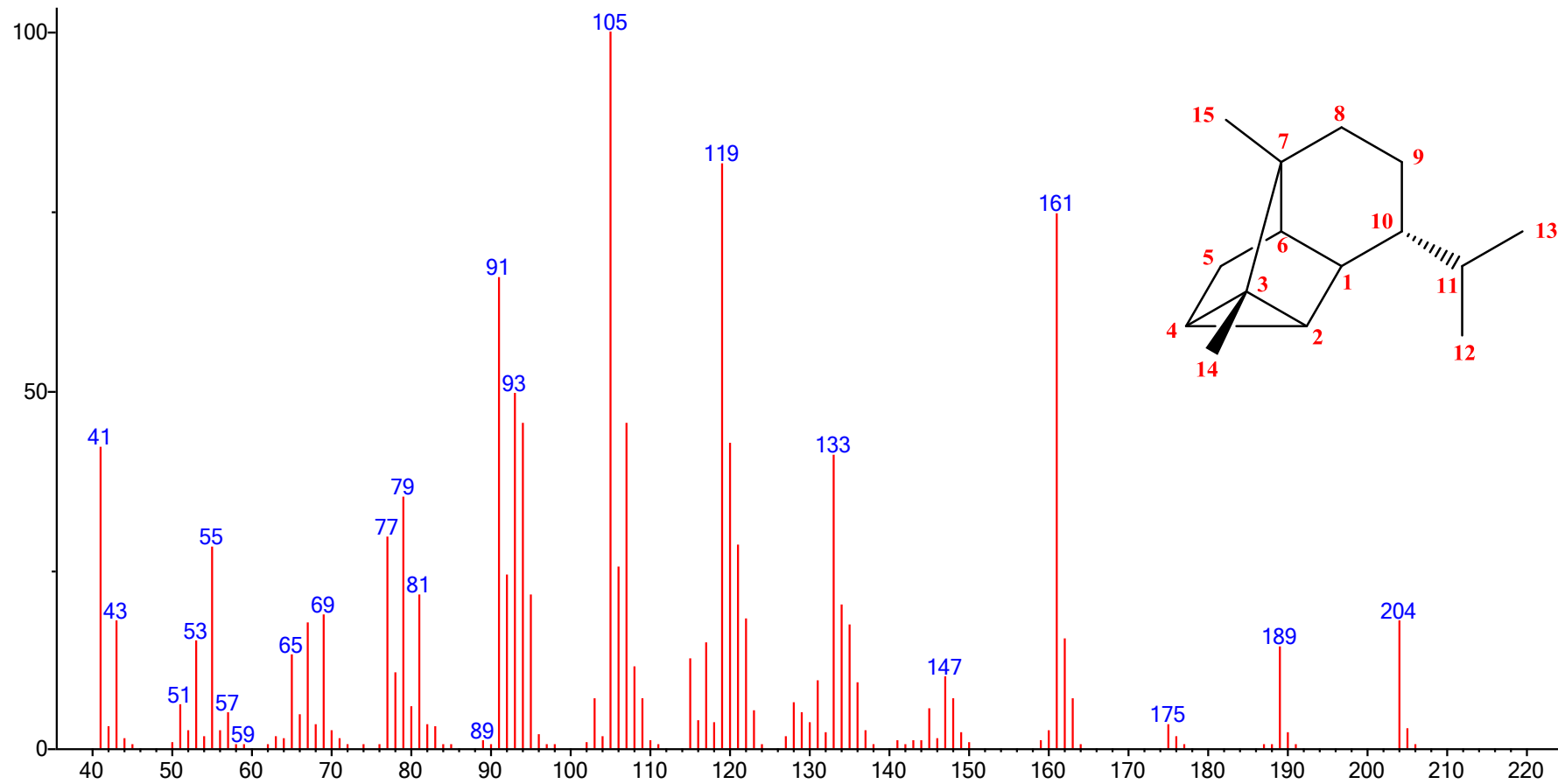




### Annexe 5 : Données MS de la 1(10)-Aristolèn-2-one (A)

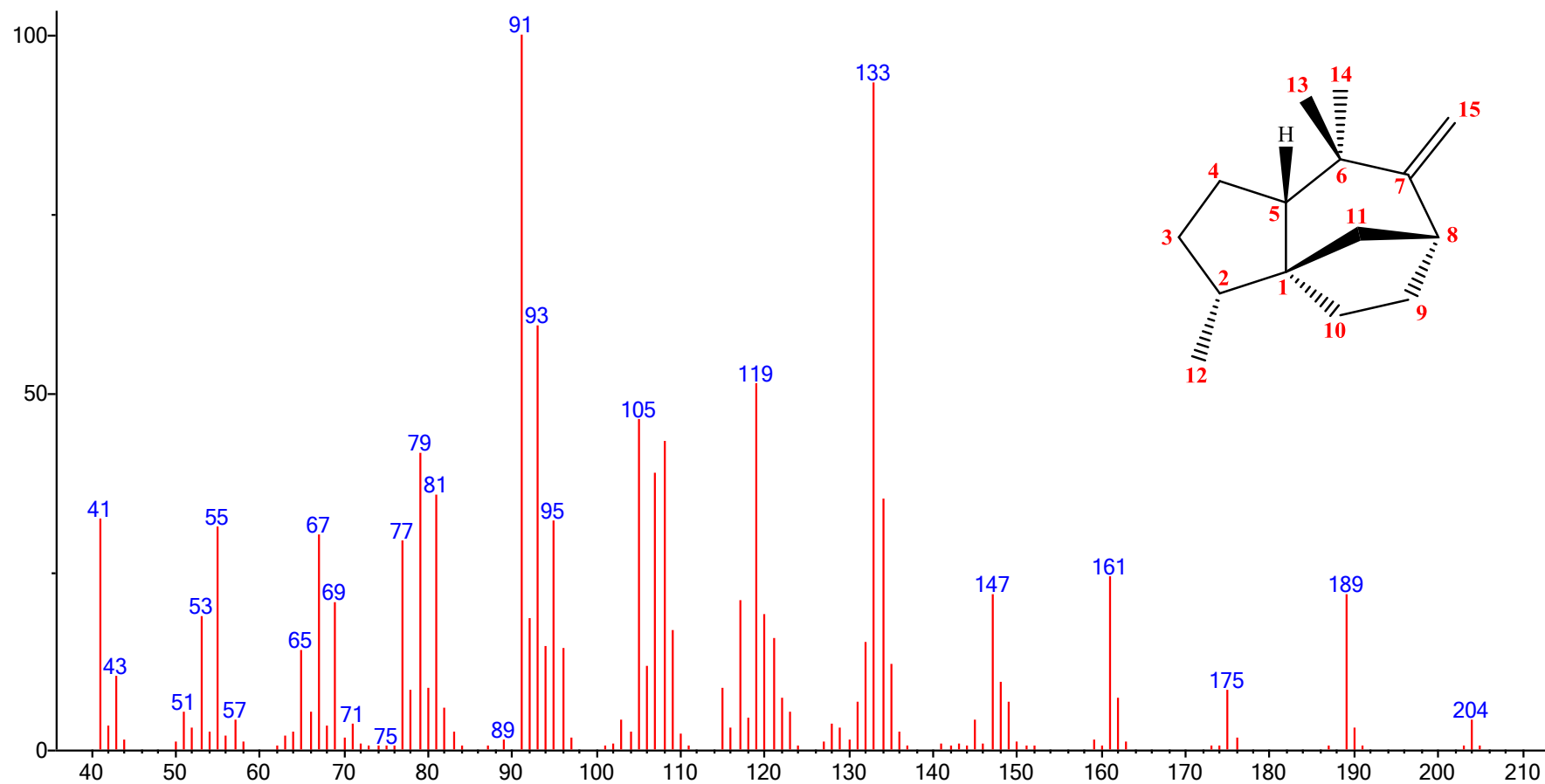


## Annexe 6 : Données MS du Cyclocopacamphène (D)



EI-MS 70 eV MS Spectrum

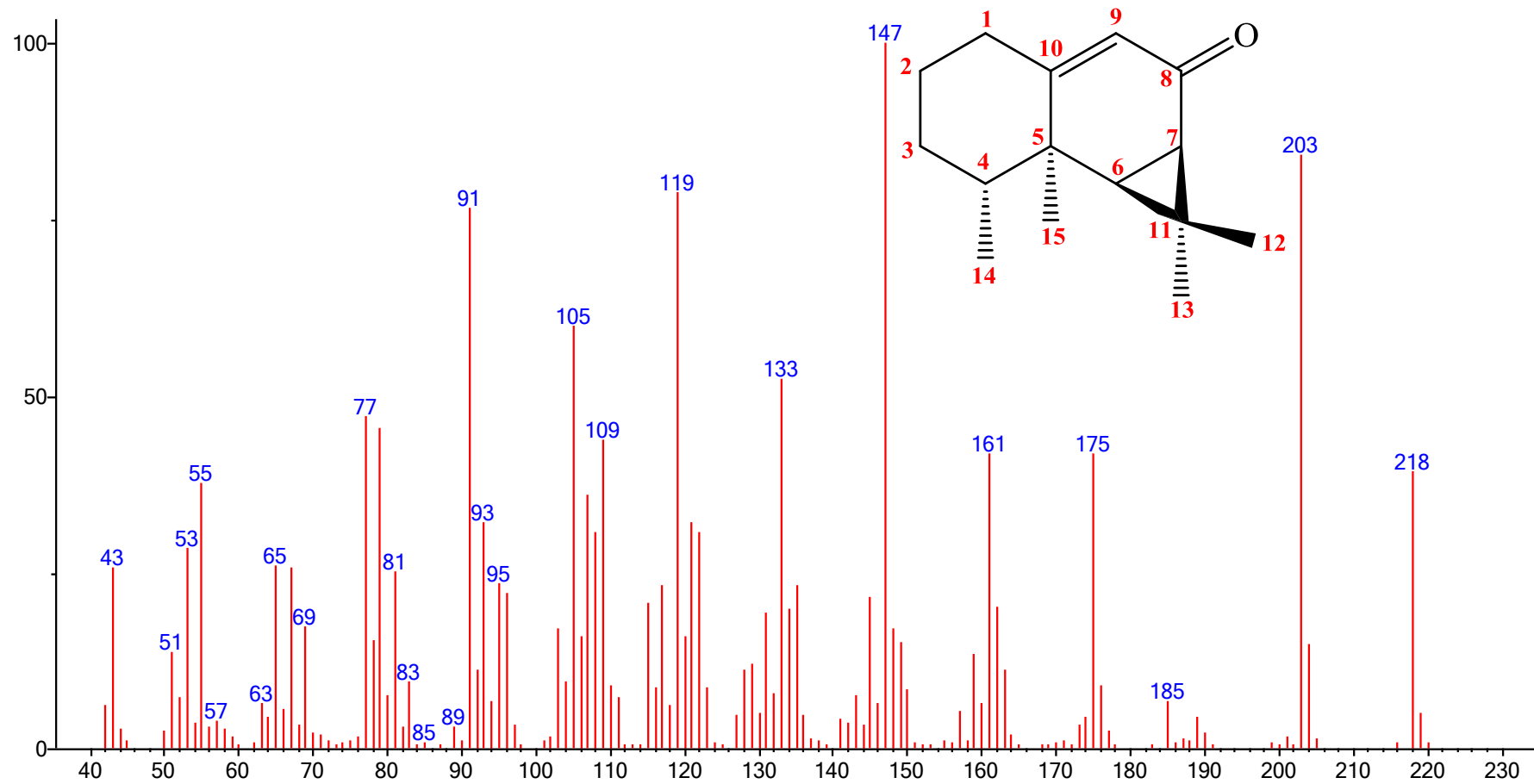
### Annexe 7 : Données MS du 2-épi-Prézizaène (E)



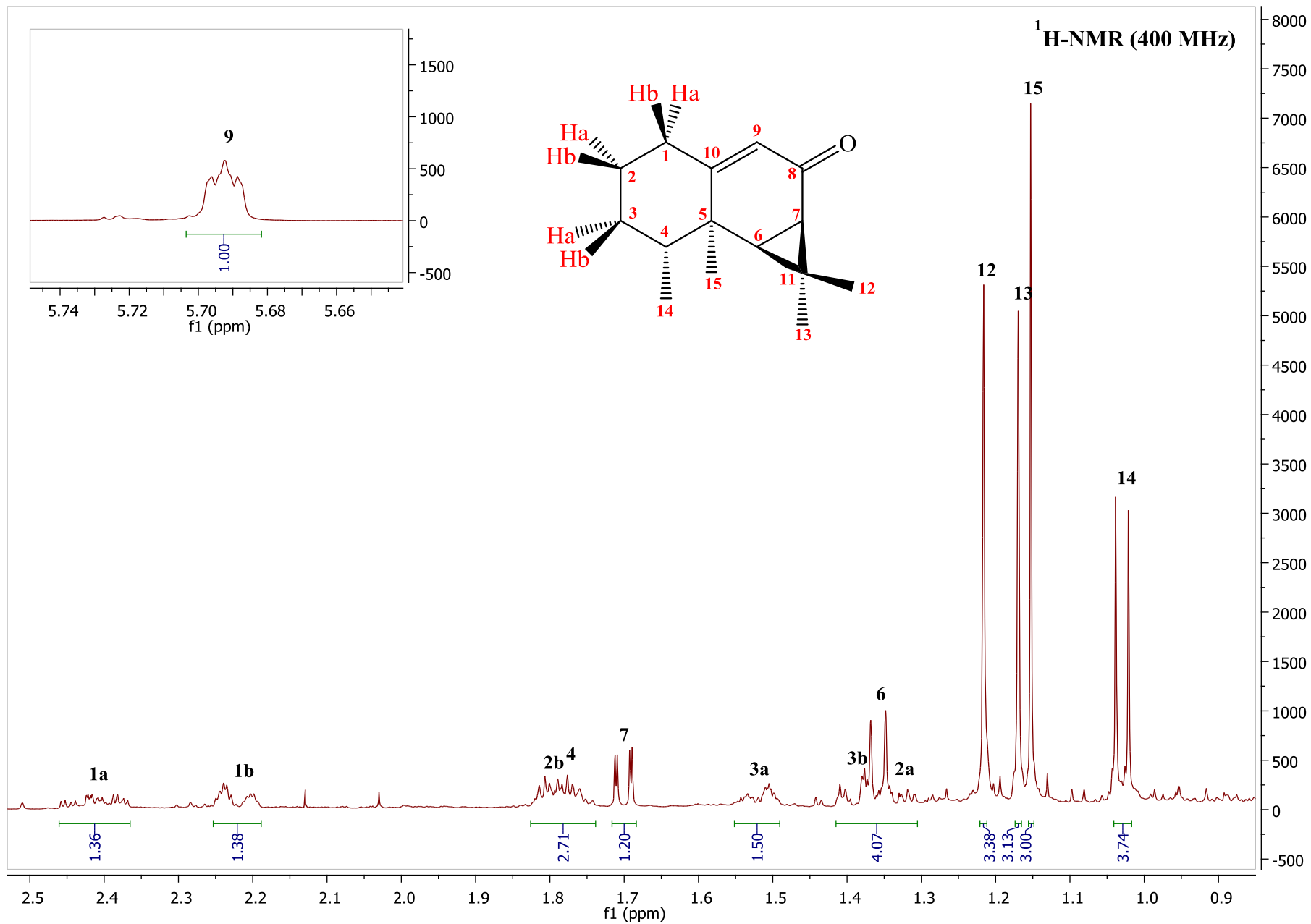
EI-MS 70 eV MS Spectrum

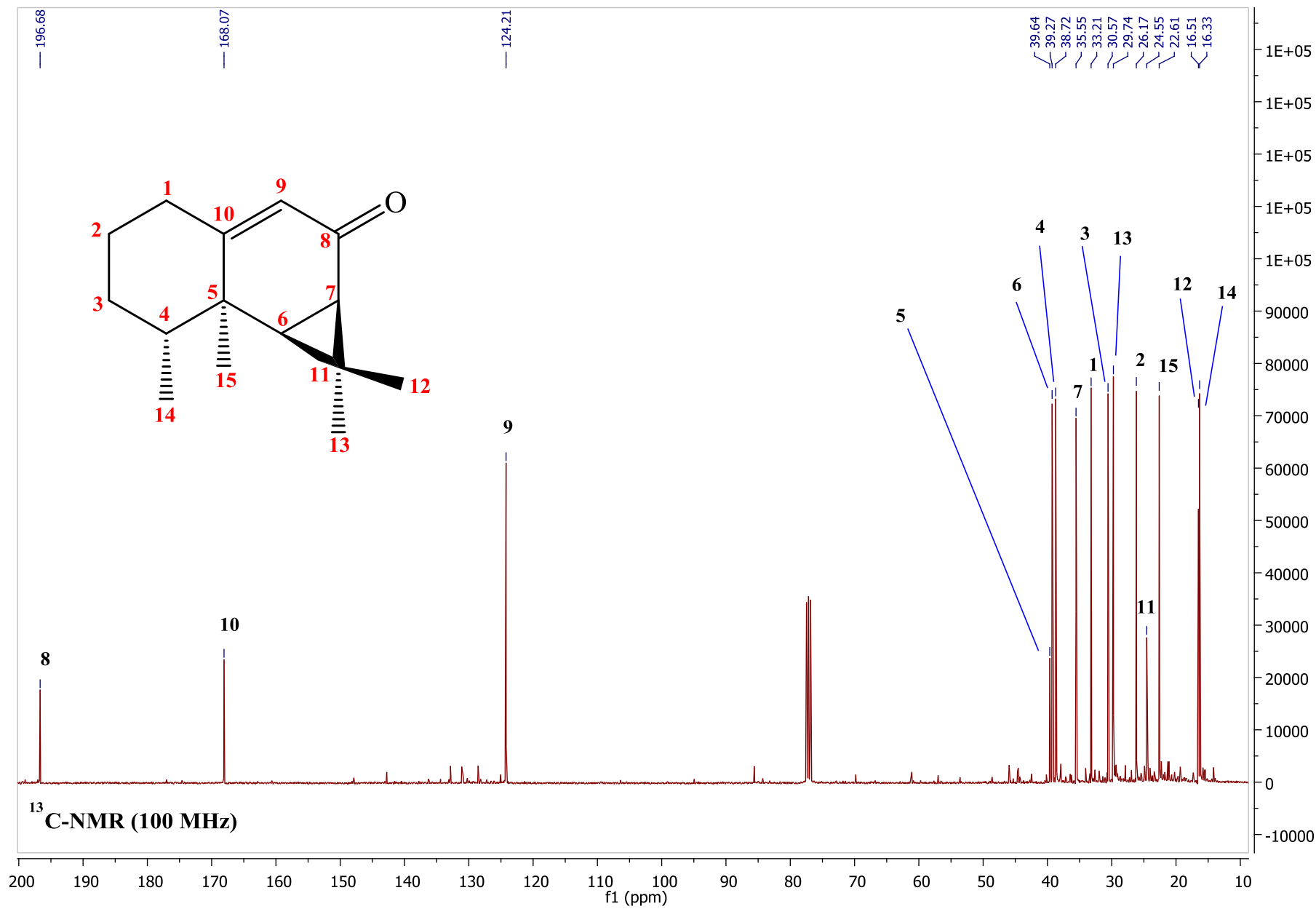


## Annexe 8 : Données MS et RMN 1D de l'Aristolone (B)

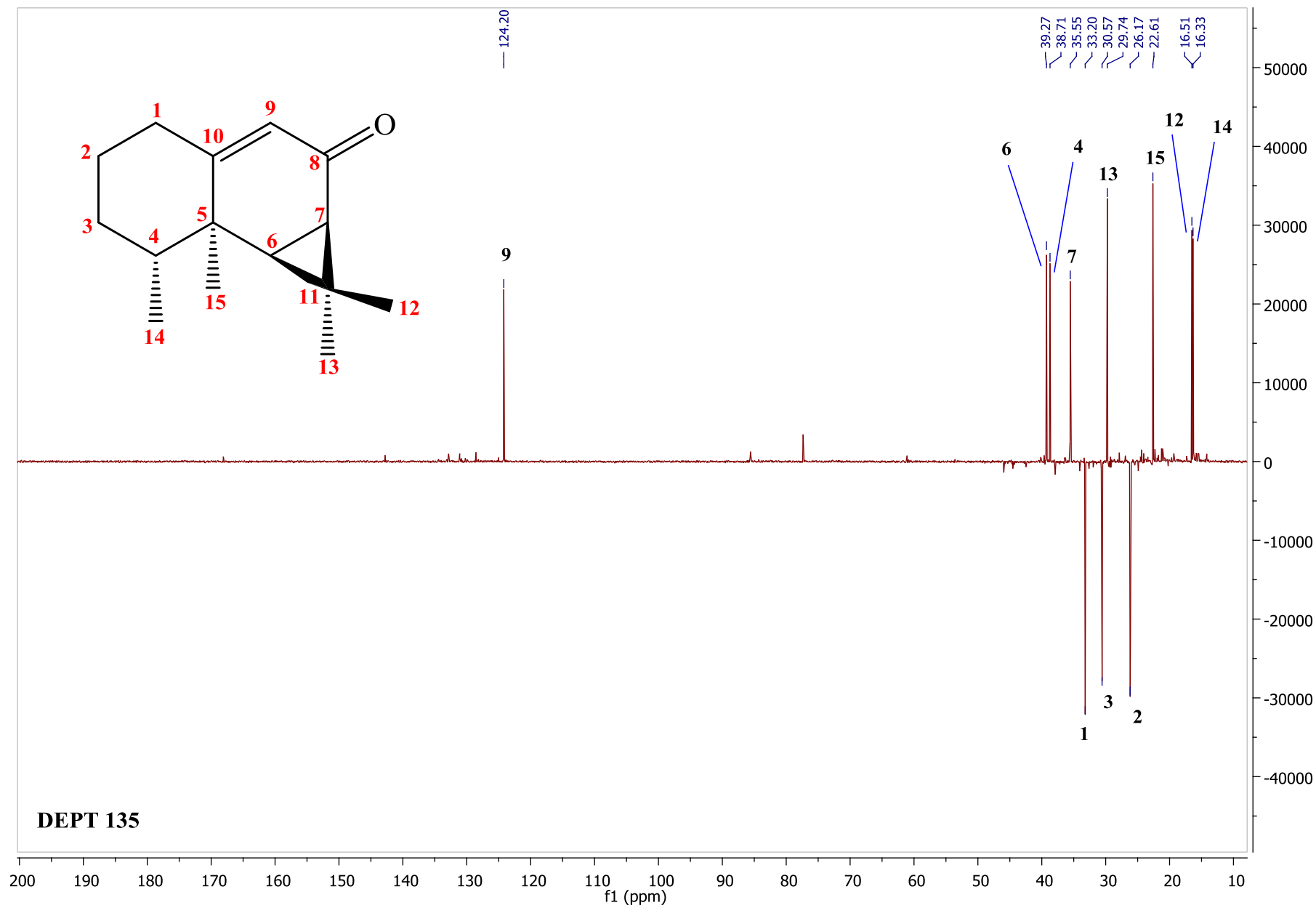


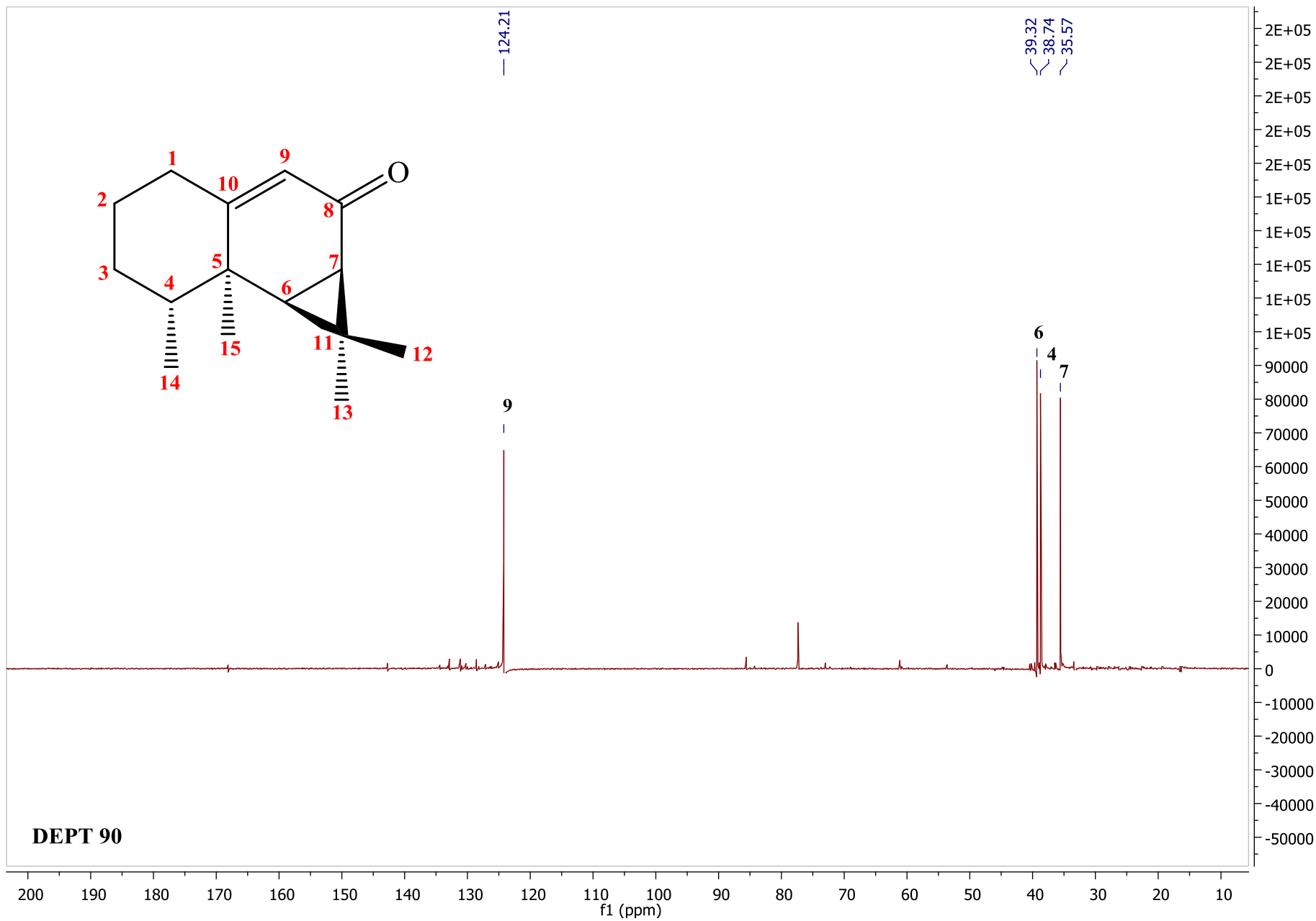
EI-MS 70 eV MS Spectrum





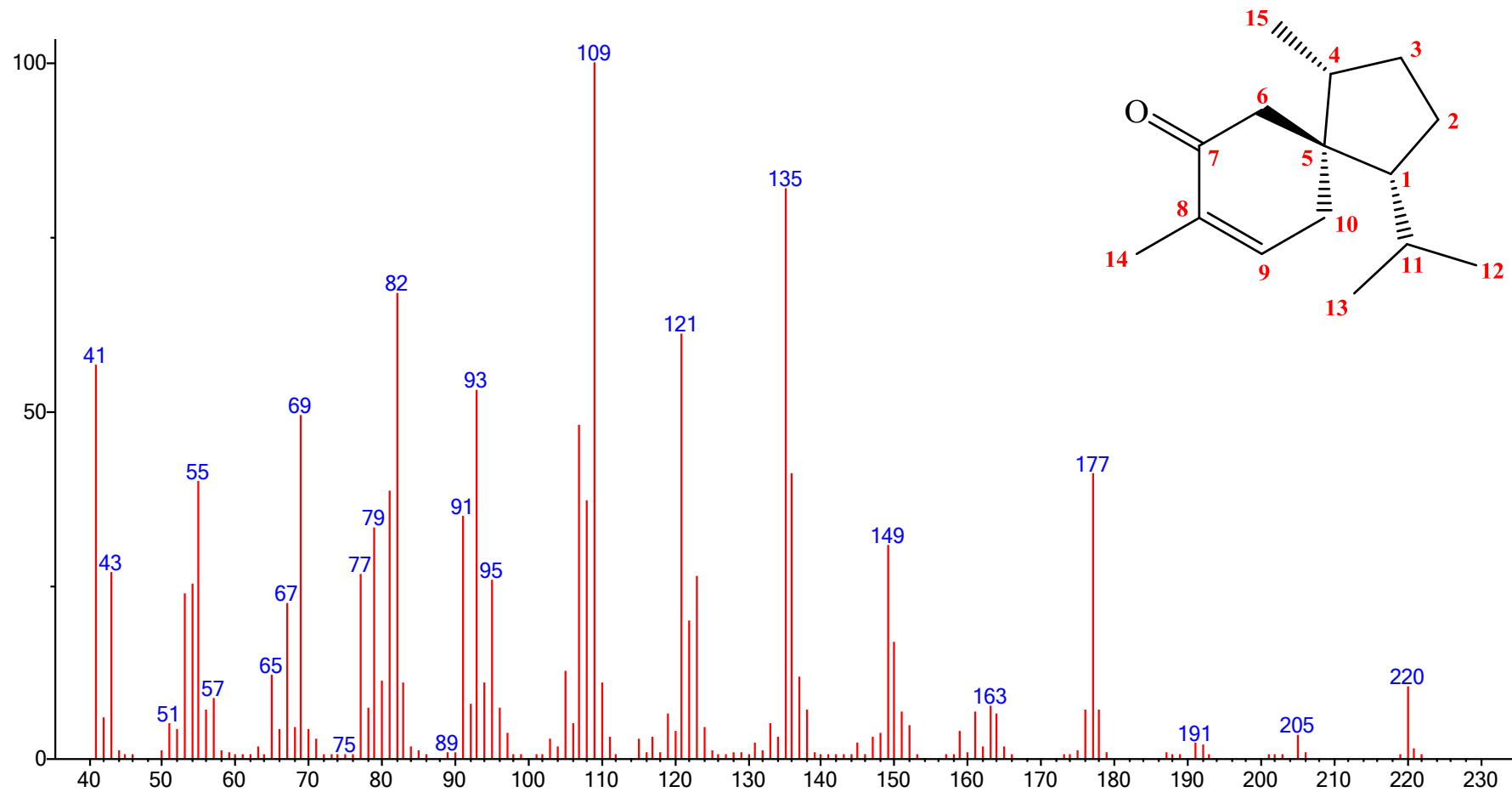




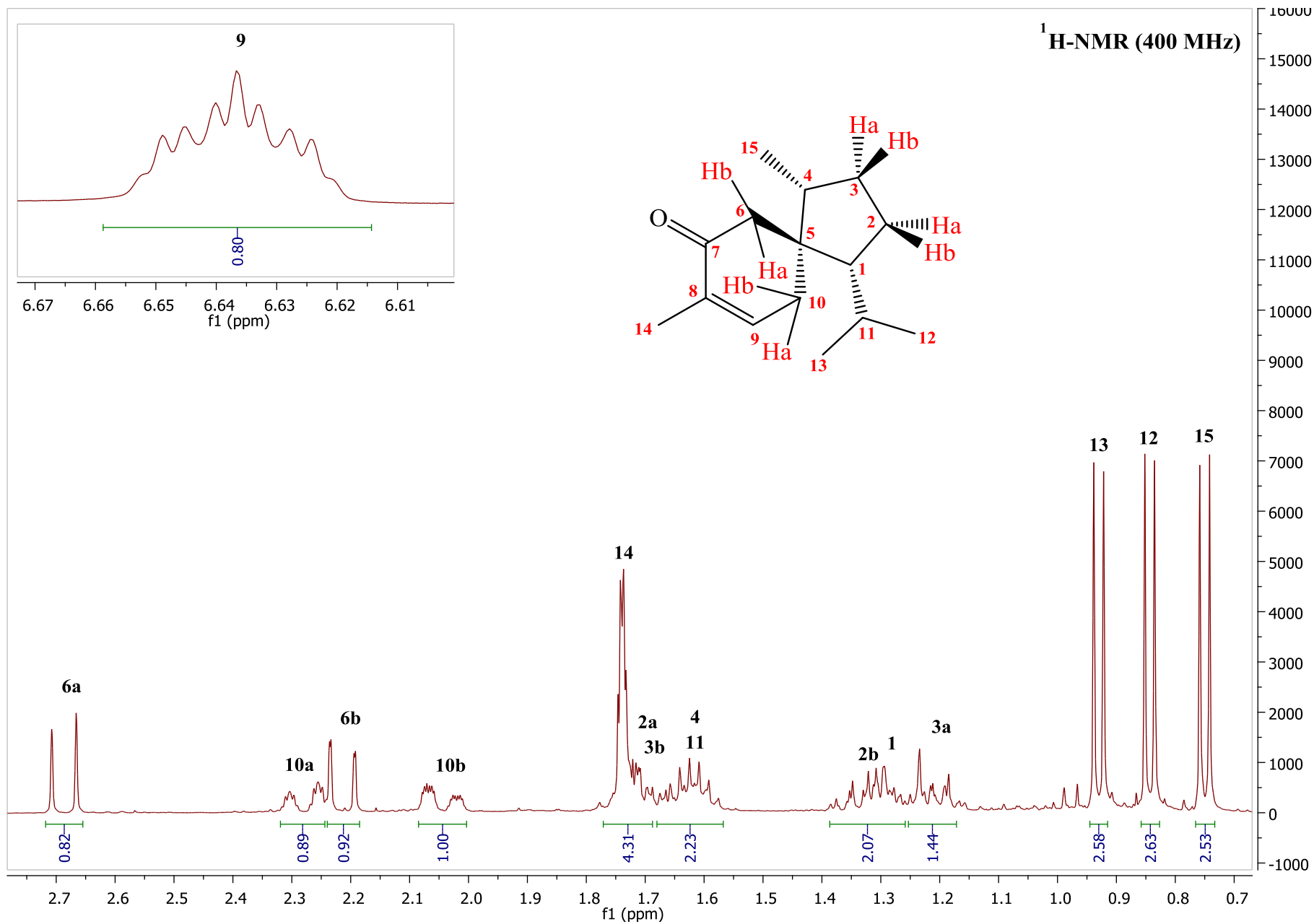


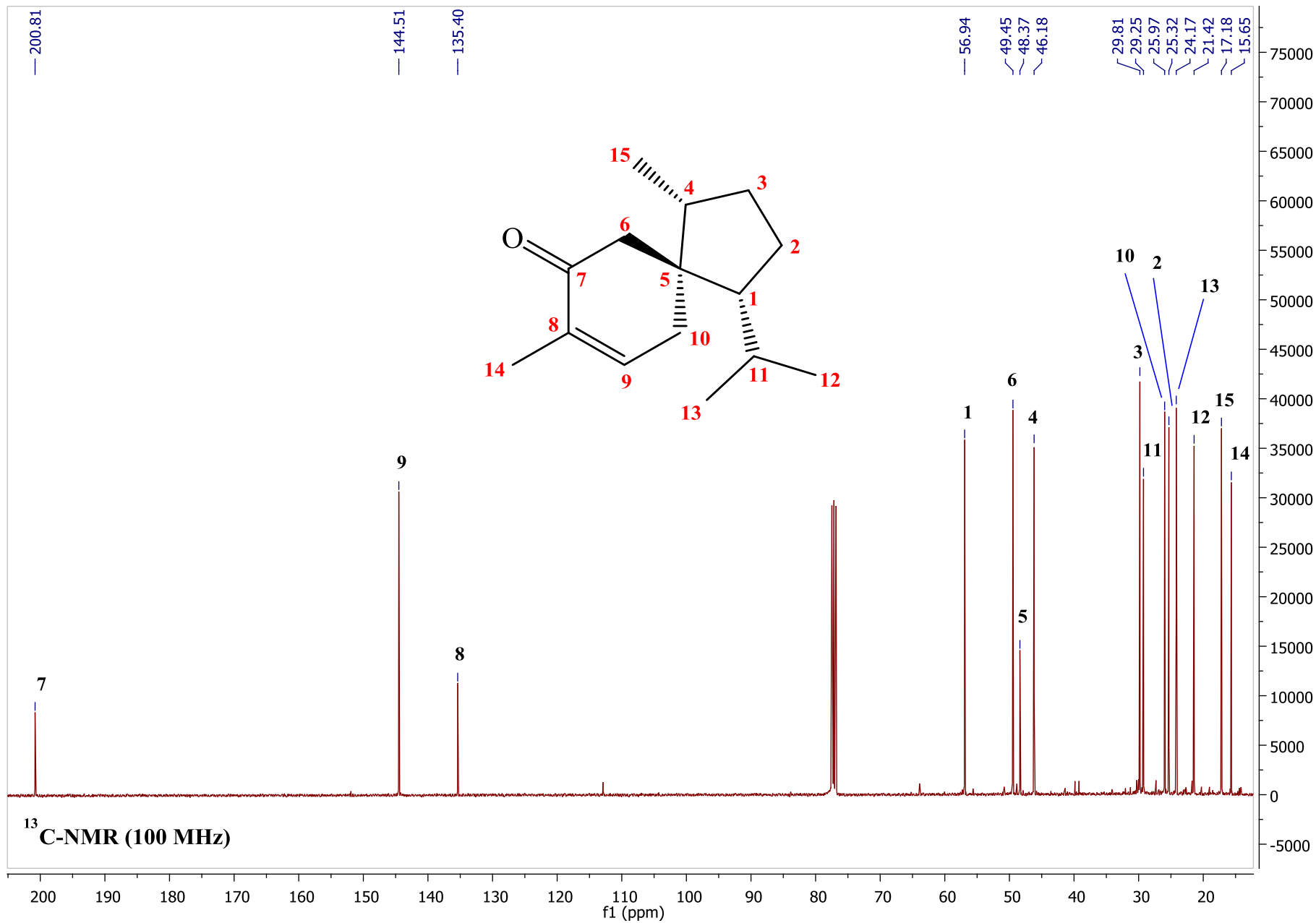


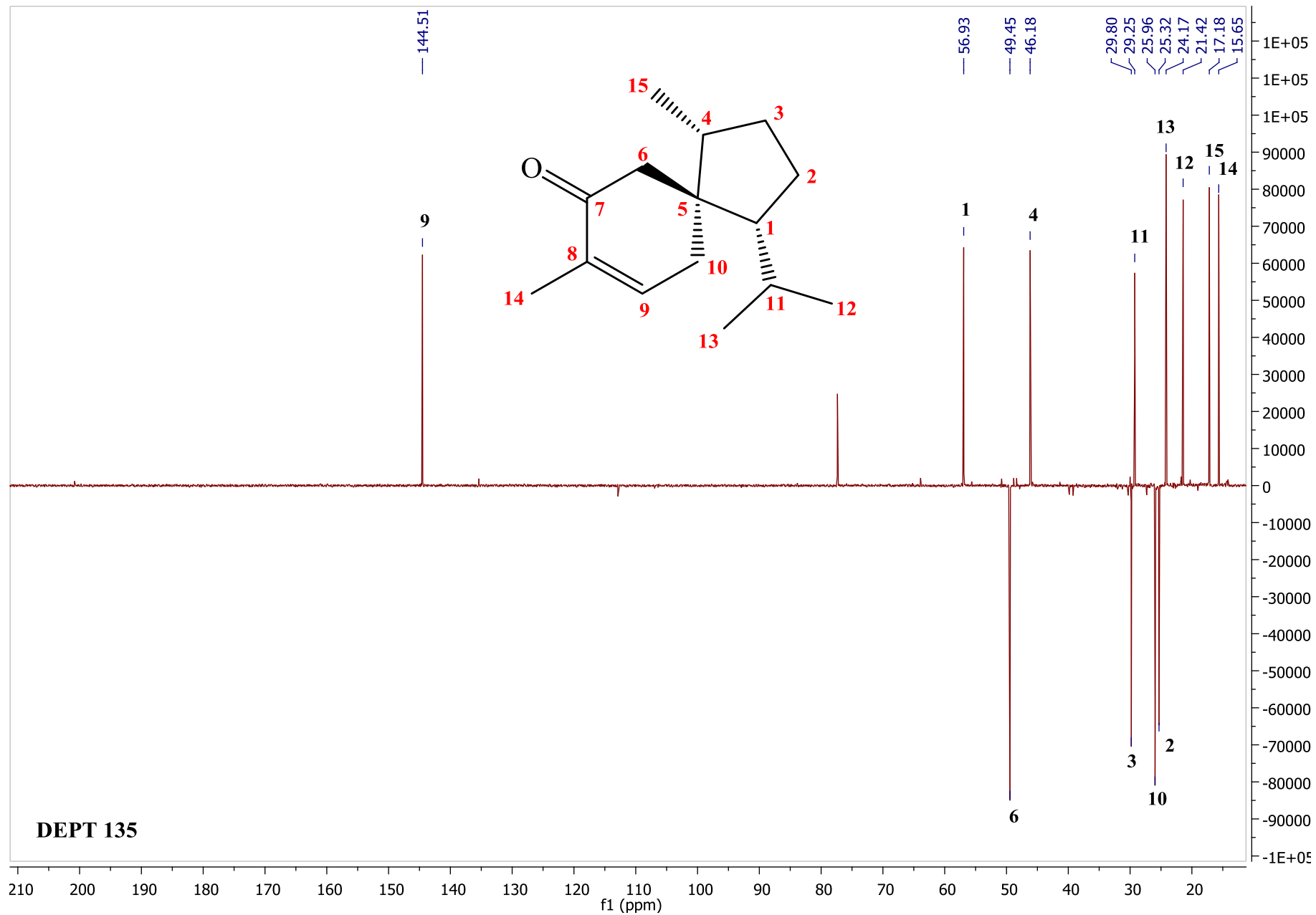
## Annexe 9 : Données MS et RMN 1D de l'Acorenone B (C)

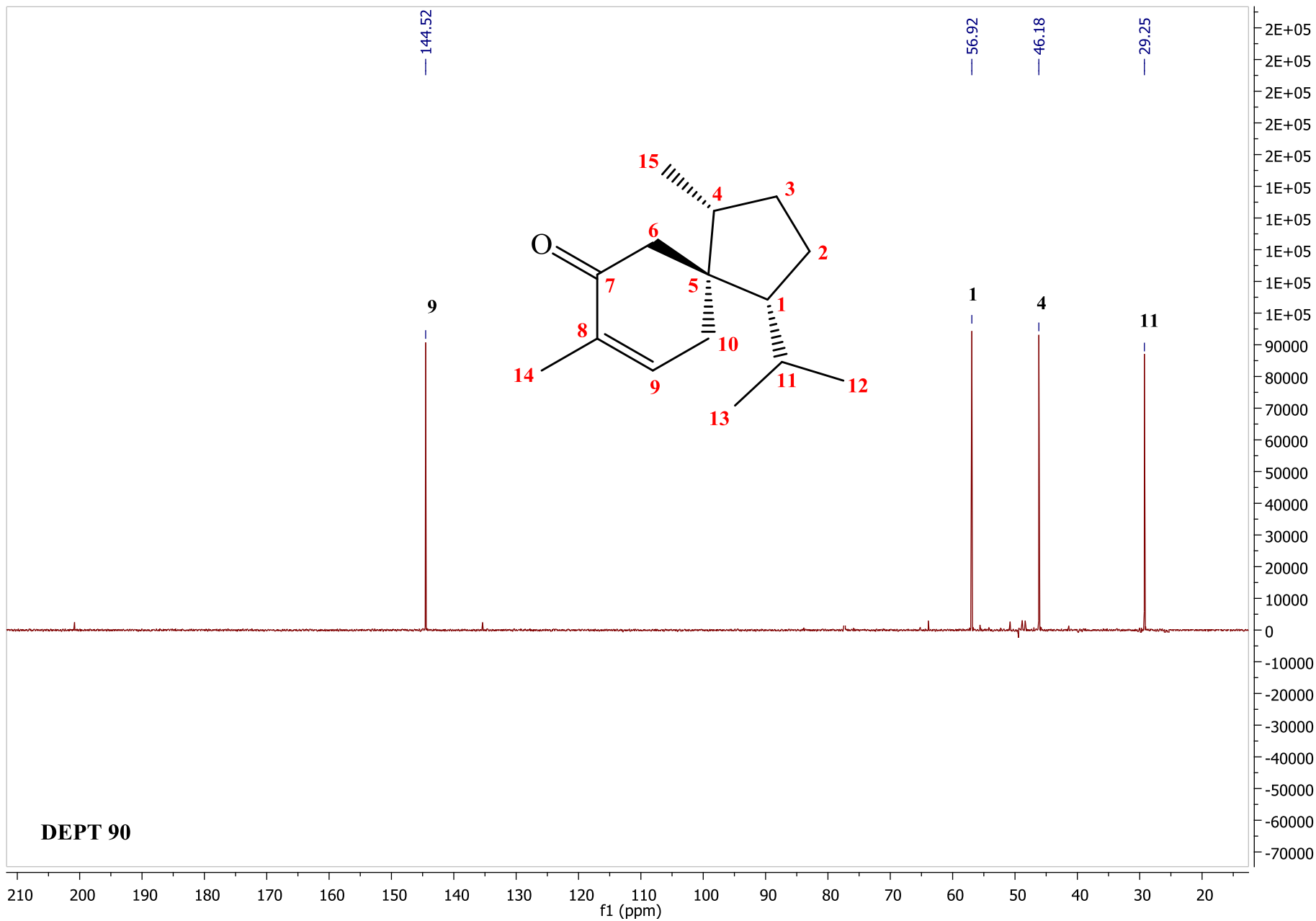


EI-MS 70 eV MS Spectrum





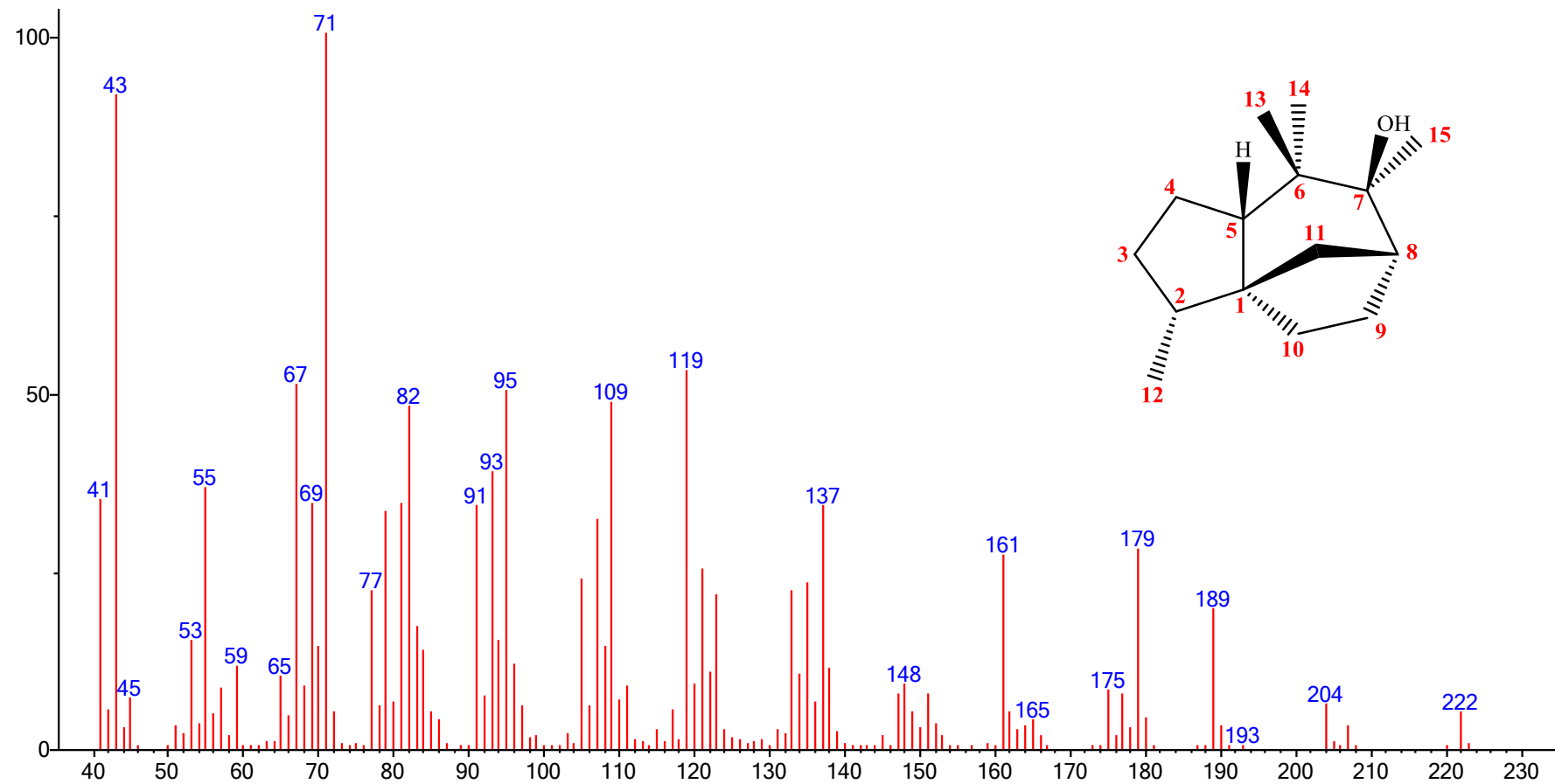




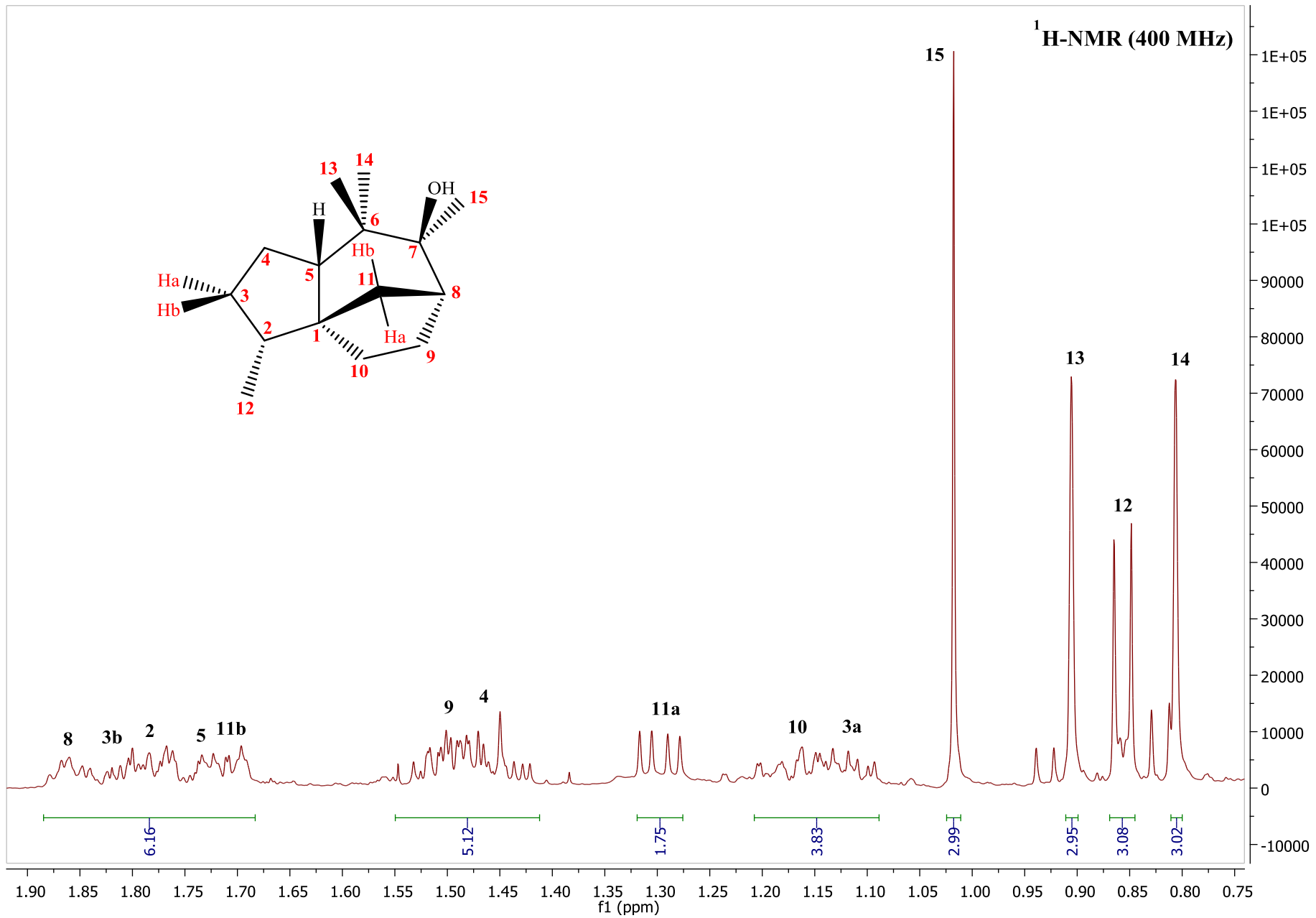


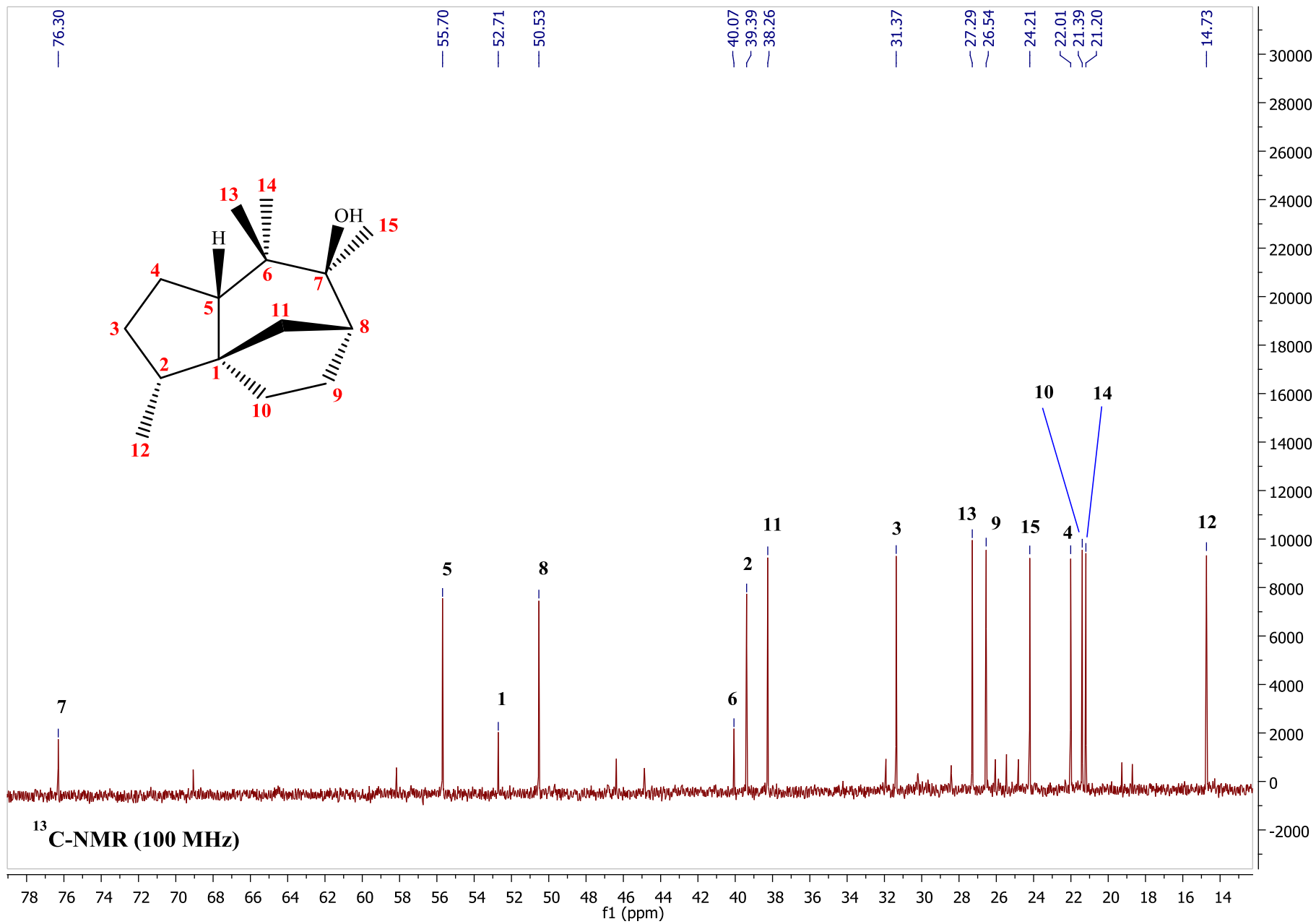


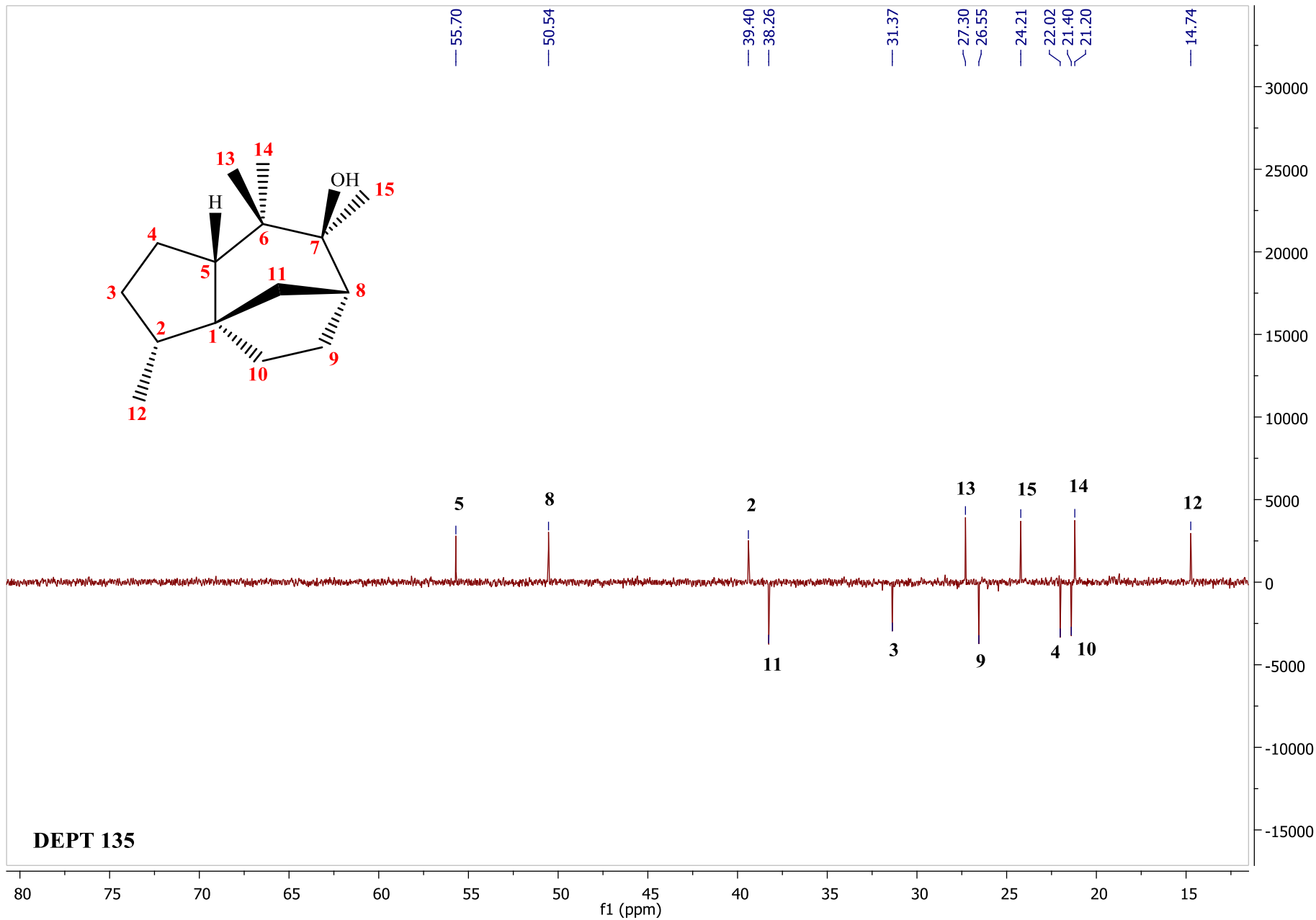
## Annexe 10 : Données MS et RMN 1D du 2-épi-Prézizaan-7-ol (F)

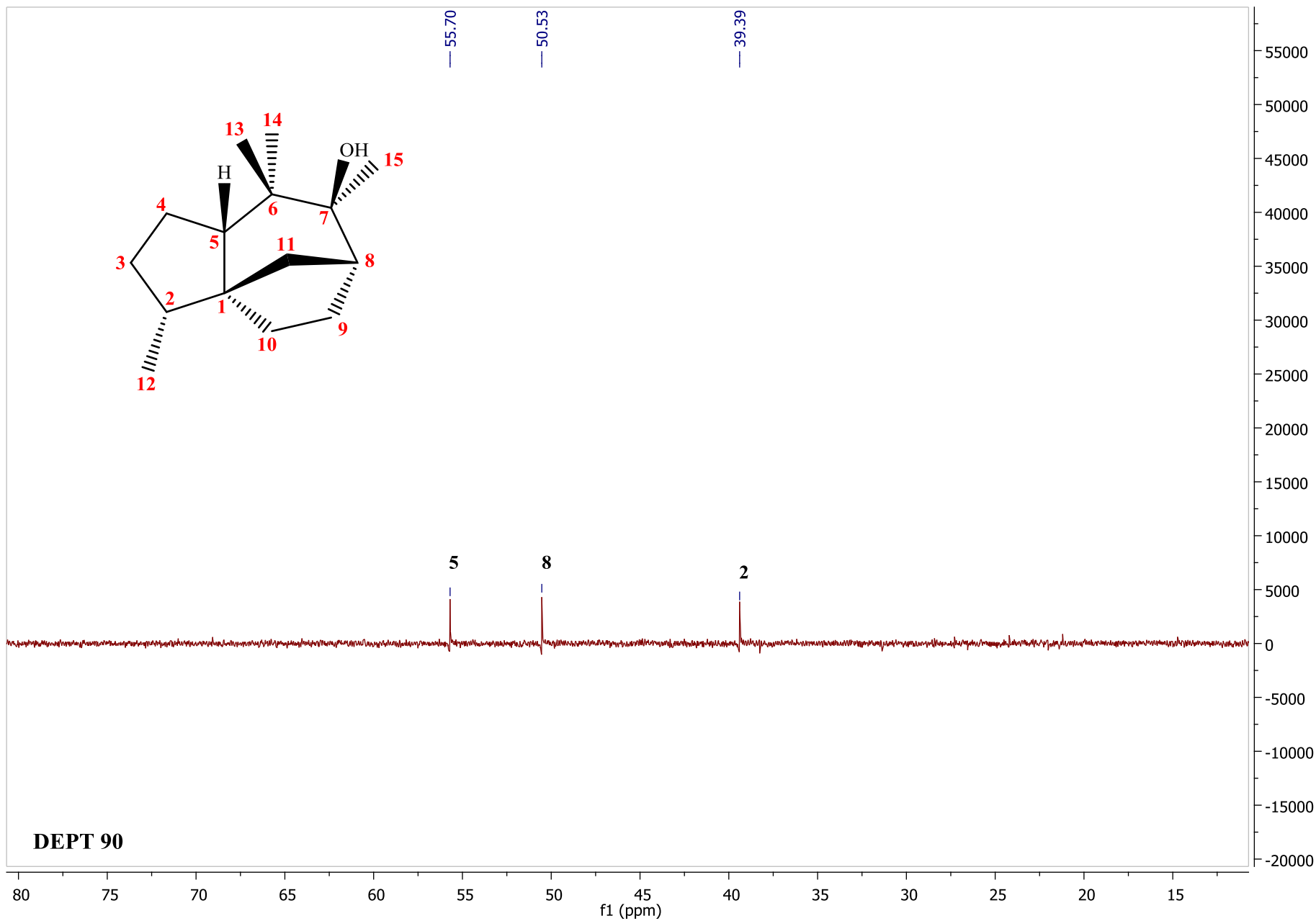


EI-MS 70 eV MS Spectrum



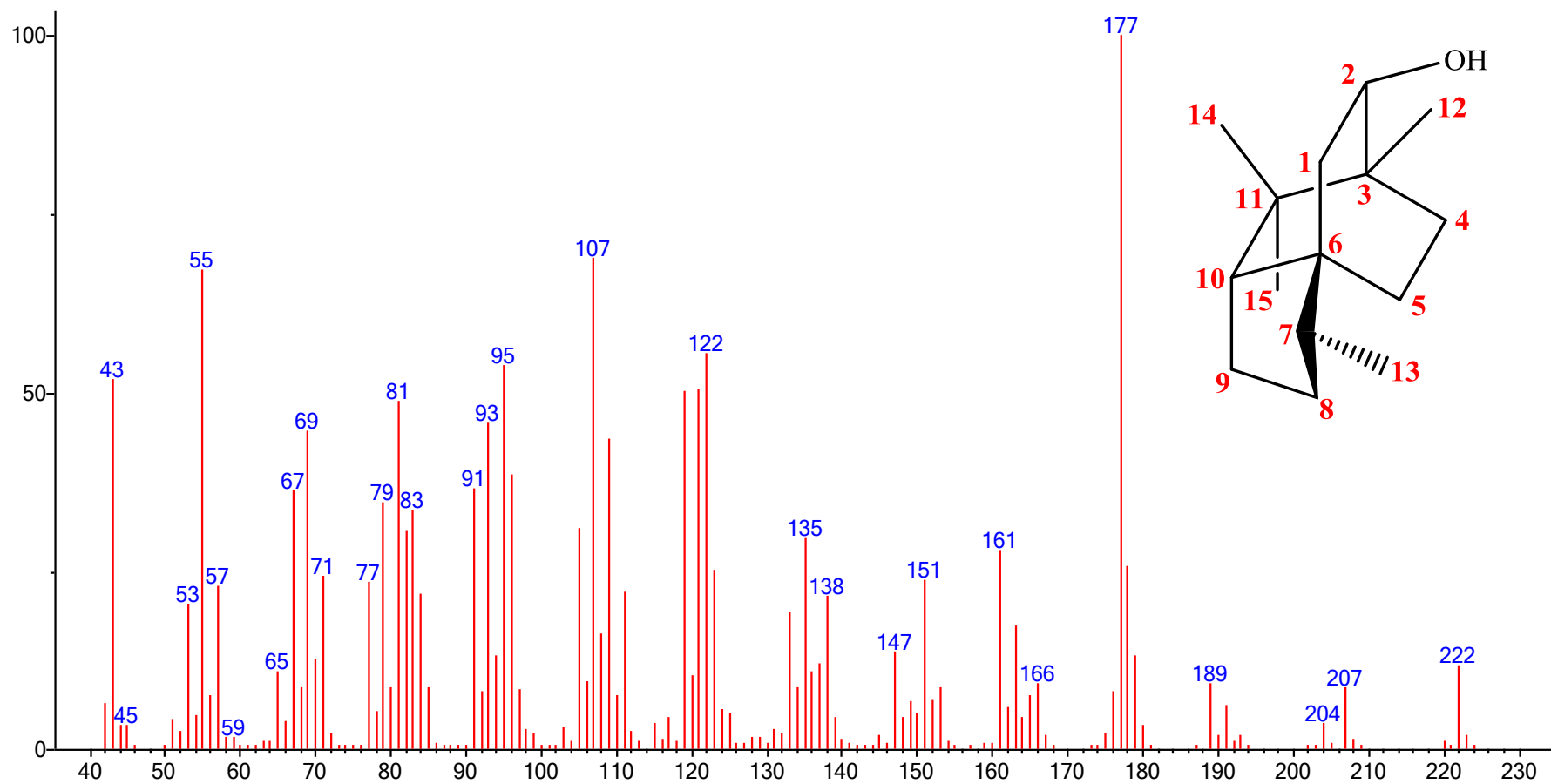






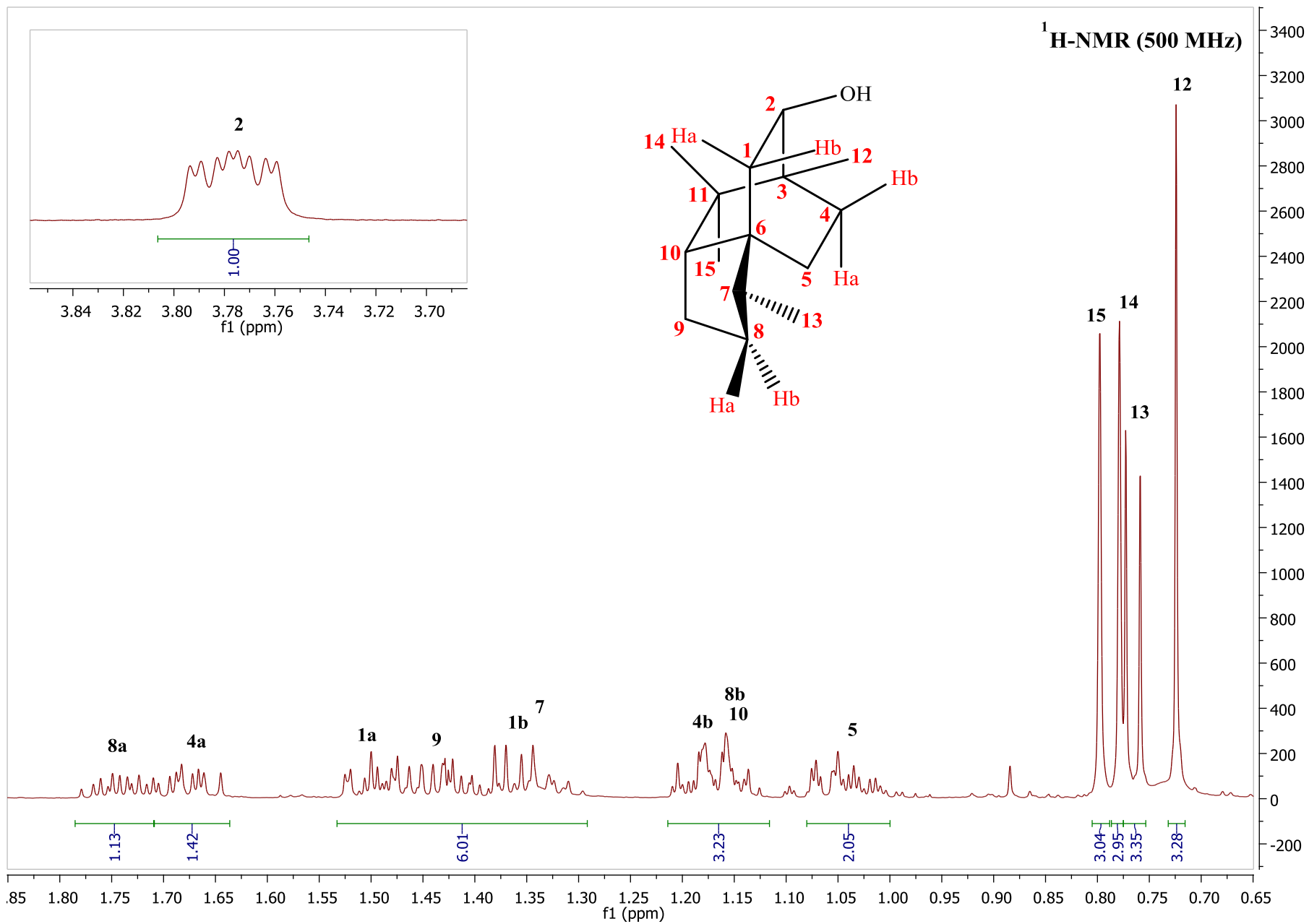


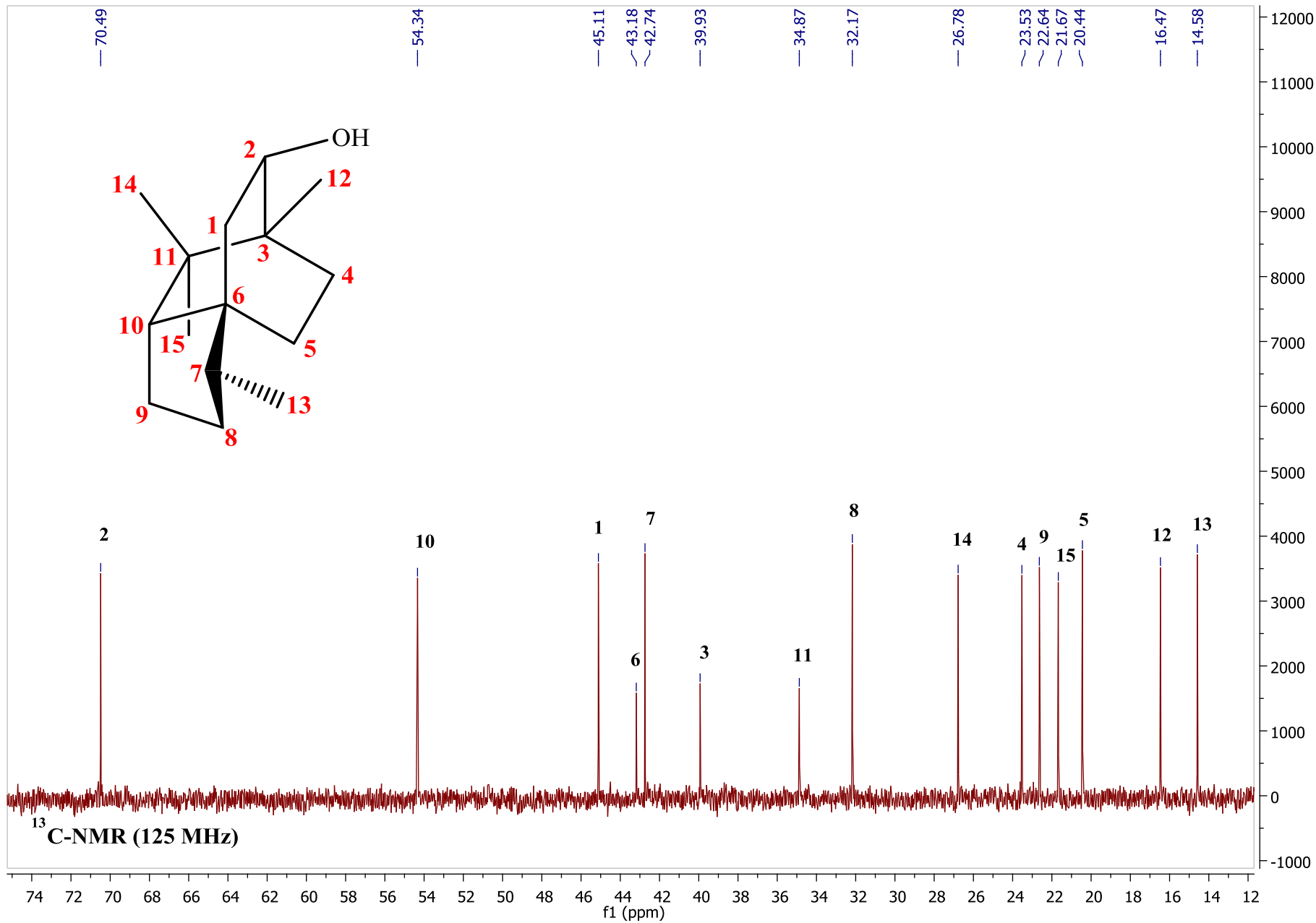
### Annexe 11 : Données MS et RMN 1D du 7-épi-Khusian-2-ol (G)

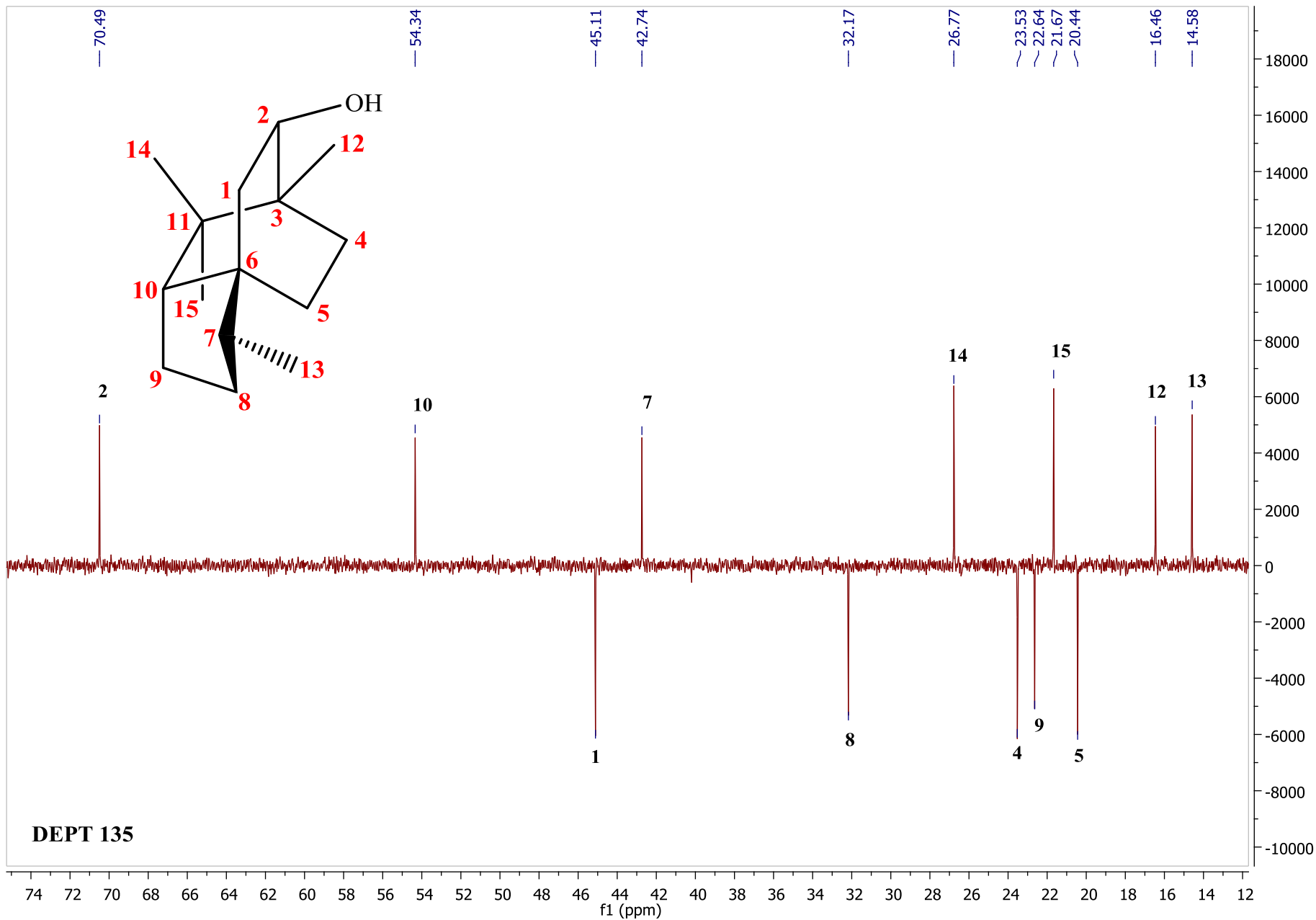


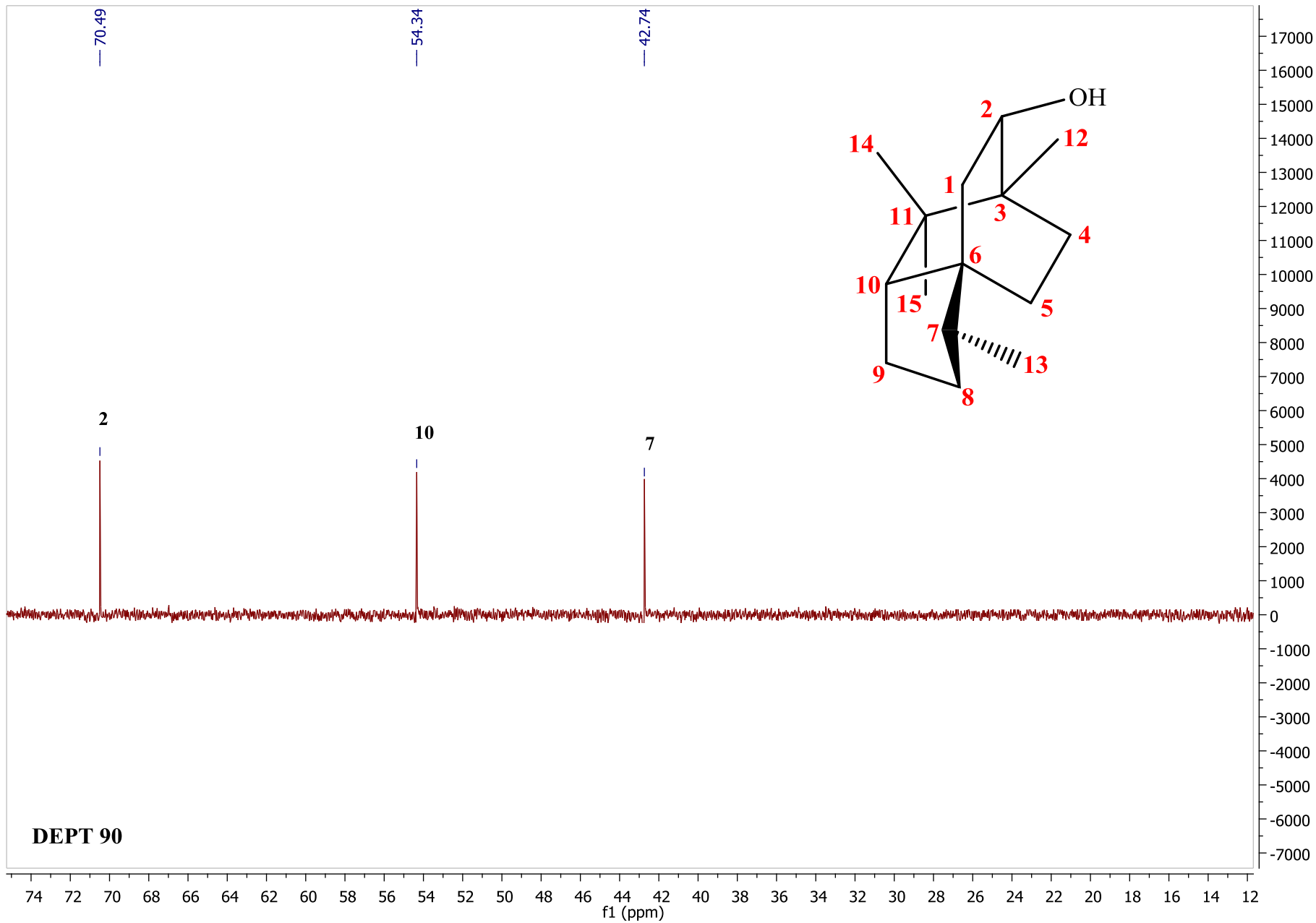
EI-MS 70 eV MS Spectrum





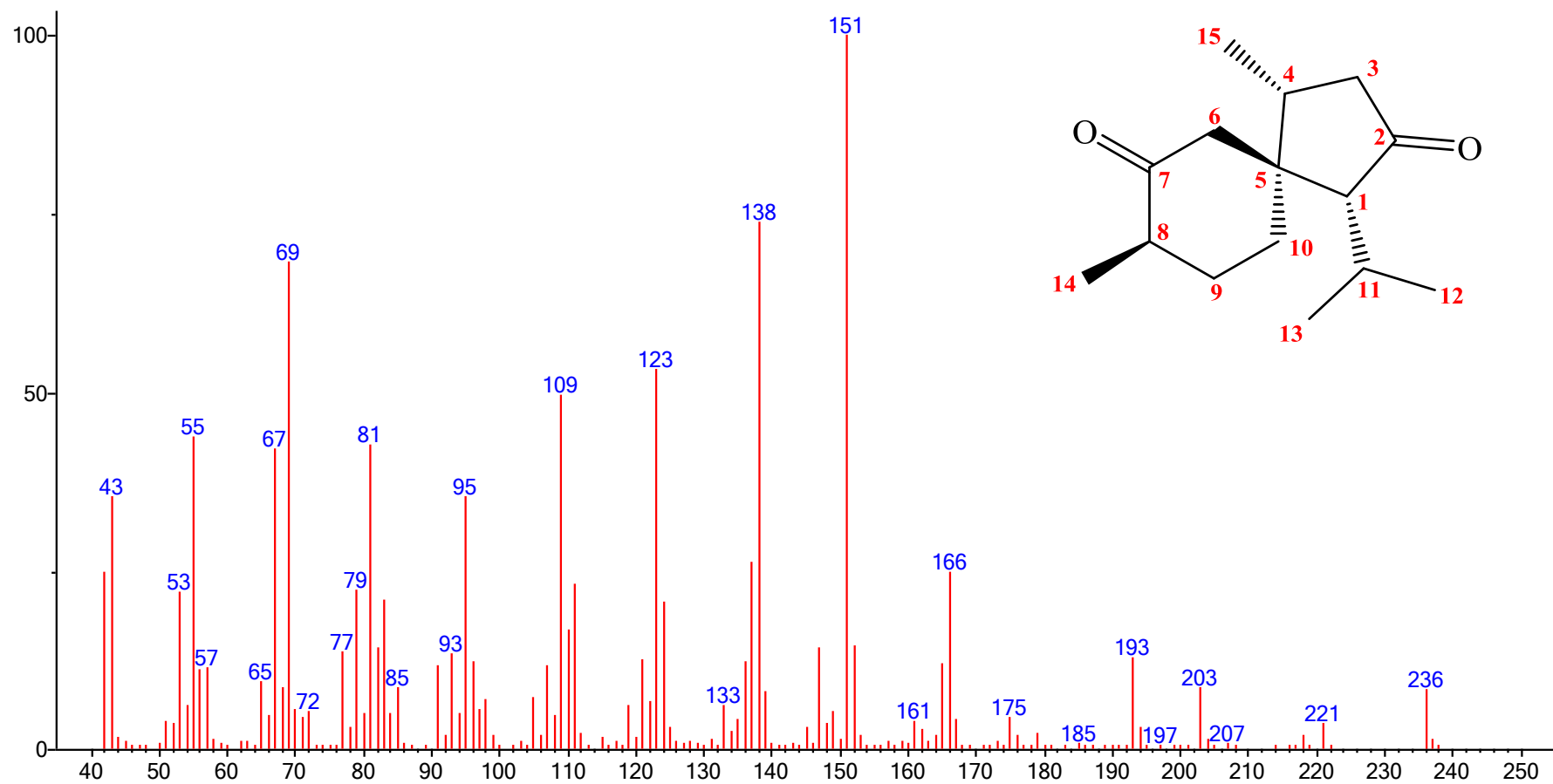




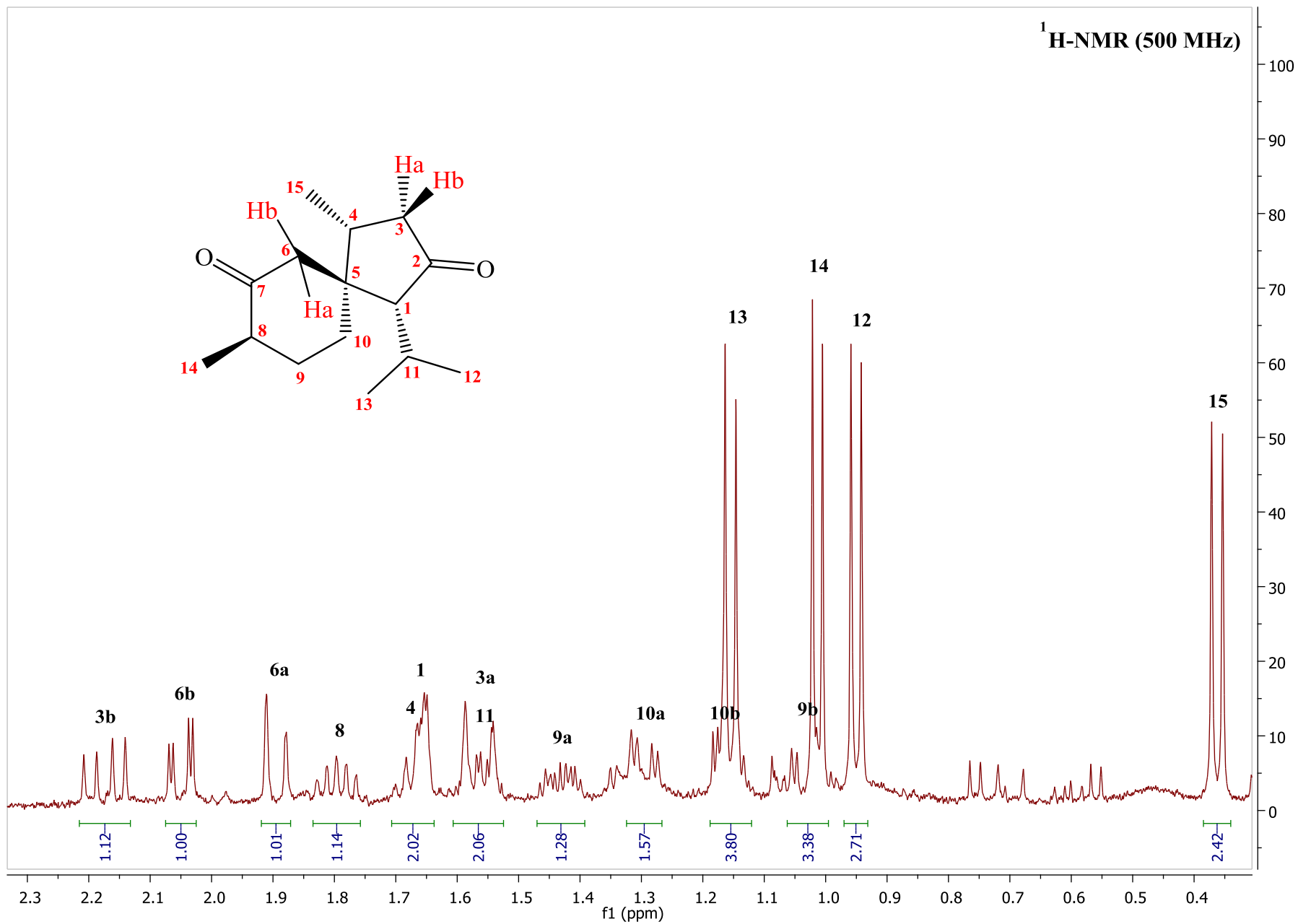


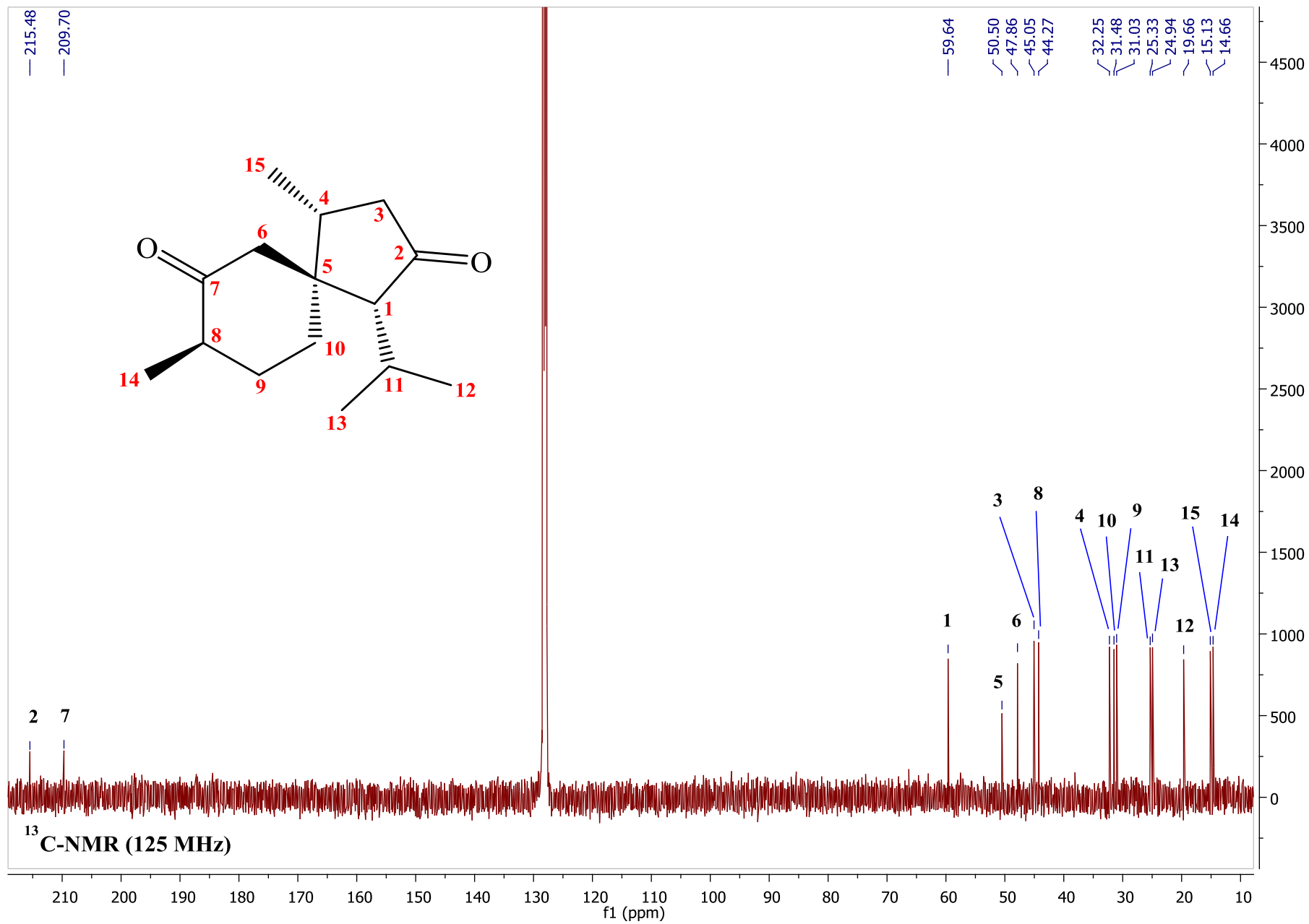


## Annexe 12 : Données MS et RMN 1D de la 4,8-di-épi-Acorone (H)

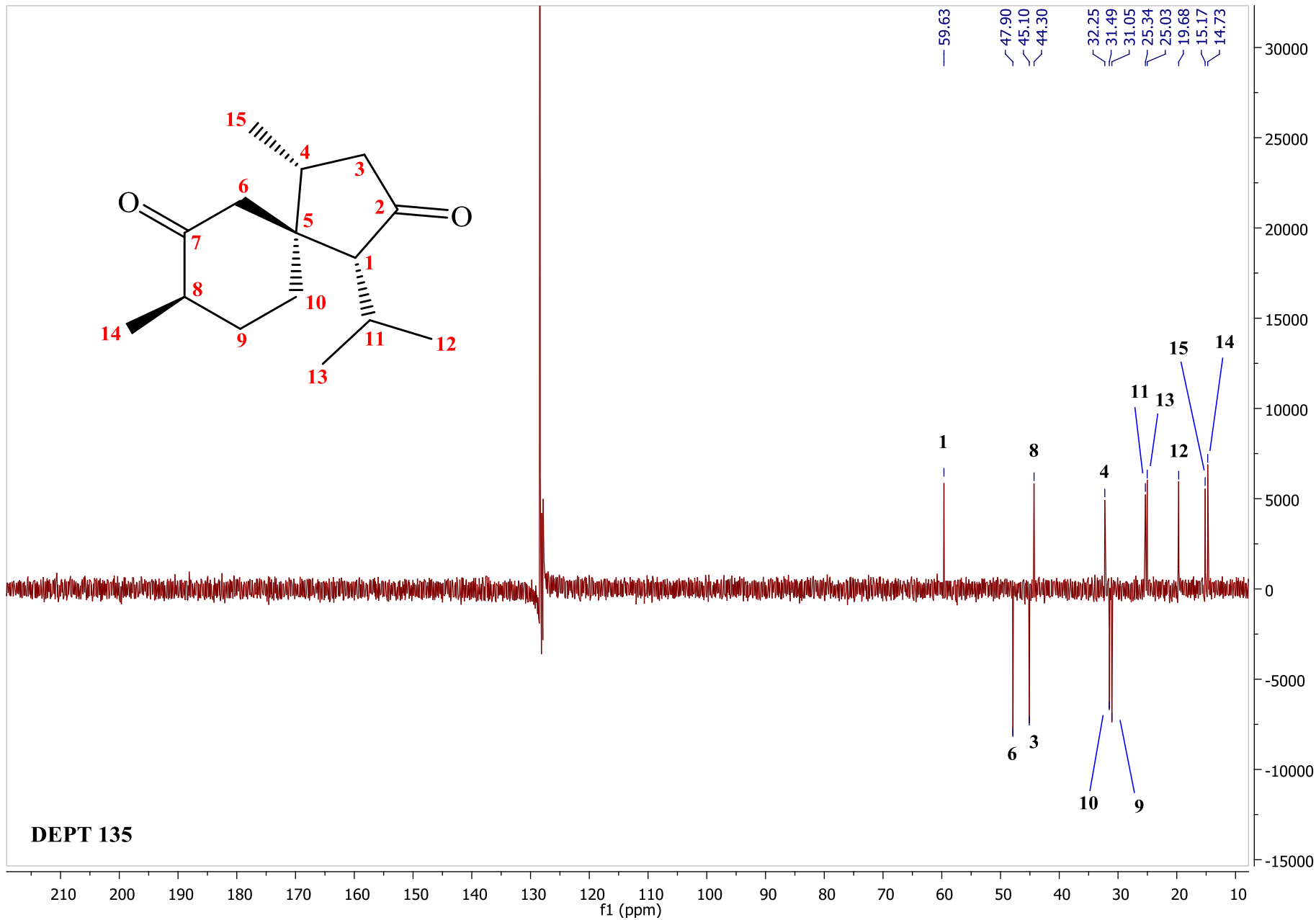


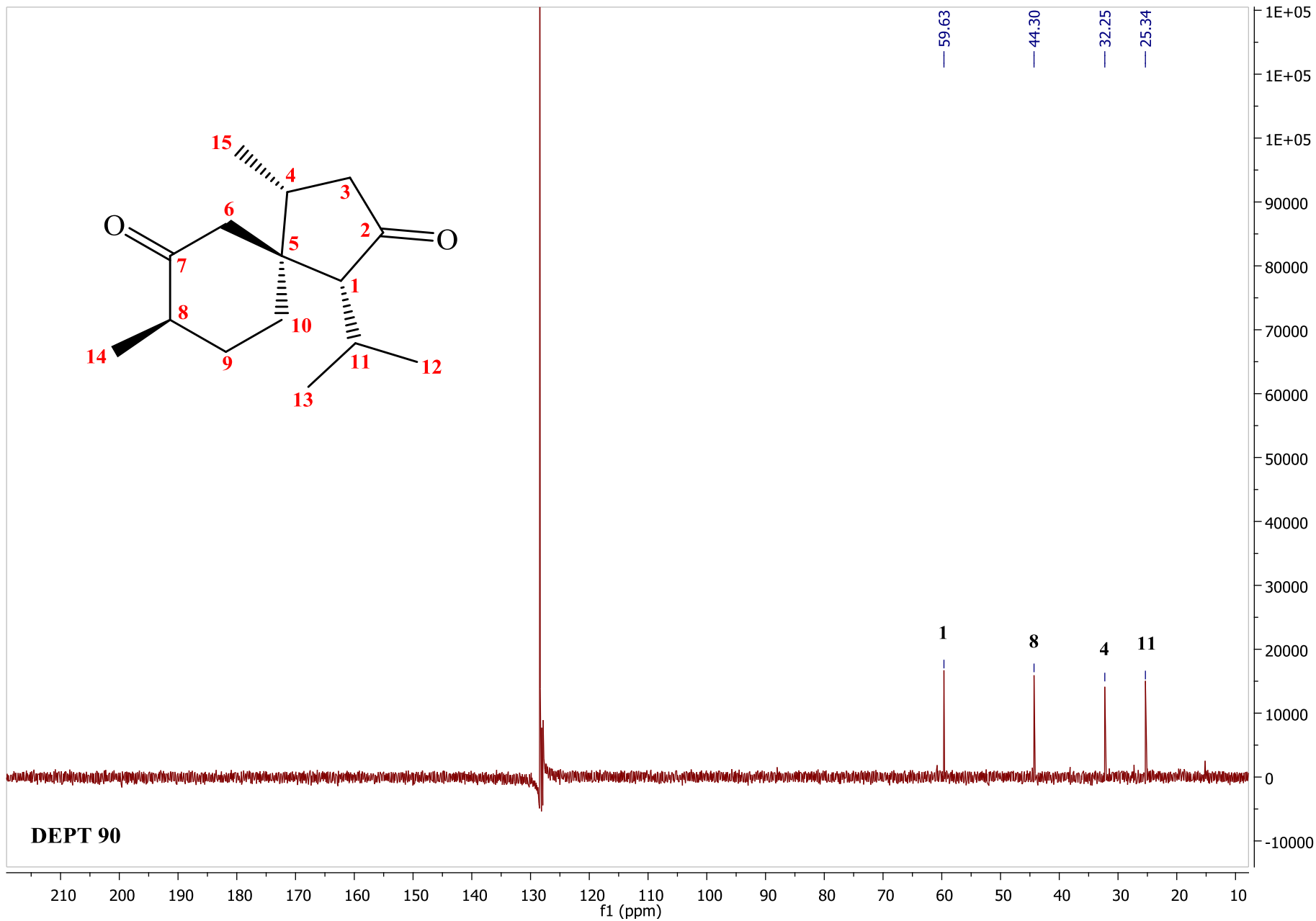
EI-MS 70 eV MS Spectrum





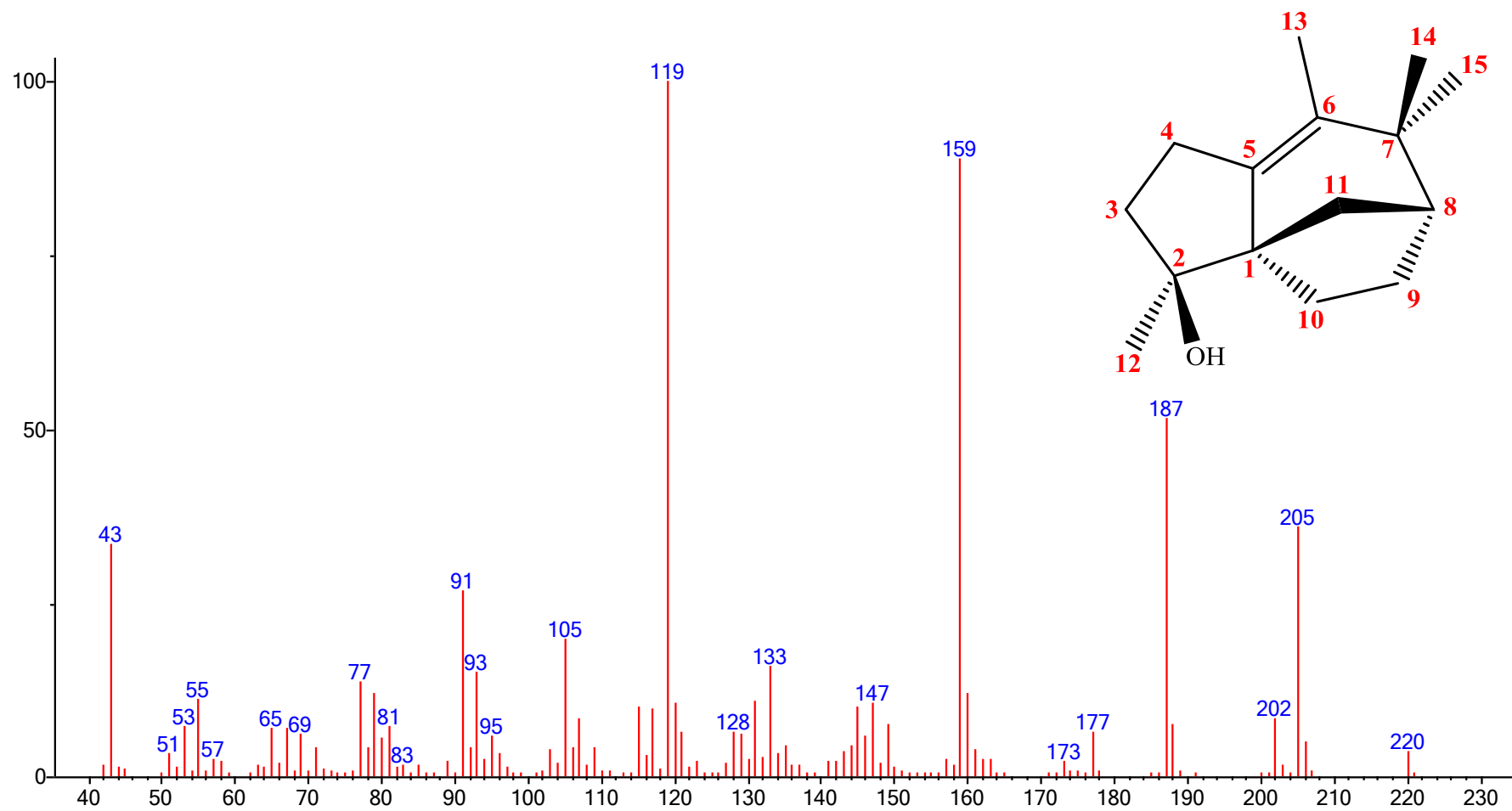




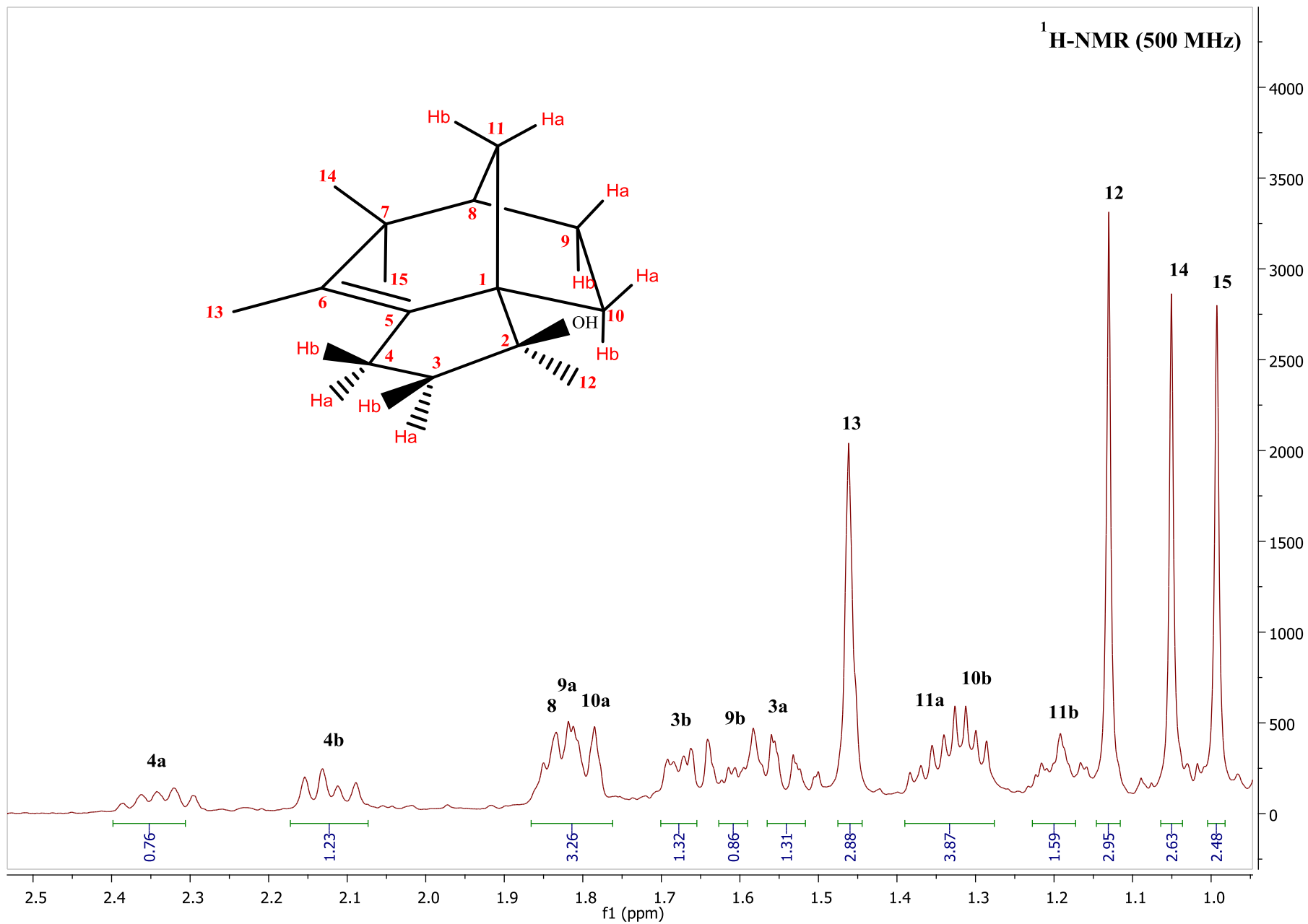


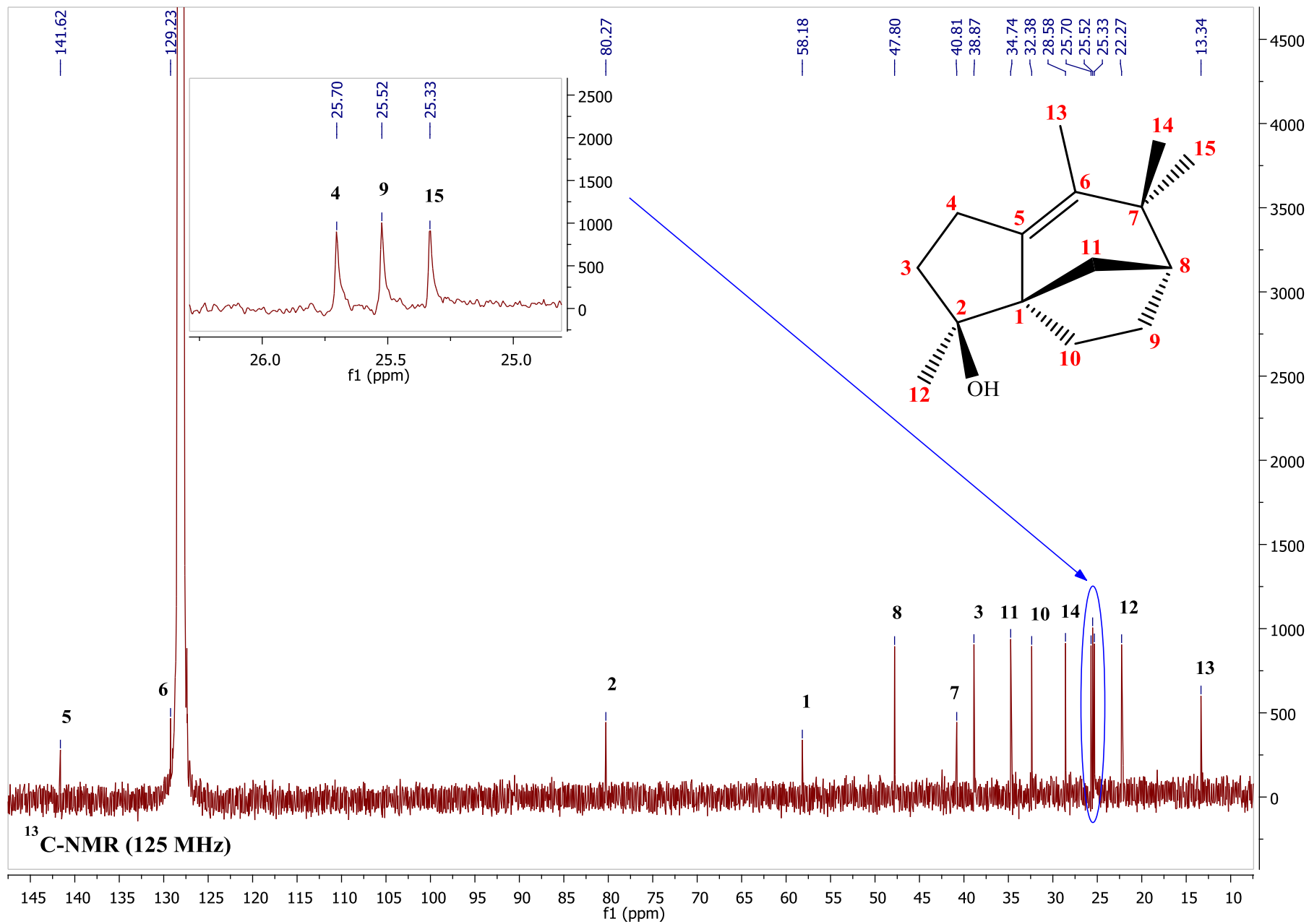


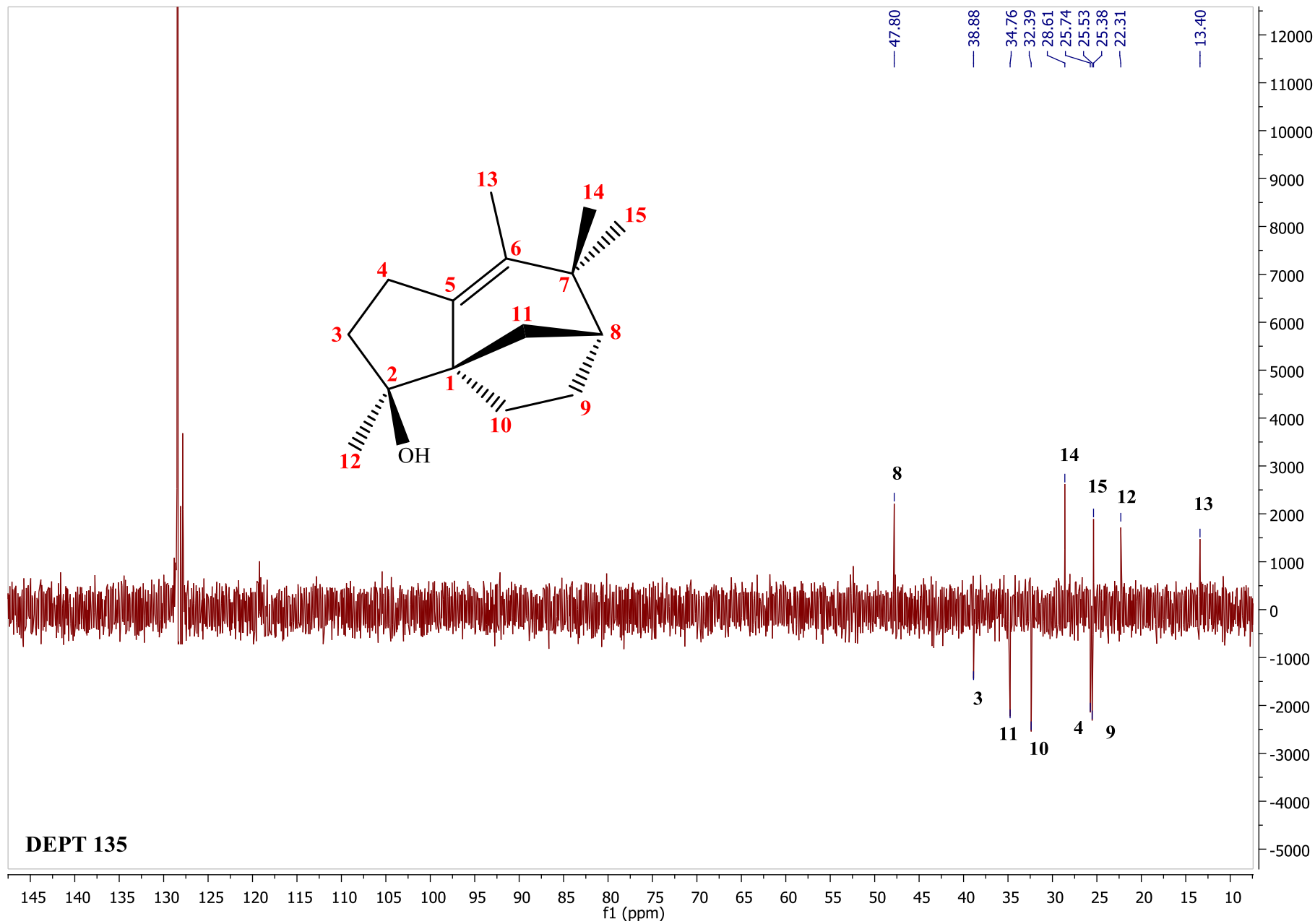
### Annexe 13 : Données MS et RMN 1D du 2-épi-Ziza-5-èn-2-ol (I)

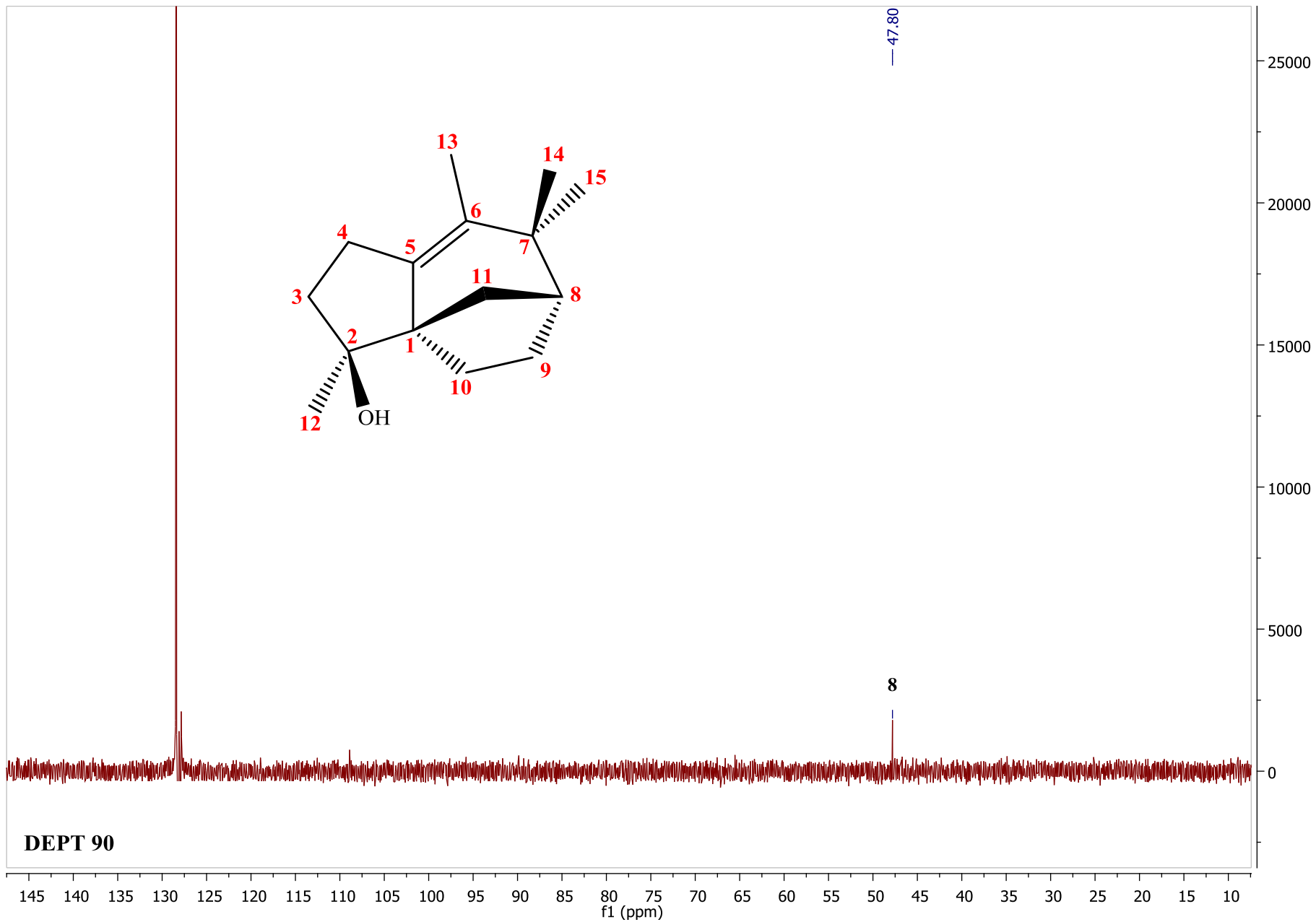


EI-MS 70 eV MS Spectrum





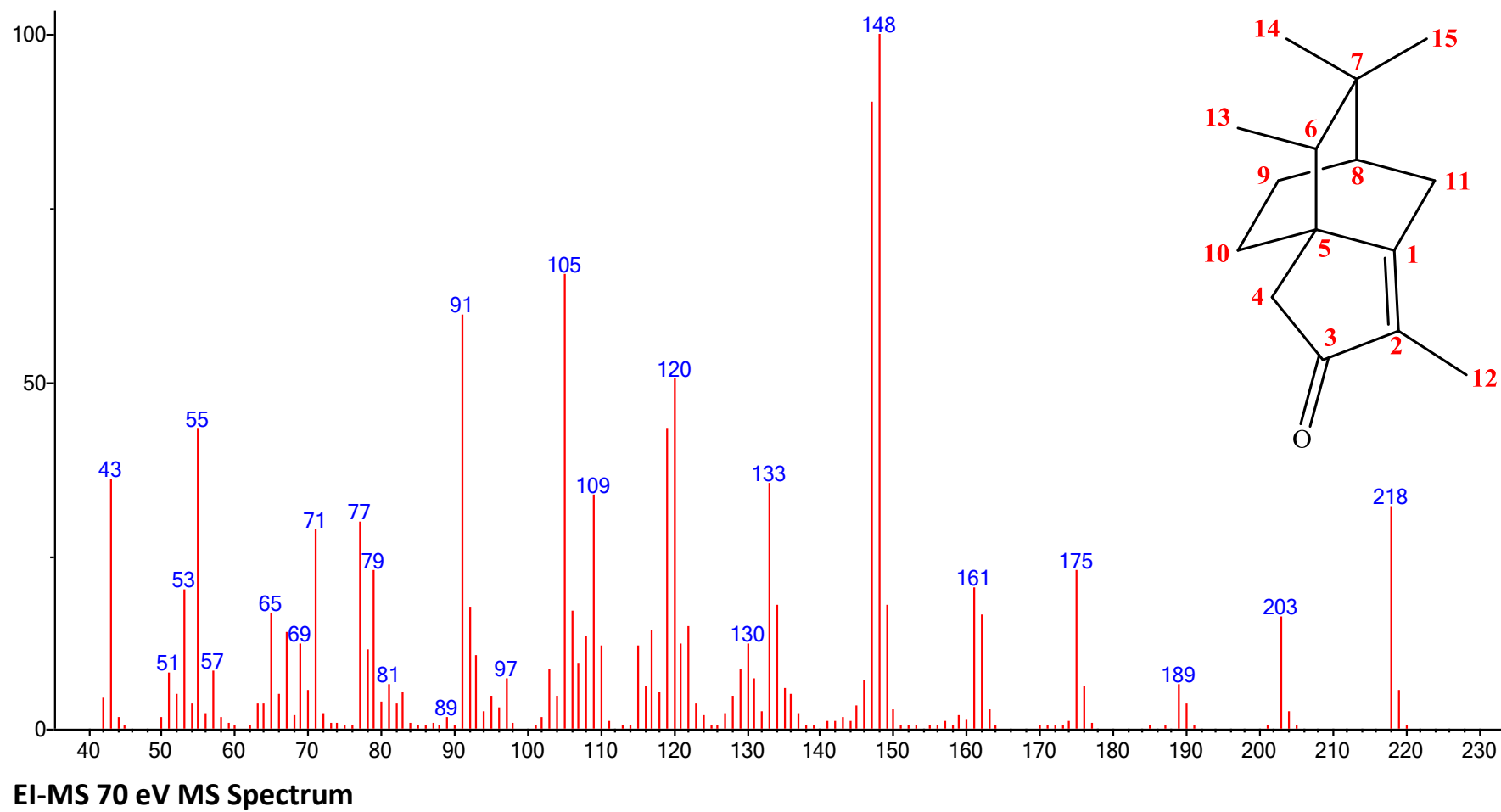


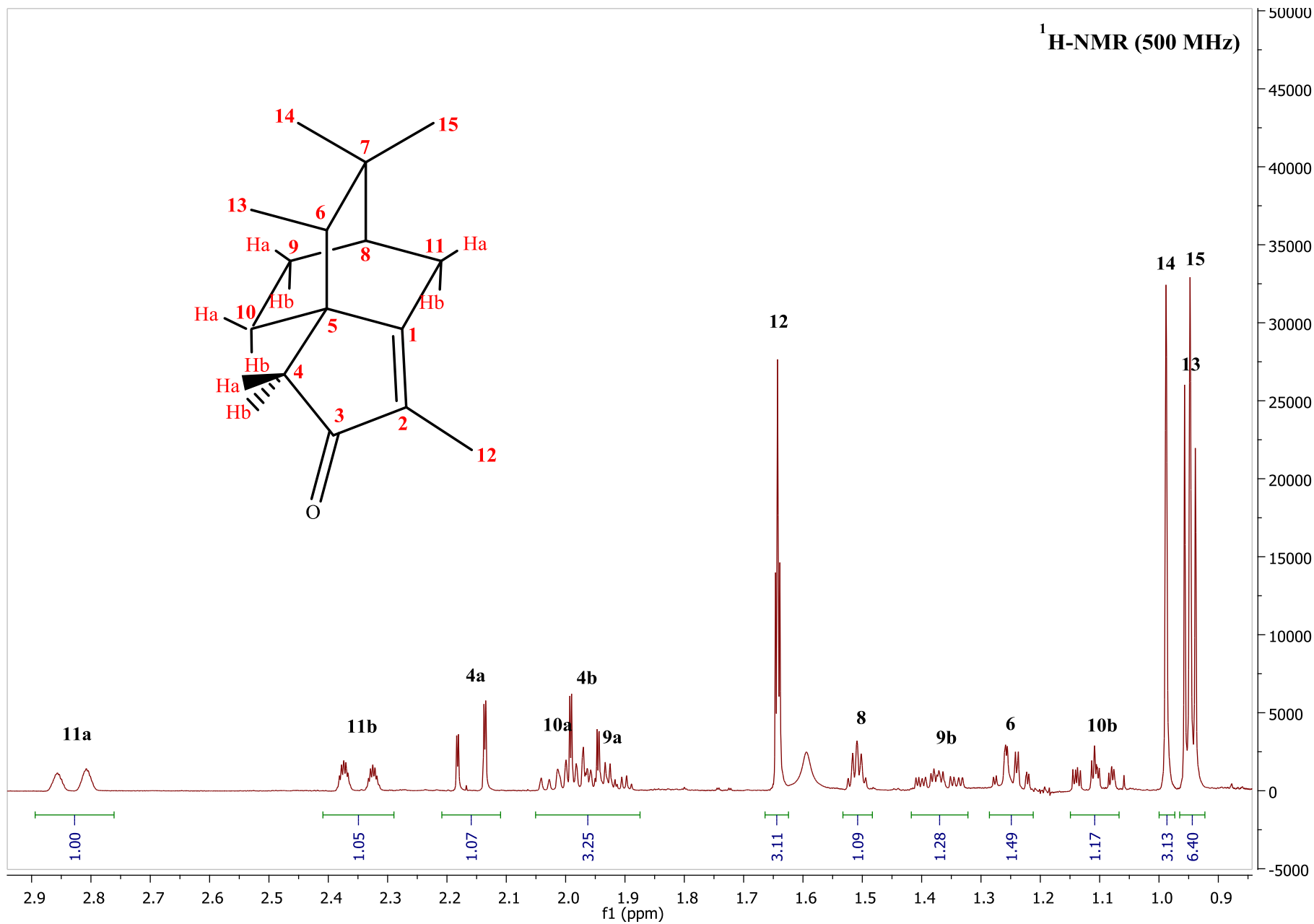


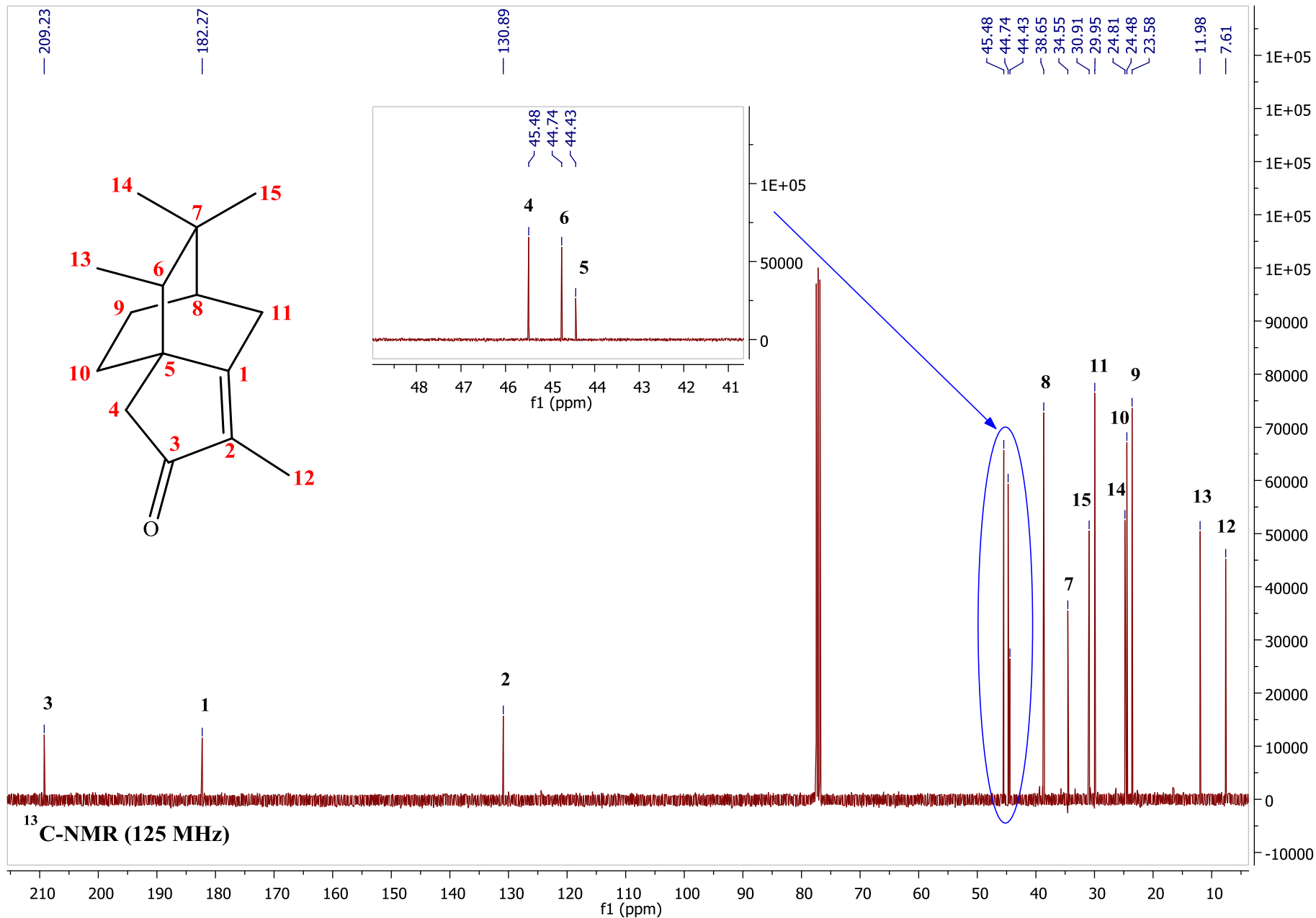


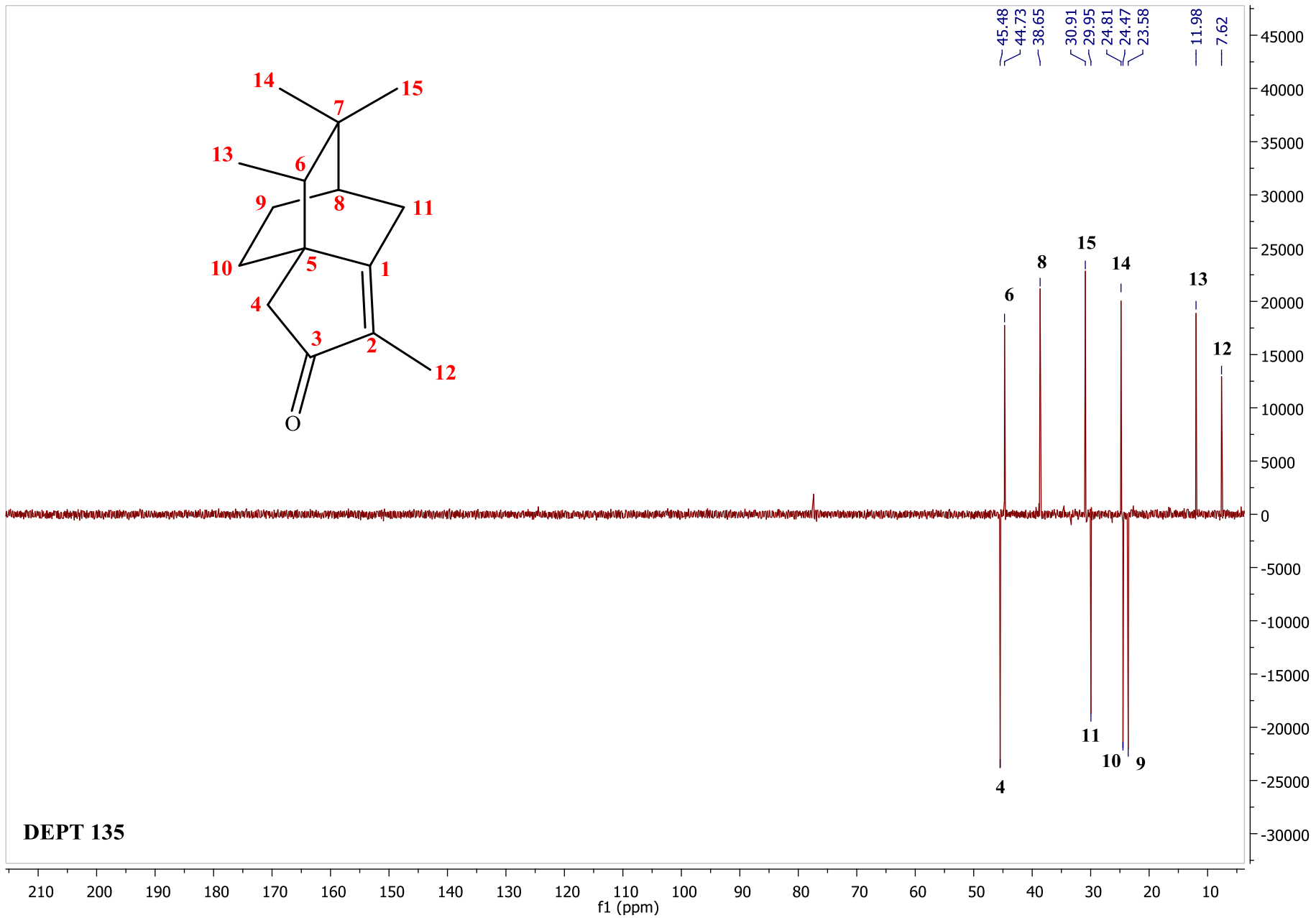


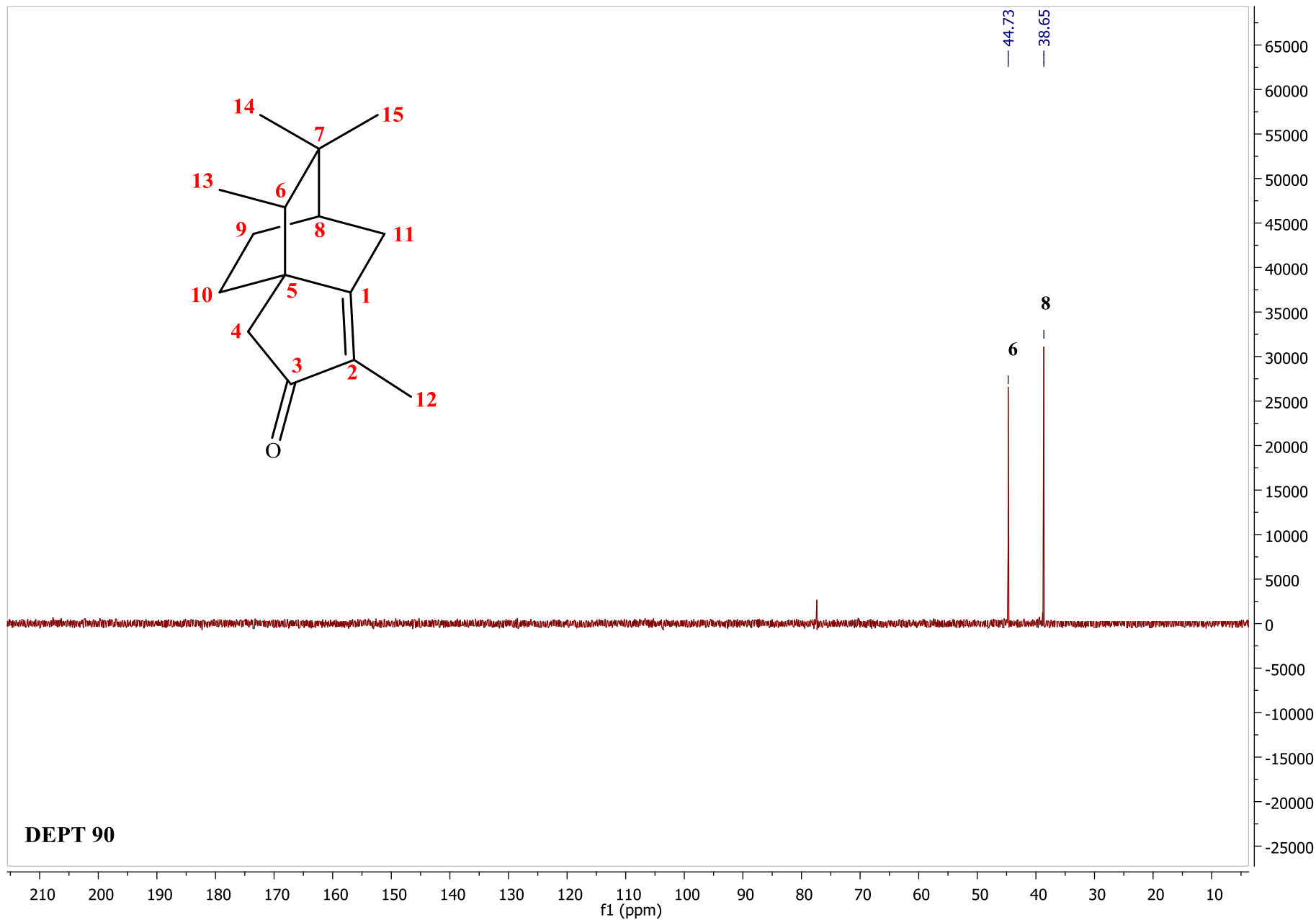
## Annexe 14 : Données MS et RMN 1D de l'Elionurone (J)













# RESUMES





## **Résumés des articles en français**



## Article 1. Chemical compositions of essential oils of five introduced conifers in Corsica

L'objectif de cette étude est de déterminer la composition chimique des huiles essentielles de cinq conifères (*Larix decidua*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus ponderosa*, *Sequoiadendron giganteum* et *Cryptomeria japonica*) acclimatés en Corse et de les comparer avec celles de ces mêmes conifères poussant dans leurs habitats naturels. Le but étant de déterminer si les conditions environnementales influencent la production de métabolites secondaires. Les huiles des différents organes (aiguilles, feuilles, bois, cônes et feuillage) de ces conifères ont été étudiées par CPG(Ir), CPG-SM et RMN <sup>13</sup>C. Les huiles essentielles d'aiguilles et de bois de *L. decidua* présentent comme composés majoritaires : l' $\alpha$ -pinène (30,8±6,6% et 26,1±9,7% respectivement), le  $\beta$ -pinène (16,1±6,8 ; 11,8±5,3%), le germacrène D (17,0±5,4 ; 0,2±0,1%) et l'acétate de bornyle (1,9±1,4 ; 13,5±6,8%). Les huiles d'aiguilles et de bois de *P. menziesii* contiennent majoritairement les monoterpènes suivant :  $\beta$ -pinène (34,6±17,6 et 21,8±11,7% respectivement),  $\alpha$ -pinène (10,8±4,4 ; 12,5±9,1%), terpinolène (11,3±6,5 ; 8,5±5,5%), terpinèn-4-ol (9,9±6,4 ; 9,5±5,3%), sabinène (5,9±6,5 ; 6,0±5,6%) et  $\Delta$ -3-carène (1,1±0,8% ; 12,9±9,0%). Celle de cône est, quant à elle, dominée par les constituants suivants :  $\alpha$ -pinène (53,6%), sabinène (13,5%), limonène (9,8%) et  $\beta$ -pinène (9,3%). Les constituants majoritaires des huiles essentielles d'aiguilles et de bois de *P. ponderosa* était : le  $\beta$ -pinène (55,7 et 29,9% respectivement), l' $\alpha$ -pinène (12,8 ; 13,6%), le  $\Delta$ -3-carène (5,5 ; 32,2%) et l'estragole (12,6% ; tr). Les huiles de feuillage et de bois de *S. giganteum* sont qualitativement très proches mais diffèrent quelque peu d'un point de vue quantitatif au regard de leurs constituants majoritaires :  $\alpha$ -pinène (59,6±11,7 et 30,4±13,3% respectivement), safrole (21,3±10,3 ; 43,8±9,9%), élémicine (3,3±1,6 ; 6,8±1,5%), méthyl eugénol (1,1±0,7 ; 2,9±1,2%) et estragole (0,4±0,3 ; 2,6±0,9%). Concernant le *C. japonica*, ses huiles essentielles de feuilles, bois, cônes et petits cônes sont très similaires entre elles et sont caractérisées par : l' $\alpha$ -pinène (19,1 ; 13,0 ; 25,0 et 12,3% respectivement), le sabinène (19,6 ; 9,4 ; 13,3 ; 17,2%), le  $\beta$ -élémol (10,7 ; 26,7 ; 12,6 ; 19,9%) et le kaurène (6,5 ; 13,3 ; 5,2 ; 9,6%). La composition chimique des huiles de *L. decidua* et de *S. giganteum* varient sensiblement par rapport à celles décrites dans la littérature.

**Mots clés** : *Larix decidua*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus ponderosa*, *Sequoiadendron giganteum*, *Cryptomeria japonica*, huiles essentielles.

## Article 2. Chemical composition of *Melicope belahe* (Baill.) T. G. Hartley (Rutaceae) leaf essential oil from Madagascar

*Melicope belahe* (Baill.) T.G. Hartley (Rutaceae) est une espèce endémique de Madagascar. La composition chimique de son huile essentielle de feuille est décrite ici pour la première fois. Le végétal a été extrait par hydrodistillation et analysé par combinaison des techniques suivantes : CPG(Ir), CPG-SM et RMN <sup>13</sup>C. Au total 56 constituants représentant 92,4% de la composition totale ont été identifiés. L' $\alpha$ -pinène (42,6%), le linalol (6,2%), l'*(E)*- $\beta$ -caryophyllène (5,2%) et le  $\beta$ -élémente (4,4%) sont les composés majoritaires de cette huile. Il faut également noter la présence de plusieurs sesquiterpènes et diterpènes en quantités plus faibles mais non négligeables, comme : l' $\alpha$ -humulène (3,1%), le  $\beta$ -sélinène (3,6%), le sélin-11- $\alpha$ -ol (1,8%), le  $\beta$ -eudesmol (0,9%) et le *(E)*-phytol (0,3%) ; ainsi que celle de quelques composés non terpéniques comme : l'hexan-1-ol (0,3%), le *(Z)*-hex-3- $\alpha$ -ol (0,2%) et le *(Z)*-hex-2- $\alpha$ -ol (0,1%).

Au regard de sa teneur en  $\alpha$ -pinène, cette huile est proche de celles de trois espèces de *Melicope* d'Australie (*Melicope broadbentiana*, *Melicope micrococca* et *Melicope vitifloral*) qui en contiennent respectivement 56,9 ; 45,4 et 30,2%. Elle contient également du linalol en teneur non négligeable tout comme l'huile de *Melicope bonwickir* d'Australie qui en contient elle-même 7,2%.

**Mots clés :** *Melicope belahe*, huile essentielle de feuille, Madagascar

### Article 3. Chemical composition of leaf and bark essential oils of *Vepris unifoliolata* from Madagascar

La composition chimique de l'huile essentielle de feuilles de *Vepris unifoliolata* est caractérisée par la présence de 29 constituants dont les majoritaires sont des monoterpènes hydrocarbonés comme l' $\alpha$ -pinène (60,5%), le myrcène (6,8%), le limonène (5,1%), l'*(E)*- $\beta$ -ocimène (4,9%) et le  $\beta$ -phellandrène (4,7%). Cette composition varie sensiblement par rapport aux huiles de feuilles des autres espèces de *Vepris* décrites dans la littérature (*V. elliotii*, *V. madagascariensis*, *V. leandriana* et *V. macrophylla*). La composition de l'huile d'écorces de *V. unifoliolata* est particulièrement originale et constituée par une haute teneur en molécules thermosensibles : isofuranodiène (43,9%), germacrone (17,1%), curzerène (9,6%) ou encore germacrène B (5,3%). Ces composés possèdent le squelette (*E,E*)-1,5-cyclodécadiénique qui est connu pour se réarranger et se dégrader durant les analyses CPG(Ir) et CPG-SM. La quantité exacte de ces couples de molécules thermosensibles : isofuranodiène/curzerène, germacrone/*trans*- $\beta$ -élemène, germacrène A/ $\beta$ -élemène et germacrène B/ $\gamma$ -élemène a été mesurée par combinaison de la CPG(Ir) et de la RMN  $^{13}\text{C}$  en tenant compte de l'intensité des signaux des carbones. Ainsi, nous obtenons une analyse de l'huile essentielle d'écorces de *V. unifoliolata*, qualitativement et quantitativement correcte. La composition de cette huile est originale avec cette importante teneur en molécules thermosensibles, qui ne sont pas présentes dans les autres espèces du genre *Vepris*.

**Mots clés :** *Vepris unifoliolata*, composés thermosensibles, RMN  $^{13}\text{C}$ , isofuranodiène, germacrone

#### **Article 4. Integrated Analysis of the Bark Oil from *Cinnamosma madagascariensis* by GC(RI), GC-MS and NMR. <sup>13</sup>C-NMR data of Cyclocopacamphene and Cyclosativene**

La composition chimique des huiles de feuilles et d'écorces de *Cinnamosma madagascariensis* a été étudiée par combinaison de la CPG (Ir), la CPG-SM et la RMN <sup>13</sup>C. L'huile de feuille contient majoritairement : le myrcène (17,9%), le limonène (17,8%), le β-phéllandrène (15,3%) et le linalol (12,2%). Ces molécules semblent correspondre à un nouveau chémotype jamais décrit pour cette huile essentielle. L'huile d'écorces a été étudiée ici pour la première fois et contient le β-pinène (49,9%) et l'α-pinène (19,5%) comme constituants majoritaires. Nous avons également identifié dans cette huile le cyclocopacamphène (2,0%), épimère du cyclosativène. Comme beaucoup d'épimères leurs indices de rétention et spectres de masse étant très proches, il est difficile de les différencier par CPG(Ir) et CPG-SM. Nous sommes parvenus à les identifier par RMN <sup>13</sup>C et fournissons les valeurs des déplacements chimiques de RMN <sup>13</sup>C pour les deux épimères. Celles du cyclocopacamphène sont décrites pour la première fois.

**Mots clés** : *Cinnamosma madagascariensis*, cyclocopacamphène, cyclosativène, huile de feuilles, huile d'écorces, RMN <sup>13</sup>C, RMN 2D.

## Article 5. New Pinane Derivatives Found in Essential Oils of *Calocedrus decurrens*

L'objectif principal de cette étude est de déterminer la composition chimique des huiles essentielles obtenues à partir des feuilles, des vieilles branches et des jeunes branches d'un conifère acclimaté en Corse, le cèdre à encens (*Calocedrus decurrens*). L'étude de la composition chimique a été réalisée par CPG(Ir), CPG-SM, CPG-prép. et RMN. Les huiles essentielles de feuilles, vieilles branches et jeunes branches contiennent l' $\alpha$ -pinène (11,2 ; 56,6 ; 22,3% respectivement), le myrcène (13,4 ; 8,4 ; 9,7%), le  $\Delta$ -3-carène (31,3 ; 5,2 ; 11,1%), le limonène (6,4 ; 5,1 ; 5,5%), le terpinolène (6,9 ; 1,5 ; 3,2%) comme constituants majoritaires. Cependant quatre composés non identifiés ont été repérés. De multiples étapes de fractionnement ont été nécessaires à l'isolation de ces molécules (CC et CPG-prép.) qui ont été identifiées comme : le pin-2-èn-8-ol (4,2 ; 4,5 ; 10,3% respectivement), l'acétate de pin-2-èn-8-yle (0,6 ; 0,6 ; 1,4%), le pin-2-èn-8-oate de méthyle (3,0 ; 1,8 ; 3,6%), et le pin-2-èn-8-al (1,6 ; 0,8 ; 2,0%). Les deux premières n'ont été que partiellement décrites en RMN  $^1\text{H}$  et leur présence n'a jamais été reportée dans cette espèce, alors que les deux dernières sont des molécules nouvelles. Dans le cas du pin-2-èn-8-al, les nombreuses tentatives de purification par CPG-prép. ont échoué, du fait de la faible stabilité du composé. Il a tendance à s'oxyder très rapidement à température ambiante pour conduire à l'acide carboxylique correspondant (transformation fortement accélérée lors du chauffage durant la CPG-prép.). Ainsi, afin de caractériser cet aldéhyde nous avons procédé par oxydation (à température ambiante) du pin-2-èn-8-ol, puis enregistré très rapidement les données spectrales du produit formé avant qu'il ne s'oxyde en acide carboxylique. Ces quatre molécules ont été totalement caractérisées par SM à haute résolution, RMN 1D et RMN 2D.

**Mots clés :** *Calocedrus decurrens*, pin-2-èn-8-al, pin-2-èn-8-oate de méthyle, acétate de pin-2-èn-8-yle, pin-2-èn-8-ol, RMN 2D, élucidation structural.



## Article 6. New sesquiterpenes including a novel skeleton (Elionurane) from *Elionurus tristis* oil

Les compositions chimiques des huiles essentielles des parties aériennes et des racines d'*Elionurus tristis* ont été déterminées au moyen de la CPG(RI), la CPG-SM, la CPG prép. et la RMN.

Outre leur teneurs importantes en composés oléfiniques:  $\alpha$ -pinène (1,7 ; 7,3% respectivement), camphène (4,0 ; 13,6%), *trans*- $\alpha$ -bergamotène (7,0 ; 3,3%) et calarène (2,1 ; 12,7%), elles sont caractérisées par une forte proportion de sesquiterpènes et principalement de sesquiterpènes oxygénés. Nous avons identifié ces composés, très rarement rencontrés tels que : le cyclocopacamphène (1,6 ; 2,2%), le 2-*épi*-prézizaène (4,0 ; 6,3%), le 2-*épi*-prézizaan-7-ol (5,1 ; 1,8%), la 1(10)-aristolèn-2-one (1,3 ; 6,4%), l'aristolone (0,6 ; 3,1%), et l'acorénone B (17,6 ; 7,2%). Après plusieurs chromatographies successives, nous sommes parvenus à isoler et identifier quatre nouveaux sesquiterpènes oxygénés : le 7-*épi*-khusian-2-ol (3,5 ; 1,5%), la 4,8-di-*épi*-acorone (3,1 ; 0,2%), le 2-*épi*-ziza-5-èn-2-ol (1,0 ; 1,3%), et l'élionurone (15,4 ; 5,6%). Le 7-*épi*-khusian-2-ol et la 4,8-di-*épi*-acorone sont de nouveaux épimères respectivement du khusian-2-ol et de l'acorone. Le 2-*épi*-ziza-5-èn-2-ol est un nouvel alcool à squelette zizaane. Le dernier composé, l'élionurone possède un nouveau squelette terpénique que nous avons nommé élionurane. Dans le but de tester la stabilité de ce composé et afin de mieux comprendre son origine, nous l'avons soumis à plusieurs réactions chimiques. Nous proposons d'ailleurs une voie de biosynthèse de ce composé, qui semble directement liée à celle du squelette zizaane. Les valeurs de RMN <sup>13</sup>C de chacune de ces dix molécules ont été fournies, et les nouvelles ont été entièrement caractérisées par SM (HR, IE), RMN 1D et RMN 2D.

**Mots clés :** elionurone, 2-*épi*-ziza-5-en-2-ol, squelette elionurane, voie de biosynthèse, 7-*épi*-khusian-2-ol, 4,8-di-*épi*-acorone, cyclocopacamphène, élucidation structurale





## Résumé vulgarisé

Le secteur des PAM (Plantes Aromatiques et Médicinales) est un secteur en plein essor. La demande en huile essentielle est en constante augmentation, au-delà des acheteurs historiques que sont les parfumeurs, il y a une demande toujours plus grande de la part du grand public, notamment depuis l'avènement de la tendance « bio ». Leurs domaines d'applications sont multiples, de l'aromathérapie à la cosmétique en passant par la parfumerie ou encore l'agroalimentaire.

Dans ce contexte, ce travail présentait deux objectifs principaux. Dans un premier temps il s'agissait d'étudier les huiles essentielles de plusieurs espèces de conifères introduites en Corse (*Larix decidua*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus ponderosa*, *Sequoiadendron giganteum*, *Cryptomeria japonica* et *Calocedrus decurrens*) qui pourraient contribuer à un élargissement de la gamme des huiles essentielles produites en Corse. Ces introductions d'espèces (menées par l'ONF) ont été effectuées pour tester leurs potentiels d'adaptabilité aux conditions pédoclimatiques de Corse, dans le but de trouver une ou plusieurs essences de substitution dans le cas d'éventuelles catastrophes telles que : une pandémie, des ravages causés par des nuisibles ou encore des feux de forêts. Ces introductions n'avaient à notre connaissance jamais fait l'objet d'investigations, notre objectif était de déterminer si les conditions environnementales influencent la production de métabolites secondaires.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux huiles essentielles de diverses espèces endémiques de Madagascar (*Melicope belahe*, *Vepris unifoliolata*, *Cinnamosma madagascariensis* et *Elionurus tristis*) très utilisées en médecine traditionnelle et paradoxalement peu étudiées.

Au sujet des conifères, les huiles de *L. decidua* et de *S. giganteum* présentaient des compositions différentes de celles reportées dans la littérature. Concernant le *P. menziesii*, l'étude de ses huiles essentielles nous a permis de déterminer la variété des arbres introduits en Corse (*P. menziesii* var. *menziesii*). L'étude des huiles de *C. decurrens* nous a permis de mettre en évidence la présence de quatre molécules inconnues de nos bases de données, dont deux sont des molécules nouvelles.

Les huiles de Madagascar nous ont permis d'apporter des données importantes concernant la biodiversité de cette île de l'océan indien. Nous avons par ailleurs identifié plusieurs molécules absentes de nos bases de données. Parmi lesquelles quatre molécules qui sont souvent incorrectement identifiées que nous identifions de manière fiable par RMN <sup>13</sup>C et quatre autres molécules qui n'avaient jusqu'à présent jamais été reportées.



## Riassuntu vulgarizatu

U settore di e PAM (Piante Aromatiche è Medicinale) hè un settore in pienu slanciu. A dumanda in olii essenziali hè in prugressione custanta, al di là di i cumpratori storici chì sò i profumatori, ci hè una dumanda sempre più forte da a parte di a ghjente publica, particularmente dipoi l'avvenimentu di a tendenza "Bio". I so duminii d'appiecazioni sò parecchi, da l'arumaterapia à a cusmetica passendu per a profumeria o ancu l'agroalimentariu.

In questu cuntestu, 'ssu travagliu avia dui oggettivi principali. In un prima tempu ci vulia à studià l'olii essenziali di parechje spezie di cuniferi intrudute in Corsica (*Larix decidua*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus ponderosa*, *Sequoiadendron giganteum*, *Cryptomeria japonica* è *Calocedrus decurrens*) chì puderianu cuntribuisce à un'allarghera di a gamma di l'olii essenziali prudutti in Corsica. St'intruduzione di spezie (realizate da l'ONF) sò state fatte di manera à sperimentà u so potenziale d'adattabilità a e cundizione pedoclimatiche di a Corsica, cù u scopu di truvà una o parechje essenze di sustituzione in casu di catastrofa cum'è : una pandemia, scumpienti causati da nucevuli o ancu i fochi di fureste. St'intruduzione ùn avianu, da ciò chè no sapemu, mai fattu l'oggettu di ricerche, u nostru oggettivu era di determinà s'è e cundizione ambientale influenzanu a pruduzione di metaboliti secundarii.

In un sicondu tempu, ci simu interessati à l'olii essenziali di spezie endemiche diverse di Madagascar (*Melicope belahe*, *Vepris unifoliolata*, *Cinnamosma madagascarensis* è *Elionurus tristis*) assai utilizate in medicina tradiziunale è paradussalmente (stranamente ?) pocu studiate.

À prupositu di i cuniferi, l'olii di *L. decidua* è di *S. giganteum* presentavanu cumpusizione sfarente di quelle rapurtate in a litteratura. Cuncirnendu u *P. menziesii*, u studiu d'i so olii essenziali ci hà permessu di determinà a varietà di l'arbori intrudutti in Corsica (*P. menziesii* var. *menziessi*). U studiu di l'olii di *C. decurrens* ci hà permessu di mette in valu a presenza di quattru molecole scunnisciate di e nostre banche date, frà e quale duie chì sò molecole nove.

L'olii di Madagascar ci anu permessu d'aghjunghje date impurtante cuncernendu a biodiversità di st'isula di l'uceanu indianu. D'altronde avemu indentificatu parechje molecole assente di e nostre banche date. Frà e quale quattru molecole chì sò aspezzu identificate di manera scurretta è chè no identifichemu di manera quasi sicura cù u RMN13C et quattr'altre molecole chì sin'à quì ùn eranu mai state rapurtate.



---

## Abstract

---

The MAP sector (Medicinal and Aromatic Plants) is a booming sector. The demand for essential oil is constantly increasing, and in addition to the historical purchasers such as perfumers, there is an increasing demand from the general public, especially since the advent of the "organic" trend. Their fields of application are multiple, from aromatherapy to cosmetics or perfumery or agri-food. In this context, this work had two main objectives. Initially, the study of the essential oils of several coniferous species introduced in Corsica (*Larix decidua*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus ponderosa*, *Sequoiadendron giganteum*, *Cryptomeria japonica* and *Calocedrus decurrens*), which could contribute to a broader range of the essential oils produced on the island. In the second phase, we focused on the essential oils of various endemic species to Madagascar (*Melicope belahe*, *Vepris unifoliolata*, *Cinnamosma madagascariensis* and *Elionurus tristis*), which are widely used in traditional medicine. Analysis of all essential oils was carried out by combination of GC(RI), GC-MS and <sup>13</sup>C-NMR.

The first part of this thesis concerns the analysis of the oils of six coniferous species introduced in Corsica. Among them, the oils of *L. decidua*, *P. menziesii*, *P. ponderosa*, *S. giganteum* and *C. japonica* are dominated by a high content of monoterpenes. Those of *L. decidua*, *P. menziesii* and *C. japonica* also contain a few sesqui- and diterpenes at appreciable contents, while those of *P. ponderosa* and *S. giganteum* are rich in phenylpropanoids. On the other hand, *C. decurrens* oils are more complex and required several fractionation steps to identify four unknown molecules in our databases: pin-2-en-8-ol, pin-2-en-8-yl acetate, methyl pin-2-en-8-oate, and pin-2-en-8-al. The last two are new molecules.

The second part was devoted to the analysis of the essential oils of endemic Madagascar species. The leaves essential oil of *M. belahe* led to the identification of 56 constituents, majors of which are:  $\alpha$ -pinene (42.6%), linalool (6.2%), (*E*)- $\beta$ -caryophyllene (5.2%) and  $\beta$ -elemene (4.4%). *V. unifoliolata* exhibited a bark essential oil with high amounts of thermosensitive molecules: isofuranodiene (43.9%), germacrone (17.1%), curzerene (9.6%) and germacrene B (5.3%). <sup>13</sup>C-NMR allowed the identification and quantification of these compounds. In addition to  $\beta$ -pinene (49.9%) and  $\alpha$ -pinene (19.5%) as major constituents, the bark oil of *C. madagascariensis* contains cyclolocopacamphene (2.0%), an epimer of cyclosativene. We report for the first time its <sup>13</sup>C-NMR chemical shifts. The essential oils of *E. tristis* are characterized by great chemical complexity. We have identified several oxygenated sesquiterpenes that are rarely encountered and four unknown compounds: (i) 7-*epi*-khusian-2-ol and 4,8-di-*epi*-acorone (respectively two new epimers of khusian-2-ol and acorone); (ii) 2-*epi*-ziza-5-en-2-ol; and (iii) elionurone, which is so far the one and only molecule with the new terpenic skeleton that we have named elionurane. We suggest a biosynthesis pathway for this molecule, which seems to be directly linked to that of the zizaane skeleton.



**Key words:** Essential Oils,  $^{13}\text{C}$ -NMR, Madagascar, Conifers, Corsica.



---

## Résumé

---

Le secteur des PAM (Plantes Aromatiques et Médicinales) est un secteur en plein essor. La demande en huile essentielle est en constante augmentation, au-delà des acheteurs historiques que sont les parfumeurs, il y a une demande toujours plus grande de la part du grand public, notamment depuis l'avènement de la tendance « bio ». Leurs domaines d'applications sont multiples, de l'aromathérapie à la cosmétique en passant par la parfumerie ou encore l'agroalimentaire. Dans ce contexte, ce travail présentait deux objectifs principaux. Dans un premier temps il s'agissait d'étudier les huiles essentielles de plusieurs espèces de conifères introduites en Corse (*Larix decidua*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus ponderosa*, *Sequoiadendron giganteum*, *Cryptomeria japonica* et *Calocedrus decurrens*) qui pourraient contribuer à un élargissement de la gamme des huiles essentielles produites sur l'île. Et dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux huiles essentielles de diverses espèces endémiques de Madagascar (*Melicope belahe*, *Vepris unifoliolata*, *Cinnamosma madagascariensis* et *Elionurus tristis*) très utilisées en médecine traditionnelle. L'analyse de toutes ces huiles essentielles ont été menées par combinaison de la CPG(Ir), CPG-SM et RMN <sup>13</sup>C.

La première partie de cette thèse concerne l'analyse des huiles des six espèces de conifères introduites en Corse. Parmi elles, les huiles de *L. decidua*, *P. menziesii*, *P. ponderosa*, *S. giganteum* et *C. japonica* qui sont dominées par une forte teneur en monoterpènes. Celles de *L. decidua*, *P. menziesii* et *C. japonica* contiennent également à des teneurs non négligeables quelques sesqui- et diterpènes, alors que celles de *P. ponderosa* et *S. giganteum* sont riches en phénylpropanoïdes. En revanche, les huiles de *C. decurrens*, plus complexes ont nécessité plusieurs étapes de fractionnement afin d'identifier quatre molécules inconnues de nos banques de données : le pin-2-èn-8-ol, l'acétate de pin-2-èn-8-yle, le pin-2-èn-8-oate de méthyle, et le pin-2-èn-8-al. Les deux dernières étant des molécules nouvelles.

La seconde partie fut consacrée à l'analyse des huiles essentielles d'espèces endémiques de Madagascar. L'huile essentielle de feuilles de *M. belahe* a conduit à l'identification de 56 constituants dont les majoritaires sont : l' $\alpha$ -pinène (42,6%), le linalol (6,2%), l'(E)- $\beta$ -caryophyllène (5,2%) et le  $\beta$ -élémente (4,4%). *V. unifoliolata* présentait une huile essentielle d'écorces avec une teneur importante en molécules thermosensibles : isofuranodiène (43,9%), germacrone (17,1%), curzerène (9,6%) ou encore germacrène B (5,3%). La RMN <sup>13</sup>C a permis de réaliser l'identification et la quantification de ces composés. Outre le  $\beta$ -pinène (49,9%) et l' $\alpha$ -pinène (19,5%) comme constituants majoritaires, l'huile d'écorces de *C. madagascariensis* contient le cyclocopacamphène (2,0%), qui est un épimère du cyclosativène. Nous reportons pour la première fois ses déplacements chimiques de RMN <sup>13</sup>C. Les huiles essentielles d'*E. tristis* sont caractérisées par une grande complexité chimique. Nous avons identifié plusieurs sesquiterpènes oxygénés, peu fréquemment rencontrés et quatre composés inconnus : (i) le 7-épi-khusian-2-ol et la 4,8-di-épi-acorone (respectivement deux nouveaux épimères du khusian-2-ol et de l'acorone) ; (ii) le 2-épi-ziza-5-èn-2-ol ; et (iii) l'élionurone qui est à ce jour la seule et unique molécule présentant un nouveau squelette terpénique que nous avons nommé élionurane. Nous proposons d'ailleurs une voie de biosynthèse de cette molécule, qui semble directement liée à celle du squelette zizaane.

**Mots clés :** Huile essentielle, RMN  $^{13}\text{C}$ , Madagascar, Conifères, Corse.







---

## RESUME

---

Le secteur des PAM (Plantes Aromatiques et Médicinales) est un secteur en plein essor. La demande en huile essentielle est en constante augmentation, au-delà des acheteurs historiques que sont les parfumeurs, il y a une demande toujours plus grande de la part du grand public, notamment depuis l'avènement de la tendance « bio ». Leurs domaines d'applications sont multiples, de l'aromathérapie à la cosmétique en passant par la parfumerie ou encore l'agroalimentaire. Dans ce contexte, ce travail présentait deux objectifs principaux. Dans un premier temps il s'agissait d'étudier les huiles essentielles de plusieurs espèces de conifères introduites en Corse (*Larix decidua*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus ponderosa*, *Sequoiadendron giganteum*, *Cryptomeria japonica* et *Calocedrus decurrens*) qui pourraient contribuer à un élargissement de la gamme des huiles essentielles produites sur l'île. Et dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux huiles essentielles de diverses espèces endémiques de Madagascar (*Melicope belahe*, *Vepris unifoliolata*, *Cinnamosma madagascariensis* et *Elionurus tristis*) très utilisées en médecine traditionnelle. L'analyse de toutes ces huiles essentielles ont été menées par combinaison de la CPG(Ir), CPG-SM et RMN <sup>13</sup>C.

La première partie de cette thèse concerne l'analyse des huiles des six espèces de conifères introduites en Corse. Parmi elles, les huiles de *L. decidua*, *P. menziesii*, *P. ponderosa*, *S. giganteum* et *C. japonica* qui sont dominées par une forte teneur en monoterpènes. Celles de *L. decidua*, *P. menziesii* et *C. japonica* contiennent également à des teneurs non négligeables quelques sesqui- et diterpènes, alors que celles de *P. ponderosa* et *S. giganteum* sont riches en phénylpropanoïdes. En revanche, les huiles de *C. decurrens*, plus complexes ont nécessité plusieurs étapes de fractionnement afin d'identifier quatre molécules inconnues de nos banques de données : le pin-2-èn-8-ol, l'acétate de pin-2-èn-8-yle, le pin-2-èn-8-oate de méthyle, et le pin-2-èn-8-al. Les deux dernières étant des molécules nouvelles.

La seconde partie fut consacrée à l'analyse des huiles essentielles d'espèces endémiques de Madagascar. L'huile essentielle de feuilles de *M. belahe* a conduit à l'identification de 56 constituants dont les majoritaires sont : l' $\alpha$ -pinène (42,6%), le linalol (6,2%), l'(E)- $\beta$ -caryophyllène (5,2%) et le  $\beta$ -élémente (4,4%). *V. unifoliolata* présentait une huile essentielle d'écorces avec une teneur importante en molécules thermosensibles : isofuranodiène (43,9%), germacrone (17,1%), curzerène (9,6%) ou encore germacrène B (5,3%). La RMN <sup>13</sup>C a permis de réaliser l'identification et la quantification de ces composés. Outre le  $\beta$ -pinène (49,9%) et l' $\alpha$ -pinène (19,5%) comme constituants majoritaires, l'huile d'écorces de *C. madagascariensis* contient le cyclocopacamphène (2,0%), qui est un épimère du cyclosativène. Nous reportons pour la première fois ses déplacements chimiques de RMN <sup>13</sup>C. Les huiles essentielles d'*E. tristis* sont caractérisées par une grande complexité chimique. Nous avons identifié plusieurs sesquiterpènes oxygénés, peu fréquemment rencontrés et quatre composés inconnus : (i) le 7-épi-khusian-2-ol et la 4,8-di-épi-acorone (respectivement deux nouveaux épimères du khusian-2-ol et de l'acorone) ; (ii) le 2-épi-ziza-5-èn-2-ol ; et (iii) l'élionurone qui est à ce jour la seule et unique molécule présentant un nouveau squelette terpénique que nous avons nommé élionurane. Nous proposons d'ailleurs une voie de biosynthèse de cette molécule, qui semble directement liée à celle du squelette zizaane.



**Mots clés :** Huile essentielle, RMN  $^{13}\text{C}$ , Madagascar, Conifères, Corse.