

APPORTS DES TECHNIQUES RMN 1D ET 2D AUX ANALYSES STRUCTURALES.  
 APPORTS DES TECHNIQUES RMN DU CARBONE-13 A L'ANALYSE QUANTITATIVE DES MELANGES  
 COMPLEXES D'INTERETS INDUSTRIEL ET NUTRITIONNEL

## Sommaire

<b>Abréviations</b> .....	<b>2</b>
INTRODUCTION	3
<b>CHAPITRE 1. VOIE A : ETUDE PAR RMN DES STRUCTURES ET DES RELATIONS STEREOCHIMIQUES DU GERMACRANOLIDE A9 ET DU GUAIANOLIDE TD15 PROVENANT DU <i>TANACETUM DENSUM SSP. SIVASICUM</i> ET <i>SSP. AMANI</i></b>	<b>6</b>
<b>1. Généralités sur les lactones sesquiterpéniques et intérêts de l'unité structurale <math>\alpha</math>-méthylène-<math>\gamma</math>-butyrolactone</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1.</b> Importances biologiques et synthétiques de l'unité $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone.....	7
<b>1.2.</b> Intérêts stéréochimiques et problèmes RMN .....	8
<b>2. Principes, matériels et méthodes</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1.</b> Matériels et méthodes.....	11
<b>2.2.</b> Principes sur les méthodologies de purification-identification des mélanges complexes d'intérêt médical (Voie <b>A</b> ).....	12
<b>3. Résultats et discussions sur les études structurales du germacranolide A9 et du guaianolide TD15 par utilisation concertée des techniques RMN 1D et 2D</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1.</b> Etudes structurales et stéréochimiques du germacranolide A9 issu du <i>T. densum ssp. sivasicum</i>	18
<b>3.2.</b> Révision structurale et études stéréochimiques du guaianolide TD15 issu de <i>T. densum sous-espèce amani</i> .....	34
<b>Conclusions</b> .....	<b>43</b>
<b>CHAPITRE 2. VOIE C : ANALYSES QUALITATIVE ET QUANTITATIVE PAR RMN DU CARBONE-13 ASSISTEE PAR ORDINATEUR DES RESINES DE PIN ET DES MIELS</b> .....	<b>44</b>
<b>1. Généralités sur les mélanges complexes des résines et des miels</b> .....	<b>45</b>
<b>1.1.</b> Oléorésines, valorisation et composition.....	45
<b>1.2.</b> Mélanges complexes des miels et sucres.....	46
<b>2. Principes, matériels et méthodes en analyse par RMN du carbone-13</b> .....	<b>51</b>
<b>2.1.</b> Matériels et méthodes.....	51
<b>2.2.</b> Principes des méthodologies d'analyse avec la RMN du carbone-13 assistée par ordinateur .....	54
<b>3. Résultats et discussions sur les résines des pins et des sucres des les miels</b> .....	<b>63</b>
<b>3.1.</b> Analyses des résines provenant des échantillons de <i>P. kesyia</i> et <i>P. patula</i> .....	63
<b>3.2.</b> Analyse quantitative des sucres et étude comparative des miels d'origines botanique et géographique diverse.....	80
<b>Conclusions</b> .....	<b>109</b>
CONCLUSION GENERALE .....	110
<b>Annexes Germacranolide</b> .....	<b>112</b>
<b>Annexes Guaianolide</b> .....	<b>114</b>
<b>Annexes résines des pins</b> .....	<b>116</b>
<b>Annexes miels</b> .....	<b>131</b>
<b>Listes des illustrations</b> .....	<b>134</b>
<b>Diagrammes</b>	134
<b>Figures</b>	134
<b>Graphiques</b>	134
<b>Schémas</b>	135
<b>Spectres</b>	135
<b>Tableaux</b>	136
<b>Abréviation en anglais</b>	138
<b>Glossaire</b>	139
<b>Références</b>	140

## Abréviations

CCM	: Chromatographie sur couche mince
CEC	: Chromatographie électrophorétique capillaire
CL	: Chromatographie (en phase) Liquide
CPG	: Chromatographie en Phase Gazeuse
Cr(acac) <sub>3</sub>	: tri-(Acétylacétonate) Chrome III
DB	: découplage par bruit (découplage à large bande)
DCMCP	: Département Chimie Minérale et Chimie Physique
Fe(acac) <sub>3</sub>	: tri-(Acétylacétonate) FeIII
HMF	: 5-hydroxyméthylefurfural
IK	: Indice de Kovac
IR	: Infrarouge
IRTF	: Infrarouge à Transformée de Fourier
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
qRMN	: Quantitative RMN
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire
S/B	: Signal/Bruit
SM	: Spectroscopie de Masse
UV	: UltraViolet

## Introduction

Depuis des millénaires, l'homme a utilisé les plantes pour satisfaire ses besoins énergétiques et d'habillement, pour s'abriter ainsi que pour se soigner.<sup>1,2</sup> Bien plus tard, la montée de l'agriculture a favorisé le développement d'une industrie chimique basée sur l'exploitation des *métabolites primaires* en tant que réserves d'énergie (huiles, amidon, hydrates de carbone, protéines, etc.) ou qui assurent l'intégrité structurale (fibre lignocellulose) et sur l'exploitation des *métabolites secondaires* qui conduisent aux produits de spécialité et de la chimie fine (colorants, parfums et arômes, produits pharmaceutiques). Les plantes médicinales en particulier ayant occupé l'avant-scène de la thérapeutique depuis très longtemps,<sup>3</sup> se trouvent encore aujourd'hui en tête dans la recherche et la production des molécules biologiquement actives.<sup>4</sup> Cette recherche sur les substances naturelles dotées d'activité biologique a été aussi le moteur majeur de la synthèse organique profondément marquée par le passage de Woodward et remarquablement théorisée par Corey. Ces progrès, en conjugaison avec l'émergence des matières premières fossiles dont surtout le pétrole, ont contribué au peuplement des espaces chimiques selon la diversité moléculaire<sup>5</sup> exprimant la typologie structurale des molécules, selon leurs caractéristiques, leur utilisation spécifique permettant ainsi leur classification.<sup>6</sup>

La synthèse combinatoire qui a vu d'abord le jour avec la synthèse des matériaux électroniques,<sup>7</sup> a pris un ascendant particulier sur la manière de conduire la synthèse en chimie<sup>8</sup> grâce au concept de *haut débit* qu'elle a véhiculé, et s'est répandue rapidement dans les autres branches de la chimie.

Actuellement, les experts s'accordent à dire que les réserves non renouvelables des ressources fossiles (le pétrole, le gaz naturel et le charbon) sur lesquelles l'ensemble de l'industrie chimique moderne dépend vont toucher à leur fin dans une quarantaine d'années au plus tard.<sup>9,10,11</sup> Les impacts environnementaux de ces industries ont pris des proportions alarmantes par leurs effets polluants sur tout l'écosystème terrestre, aquatique ou aérien. Suite au sommet de Rio (1992), l'IUPAC en collaboration avec d'autres organismes a ainsi formulé des principes scientifiques pour développer le cadre d'activité d'une chimie durable.<sup>12</sup> Ils sont à la base d'un ensemble de stratégies pour le développement des activités industrielles environnementalement saines et qui soient économiquement avantageuses, socialement bénéfiques,<sup>13</sup> favorisent un regain d'intérêt aux biomasses en général et aux plantes médicinales en particulier. Ce retour est d'autant plus motivé que la chimie combinatoire a déçu l'ensemble des chercheurs dans la course vers la découverte de nouveaux médicaments.<sup>14</sup>

Si Madagascar est bien connu par sa riche biodiversité unique au monde avec un des plus forts taux d'endémicité, des microclimats richement variés permettant l'acclimatation des espèces importées, il est classé aussi parmi les pays les plus menacés par les dégradations environnementales et pollutions des écosystèmes terrestres, aquatiques. A cet état viennent s'ajouter les perspectives nouvelles d'exploitations minières ainsi que de production pétrolière engendrant à la fois, des opportunités économiques et des menaces écologiques.

L'analyse des mélanges complexes générés par les biomasses, leurs produits ou leurs déchets est d'une importance primordiale pour évaluer une qualité, pour faire ressortir une spécificité. Le laboratoire de chimie physique structurale dans laquelle nous travaillons s'est

engagé depuis des années dans l'analyse physico-chimique des mélanges complexes issus des plantes médicinales,<sup>15,16</sup> des médicaments<sup>17</sup> ou encore des pesticides<sup>18</sup> ainsi que des contrôles et qualité des médicaments en collaboration avec le Ministère de tutelle ainsi que des organisations internationales telles que l'OMS ou encore des partenaires académiques.

Notre séjour à l'Université de Boston a été profitable dans la manipulation du spectromètre de RMN pour l'analyse structurale des molécules issues des plantes médicinales. Au laboratoire de chimie et biomasse d'Ajaccio, nous avons pu nous familiariser avec l'analyse des mélanges complexes utilisant la RMN du carbone-13 assistée par ordinateur. On peut ainsi distinguer schématiquement (Figure 1) deux démarches analytiques en fonction de l'objectif que l'on se fixe :

(i) la première démarche est d'élucider la structure d'une molécule qui n'a jamais été décrite dans la littérature. C'est la Voie **A** dite de purification-identification mettant en oeuvre des séries séquentielles d'extraction, de fractionnement et de purification avant l'identification ;

(ii) la seconde démarche se rapporte à l'identification et à la quantification des composés déjà connus et dont les caractéristiques spectrales en sont déjà bien documentées ; elle se retrouve dans la Voie **B** et la Voie **C**. La Voie **B** met en oeuvre des systèmes de *couplage* entre les techniques chromatographiques permettant l'individualisation des composés dans un mélange complexe et les techniques spectroscopiques comme outils d'identification.  
19,20,21,22,23,24,25

(iii) La Voie **C**, utilisant les techniques de la RMN du carbone-13 assistée par ordinateur se distingue des deux autres méthodologies précédentes en effectuant *directement* l'identification et la quantification des composés dans un mélange complexe sans séparation, ni purification, ni individualisation au préalable.

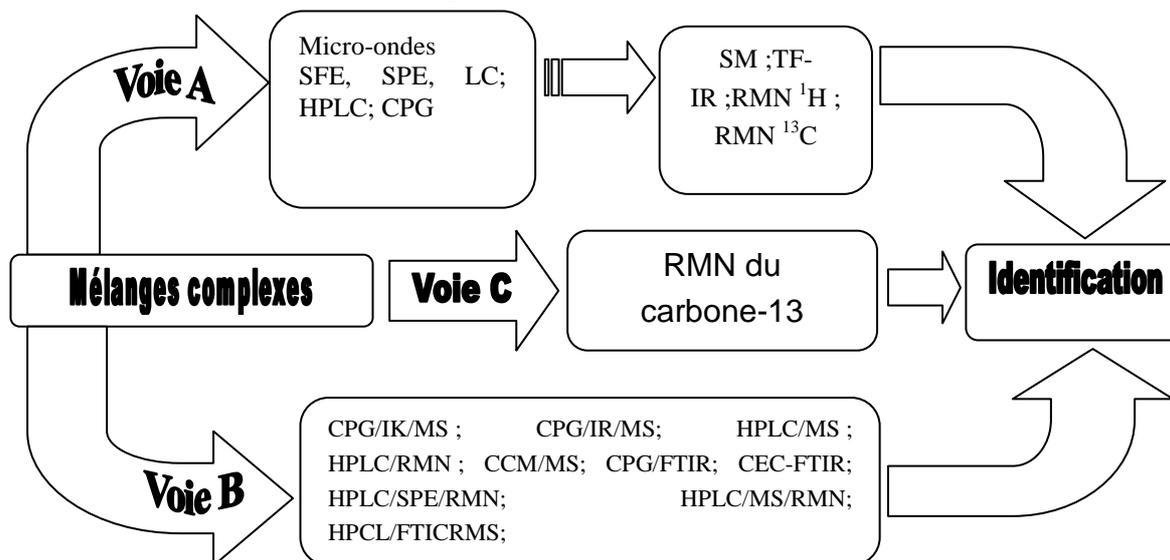


Figure 1: représentation schématique des Voies A, B et C

L'objectif de notre travail est alors de relever les pertinences propres aux approches analytiques des techniques de RMN selon le domaine où l'on se situe ainsi que de souligner l'opportunité nouvelle offerte par le concept d'analyse directe des mélanges complexes vis-à-vis de la

compatibilité environnementale, de la recherche académique et de la valorisation industrielle et économique de la biomasse. Cette thèse comprendra ainsi deux chapitres :

– Chapitre **1** : Analyse structurale des lactones sesquiterpéniques type germacranolide et type guaianolide ayant l'unité  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone et issus de l'espèce *Tanacetum densum* (Voie **A**) ;

– Chapitre **2** : Etude et analyse quantitative par la RMN du carbone-13 assistée par ordinateur des résines de pin du genre *Pinus* de Madagascar ainsi que des miels de Madagascar. (Voie **C**).

---

**Chapitre 1.** Voie A : Etude par RMN des structures et des relations stéréochimiques du germacranolide A9 et du guaianolide TD15 provenant du *Tanacetum densum* ssp. *Sivasicum* et ssp. *Amani*

---

1. **Généralités** sur les lactones sesquiterpéniques et intérêts de l'unité structurale  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone
  - 1.1. Importances biologiques et synthétiques de l'unité  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone
  - 1.2. Intérêts stéréochimiques et problèmes RMN
2. **Principes, matériels et méthodes**
  - 2.1. Matériels et méthodes
  - 2.2. Méthodologies de purification-identification (Voie A) des mélanges complexes
3. **Résultats et discussions**
  - 3.1. Etudes structurales et stéréochimiques du germacranolide A9 issu du *T. densum* sous-espèce *sivasicum*
  - 3.2. Révision structurale et études stéréochimiques du guaianolide TD15 issu de *T. densum* ssp *amani*

## 1. GENERALITES SUR LES LACTONES SESQUITERPENIQUES ET INTERETS DE L'UNITE STRUCTURALE $\alpha$ -METHYLENE- $\gamma$ -BUTYROLACTONE

Les lactones sesquiterpènes sont parmi les métabolites secondaires les plus répandus surtout dans la famille des *Asteraceae*. L'attrait de ces composés provient de l'unité structurale  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone qui leur confère des propriétés biologiques d'intérêt alliées à des caractéristiques stéréochimiques particulières qui sont d'autant de défis pour les chimistes de produits naturels que pour les chimistes organiciens et les spectroscopistes.

### 1.1. Importances biologiques et synthétiques de l'unité $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone

Les produits naturels contenant le fragment  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone et exhibant des activités biologiques aussi bien variées qu'intéressantes ont fait l'objet d'intenses investigations depuis le début des années 60.<sup>26,27,28</sup> La découverte de Kupchan sur les activités des lactones sesquiterpéniques<sup>29,30</sup> a donné lieu à un essor considérable des études sur les relations structure-activité des composés contenant l'unité  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone.

#### 1.1.1. Intérêts biologiques

Les différentes activités du fragment  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone proviennent du fait qu'il se comporte comme un réactif d'alkylation avec des nucléophiles biologiques comme les enzymes *via* la réaction de Michael :<sup>31</sup>



Ce fragment est responsable des *activités anti-cancer*<sup>32,33,34</sup> ou des *activités allergéniques* au niveau des peaux des plantes qui les contiennent. Elles confèrent aussi aux métabolites secondaires des propriétés de *régulation de croissance* des micro-organismes<sup>35</sup> ou des plantes.<sup>36</sup> On a enregistré des composés avec des *activités anti-malaria*,<sup>37</sup> des *activités convulsives* et *anti-convulsives*.<sup>38</sup>

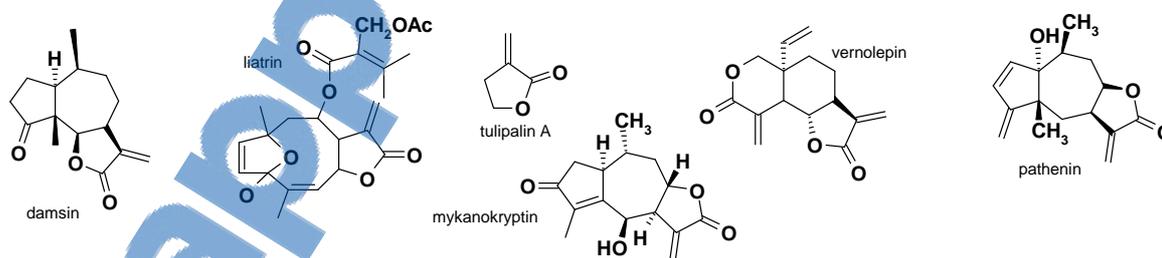


Figure 2 : Quelques composés lactones sesquiterpéniques avec activités biologiques représentatives

Par ailleurs, des auteurs ont rapporté le rôle inhibiteur du fragment  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone contre l'effet d'absorption de l'éthanol.<sup>39</sup>

### 1.1.2. Intérêts synthétiques liés à l'unité $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone

Les défis liés à la diversité des structures et des stéréochimies contenant l'unité  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone ont fait également mobiliser les chimistes organiciens. En effet, plusieurs molécules représentatives de ces classes de composés telles que le henelanin,<sup>40</sup> confertin,<sup>41,42</sup> dansin<sup>43</sup> ou plus récemment le pathernin<sup>44</sup> ont été les cibles de synthèse totale. Des efforts ont été aussi entrepris pour la modification fonctionnelle de l'unité  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone en vue d'atténuer la toxicité, de changer l'activité biologique ou pour synthétiser des analogues non naturels tels que les dérivés de naphthalène.<sup>45</sup>

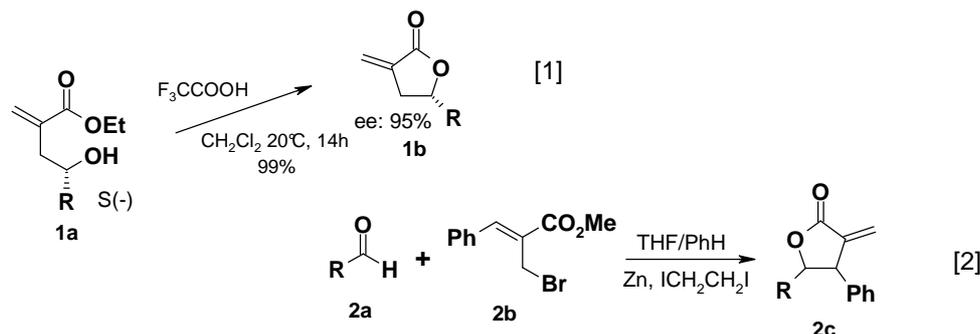


Figure 3: Exemples de route synthétique asymétrique vers l'unité  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone. Plusieurs méthodes,<sup>46,47,48,49</sup> dont des procédés de synthèse asymétrique ont été développés pour l'unité  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone<sup>50,51</sup> en tant que composante de base de synthèse d'importance. (Voir Fig.2)

### 1.2. Intérêts stéréochimiques et problèmes RMN

La position du cycle lactonique dans la structure moléculaire des sesquiterpènes résulte de leur biogénèse. Les lactones sesquiterpéniques se rencontrent généralement dans cinq différents squelettes carbonés tels que l'anolide, le germacranolide, le guaianolide, l'ambrosanolide et le xanthanolide. Pour les classes des  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactones, on a les positions jonction (6,7) en **1** ou (7,8) en **3**. Alors, un des problèmes cruciaux de stéréochimie relatifs à ces classes de composés réside dans la stéréochimie *cis/trans* des fusions de cycle. Nous allons nous intéresser plus particulièrement au fragment  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone **2** présent dans les sesquiterpènes lactones.

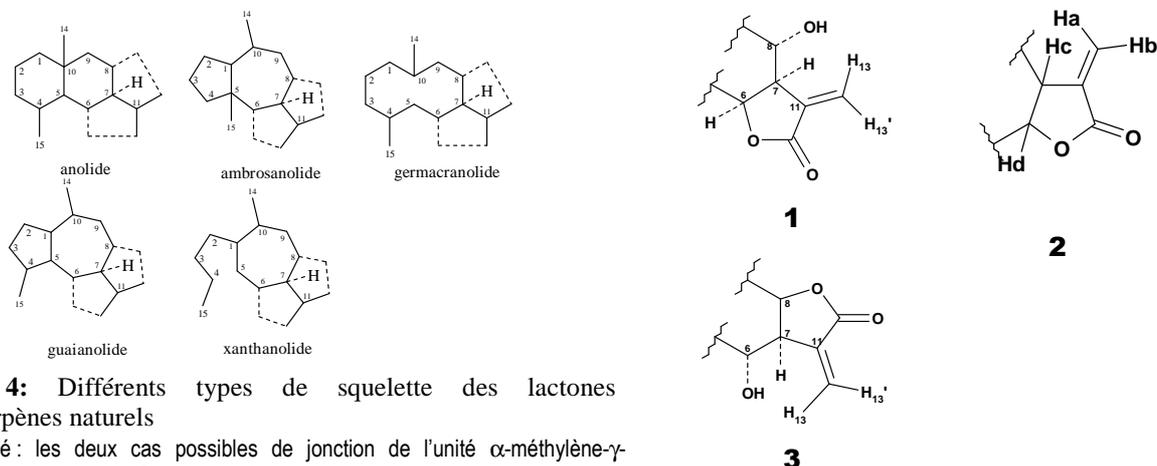
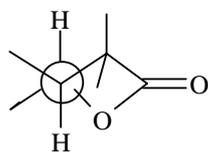


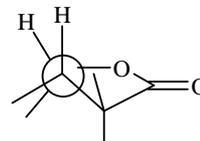
Figure 4: Différents types de squelette des lactones sesquiterpènes naturels. En pointillé : les deux cas possibles de jonction de l'unité  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone sur le cycle B des sesquiterpènes

### 1.2.1. Méthodes d'analyse associées à l'unité $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone des sesquiterpènes

Diverses règles empiriques ont été formulées pour l'étude stéréochimique du cycle lactonique dont la plus utilisée est l'analyse des couplages vicinaux  $^3J_{c,d}$  des protons des têtes de pont H<sub>c</sub> et H<sub>d</sub>. (Fig. 3 ; structure 1, et 2) selon Karplus.<sup>52</sup>



P, *trans*  $^3J_{H,H} > 10$  Hz



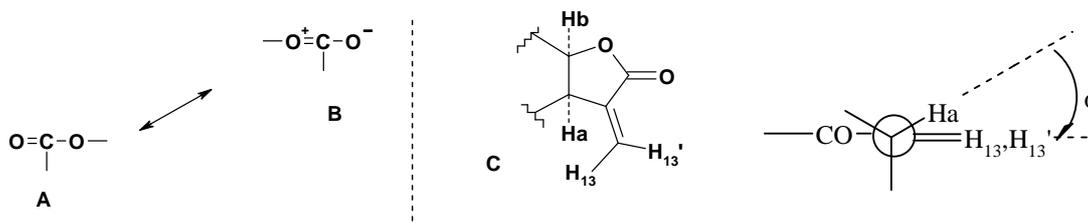
Q, *cis*  $^3J_{H,H} \leq 10$  Hz

D'autres règles basées différentes transformations chimiques et la mesure des constantes de couplages vicinaux des groupements résultants ont été élaborées telles que la règle de Narayna et Venkatasubramaniam,<sup>53</sup> celui de Wolsinky *et coll.*<sup>54</sup> ou encore celle de Snatzke.<sup>55,56</sup> Ce dernier a établi une relation entre la configuration absolue des dérivés pyrazolines et le signe de l'effet Cotton. Mais la solution par transformation en dérivés est rendue compliquée par une possible épimérisation du carbone allylique. A ce problème d'ordre structural se sont ajoutés des problèmes d'ordre pratique en RMN pour l'extraction des signaux des protons H<sub>c</sub> et H<sub>d</sub> qui s'est révélé particulièrement ardue avec les appareils à onde continue 60-100 MHz de l'époque.

#### 1.2.1.1. Utilisation des couplages allyliques pour la détermination de la stéréochimie de fusion de cycle

La recherche sur les couplages allyliques comme critères supplémentaires à la détermination de la stéréochimie de fusion de cycle dans les sesquiterpènes lactones puise son origine d'abord sur des considérations conformationnelles offertes par des études par rayon X, ensuite par des considérations d'ordre pratique RMN.

Les études conformationnelles par rayons X ont montré que la structure de résonance **A** contribue d'une façon appréciable à l'état fondamental du groupement lactone **B**. Dans le cas de la structure **C**, celle-ci peut être stabilisée par conjugaison avec la double liaison exométhylénique. (Schéma 1)



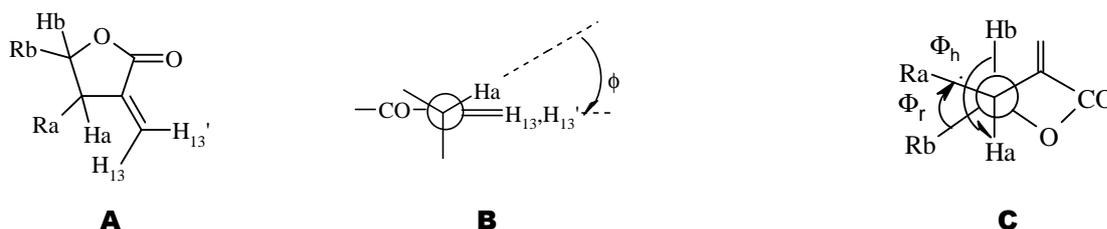
**Schéma 1:** Résonance du lactone et conjugaison dans l'unité  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone

Les conséquences de ce résultat sont importantes : une appréciable limitation de la mobilité conformationnelle du cycle lactonique, une limitation de la variabilité de l'angle dièdre  $\phi$  qui détermine principalement la valeur des constantes de couplage allylique. Ce potentiel d'utilisation d'origine conformationnelle est d'autant plus attrayant que les pics RMN d'intérêt H-13 et H-13' sont facilement reconnaissables et aisément accessibles.

### 1.2.1.2. Considérations RMN d'ordre pratique et règle allylique de Samek

L'utilisation des couplages allyliques, exaltés par le couplage géminé par effet de Van der Waals a été étudiée par Samek pour la configuration des fusions des cycles  $\gamma$ -lactones dans un certain domaine de validité dépendant des différents facteurs (taille, conformation du cycle annulaire ou « l'équatorialité » de la liaison les têtes de pont de cycle). D'une part, contrairement aux protons vicinaux des têtes de ponts H<sub>a</sub> et H<sub>b</sub> (Schéma 1, structure **c**), les signaux des protons exométhyléniques H-13 et H-13' sont facilement identifiables dans les spectres RMN des sesquiterpènes lactones grâce aux indéniables avantages suivants :

- (i) les positions à champ relativement faible aux alentours de 5-6 ppm avec une différence de déplacement chimique interne  $\Delta\delta$  relativement élevée de l'ordre 0,5 à 0,9 ppm ;
- (ii) un rapport signal/bruit élevé ;
- (iii) l'éclatement caractéristique dû aux couplages allyliques allant jusqu'aux alentours de 4 Hz ou plus pouvant être dédoublés par des couplages géminés de 0-2,5 Hz.



L'approche de Samek consiste en considérant la relation entre l'angle dièdre  $\phi$  définissant l'angle allylique entre les protons exométhyléniques ainsi que Ha (**B**) et les angles dièdres  $\Phi_h$  et  $\Phi_r$  respectivement entre les deux protons de tête de cycle Ha et Hb ou entre les restes hydrocarbonés Ra et Rb (**C**) définissant configuration *cis/trans* du cycle lactonique dans la structure partielle (**A**).

Samek a ainsi formulé ses règles « allyliques » compte tenu de ces avantages spectraux de la façon suivante :

**Lactones *trans*-** : Pour les lactones *trans*-, deux configurations du cycle lactonique sont possibles :  $\Phi_r$ , inférieur ou égal à  $120^\circ$ , alors on obtient  $|^4J_{\text{trd}}| \geq 3 \text{ Hz}$  comme typique ;  $\Phi_r$  supérieur ou Ray Freeman and Garetha . Morris, Experimental Chemical Shift Correlation Maps in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, *J.C.S. Chem. Comm.* **1978**, 684-686

égal à  $120^\circ$  ; alors  $|^4J_{\text{trd}}| \leq 3 \text{ Hz}$

**Lactones *cis*-** : Pour les deux intervalles de valeur  $\Phi_r$  ;  $|^4J_{\text{trd}}| \leq 3 \text{ Hz}$  est toujours valide.

## 2. PRINCIPES, MATERIELS ET METHODES

### 2.1. Matériels et méthodes

*Tanacetum densum* sous-espèce *sivasicum* : collectée en Turquie centrale (Sivas) avec un spécimen voucher (N° 200) déposé à l'herbarium de la Faculté des Sciences et Arts, Université de Cumhuriyet, Sivas, Turquie. Le germacranolide **A9** a été isolé et purifié par Dr Nehzun Gorèn *et coll.* (Voir annexes germacranolide, p.112). *Tanacetum densum* sp. *amani* : récolté dans les montagnes de Taurus (Feke-Adana) en Turquie par les auteurs turcs.<sup>57</sup> L'extraction, le fractionnement, l'isolement et purification pour le pyréthroïdine **18** et le parishine **19** ont été effectués par les mêmes auteurs. (Voir annexes guaianolide, p. 114).

*Procédures générales pour RMN.* Les spectres <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C ont été enregistrés sur VARIAN XL-400 (93,94 kG ; <sup>1</sup>H 400 MHz ; <sup>13</sup>C 100 MHz) dans le chloroforme-d<sub>2</sub> et le dichlorométhane-d<sub>2</sub> comme solvants (CHCl<sub>3</sub> δ 7,24 et CDHCl<sub>2</sub> δ 5,32 ; <sup>13</sup>CDCl<sub>3</sub> δ 77,0 et <sup>13</sup>CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> δ 53,8). Les séquences d'impulsion RMN ont été exécutées en utilisant le logiciel standard VARIAN version 6.1c. La séquence FLOCK qui a été ajoutée à la bibliothèque des séquences avec le programme de Reynold.

*Paramètres d'acquisition pour spectres RMN.* Paramètres d'acquisition 1D <sup>1</sup>H à 1 dimension : largeur spectrale (SW) 4000 Hz avec 32 758 points. Pour les spectres de <sup>13</sup>C, la largeur spectrale est de 22 000 Hz avec 32 768 points de données. Spectres 2D COSY, LRCOSY, NOESY : fenêtre spectrale de 3200 Hz, avec 1024 points de donnée ; 256 d'incrément collectés avec 32 transients par incréments complétés à 1024 par remplissage de zéro, délai de relaxation de 1 s ; enregistrement : LRCOSY avec un temps de délai (Δ) de 300 ms avant et après le temps de mixage ; - NOESY : temps de mixage de 800 ms. Spectres de corrélation hétéronucléaire : fenêtre spectrale de 14 000 Hz avec 1024 points complétés à 2048 points par remplissage de zéro ; dans la dimension proton, on a utilisé une fenêtre spectrale de 3200 Hz, 64 incréments de temps (256 transients par incréments) qui ont été complétés à 512 points par remplissage de zéro, un délai de relaxation de 2 s a été utilisé. Spectres HETCOR : délais optimisés pour <sup>1</sup>J<sub>CH</sub> = 140 Hz. Spectres FLOCK : délais optimisés pour <sup>3</sup>J<sub>CH</sub> = 4 et 7 Hz. Spectres SINEPT : délai d'excitation (Δ<sub>1</sub> = 1/2J) et un délai de refocusing (Δ<sub>2</sub> = 1/3J) optimisés pour <sup>3</sup>J<sub>CH</sub> = 4 et 7 Hz avec une fenêtre spectrale de 14 000 Hz. Spectres DNOE : 1024 transients pour chaque saturation (on résonance) et irradiation off résonance (spectres négatifs) acquis en des blocks répétitifs de 16 transients avec un délai d'irradiation de 8 s avant l'acquisition.

*Spectres de masse.* Les mesures de masse en basse résolution et des masses exactes ont été obtenues sur un spectromètre de masse FINNIGAN MAT-90 en ionisation chimique (ammoniac, 140 eV) ou en IE (70 eV). *Spectres UV.* Les spectres UV ont été enregistrés sur HP 8452. *Spectres de dichroïsme circulaire (DC).* Les spectres DC ont été pris sur AVIV 62DS.

## 2.2. Principes sur les méthodologies de purification-identification des mélanges complexes d'intérêt médical (Voie A)

Les méthodes de purification-identification procèdent par étapes bien séparées où les matériaux provenant des diverses matrices complexes préalablement traitées par les méthodes d'extraction seront soumis à des séries séquentielles de séparation et de purification chromatographiques. On procède finalement à l'étude structurale des substances ainsi isolées et purifiées à l'aide des différentes techniques spectroscopiques. Dans ces méthodologies, la RMN joue un rôle à part entière dans le suivi de la purification et surtout dans l'identification structurale des composés isolés. Nous allons donc nous concentrer sur cet aspect RMN dans une brève revue ci-dessous.

En effet, depuis les travaux de Hanh<sup>58</sup> sur l'écho de spin en 1950 et qui ont été cruciaux pour le développement de la RMN moderne et sans lesquels cette dernière n'aurait pas eu sans doute lieu, des multiples bouleversements ont conduit les techniques RMN à son stade actuel.

Aux méthodologies classique de transfert de polarisation depuis les INEPT ou DEPT s'ajoutent les techniques de pompage optique,<sup>59,60</sup> de polarisation nucléaire dynamique<sup>61</sup> ou de techniques de T<sub>J</sub>-DNP (Temperature jump high frequency dynamic nuclear polarization) en passant aux séquences de relaxation de TROSY<sup>62</sup> (Transverse-Relaxation-Optimised Spectroscopy) qui se conjuguent avec les technologies des cryoaimants ainsi que des sondes cryogéniques<sup>63,64,65</sup> pour bouleverser les ordres de grandeur de sensibilité et accroître la résolution. A côté, les méthodologies telles que le gradient de champ pulsé viennent considérablement améliorer l'efficacité des méthodologies RMN 2D aussi bien que 1D. L'introduction d'autres paramètres physico-chimiques tels que le coefficient d'auto diffusion des molécules en corrélation avec les déplacements chimiques <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C a étendu les capacités de la RMN à la séparation « spectrale » et l'identification simultanées des analytes dans des mélanges.<sup>66</sup>

En accord avec l'évolution des technologies qui bouleversent les pratiques et les théories, confirment ou corrigent les règles empiriques, nous allons décrire dans ce paragraphe quelques méthodologies de RMN utilisées lors des nos études structurales sur les lactones sesquiterpéniques.

### 2.2.1. Expérience de spin écho et modification APT

L'expérience de spin écho a été initialement développée par Hanh en 1950 pour étudier la vitesse de relaxation transversale, mais elle est devenue une des composantes-clés à la base des séquences d'impulsions modernes.<sup>67</sup> La séquence peut s'écrire sous la forme simplifiée (diagramme 1) :

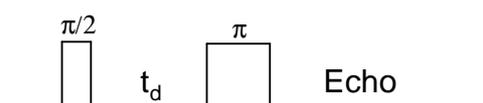


Diagramme 1 : Séquence d'impulsion de base d'expérience de spin écho

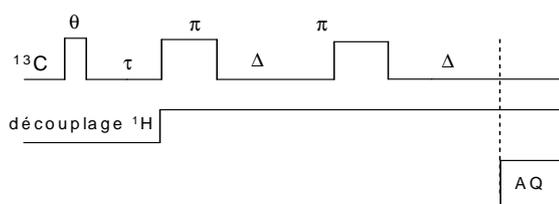


Diagramme 2 : séquence d'impulsion APT

Après l'impulsion de 180° et un temps de délai  $\tau$ , les composantes du vecteur magnétisation se refocussent pour donner une résultante d'amplitude maximale qui est l'écho. Les séquences de

spin écho s'utilisent pour supprimer sélectivement les larges pics qui relaxent plus rapidement que les pics plus fins. L'expérience de J-modulation est une expérience de spin écho modifié appliqué aux systèmes hétéronucléaires. Elle s'utilise beaucoup pour distinguer entre les multiplicités des carbones et s'appelle ainsi **Attached Proton Test** ou APT.<sup>68</sup> La version originale de Shoorley a été améliorée en introduisant un angle de Ernst  $\theta$  optimisé (au lieu de  $90^\circ$ ) et une deuxième période de spin écho. (Voir diagramme 2)

### 2.2.2. Expériences de transfert de polarisation

Les expériences de transfert de polarisation ou d'inversion de population entre des noyaux couples font suite aux recherches sur l'amélioration de la sensibilité des expériences portant sur les noyaux peu sensibles dont le carbone. Elles sont à la base de la conception des nombreuses séquences d'expériences hétéronucléaires à 2 dimensions des noyaux en interaction spin-spin.

#### 2.2.2.1. Expériences de Transfert de polarisation sélectif

On perturbe sélectivement un pic dans l'ensemble du spectre du noyau sensible ( $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ). On obtient un transfert de population qui amplifie le signal du noyau peu sensible ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) qui lui est couplé. Le facteur d'amplification du signal est plus élevé que celui obtenu avec l'effet NOE (Pour le  $^{13}\text{C}$  : NOE 2,99 ; SPI 3,99 ;  $^{15}\text{N}$  : NOE -3,94 ; SPI : 9,87). Si l'on ne parvient pas à une inversion quantitative, on a un simple transfert de polarisation (SPT). Ces techniques s'utilisent avec succès dans l'attribution des signaux. (INEPT, SINEPT, DEPT)

#### 2.2.2.2. Expériences INEPT et SINEPT

Nous allons parler un peu en détail l'expérience INEPT qui est à la base des expériences de transfert de polarisation qui vont suivre et que nous allons utiliser par la suite. C'est une expérience de transfert de polarisation non sélective développée par Morris et Freeman<sup>69</sup> qui utilise l'excitation des échos de spin à la suite d'autres méthodologies d'impulsions sélectives des protons.<sup>70,71,72,73</sup> L'effet total de la séquence est le transfert non sélectif de polarisation des protons (plus sensibles) vers les noyaux hétéro- (moins sensibles) moyennant une valeur appropriée de  $^1J_{\text{HX}}$ . L'effet d'accroissement des signaux par le transfert de polarisation est nettement supérieur à celui effectué par couplage dipolaire (ou NOE) comme le montre le tableau 1 qui suit.

Tableau 1: Comparaison des facteurs d'accroissement des signaux par effet NOE et INEPT de  $^1\text{H}$

X	$^{11}\text{B}$	$^{13}\text{C}$	$^{15}\text{N}$	$^{29}\text{Si}$	$^{57}\text{Fe}$	$^{103}\text{Rh}$	$^{109}\text{Ag}$	$^{119}\text{Sn}$	$^{183}\text{W}$
NOE	2.56	2.99	-3.94	-1.52	16.48	-16.89	-9.75	-0.41	13.02
INEPT	3.12	3.98	9.87	5.03	30.95	31.77	21.50	2.81	24.04

Elle fournit une alternative aux expériences ultérieures de « rotating frame cross-polarization »,<sup>74,75</sup> initiées par Hartmann et Hanh<sup>76</sup> ou l'expérience DEFT de Becker *et coll.*<sup>77</sup> Ces expériences INEPT se sont évolués vers les techniques avec découplage durant l'acquisition. Les expériences INEPT sont actuellement utilisées couramment pour les RMN du solide, par exemple pour l'attribution spectrale des atomes Al et P dans les motifs de composés minéraux.<sup>78</sup> Leurs variantes en 2D sont utilisées par ailleurs dans l'analyse des lipides dans les biomembranes ;<sup>79</sup> dans les composés contenant à la fois des différents hétéronoyaux tels que le carbone-13 et l'azote-15 en expériences avec double sélectivité.<sup>80</sup>

**Technique SINEPT.** La SINEPT « Selective INEPT »<sup>81</sup> dérive de la technique INEPT développé par Freeman *et coll.* (voir ci-dessus) On irradie un proton spécifique, et on détecte sur le spectre les carbones possédant un couplage à longue portée avec ce proton ( ${}^2J_{CH}$ ,  ${}^3J_{CH}$ ).

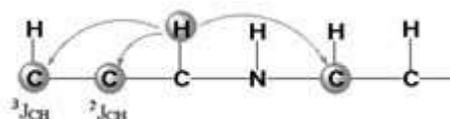


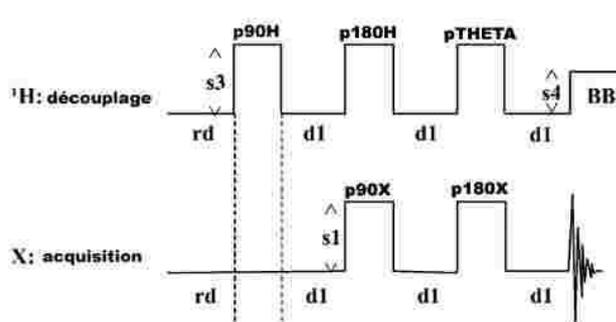
Figure 5: Connectivité en expérience SINEPT

Expérience SINEPT : l'intensité des pics détectés dépend de l'optimisation de délai entre les impulsions qui est fonction de  ${}^nJ_{CH}$ , typiquement de 5-10 Hz.

Cette technique 1D est préférable à la place des techniques à 2 dimensions lorsqu'il s'agit de travailler sur un nombre limité de carbone/proton. Dans ce cas, il s'avère très utile dans l'attribution spectrale des carbones quaternaires. La séquence dérive de l'expérience de « refocused INEPT » avec découplage du proton sur large bande. Le SINEPT a été beaucoup utilisé en tandem avec d'autres méthodologies RMN pour l'étude de structure. Mais la séquence tombe en désuétude avec l'avènement des méthodologies en détection inversée comme le HMBC et les techniques de champ de gradient pulsé qui rendent les mesures beaucoup plus sensibles et beaucoup plus rapides. Elle a trouvé toutefois un nouveau terrain de prédiction avec la RMN des composés minéraux et organométalliques.

### 2.2.2.3. Expériences DEPT

Le spectre DEPT, développé par Bendall *et coll.*,<sup>82</sup> résulte aussi d'une expérience de transfert de polarisation du proton vers le carbone, noyau moins sensible. Mieux que l'APT, il permet de rendre compte directement les multiplicités des carbones protonés et différencie les méthyles, les méthylènes, les méthines. Les carbones quaternaires seront absents des spectres.



Paramètres de la séquence DEPT avec découplage

p90X ( $\mu$ s) : transmetteur RF à haute puissance à  $90^\circ$  ; p180X ( $\mu$ s) transmetteur à RF haute puissance de  $180^\circ$  ; p90H : découpleur à haute puissance RF à  $90^\circ$  ; p180H : découpleur à haute puissance RF à  $180^\circ$  ; s1 : niveau d'atténuation des radios fréquences à haute puissance pour X ; s3 : niveau d'atténuation des radios fréquences à haute puissance pour 1H ; s4 : niveau d'atténuation des radios fréquences à basse puissance pour découplage sur large bande (BB) ; pTHETA : découpleur RF à haute puissance de  $45, 90$  or  $135^\circ$  ( $\mu$ s) ;

Diagramme 3 : séquence DEPT avec découplage

### 2.2.3. Expériences de corrélation par couplage scalaire proton-proton à 2 dimensions

**Expérience COSY.** L'expérience de corrélation par couplage scalaire à 2 dimensions (COSY) de Jeneer en 1971 a été historiquement à la base des concepts de spectres à deux dimensions.<sup>83</sup> Mais ce n'est qu'à partir de 1981 qu'elle devient vraiment opérationnelle après les travaux intensifs d'Aue, Bertholdi et Ernst publiés en 1976.<sup>84</sup> Le COSY utilise le couplage scalaire entre protons pour produire des corrélations entre les déplacements chimiques des protons sur les deux axes F1 et F2. La séquence impulsionnelle de base comprend deux impulsions à  $90^\circ$  chacune (COSY  $90^\circ$ ). Nous avons utilisé une version avec la deuxième

impulsion valant  $45^\circ$  pour réduire le nombre de réponses non pertinentes et on applique une opération finale de symétrisation pour diminuer ou éliminer les bruits.

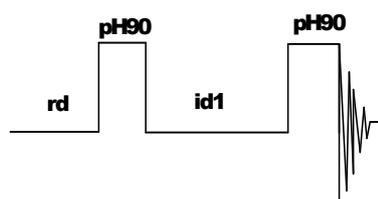


Schéma 2: séquence de COSY90

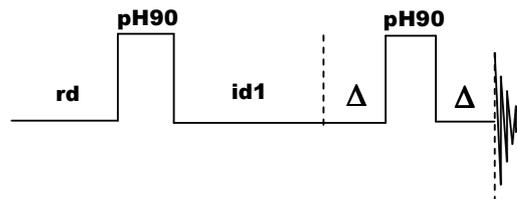


Schéma 3: séquence de LRCOSY

**Expériences 2D de couplage scalaire  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ .** **rd** : délai de relaxation permettant le retour à l'équilibre entre deux impulsions (ms) ; **id1** : délai d'évolution incrémentée avec valeur de départ égal à  $1/\text{SW}$  (ms) ; **p90** : impulsion de  $90^\circ$  du transmetteur ( $\mu\text{s}$ ) ; **p90** : impulsion de  $90^\circ$  du transmetteur ( $\mu\text{s}$ ) ; réduite à  $45^\circ$  dans le COSY 45. Le DQF-COSY utilise une troisième impulsion de  $90^\circ$  pour « filtrage quantique » qui réduit les pics des méthyles très intenses pouvant cacher les pics des couplages d'intérêt plus faibles. Le LRCOSY s'obtient en insérant un délai fixe  $\Delta$  avant et après la deuxième impulsion **p90**. On choisit  $\Delta$  de telle façon que  $\text{rd} = T_2 - \Delta$  et  $\text{id}_1 = T_2 - \Delta$ . On peut choisir avantageusement la deuxième impulsion avec un angle  $60^\circ$ .

Le COSY est parmi les expériences 2D les plus courts, il commence la série des méthodologies RMN dans les études structurales. Avec l'avènement de gradient des champs pulsés, (gCOSY) on peut obtenir un spectre en 5 mn.

**Expérience de LRCOSY.**<sup>85</sup> Cette expérience permet de détecter des pics de corrélation des constantes de couplage relativement faibles (à partir de 2 Hz) et qui ne sont pas observables avec COSY 90 ( $^1\text{J} \leq 1\text{Hz}$  :  $n=3,4,5\dots$ ). Les expériences de LRCOSY ont été utilisées beaucoup pour « traquer » les faibles couplages. Par exemple, Wynants *et coll.* les ont utilisé pour les couplages à longue distance des peptides cycliques,<sup>86</sup> tandis que Sydnès et Skjetne les ont employés pour l'étude des benzo[e]pyrènes<sup>87</sup> et Sakai *et coll.* pour l'élucidation structurale du macrolide misakinolide-A.<sup>88</sup> Mais les expériences de MQF (multiple quantum filtration) de Ernst *et coll.*,<sup>89</sup> de TOCSY<sup>90</sup> (Total Correlation Spectroscopy) ainsi que les expériences de HOHAHA (Homonuclear Hartmann-Hahn)<sup>91</sup> offrent des alternatives potentiellement supérieures aux expériences de LRCOSY.

#### 2.2.4. Expériences de couplage scalaires hétéronucléaires à deux dimensions

**Expérience HETCOR.** Développé par Bax et Morris,<sup>92</sup> l'expérience de corrélation hétéronucléaire HETCOR est l'analogue du COSY avec un noyau hétéronucléaire (en l'occurrence  $^{13}\text{C}$ ) en seconde dimension. On exploite les couplages scalaires directs  $^1\text{J}_{\text{CH}}$  (100-280 Hz) entre le proton et le carbone auquel il est lié permettant le transfert d'aimantation du proton au carbone (le noyau le moins sensible).

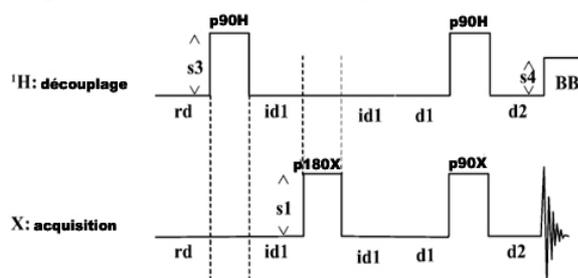


Diagramme 4 : séquence de base HETCOR

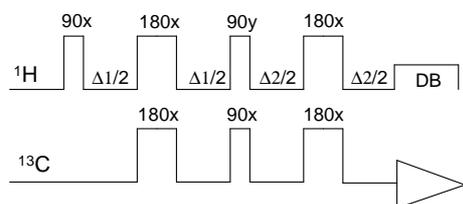
**Paramètres de la séquence HETCOR :** **s1** : niveau d'atténuation des radio fréquences à haute puissance pour X ; **s3** : niveau d'atténuation des radio fréquences à haute puissance pour  $^1\text{H}$  ; **s4** : niveau d'atténuation des radio fréquences à basse puissance pour découplage sur large bande (BB) ; **p90X** ( $\mu\text{s}$ ) : transmetteur RF à haute puissance à  $90^\circ$  ; **p180X** ( $\mu\text{s}$ ) transmetteur à RF haute puissance de  $180^\circ$  ; **p90H** : découpleur à haute puissance RF à  $90^\circ$  ; **id1** (ms) : délai d'évolution incrémentée : valeur de départ :  $1/2\text{SW}$  ; **rd** (ms) : délai de relaxation ; **d1** : délai =  $1/2^1\text{J}_{\text{XH}}$  ; **d2** : délai =  $1/3^1\text{J}_{\text{XH}}$  pour toutes les multiplicités ; NS : nombres de balayages : multiple de 4.

**HECTOR (basé sur INEPT<sup>93</sup>).** **rd** : le délai de relaxation en général : 1,3-1,5T1 ou T1 ( $^1\text{H}$ ) ; **d1** :  $\text{J}_{\text{XH}}$  : avec X =  $^{13}\text{C}$ , moyenne de  $^1\text{J}_{\text{CH}}$  : 135 Hz par défaut correspondant à 3,7 ms. Pour un composé inconnu on utilise une moyenne de 155 Hz. Pour les cas des composés purement

aliphatiques, les constantes de couplage peuvent varier de 125 Hz à 145 Hz (carbone portant des groupements hydroxyles par exemple), on peut prendre alors une moyenne de 135 Hz (correspondant à un délai de relaxation  $\tau_d$  de 3,7 ms). Pour des composés contenant des fragments vinyliques avec des couplages allant jusqu'à 165 Hz, on aura une moyenne de 145 Hz (3,45 ms), tandis que pour des composés purement aromatiques, les couplages peuvent varier de 165 à 185 Hz.

Pegg *et coll.* ont élaboré des expériences de corrélation hétéronucléaires basées sur la séquence DEPT,<sup>94</sup> ces expériences se sont évoluées en utilisant le DEPT comme base pour transfert de polarisation en remplaçant l'impulsion de  $180^\circ$  de « recentrage » par une séquence de découplage proton-proton à large bande (BIRD).<sup>95</sup> Actuellement, les techniques HETCOR s'utilisent aussi largement en RMN du solide avec les composés minéraux tels que le  $\text{AlPO}_4\text{-5}$ <sup>96</sup> comportant différents noyaux hétéronucléaires en expérience de double résonance. De nos jours, on utilise les expériences en détection inverse dérivant des concepts de cohérence à multiple quantum initiés par Müller,<sup>97</sup> développées par Ernst *et coll.*<sup>98</sup> avant les classiques expériences de Bax et Freeman plus abordables expérimentalement. Pour les  $^1\text{J}_{\text{CH}}$ , le HMQC (heteronuclear multiple quantum coherence) est donc plus sensible que le HETCOR, le HSQC (single quantum coherence) similaire au HMQC mais plus sensibles avec les méthines (CH).

**Corrélation hétéronucléaire à longue distance.** L'idée d'utiliser les couplages hétéronucléaire à longue distance ( $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ,  $n = 2,3,4$ ) pour la corrélation des déplacements chimiques remonte en 1980 avec Hallenga et van Binst.<sup>99</sup> Mais il aura fallu attendre les travaux de Freeman et Morris utilisant les transferts de polarisation à longue distance basés sur les séquences INEPT ou ceux de Levitt *et coll.*<sup>100</sup> utilisant des expériences basées sur des séquences DEPT pour le développement des méthodologies utilisant le concept de Binst.<sup>101</sup>



En général les valeurs de  $\Delta 1$  et  $\Delta 2$  dépendent des cas, ils peuvent être égaux, dépendant de valeur  $^n\text{J}_{\text{CH}}$  que l'on prend. On doit tester 2 ou 3 spectres 2D, mais on peut avoir comme règle:  $\Delta 1 = 1/2\text{J}_{\text{CH}}$ ;  $\Delta 2 = 1/3\text{J}_{\text{CH}}$  moyennant  $^3\text{J}_{\text{CH}}$ .

Diagramme 5 : séquence FLOCK

Nous avons utilisé dans notre travail la séquence FLOCK de Reynolds<sup>102</sup> pour les couplages à longue distance basée sur la séquence de Freeman avec l'optimisation des délais  $d1$  et  $d2$  (voir séquence pour HETCOR) dont une valeur de 10 Hz constitue en général, un point de départ raisonnable. Le COLOC (Correlated Long Range Coupling) constitue une autre alternative pour la corrélation hétéronucléaire à longue distance.<sup>103</sup> Mais toutes ces expériences sont supplantées par les expériences à détection inverses telles que le HMBC (Heteronuclear multiple bond correlation) qui permet d'obtenir des spectres 2D en des temps relativement courts.

### 2.2.5. Expériences de couplage dipolaire proton-proton NOESY et DNOE

**Expérience 2D NOESY.** La séquence NOESY a été publiée par Ernst *et coll.* en 1979.<sup>104</sup> La technique permet de calculer des distances interatomiques au moyen des taches de

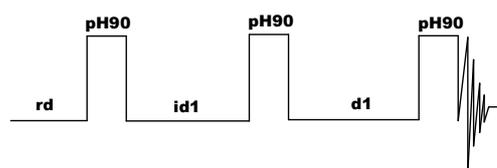


Diagramme 6: Séquence de base NOESY

**Paramètres NOESY.** **pH90** : transmetteur RF à haute puissance de  $90^\circ$  ( $\mu\text{s}$ ) ; **id1** : délai d'évolution incrémentée, valeur de départ =  $1/\text{SW}$  (ms) ; **d1** : délai de mixage ou MIX (ms) qui précède le temps d'acquisition ; **rd** : délai de relaxation (ms) ; **NS** : nombre de balayage (multiple de 8). Pour des petites molécules, le délai de mixage est généralement 80% du délai de relaxation ; pour des molécules plus grandes, ils sont plus courts pour éviter les problèmes de diffusion de spin.

corrélations hors diagonal qui traduisent une certaine distance spatiale (2 à 5 Angströms). Le NOESY, ne permet de distinguer que difficilement entre taches de corrélation provenant des effets nOe et celles provenant des échanges chimiques ou d'échanges conformationnelles que pour les petites molécules avec les pics d'échange en phase positive et les pics nOe en phase négative. Pour les molécules plus grandes avec des temps de corrélation plus courte, ces pics se confondent et on alors recours aux expériences de NOESY en repère tournant ou ROESY. L'utilisation du gradient de champ pulsé (gNOESY) permet de réduire considérablement le temps d'enregistrement des spectres.

**Différence NOE ou DNOE.** La DNOE est une expérience à 1D utilisée surtout pour détecter des signaux NOE dans les petites molécules pour résoudre ponctuellement un petit nombre des pics dans un spectre plutôt bien dégagé. Le DNOE fait partie des techniques de double résonance avec un deuxième champ B2 pour irradiation.

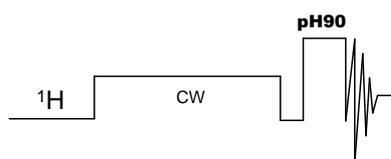


Diagramme 7: Séquence de différence NOE ou DNOE

Pour un premier spectre, la résonance d'intérêt est sélectivement irradiée avec un long RF continue à faible puissance suivie d'une impulsion de  $90^\circ$ . Pour le second spectre, l'irradiation est effectuée dans une zone vide de tout pic par la même séquence. La différence NOE est obtenue en faisant la soustraction entre les deux spectres.

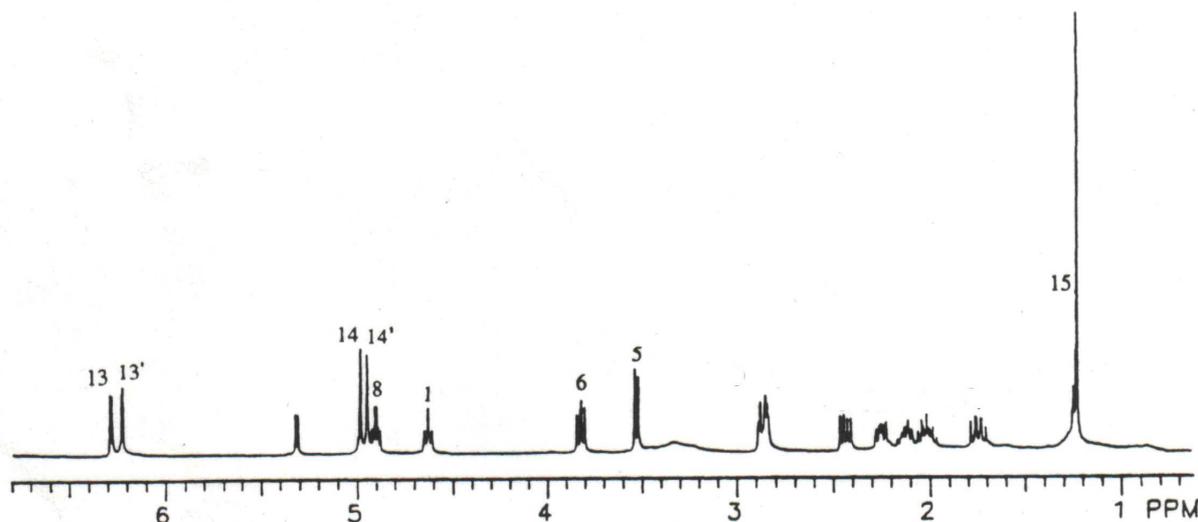
Ces techniques sont largement utilisées pour les études structurales, stéréochimiques, conformationnelles des molécules ainsi que de leur mouvement.

### 3. RESULTATS ET DISCUSSIONS SUR LES ETUDES STRUCTURALES DU GERMACRANOLIDE A9 ET DU GUAIANOLIDE TD15 PAR UTILISATION CONCERTEE DES TECHNIQUES RMN 1D ET 2D

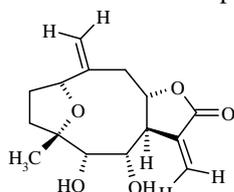
Nous avons vu les généralités sur la classe des lactones sesquiterpéniques contenant l'unité structurale  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone à laquelle appartiennent le germacranolide A9 et le guaianolide TD15, objets de notre étude (parag. 1.). Nous avons survolé dans le paragraphe 2 les méthodologies de purification-identification utilisées pour l'isolement et la purification des isolats des plantes médicinales en nous nous limitant sur l'aspect RMN, ainsi que les matériels et méthodes utilisés au cours de nos travaux. Nous allons aborder dans cette section les résultats et les discussions concernant le germacranolide A9 issu du *T. densum* de la sous-espèce *sivasicum* (3.1.) et le guaianolide TD15 issu de la sous-espèce *amani* (3.2) qui nous ont été fournis par Dr Gören *et coll.*

#### 3.1. Etudes structurales et stéréochimiques du germacranolide A9 issu du *T. densum* ssp. *sivasicum*

Les spectres de A9 ont été enregistrés successivement dans le chloroforme- $d_1$  et le dichlorométhane- $d_2$ . Une meilleure dispersion spectrale de A9 a été obtenue dans le dichlorométhane- $D_2$  comme solvant où 17 protons magnétiquement différents sont observés. Les spectres de proton ainsi obtenus renferment des caractéristiques propres aux lactones sesquiterpéniques que l'on obtient des espèces provenant de la famille des *Asteracea*. (spectre 2)



Spectre 1 : Individualisation des signaux  $^1\text{H}$  dans le dichlorométhane- $d_2$  de A9.



**1**

Diol *cis*-germacranolide

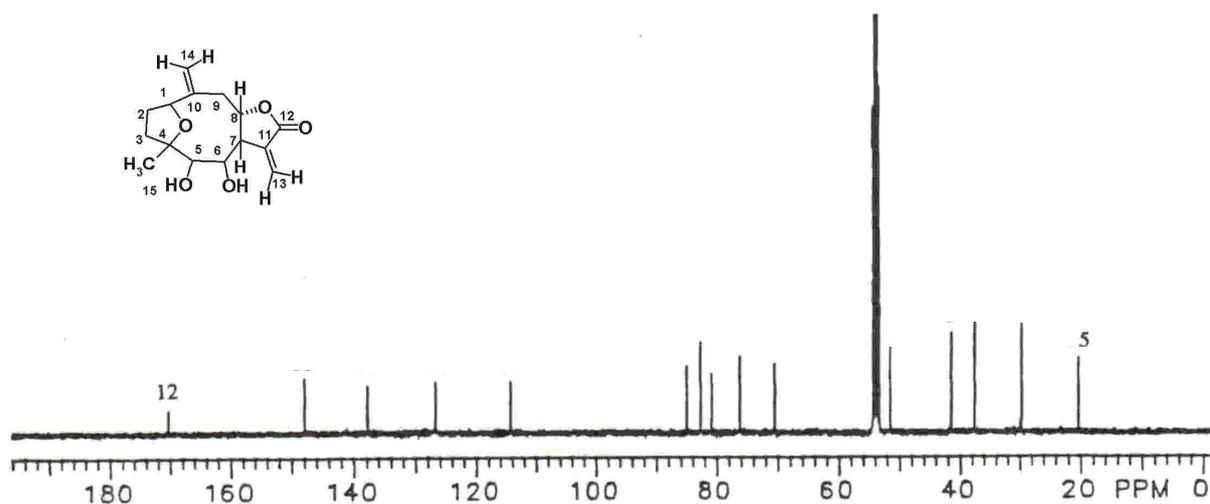
Le spectre proton de A9 pris dans le  $\text{CDCl}_3$  rendant compte pour les 18 protons magnétiquement différents de la molécule montre une similarité avec le spectre de l'isomère diol *cis*-germacranolide **1** isolé par Gorèn.<sup>105</sup>

Ainsi, on remarque les « empreintes digitales » de l'unité  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone se démarquent avec le doublet des protons H-13 (6,30 ppm) et H-13' (6,23 ppm). Les autres empreintes digitales de la molécule sont formées par les protons exométhyléniques à 4,95 ppm et 5,00 ppm portés par le C-14. Un excellent point d'entrée est constitué par le triplet bien dégagé de H-1 à 4,64 ppm. Les protons attachés aux carbinols à 3,55 et à 3,84 ppm et le proton attaché au carbone éther à 4,93 ppm constituent des maillons dans l'établissement des systèmes de spin.

Un va-et-vient entre l'étude des couplages, des corrélations (spectre COSY **5**, HETCOR) permet de résumer une comparaison des constantes de couplage des 18 protons dans le  $\text{CDCl}_3$  et des 17 protons dans  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  dans le tableau **2** ci-après.

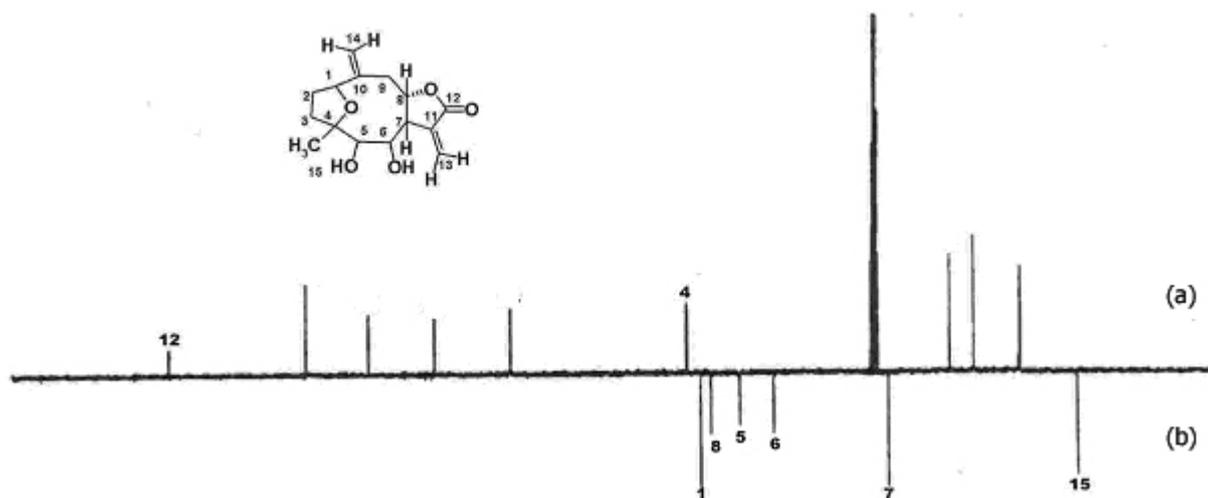
Tableau 2: Comparaison des constantes de couplages des 18 protons de A9

Proton	$\delta^1\text{H}$ (ppm, $\text{CDCl}_3$ ) ; J (Hz)	$\delta^1\text{H}$ (ppm, $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ) ; J(Hz)
1	4,64 (dd ; J = 7,3; 7,3)	4,63 (dd ; J = 7,4; 7,3)
2 $\alpha$	2,03 (dddd ; J = 13,7; 10,7; 7,8; 7,3)	2,04 (dddd ; J = 13,7; 10,8; 8,1; 7,3)
2 $\beta$	2,14 (dddd ; J = 13,7; 8,9; 7,3; 2,3)	2,18 (dddd ; J = 13,7; 9,4; 7,4; 2,4 )
3 $\alpha$	2,27 (ddd ; J = 12,5; 7,8; 2,3)	2,27 (ddd ; J = 12,7; 8,1; 2,4)
3 $\beta$	1,77 (ddd ; J = 12,5; 10,7; 8,9)	1,78 (ddd ; J = 12,7, 10,0; 9,4 )
5	3,55 (d ; J = 7,60)	3,53 (d ; J = 7,80)
6	3,84 (dd ; J = 9,0; 7,6)	3,83 (dd ; J = 8,7; 7,8)
7	2,86 (superposition)	2,84 (superposition)
8	4,93 (ddd ; J = 7,5; 7,5; 4,4)	4,93 (superposition)
9 $\alpha$	2,44 (dd ; J = 14,6; 7,5)	2,39 (dd ; J = 14,5; 8,0)
9 $\beta$	2,89 (dd ; J = 14,6; 4,4)	2,93 (dd ; J = 14,5; 4,9)
13	6,23 (dd ; J = 3,1; 1,5)	6,20 (dd ; J = 2,7; 1,1)
13'	6,30 (dd ; J = 2,8; 1,5)	6,39 (dd ; J = 3,1; 1,1)
14	4,96 (s, élargi)	4,95 (s ; élargi)
14'	5,00 (s ; élargi)	4,97 (s ; élargi)
15	1,23 (s)	1,23 (s)
OH	3,35 (s ; élargi)	3,60 (s ; élargi ; 2H)
OH	3,45 (s ; élargi)	

Spectre 2 : Spectre de carbone-13 de A9 dans  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ 

Les spectres de carbone ont été enregistrés dans le dichlorométhane- $d_2$  et rendent compte pour 15 carbones analysés en spectrométrie de masse HRMS. Le pic du méthyle et celui du carbonyle sont aisément reconnaissables à leur déplacement respectivement à champ fort à 20,2 ppm ( $^1\text{H}$  1,23 ppm) et à l'autre extrémité vers le champ faible à 170,5 ppm (C-12). Les autres carbones quaternaires insaturés sont regroupés dans la région bien dégagée entre 110-180 ppm, il en est de même des carbinols C-5, C-6 et des carbones C-O- en C-8, C-1 et C-4 groupés entre 70 et 96

ppm. Les autres pics de résonances de carbone saturés se situent entre les pics de solvant et celui du méthyle C-15.



**Spectre 3:** Spectre APT de **A9** dans le dichlorométhane-d<sub>2</sub>.

**APT :** (a) carbones secondaires et quaternaires ; (b) carbones primaires et tertiaires ; solvant : CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ; 15 : 76,2 ppm CH ; 7 : 51,4 ppm CH ; 6 : 70,5 ppm CHOH ; 5 : 76,2 ppm CHOH ; 8 : 80,9 ppm CHOC- ; 1 : 82,6 CHOC- ; 4 : 85,0 ppm HCOC- ; 12 : 170,5 ppm >C=O.

L'APT rend compte pour les 5 carbones tertiaires et 1 méthyle à 20,2 ppm (pics inversés), les neuf autres pics des carbones secondaires et les carbones quaternaires (carbonyle à 170,5 ppm, carbones oléfiniques respectivement à 147,9 ppm ; 137,7 ppm ; 126,8 ppm). Cette étude de multiplicité a été complétée par les données DEPT

Tableau 3 : **Multiplicité des carbones déterminés de A9 par DEPT dans le dichlorométhane-d<sub>2</sub>.**

$\delta$ (ppm)	multiplicité	$\delta$ (ppm)	Multiplicité
51,4	d	147,9	s
70,5	d	170,5	s
76,2	d	37,5	t
80,9	d	39,7	t
82,6	d	41,4	t
20,2	q	114,3	t
85,0	s	126,8	t
137,7	s		

Nous avons continué le travail sur A9 avec une hypothèse de structure basée sur **1**. Cette étude sur A9 va comprendre trois parties : les attributions spectrales spécifiques dans A9 ; (**3.1.1**) ; l'établissement de la structure de A9 (**3.1.2**) l'étude des relations stéréochimiques et l'établissement de la stéréochimie absolue des carbinols vicinaux ainsi que de la molécule (**3.1.3**).

### 3.1.1. Attributions spectrales spécifiques dans A9

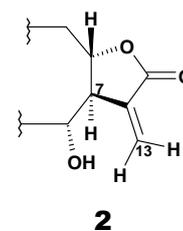
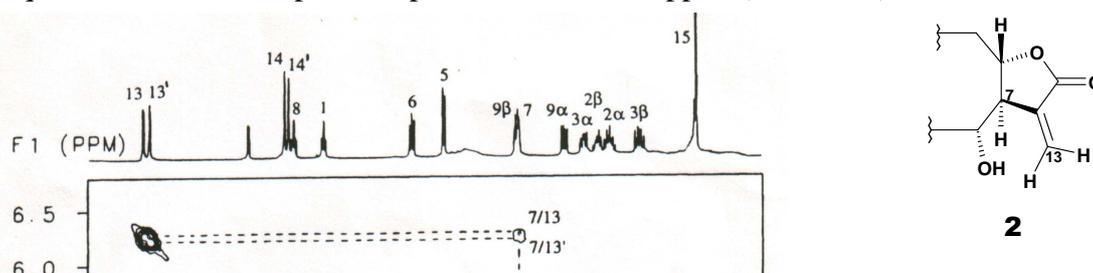
Nous allons déterminer en premier lieu des empreintes digitales et des points d'entrée contenus dans la molécule.

### 3.1.1.1. Empreintes digitales et points d'entrée d'étude structurale

Les empreintes digitales sont des pics caractéristiques d'une molécule pouvant offrir des indices intéressantes pour la présence d'une classe de composé. Les points d'entrée quant à eux, offrent des points de départ pour l'étude de connectivité ou de relation spatiale de la molécule. Pour la molécule A9, le proton H-1 du carbone C-1 (82,6 ppm ; confirmé par HETCOR) portant l'éther du cycle furannique en  $\alpha$  de la double liaison exométhylénique et se situant à une position bien dégagée de 4,64 ppm constitue un point d'entrée évident. Les protons exométhyléniques en C-13 et en C-14 qui sont parmi les empreintes digitales de la molécule offrent en même temps d'excellents points d'entrée.

#### 3.1.1.1.1. Protons exométhyléniques du cycle lactonique de la molécule A9

Les protons exométhyléniques H-13 et H-13' caractérisant les empreintes digitales des spectres des lactones sesquiterpéniques se remarquent d'emblée sur les spectres que ce soit dans le chloroforme- $d_1$  ou dans le dichlorométhane- $d_2$ . Dans ce dernier solvant, on remarque une meilleure dispersion spectrale  $\Delta\delta$  de 0,19 ppm. (Tableau 4)

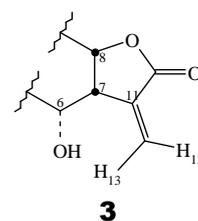


Spectre 4 : Spectre partiel de COSY montrant les couplages entre les protons H-13, H-13' et 7

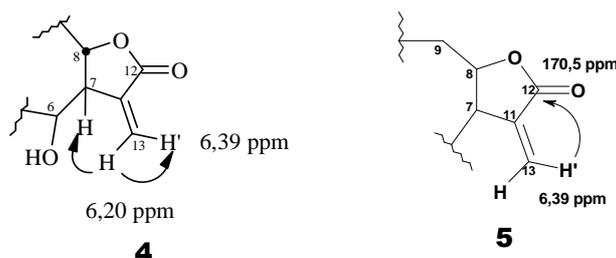
Les doublets proviennent du couplage géminé entre les deux protons. Empiriquement, le proton 13' est celui qui est *syn* carbonyle avec un déplacement chimique à champ plus faible induit par l'effet de Van der Waals de groupement hydroxyle en  $\beta$  de la double liaison.<sup>106</sup>

Tableau 4: Paramètres des doublets des protons méthyléniques de 3.

Position	<sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> )		<sup>1</sup> H (CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	
	$\delta$ (ppm)	J (Hz)	J (Hz)	$\delta$ (ppm)
13	6,23 (dd, 1H)	3,1 ; 1,5	2,7 ; 1,1	6,20 (dd, 1H)
13'	6,30 (dd, 1H)	2,8 ; 1,5	3,1 ; 1,1	6,39 (dd, 1H)



Les données sont compatibles avec la structure partielle **3** rationalisée dans le tableau ci-dessus suivant les couplages allyliques et géminés selon les études de Marbry et Samek. Ce couplage géminé est exalté sous l'effet de Van der Waals exercé par la proximité d'un alcool en  $\alpha$  de la jonction du cycle lactonique.

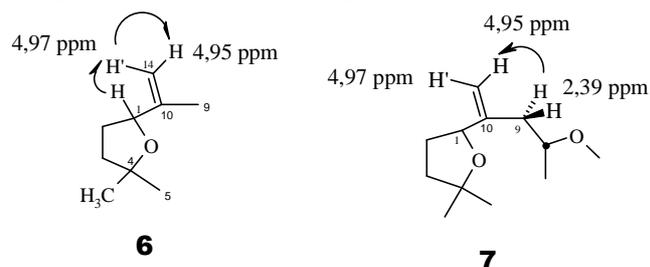


Notons que le NOE observé entre H-7/H-13 (4) a permis de supporter expérimentalement l'attribution de la résonance à plus champ faible au proton H-13' en *syn* du carbonyle sur la base des déplacements chimiques dans le tableau 3.

**Attribution spectrale H-13' par SINEPT.** Une ultime expérience d'irradiation sélective (SINEPT) (5) du proton en *syn* du carbonyle a provoqué un transfert de polarisation au carbone du carbonyle qui quoique faible supporte l'effet par NOE et par suite confirme sans équivoque l'attribution spectrale de H-13' en *syn* du carbonyle.

### 3.1.1.1.2. Protons exométhyléniques du cycle germacrane

Une faible absorption IR à  $1660\text{ cm}^{-1}$ , typique d'un groupe méthylène exocyclique rend compte d'un deuxième groupe méthylénique exocyclique en C-14:  $^1\text{H NMR } \delta$  4,96 (s, élargi ; H-14), 5,00 (s, élargi ; H-14') dans le  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ .



Ces protons constituent d'excellents points d'entrée pour la corrélation proton-proton au cours de la détermination structurale. L'irradiation sélective du proton H-1 (1D DNOE) produit un NOE positif sur H-14' et un NOE négatif sur H-14 (6).

En même temps, il se produit un NOE sur H-9 $\beta$ , ce qui a permis de différencier les protons diastéréotopiques en C-9 (7). Les attributions spectrales des protons (H-14) sont en plus supportées par un NOE sur H-14 sur irradiation de H-9 $\alpha$  (7). On peut procéder de la même façon, pour attribuer les protons diastéréotopiques portés par les carbones C2, C3, C9.

### 3.1.1.1.3. Les protons hydroxyliques de la molécule A9

Le spectre de protons dans le  $\text{CDCl}_3$  révèle la présence de deux protons hydroxyliques  $\delta$  3,35 (s, élargi); 3,45 (s, élargi). Ces pics se superposent dans le dichlorométhane- $d_2$  en un singulet élargi pour 2 protons à 3,60 ppm. Les déplacements chimiques de ces protons hydroxyliques dépendent de la concentration. En solution très diluée dans le  $\text{CDCl}_3$ , on a pu observer les couplages de ces protons hydroxyliques avec les protons H-5 et H-6 :  $\delta$  2,79 (d,  $J = 4,2\text{ Hz}$ , 5-OH) et  $\delta$  2,89 (d,  $J = 3,4\text{ Hz}$ , 6-OH).

### 3.1.1.2. Confirmation des attributions spectrales des protons par NOE

Les études par NOEs permettent de confirmer et de préciser les attributions spectroscopiques des pics de résonance. En général, le NOESY (à deux dimensions) donne d'emblée une « topographie d'ensemble » des relations de voisinage des divers atomes de la molécule, permettant ainsi de guider une irradiation sélective par DNOE.

Tableau 5: Diagnostic de DNOE pour A9.

Irradiation	NOE observé	Irradiation	NOE observé
H-1	H-9 $\beta$ ; H-14'	H-8	H-6 ; H-9 $\beta$
H-3 $\alpha$	H-15	H-9 $\alpha$	H-5 ; H-15
H-3 $\beta$	H-15	H-13	H-7 ; H13'
H-5	H-2 $\alpha$ ; H-3 $\alpha$ ; H-7 ; H-9 $\alpha$	H-13'	H-13
H-6	H-8 ; H-15	H-15	H-3 $\beta$ ; H-6

### 3.1.1.2.1. Confirmation des attributions spectrales par NOE

Les attributions spectrales des protons méthyléniques diastéréotopiques du pont tétrahydrofurane ont été confirmées grâce aux NOEs observés dans le spectre NOESY à partir de H-1  $\delta$  (4,63) ; vers H-2 $\beta$   $\delta$  2,18 et H-3 $\beta$   $\delta$  1,78 ppm. De la même façon, l'attribution des protons diastéréotopiques H9 $\alpha$  et H9 $\beta$  du carbone C-9 du cycle en C8 se détermine par inspection du spectre 2D NOESY des corrélations du proton H-1 avec ces protons. Une ultime expérience de DNOE par irradiation du proton H-1 supporte en plus ces observations en expériences 2D.

### 3.1.1.2.2. Confirmation des attributions spectrales des protons exométhyléniques

Les couplages allyliques, quoique faibles ont été observés entre H-1 et H-14' d'une part, et entre H-9 $\alpha$  et H-14 d'autre part. Ces deux protons ont été aussi différenciés sur la base des observations NOE. Ainsi en DNOE, on observe un transfert de polarisation de H-1 vers H-14' induisant un NOE négatif. L'attribution des protons exométhyléniques en C-13 du cycle lactonique a fait l'objet de nombreuses investigations. Nous avons mené une expérience SINEPT sur le carbone C-11 du carbonyle pour corroborer les règles empiriques de Samek. L'irradiation du proton H-13' provoque un transfert de polarisation observable vers le carbone C-11 du carbonyle. Cette expérience ultime, est donc en support des observations NOE et a validé la méthode d'attribution de Samek.

Tous ces résultats conduisent à l'établissement de la structure du germacranolide avec attribution complète des résonances des protons et des carbones résumés dans le spectre **5** et le tableau **6** qui suivent.

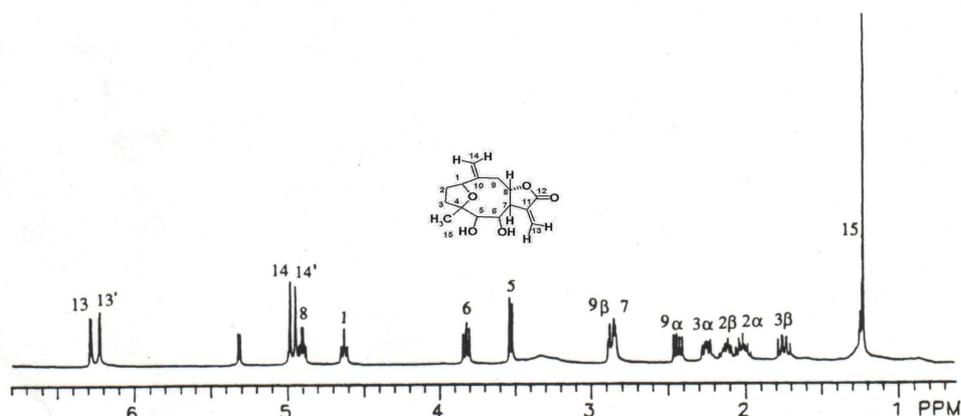
Spectre **5** : Attribution des pics dans le spectre de proton de A9

Tableau 6 : Attribution complète des protons de A9

Proton	$\delta^1\text{H}$ (ppm, $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )	Proton	$\delta^1\text{H}$ (ppm, $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )
1	4,63	9 $\alpha$	2,39
2 $\alpha$	2,04	9 $\beta$	2,93
2	2,18	13	6,20
3 $\alpha$	2,27	13'	6,39
3 $\beta$	1,78	14	4,95
5	3,53	14'	4,97
6	3,83	15	1,23
7	2,84	OH	3,60
8	4,93	OH	

L'attribution complète des carbones est donnée ci-dessous.

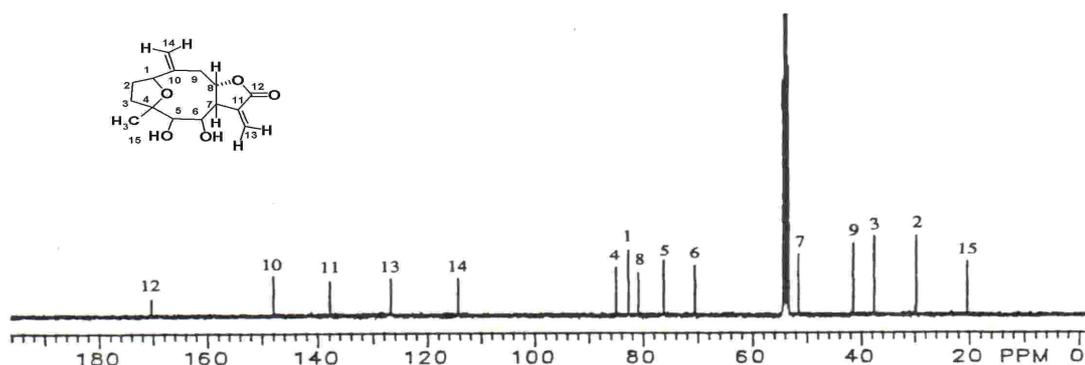
Spectre 6 : Attribution des pics de résonance des carbones de A9 dans  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ 

Tableau 7 : Attributions spectrales des carbones de A9

Position	$^{13}\text{C}$ (ppm, $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )	Position	$^{13}\text{C}$ (ppm, $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )
1	82,6	9	41,4
2	39,7	10	147,9
3	37,5	11	137,7
4	85,0	12	170,5
5	76,2	13	126,8
6	70,5	14	114,3
7	51,4	15	20,2
8	80,9	-	-

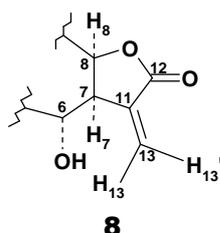
Ayant éclairci les résonances spécifiques de A9, nous allons compléter l'étude de la structure de la molécule par l'établissement des connectivités entre les différents fragments révélés par les systèmes de spin et les différentes corrélations *homo*- et hétéronucléaires.

### 3.1.2. Etablissement de la structure de A9

Les résultats obtenus à partir des paragraphes précédents surtout à partir des spectres de proton et de carbone nous permettent déjà de bien cerner les problèmes de la résolution structurale que nous allons aborder dans cette section.

#### 3.1.2.1. Acquis spectroscopiques RMN, IR et masse

Ainsi, les spectres APT, puis de DEPT rendent compte pour 15 résonances de  $^{13}\text{C}$ . D'autre part, le spectre de masse à haute résolution (HRMS), donnant une entité  $[\text{M}+1]^+$  de masse égale à 281,1351, a permis de déduire une formule moléculaire  $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_5$  (calculée pour 281,1389), portant le nombre d'insaturation et de cycle à 6.



L'unité  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone avec le groupement hydroxyle en C-6 a été déjà suggérée par l'inspection des spectres  $^1\text{H}$  avec les protons exométhyléniques caractéristiques. Ces suggestions ont été de plus appuyées par la corrélation hétéronucléaire HETCOR et les données spectrales FT-IR qui suivent et qui s'accordent avec la structure partielle **8** :

- un  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -lactone : IR 1760  $\text{cm}^{-1}$  ; RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  6,23 (dd,  $J = 3,1 ; 1,5$  ; H-13), 6,30 (dd,  $J = 2,8 ; 1,5$  Hz, H-13') ; RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  170,5 (s, C-12), 137,7 (s, C-11), 126,8 (t, C-13), dans le  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  .

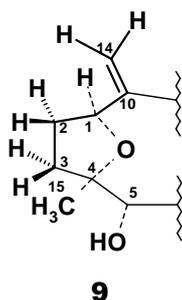
- La présence d'un premier alcool secondaire, avec une absorption IR à 3220  $\text{cm}^{-1}$  (Ceci rend compte pour le deuxième oxygène en spectrométrie de masse) ; suggérée par le couplage géminé entre les protons exométhyléniques exaltée par la proximité de l'alcool) et vérifiée par les corrélations hétéronucléaires : 3,84 (dd,  $J = 9,0 ; 7,6$  Hz, H-6) ; 70,5 (d, C-6) dans  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ;

- La présence d'un deuxième alcool secondaire : IR 3220  $\text{cm}^{-1}$  ; RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  3,55 (d,  $J = 7,6$  Hz, H-5) ; RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  76,2 (d, C5) dans  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  .

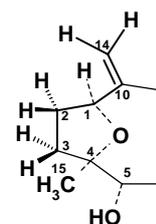
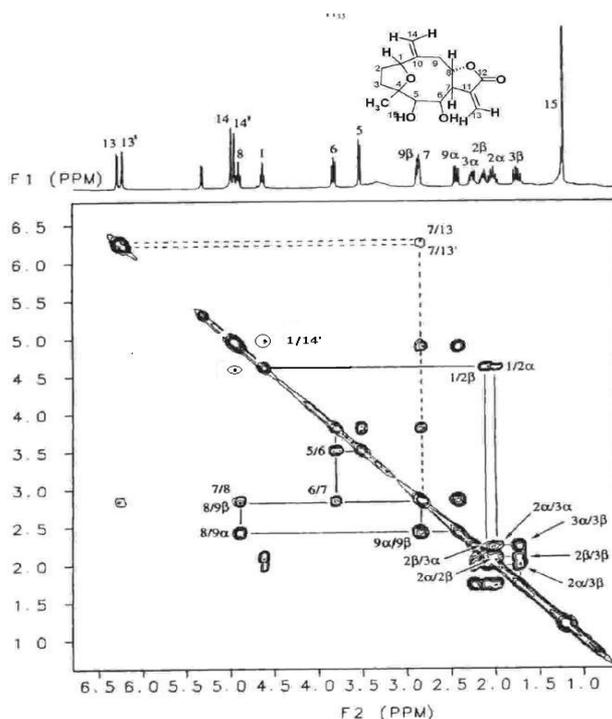
- Une faible absorption IR à 1660  $\text{cm}^{-1}$ , typique d'un méthylène exocyclique a été observée justifiant le deuxième groupe méthylénique exocyclique et appuyée par les corrélations hétéronucléaires :  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  4,96 (s, élargi; H14), 5,00 (s, élargi; H-14') ; RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  147,9 (s, C10) ; 114,3 (t, C-14).

- L'unité d'insaturation restante, requise par le spectre de masse est un squelette tétrahydrofurane rendant compte pour le dernier oxygène et les deux carbones oxygénés. Ceci explique le quatrième oxygène, les deux carbones oxygénés qui restent et le reste d'une unité d'insaturation exigé par la formule moléculaire.

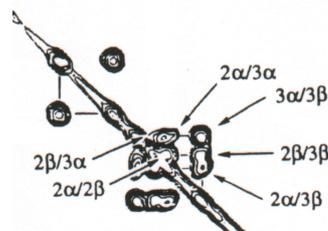
### 3.1.2.2. Etudes des connectivités par corrélations $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ et $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$



Le spectre H-H-COSY a permis de relever les deux systèmes de spin distincts dans le squelette de germacranolide. Le premier système de spin part de H-14' en passant par H-1, les protons géminés en C-2 pour déboucher aux protons géminés en C-3 (**9**). En effet, un faible couplage allylique transoïde entre le H-1 et pic large singulet H-14' noté dans le spectre COSY (spectre **5**), étend ce réseau de spin de C-10 vers le carbone méthylénique exocyclique C-14 (voir aussi LRCOSY). La nature géminée des protons en C-2 et en C-3 a été confirmée par couplage hétéronucléaire obtenu par HETCOR :  $\delta$  29,7 (C-2) ; 37,5 (C-3).

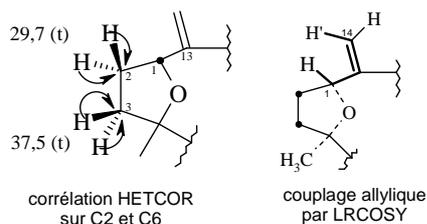


Le schéma ci-dessus montre le premier système de spin dont le COSY ci-contre montre le départ à partir des pics croisés 1/14' et qui finit aux pics croisés 3α/3β. Le second système part de 5/6 et aboutit en 9α/9β.



**Schéma 4 :** pics croisés entre les protons en C2 et C3 en COSY

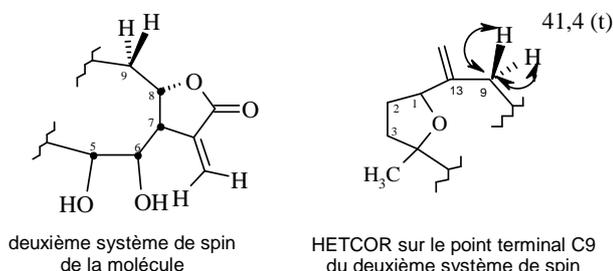
**Spectre 7: 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY de A9 dans le dichlorométhane de A9.**



**Schéma 5** système de spin 1 établi par couplage 1H COSY, expérience HETCOR et LRCOSY

Les deux têtes de pont asymétriques C1 et C4 relient le premier système de spin au second système. Ce second système de spin s'étend à travers une séquence de protons méthiniques partant de H-5, H-6, H-7, H-8 et se terminant par la dernière paire géminée de protons en C-9 ( $\delta$  41,4 ; t) qui a été identifiée par spectre HETCOR.

Trois des quatre protons méthines sont portés par des carbones oxygénés dont H-5 et H-6 comme protons d'un carbinol secondaire et le troisième, le proton du radical ester du cycle lactonique ( $\delta$  4,93 ; ddd ; J = 7,5 ; 7,5 ; 4,4 Hz, H8 ; <sup>13</sup>C :  $\delta$  80,9 C-8). Le proton méthine H-7 ( $\delta$  2,87 ) est partiellement en superposition avec un des protons méthyléniques qui terminent ce second système de spin ( $\delta$  2,89 ; dd ; J = 14,6 ; 4,4 Hz ; H-9β).



**Schéma 6 :** 2<sup>ème</sup> système de spin <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H de A9

Le deuxième système de spin s'étend du méthine en C-5 jusqu'en C-9 en passant par les méthines portés par C-6, C-7 et C-8. Il est ainsi constitué par le cycle en C-8 qui relie l'unité cyclofurannique à l'unité d' $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone.

Le spectre COSY permet d'observer les couplages allyliques de ce méthine (H-7) avec les deux protons méthyléniques exocycliques à champ faible de l' $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone. La

fonctionnalité  $\gamma$ -lactone est donc localisée entre le diol vicinal et le groupe méthylénique en C-9 de ce système de spin.

Les constantes de couplage entre les quatre méthines ( $^3J_{5,6} = 7,6$  Hz ;  $^3J_{6,7} = 9,0$  Hz ;  $^3J_{7,8} = 7,5$  Hz et  $^3J_{8,9\alpha} = 7,5$  Hz) suggèrent une relation séquentielle *trans* entre ces protons, laquelle sera confirmée par NOE plus tard. Le carbone quaternaire oxygéné restant ( $\delta$  85,0 ; C-4) sur lequel doit être attaché le méthyle singulet doit être l'un des points de liaison entre les deux systèmes de spin protonique.

Maintenant, l'utilisation concertée des expériences LRCOSY, SINEPT et FLOCK va permettre d'observer respectivement les couplages à long portée proton-proton ainsi que les couplages hétéronucléaires connectant les deux systèmes de spin et bouclant ainsi le squelette de germacranolide.

### 3.1.2.3. Connexion des deux systèmes de spin par corrélation à longue portée homo- et hétéronucléaires

Dans ce paragraphe, nous allons voir comment les deux systèmes de spin C1-C4 et C14-C5 décrits ci-dessus se connectent grâce aux techniques de corrélation homo- et hétéronucléaires. Il débutera avec les corrélations proton-proton.

#### 3.1.2.3.1. Contributions des corrélations proton-proton

Dans le spectre de LRCOSY, H-9 $\alpha$  ( $\delta$  2,44 ; dd ; J = 14,6 : 7,5 Hz) et H-9 $\beta$  ont donné lieu tous les deux à des couplages avec le même groupe de protons méthyléniques exocycliques (H-14/H-14') qui possèdent un couplage observable avec H-1, établissant ainsi la connexion de C-1 avec C-9 en passant par C-10 (Voir schéma 7).

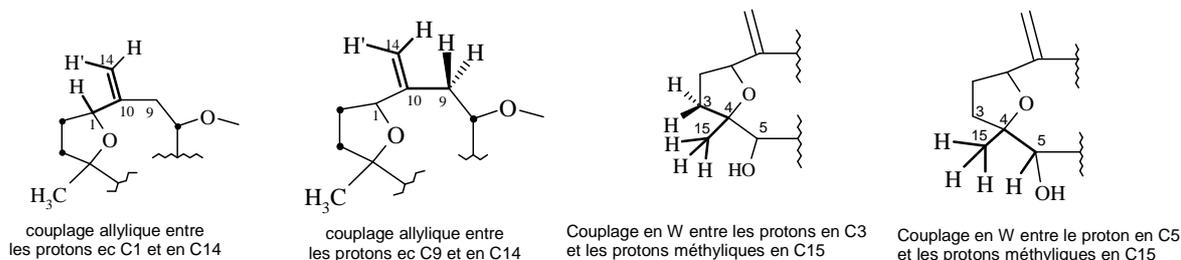


Schéma 7: Etablissement des connectivités par couplage allylique détectés par LRCOSY

Ces couplages allyliques, transoïde  $^4J_{\text{trs}}$  entre le proton H-14 et les protons de C-9, cisoïde entre  $^4J_{\text{csd}}$  entre H-14' et les protons de C-9 ne sont pas observables directement à partir du spectre de proton dans le  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  où l'on observe des multiplets non résolus pour chacun des protons méthyléniques  $\delta$  4,96 (H-14), et  $\delta$  5,00 (H-14'). D'autre part, des couplages allyliques entre les protons méthyliques (H-15)  $\delta$  (1,23 ; s) et H-3 $\alpha$   $\delta$  (2,27 ; ddd), non observés dans le spectre de proton se révèlent dans le spectre de LRCOSY. De la même façon, l'expérience LRCOSY a permis de détecter le couplage allylique entre ces mêmes protons méthyliques (H-15) avec le proton H-5  $\delta$  (3,55 ; d). Ces observations complètent les connexions du système de spin considéré et, combinées avec celles du COSY nécessitent un cycle 7,8-lactone. Ces déductions faites à partir des couplages homonucléaires sont par ailleurs supportées par les corrélations hétéronucléaires à longue portée SINEPT et FLOCK.

**3.1.2.3.2.** Corrélations hétéronucléaires par SINEPT et FLOCK

La combinaison de FLOCK et de SINEPT peut être très fructueuse pour étudier les corrélations à longue portée proton-carbone. Le FLOCK donne un aperçu général « de la carte des corrélations hétéronucléaires » et peut guider là où une radiation sélective doit être menée avec le SINEPT pour plus de détails. Les expériences de FLOCK et de SINEPT ont été menées dans le dichlorométhane- $d_2$ . Les résultats sont résumés dans le tableau 7 qui suit.

**Tableau 8:** Couplages hétéronucléaires observés en SINEPT et FLOCK

$^2J_{C,H}$ et $^3J_{C,H}$			
Proton	Carbone	Proton	carbone
H-1	C-4	H-13'	C-7, C-11
H-3 $\beta$	C-5	H-14	C-1, C-9
H-6	C-4, C-5, C-8	H-15	C-3, C-4, C-5
H-9 $\alpha$	C-1, C-8, C-10, C-14		

Le spectre FLOCK a révélé des couplages entre H-9 $\alpha$   $\delta$  (2,39; dd), avec le carbone oléfinique C-10  $\delta$  (147,9; s) et le carbone exométhylénique C-14  $\delta$  (114,3 ; t) aussi bien qu'avec le carbone oxygéné C-1  $\delta$  (82,6; d), connectant ainsi les deux systèmes de spin protoniques. Il en est de même pour l'irradiation sélective des protons méthyléniques (H-15) dont les corrélations avec les carbones C-4  $\delta$  (85,0; s) ; C-3  $\delta$  (37,5 ; t) et C-5  $\delta$  (76,2 ; d) connectent les deux fragments structuraux de l'autre côté de l'unité tétrahydrofurannique.

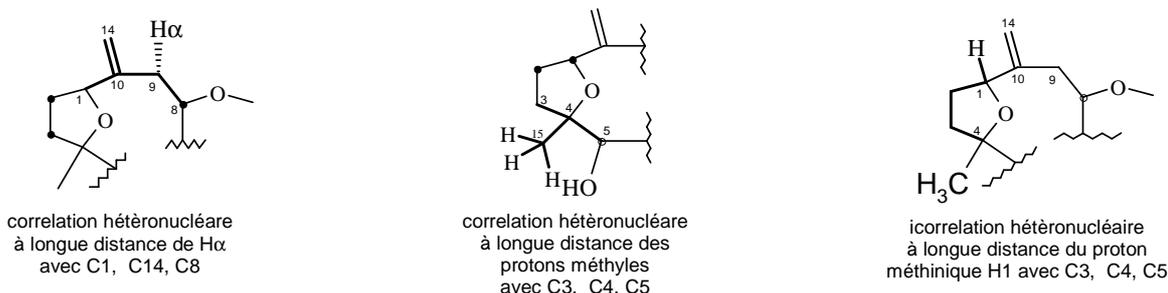
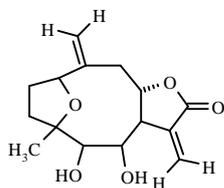


Schéma 8: étude de connectivité par détection des corrélations hétéronucléaires par FLOCK

De plus, l'expérience SINEPT a permis de confirmer l'unité de tétrahydrofuranne par l'observation d'un transfert de polarisation de H-1  $\delta$  (4,63 ; dd) vers C-4,  $\delta$  (85,0, s).

**10**

L'établissement du squelette germacranolide (**10**) ainsi établi, il reste à confirmer des attributions spectrales dont celles des protons diastéréotopiques ainsi que les problèmes stéréochimiques comprenant la relation *anti*- entre les diols vicinaux en C5/C6 et la fusion *trans* du cycle lactonique.

**3.1.3.** Etudes des relations stéréochimiques et conformationnelles de A9

La molécule A9 compte 6 centres asymétriques y compris les têtes de pont de fusion du cycle lactonique et du cycle à 10 membres.

Tableau 9: centres asymétriques de A9 et multiplicité

Centres	$\delta$ (ppm)	multiplicité	Centres	$\delta$ (ppm)	Multiplicité
C-1	82,6	d	C-6	70,5	D
C-4	85,0	s	C-7	51,4	D
C-5	76,2	d	C-8	80,9	D

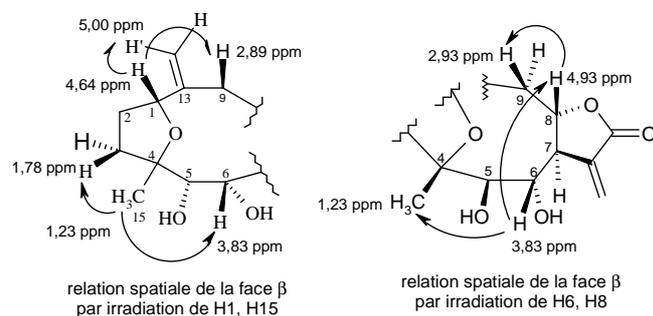
Nous allons donc étudier dans ce qui suit les relations spatiales de proximité contenues dans cette molécule.

### 3.1.3.1. Relations de proximité et stéréochimies relatives dans la molécule A9

Utilisant les techniques d'irradiation proton-proton, nous allons étudier les relations de proximité sur les deux faces de la molécule A9. Les points d'entrée ou les « empreintes digitales » offrent des points de départ évidents pour aborder l'étude.

#### 3.1.3.1.1. Relations de proximité sur la face $\beta$ de la molécule A9

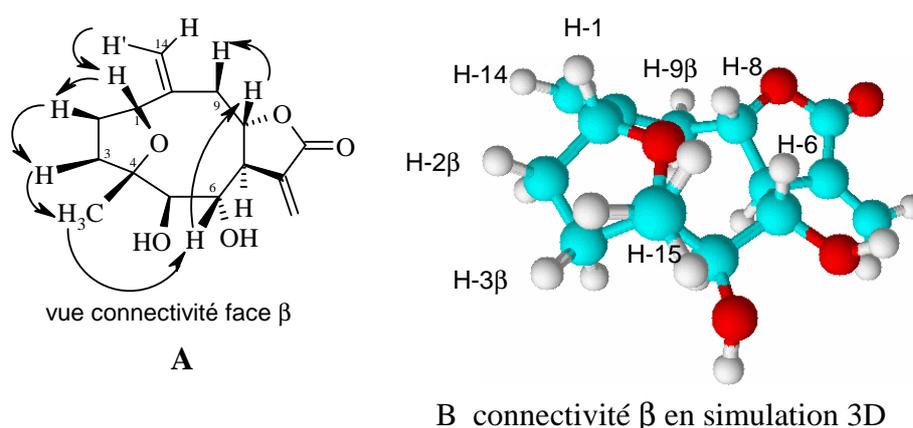
De même qu'en COSY, le proton H-1 constitue aussi un excellent point d'entrée pour l'interprétation du spectre NOESY.

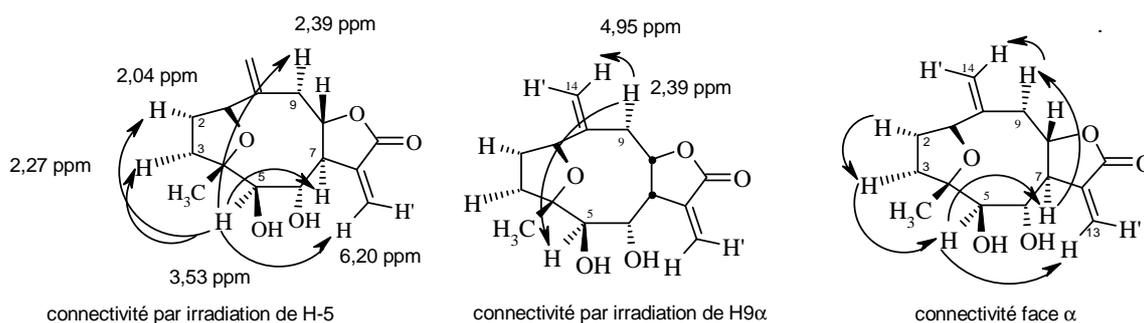


Par irradiation sélective, il a permis de relier les protons exométhyléniques aux protons méthyléniques du cycle furannique. Il en est de même pour le méthyle-15 (1,23 ; s) qui constitue aussi un point-clé de propagation de relation de proximité et avec le proton H-6  $\delta$  (3,83 ; dd), permet de basculer de l'autre côté du cycle à 10 membres en passant par la tête de pont H-8 qui à son tour entre en corrélation avec H-9 $\beta$ .

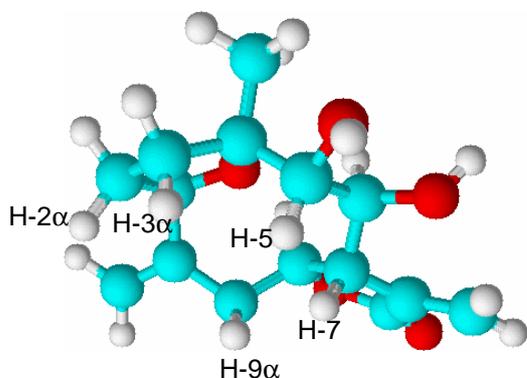
### Schéma 9: Connectivité de la face $\beta$ par DNOE et NOESY

Par rapport à H-1, on obtient donc une relation de proximité de la face  $\beta$  que l'on peut cartographier sur la structure. Cette relation de proximité définit immédiatement la stéréochimie relative en C-4.



**3.1.3.1.2.** Relation de proximité de la face  $\alpha$  de la molécule A9Schéma 10: relation de connectivité de la face  $\alpha$  utilisant DNOE et NOESY.

Le proton H-5  $\delta$  (3,53 ;d), un doublet bien dégagé dans le spectre de proton constitue un excellent point d'entrée pour analyse spectrale en deux dimensions.

**11**

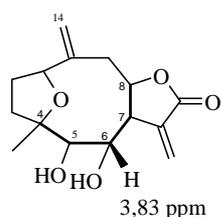
Son irradiation en expérience DNOE produit une relation de proximité abondante sur la face  $\alpha$  de la molécule en passant par la tête de jonction de cycle H-7  $\delta$  (2,84). L'irradiation de H-9 $\alpha$   $\delta$  (2,69, dd) permet de boucler le cycle à 10 membres par le NOE que ce dernier produit en H-4. Ainsi, il s'établit une relation de proximité sur la face  $\alpha$  (schéma 10) de la molécule que l'on peut visualiser sur la structure **11**.

**3.1.3.1.3.** Stéréochimies relatives dans la molécule A9

Les relations de proximité sur les deux faces  $\alpha$  et  $\beta$  déterminent immédiatement les stéréochimies relatives des centres asymétriques C-1 et C-4. De plus, ces relations de proximité supportent la relation *trans* séquentielle des protons méthiniques de H-5 jusqu'en H-9 $\alpha$  initialement suggéré par l'analyse des constantes de couplage ( $^3J_{5,6} = 7,6$  Hz ;  $^3J_{6,7} = 9,0$  Hz ;  $^3J_{7,8} = 7,5$  Hz ;  $^3J_{8,9\alpha} = 7,5$  Hz)

**3.1.3.2.** Etude de l'unité  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone de A9

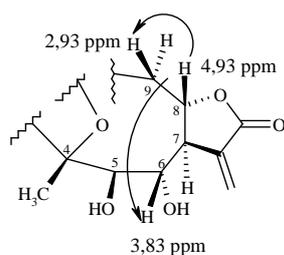
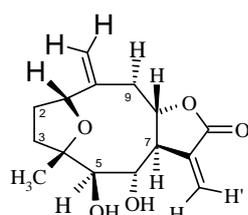
Nous avons vu dans les généralités les problèmes induits par la présence de l'unité  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -lactone revus par Samek *et coll.* sur les couplages, les déplacements chimiques des protons exométhyléniques ; la position et la stéréochimie de fusion du cycle lactonique. Nous allons montrer dans ce paragraphe comment la combinaison des techniques modernes apporte des solutions immédiates et nettes à l'étude de l'unité  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone.

**3.1.3.2.1.** Position du cycle lactonique**12**

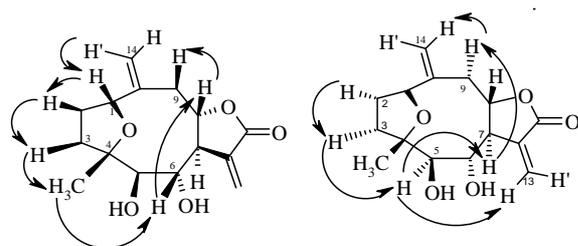
La position 7,8 du cycle lactonique a été déduite des observations COSY (relation séquentielle *cis-trans* des méthines) appuyées par les couplages à longue portée proton-proton LRCOSY aussi bien que par les couplages hétéronucléaires à longue portée entre H-6 (3,83 ; dd) C-4 ; C-5 et C-8 (**12**). La jonction *trans*- du cycle est aisément vérifiée par les connectivités de la face  $\beta$  et de la face  $\alpha$  impliquant H8 avec H6 et H9 $\alpha$  ainsi que H7 avec H5. (voir tableau **5** p.25).

**3.1.3.2.2.** Etude de la jonction du cycle lactonique de la molécule

La stéréochimie *trans*- de la fusion du cycle lactonique a été souvent difficile à établir par les constantes de couplages vicinaux.<sup>107</sup> L'interprétation des couplages allyliques selon la règle de Samek est délicate à cause de la position 7-8 du cycle lactonique. Par contre, les irradiations sélectives par technique de (DNOE) résolvent immédiatement le problème. L'irradiation du proton H-7 est rendue plus délicat à cause de sa superposition avec H-9 $\beta$  dans le chloroforme-d et le dichlorométhane-d<sub>2</sub>.

**43****14**

L'irradiation de H-8  $\delta$  4,93 donne des effets NOE en H-6 (3,83 ; dd) et H-9 $\beta$  (2,93 ; dd) (**13**) se recoupant avec l'observation précédente sur l'irradiation de H-6. D'autre part, l'irradiation de H-5 conduit aux NOEs en H-7 et H-9 $\alpha$  (**14**).

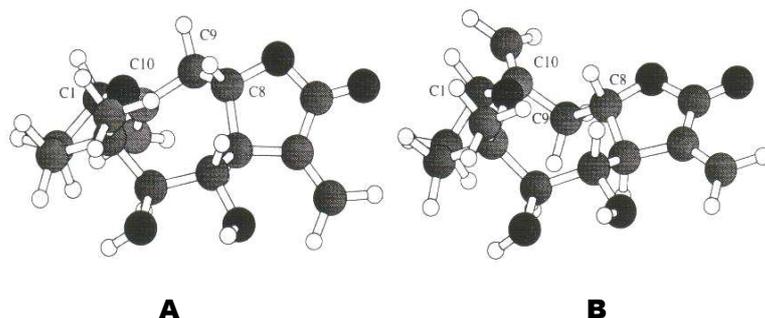
connectivité de la face  $\beta$ connectivité de la face  $\alpha$ 

Ces deux types de NOE *diaxiaux* sont connus pour être incompatibles avec une fusion *cis* d'un  $\gamma$ -lactone. Les relations de proximité précédentes qui gouvernent les stéréochimies relatives déduites des NOEs illustrent clairement cette stéréochimie *trans*- de la jonction C7-C8.

**Schéma 11** : relation de proximité des faces  $\alpha$  et  $\beta$  démontrant le relation *trans* de la jonction C7-C8. Ces résultats sont validés par l'étude de la relation stéréochimique absolue *trans*-diol dont nous allons donner un aperçu ci-dessous après une étude de modélisation de la molécule.

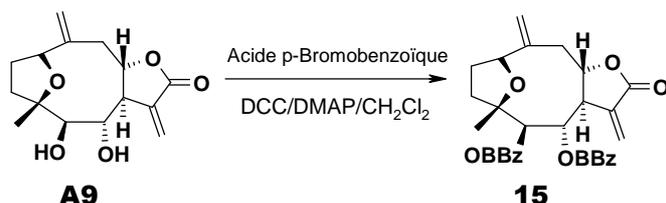
**3.1.3.3.** Aperçu sur la modélisation moléculaire A9 et stéréochimie absolue *trans*-diol

La modélisation de la molécule A9, effectuée au laboratoire après nos études RMN a montré deux conformations en solution qui diffèrent par l'angle de torsion C1-C10-C9-C8.<sup>108</sup> L'étude de modélisation moléculaire de **A9** prédit que les deux conformations donneraient lieu à des lactones de chiralité opposée.

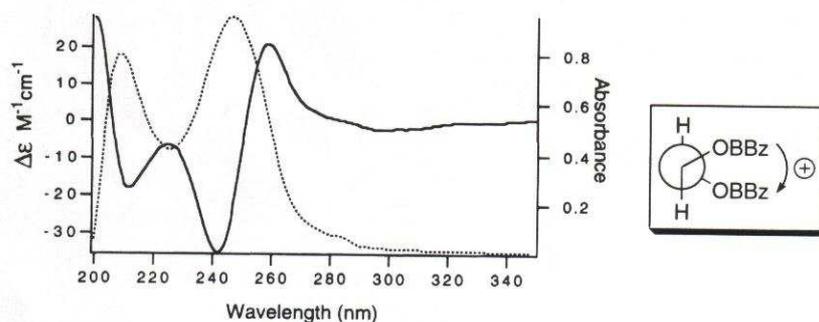
Figure 6: Conformations du germacranolide **A9**

Dans la conformation **A**, les distances entre les protons pour qui des NOEs ont été observés sont inférieures ou égales à 3,0 Angströms, excepté pour celle de H-1/H-9 $\beta$  qui est égale à 4,3 Angströms. Dans la conformation **B**, ces distances pour NOE sont égales ou inférieures à 2,9 Angström (H-1/H-9 $\beta$  ; 2,8 Angströms) pour H5/H $\alpha$ , elle vaut 4,5 Angströms (2,4 Angströms dans **A**). Ces expériences de modélisation moléculaire s'accordent avec les expériences NOEs ainsi qu'avec les données des constantes de couplage et indiquent que **A9** se distribue sur **A** et **B** qui subissent un rapide interconversion sur l'échelle de temps RMN.

**Stereochimie absolue.** La détermination de la fonctionnalité *trans*-diol a été accomplie par application de la méthode des excitons chiraux en dichroïsme circulaire en utilisant les *bis*-*p*-bromobenzoates.<sup>109,110</sup> (Voir annexes germacranolide, p. 116)

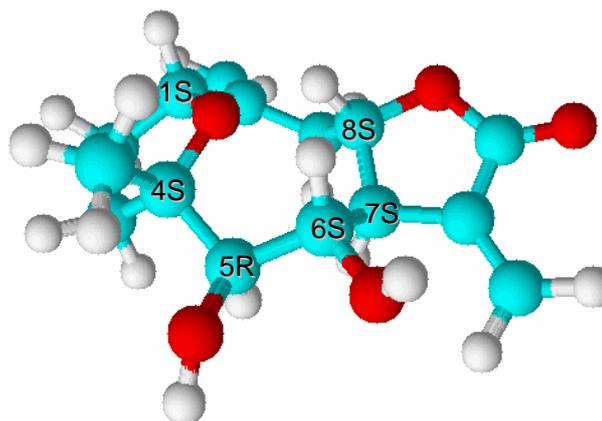
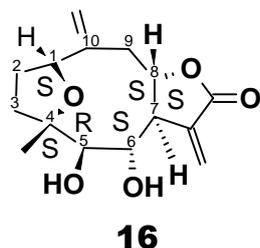


Le dérivé *bis*-*p*-bromobenzoate **15** a été préparé à partir de **A9** suivant les procédures standards de la méthode DCC.<sup>111</sup>



Le spectre UV de du dérivé *p*-bromobenzoate **15** a montré un  $\lambda_{\max}$  à 248 nm ( $\epsilon$  44 200) provoqué par les chromophores *p*-bromobenzoates, alors que le spectre de dichroïsme circulaire (DC) a donné lieu au couplage classique d'exciton avec une chiralité positive : Aobs = + 58,8. Le spectre UV de **A9** a seulement exhibé une fin d'absorption, typique pour un  $\alpha$ -méthylène-lactone avec une relation *trans* (5R, 6S) pour **15**. Par corrélation, la relation *trans*-diol est aussi (5R, 6S) pour **A9**.

En conclusion, la structure de A9 a été résolue avec une attribution complète des protons et des carbones dont les tableaux ci-dessous résumet les résultats. Les stéréochimies ont été complètement établies avec une relation *trans*-diol (5R, 6S). On en déduit la stéréochimie absolue de la molécule qui s'écrit (**1S**, **4S**, **5R**, **6S**, **7S**, **8S**). (voir structures **16** et **16a**)



Les tableaux **10** et **11** résument les données spectrales ainsi obtenues pour le germacranolide A9 :

Tableau **10**: Récapitulation des données spectrales proton pour A9

Attributions spectrales <sup>1</sup> H complètes de A9 (CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )			
<sup>1</sup> H	δ (ppm)	<sup>1</sup> H	δ (ppm)
1	4,63	9α	2,39
2α	2,04	9β	2,93
2	2,18	13	6,2
3α	2,27	13'	6,39
3β	1,78	14	4,95
5	3,53	14'	4,97
6	3,83	15	1,23
7	2,84	OH	3,35 (s, élargi)
8	4,93	OH	3,45 (s, élargi)

Tableau **11**: Récapitulation des données spectrales carbone pour A9

Attributions spectrales <sup>13</sup> C complètes de A9 (CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )			
<sup>13</sup> C	δ (ppm)	<sup>13</sup> C	δ (ppm)
1	82,6	9	41,4
2	39,7	10	149,9
3	37,5	11	137,7
4	85,0	12	170,5
5	76,2	13	126,8
6	70,5	14	114,3
7	51,4	15	20,2
8	80,9		

### 3.2. Révision structurale et études stéréochimiques du guaianolide TD15 issu de *T. densum* sous-espèce *amani*

#### Introduction

La pyréthroïdine TD15 **17** a été isolée pour la première fois du *Pyrethrum pyrethroides* par des auteurs russes.<sup>112,113</sup> Le parishine **18** a été isolé de l'*Artemisia tridentata* ssp. *Tridentata* f. *parishi* (Gray) Beetle<sup>114</sup> comme un composant inséparable dans un mélange avec son dérivé dihydro-11 $\beta$ ,13- (lactone isophoto- $\alpha$ -santonique<sup>115,116</sup>), et plus tard à partir des espèces non identifiées d'*Eriocephalus*.<sup>117</sup> L'analogue 3-hydroperoxyde du parishine a été aussi trouvé à partir de ces dernières sources.



Les publications antérieures n'ont pas fait état ni des spectres <sup>13</sup>C ni d'attributions complètes des spectres de protons. Le premier article sur **17** a seulement publié des déplacements chimiques de quelques protons choisis dans la pyridine-d<sub>5</sub>, et la structure a été étudiée par cristallographie X (stéréochimie relative). Ceci nous a emmené à entreprendre une révision structurale complète de ce guaianolide. Les résultats des études seront alors décrits dans cette section qui comprendra quatre parties : données spectrales de TD15 et études de quelques attributions spécifiques (**3.2.1**) ; établissement de la squelette de la molécule et attributions spectrales spécifiques (**3.2.2**) ; relations stéréochimiques relatives (**3.2.3**) ; détermination de la stéréochimie absolue des centres asymétriques. (**3.2.4**)

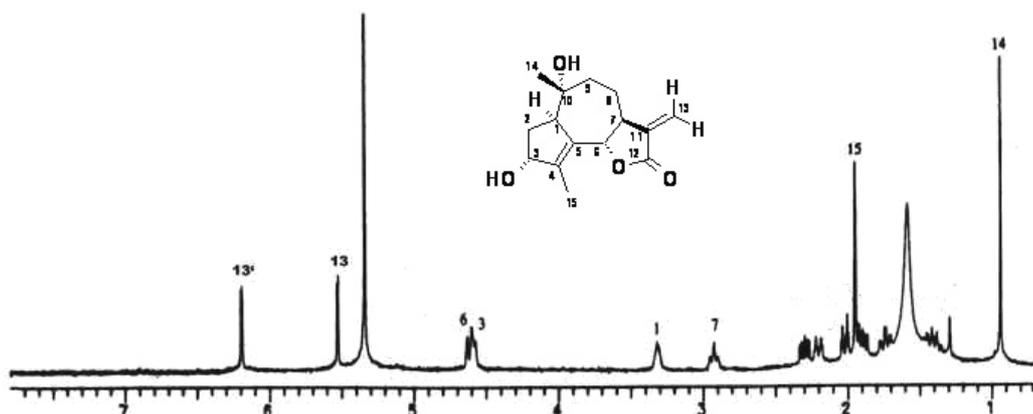
#### 3.2.1. Données spectrales et attributions spécifiques dans la molécule TD15

L'analyse par spectre de masse du composé TD15 a donné une masse moléculaire de 265,1422 calculée pour une formule moléculaire de C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>O<sub>4</sub>. TD15 possède deux liaisons oléfines dont l'une fait partie d'une fonctionnalité  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -lactone (IR<sub>KBr</sub>  $\nu_{C=O}$  1760 cm<sup>-1</sup>).

##### 3.2.1.1. RMN du 1H et stabilité du guaianolide TD15

Les déplacements chimiques dans la pyridine de quelques protons de TD15 rapportés dans l'article originel correspondent bien aux déplacements chimiques obtenus dans ce travail dans pyridine-d<sub>5</sub>.

**Stabilité du TD15.** Dans chloroforme-d<sub>1</sub>, le composé TD15 en solution se décompose lentement dans le tube RMN. Une rapide vérification par RMN nous montre les impuretés qui se révèlent nettement sur plaque CCM (Gel de silice). Il nous a fallu le purifier par sur gel de silice dans une pipette pasteur et vérifier sur CCM et par RMN <sup>1</sup>H la pureté avant de reprendre tout travail de RMN dans le dichlorométhane-d<sub>2</sub>. Ce dernier se révèle par la suite comme le solvant de choix pour les études RMN de TD15 comme il l'a été pour A9.

Spectre **8**: Attribution des quelques pics du le spectre proton de TD15 dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>Tableau **12**: Comparaison des paramètres RMN des protons dans la pyridine-d<sub>5</sub> et dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

δ ppm (Py-d <sub>5</sub> )	Multiplicité	δ ppm CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Multiplicité	δ ppm (Py-d <sub>5</sub> )	Multiplicité	δ ppm CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Multiplicité
1,15	s	0,91	s	2,75	dd,élargi	2,90	dddd
1,32	m	1,32	dddd	2,87	ddd	2,27	ddd
1,89	ddd	1,71	ddd	3,55	m	3,29	m
2,01	m	2,17	dddd	4,73	de	4,60	dq
2,17	ddd	1,99	ddd	4,93	d,élargi	4,56	d,élargi
2,21	s, élargi	1,92	dd	5,45	d	6,18	d
2,45	ddd	1,86	ddd	6,29	d	5,51	d

m : multiplet non résolu

Quatorze résonances ont été identifiées au total que ce soit dans le dichlorométhane ou dans la pyridine-d<sub>5</sub>. Dans ce dernier solvant, le multiplet non résolu à 1,32 ppm se résout comme quadruplet de doublet à 1,32 ppm dans le dichlorométhane-d<sub>2</sub>. Il en est de même pour le massif à 2,01 ppm dans la pyridine-d<sub>5</sub> qui correspond au quadruplet de doublet (dddd) à 2,17 ppm dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

### 3.2.1.1.1. Spectre des protons dans le dichlorométhane-d<sub>2</sub> et points d'entrée

Les protons exométhyléniques H-13 et H-13', caractéristiques de l'unité α-méthylène-γ-butyrolactone sont bien visibles respectivement à 5,51 et 6,18 ppm à côté du pic du solvant CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5,32 ppm). Les pics caractéristiques facilement identifiables H-1 (3,29 ppm) et H-7 (2,90 ppm) de la molécule sont observés dans la région bien dégagée entre 2,80 et 3,30 ppm. De même, on observe une superposition des pics H-3 (4,56 ppm ; doublet élargi) et H-6 (4,60 ppm) dans la région à champ plus faible en dessous du pic du solvant entre 4,56-4,60 ppm. Les autres pics de la molécule, à champ relativement plus élevé, se superposent plus ou moins dans la région entre 1,2 et 2,4 ppm d'où émerge le pic singulet du méthyle vinylique à 1,92 ppm, l'autre pic singulet intense observé à 0,91 étant celui de H-14.

**Points d'entrée.** Ainsi, le proton H-1 s'est révélé un très utile point d'entrée pour attaquer les spectres 2D en NOESY, COSY, LRCOSY et FLOCK. Les irradiations sélectives en expérience SINEPT se sont avérées décisives pour rassembler les fragments de structure de TD15.- Le proton H-7, tête de pont de la fusion du cycle lactonique, bien isolé à 3,06 ppm (dddd), C-7 δ

44,7 (d) va ainsi commander les connectivités des fragments constituant la molécule ainsi que la résolution de la stéréochimie relative de la molécule.

### 3.2.1.1.2. Protons exométhyléniques du cycle lactonique

Les protons exométhyléniques H-13 et H-13' se remarquent d'emblée sur les spectres que ce soit dans le chloroforme-d<sub>1</sub>, dans le dichlorométhane-d<sub>2</sub> ou la pyridine-d<sub>5</sub>. Par ailleurs, on leur obtient une meilleure dispersion spectrale  $\Delta\delta$  de 0,84 ppm dans ce dernier solvant. Mais on n'observe plus le quartet, propre aux couplages géminés des protons exométhyléniques flanqués d'un hydroxyle en  $\alpha$  du cycle lactonique.

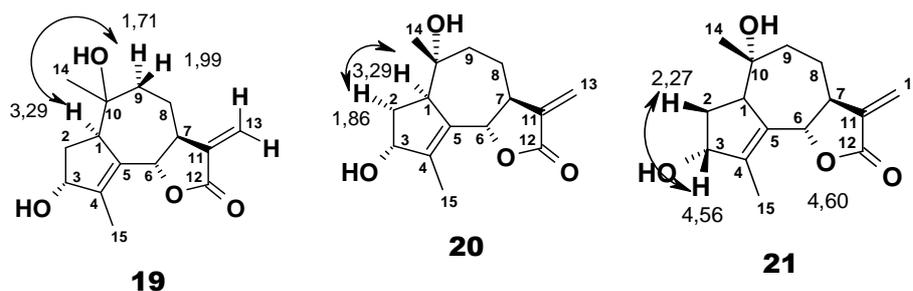
Tableau 13: Identification des doublets des protons méthyléniques sur le pyréthroidine

Position	<sup>1</sup> H (Pyridine-d <sub>5</sub> )		<sup>1</sup> H (CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	
	$\delta$ (ppm)	J (Hz)	$\delta$ (ppm)	J (Hz)
13'	6,29 (d)		6,18 (d)	3,1
13	5,45 (d)		5,51 (d)	3,3

Cette absence de substituant en alpha sur C8 se traduit par des limites moyennes de déplacement chimique de H-13 et H-13' respectivement à 5,55 et 6,28 ppm (dans le CDCl<sub>3</sub>) ce qui a été vérifié expérimentalement dans le CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5,51 ppm ; 6,18 ppm). L'absence de couplage géminé entre ces deux protons H-13 et H-13' sur les spectres a été prévisible sur la base des études de Marbry et Samek sur l'influence des substituants R sur cette position en C-8. Avec R = H, ce couplage reste faible inférieur ou égal à 0,5 Hz. Par contre, on observe des couplages allyliques substantiels entre ces protons et le proton en tête de jonction de cycle H-7 (<sup>4</sup>J<sub>7,13</sub> = 3,3 Hz ; <sup>4</sup>J<sub>7,13'</sub> = 3,1 Hz) caractéristique d'une fusion de cycle *trans*- selon les règles de Samek ce qui sera vérifié plus tard par des études NOE.

### 3.2.1.1.3. Attributions spectrales des protons

**Attributions des résonances des protons diastéréotopiques.** Les protons (H9) donnent lieu à des couplages W avec les protons méthyléniques (H14). Le pic du proton H-9 $\alpha$   $\delta$  1,71 (ddd, J = 13,5 ; 13,4 ; 4,0 Hz) a été d'abord attribué sur la base d'une forte constante de couplage vicinal *trans* <sup>3</sup>J<sub>8 $\beta$ ,9 $\alpha$</sub>  = 13,4 Hz) avec le proton H-8 $\beta$   $\delta$  1,32 (dddd ; J = 14,6 ; 13,4 ; 10,8 Hz). Par ailleurs, le proton H-9 $\beta$   $\delta$  1,99 (ddd, J = 13,5 ; 3,9 ; 3,6 Hz) montre un fort couplage géminé (<sup>2</sup>J<sub>9 $\alpha$ ,9 $\beta$</sub>  = 13,5 Hz) et des couplages vicinaux relativement faibles, caractéristiques (<sup>3</sup>J<sub>9 $\beta$ ,8 $\alpha$</sub>  = 3,9 Hz ; <sup>3</sup>J<sub>9 $\beta$ ,8 $\beta$</sub>  = 3,6 Hz) d'une orientation équatoriale avec les deux protons H-8. Les attributions spectrales de protons (H9) ont été supportées par ailleurs par les observations NOE du H-9 $\alpha$  avec le proton H-1 (3,29 ; m) (**19**).



Les observations des NOE (**20**) ont permis aussi de différencier les protons (H2) avec H-1 et H-2 $\alpha$  (1,86 ; ddd) se trouvant sur la même face opposée à celle où se trouve H-3 (4,56 ; d élargi) et H-2 $\beta$  (2,27 ; ddd) (**21**). Le va-et-vient entre les études de corrélations permet de résumer les attributions spectrales des protons et leurs constantes de couplage qui serviront de base pour l'étude des systèmes de spin.

Tableau 14: Constantes de couplage des protons de TD15 dans CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Position	$\delta$ ppm (CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	J (Hz)	multiplicité
1	3,29	(8,0 ; 5,7 ; 1,3)	m
2 $\alpha$	1,86	(14,7 ; 8,0 ; 2,5)	ddd
2 $\beta$	2,27	(14,7 ; 7,6 ; 5,7)	ddd
3	4,56	(5,7 ; 2,7)	d élargi
6	4,60	(10,9 ; 1,6)	dq
7	2,90	(10,9 ; 10,8 ; 3,3 ; 3,1 ; 1,6)	dddd
8 $\alpha$	2,17	(14,6 ; 4,0 ; 3,9, 1,6)	dddd
8 $\beta$	1,32	(14,6 ; 13,8 ; 10,8 ; 3,6)	dddd
9 $\alpha$	1,71	(13,6 ; 13,8 ; 4,0)	ddd
9 $\beta$	1,99	(13,6 ; 4,0 ; 3,6)	ddd
13	5,51	(3,3)	d
13'	6,18	(3,1)	d
14	0,91		s
15	1,92	(1,6 ; 1,3)	dd

### 3.2.1.2. Données spectrales de <sup>13</sup>C du composé TD15

Les spectres de carbone ont été enregistrés dans le dichlorométhane-d<sub>2</sub> et rendent compte pour 15 carbones analysés en spectrométrie de masse HRMS. Un pic de méthyle allylique résonne à  $\delta$  13,5 ppm (<sup>1</sup>H 1,92 ppm), tandis qu'un second méthyle porté par un carbinol résonne plus bas à  $\delta$  21,3 (<sup>1</sup>H ; 0,91). Les expériences DEPT ont permis de préciser les multiplicités des carbones, tandis que celles du SINEPT ont permis d'établir les corrélations à longue distance des « centres spectroscopiquement silencieux ». <sup>118</sup>

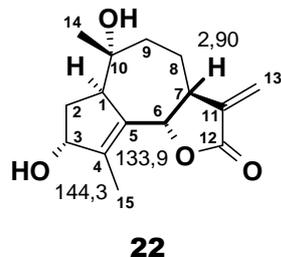
Tableau 15 : Points-clés SINEPT dans CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pour TD15

Irradiation ( <sup>1</sup> H)	Observations ( <sup>13</sup> C)
H-1	C-4 ; C-5 ; C-6 ; C-10 ; C-14 C9
H-7	C-5 ; C-11 ; C-13

Les résultats rendent compte pour les cinq carbones tertiaires, trois carbones secondaires, les deux méthyles, et les 5 carbones quaternaires de la molécule et dont fait partie le carbonyle de l'unité lactone  $\delta$  168,5 ; IR  $\nu$  1760 cm<sup>-1</sup> ; et 2 carbones oléfiniques C-4  $\delta$  (144,3 ; s) et C-5  $\delta$  (133,9 ; s). Ces deux derniers carbones quaternaires sont différenciés par irradiation de H-7 en expérience SINEPT.

**3.2.1.2.1.** Attribution des résonances des carbones oléfiniques quaternaires

Comme on l'a déjà mentionné, les quelques déplacements chimiques publiés antérieurement pour le pyréthroïdine se rapportent à des protons observés dans la pyridine-d<sub>5</sub> et il n'y avait eu aucune donnée sur les résonances des carbones. Les observations des corrélations à longue portée ainsi que les effets NOE ont été effectués dans ce travail pour l'attribution des pics de résonance des protons et des carbones qui n'ont pas pu être établie auparavant.



Les résonances des carbones oléfiniques quaternaires C-4 et C-5, ont pu être attribuées sans aucune ambiguïté par les corrélations hétéronucléaires à longue portée. L'irradiation sélective de H-7 (2,90, ddd) en expérience SINEPT a déjà révélé les corrélations avec C-5 ; C11 et C-13. Ainsi, le couplage à longue portée  $^3J_{H7,C5}$  révélé par le SINEPT désigne sans aucune ambiguïté le pic de résonance de C-5 (133,9 ; s) par rapport à C-4 (144,3 ; s). (**22**)

Tableau 16 : Identification des résonances de carbone de TD15

$\delta$ ppm (CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	Multiplicité	N° Carbone	CORRELATION
13,5	q	15	HETCOR (H-15)
21,3	q	14	HETCOR (H-14)
24,8	d	8	HETCOR (H-8)
35,5	t	2	HETCOR (H-2 $\alpha$ ; H-2 $\beta$ )
45,3	t	9	HETCOR (H-9 $\beta$ ; H-9 $\beta$ )
45,6	d	7	HETCOR (H-7)
56,2	d	1	HETCOR (H-1)
75	s	10	SINEPT (H-1)
80,5	d	3	HETCOR (H-3)
82,2	d	6	HETCOR (H-6)
119,3	t	13	HETCOR (H-13, H-13')
133,9	s	5	SINEPT (H-7)
139,4	s	11	SINEPT (H-7)
144,3	s	4	SINEPT (H-1)
168,5	s	12	

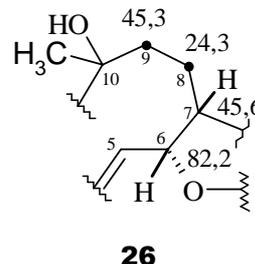
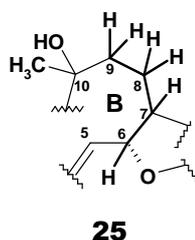
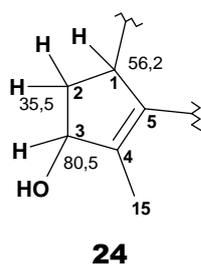
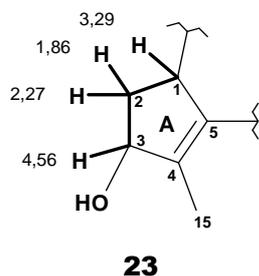
**3.2.2.** Etablissement du squelette de la pyréthroïdine TD15

L'unité cyclodécyle du pyréthroïdine est constituée par la fusion de cyclopentanone **A** et du cycloheptyle **B** qui, à son tour, se connecte avec l'unité **C**  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -lactone en fusion (6,7). L'établissement du squelette de TD15 se fait alors moyennant diverses corrélations homonucléaires et hétéronucléaires pour construire les connectivités.

**3.2.2.1.** Etudes des systèmes de spins et connectivités par COSY et HETCOR

Le spectre  $^1H$ - $^1H$  COSY de TD15 a permis de traquer un premier système de spin protonique -CH-CH<sub>2</sub>-CH(O)- de H-1  $\delta$  (3,29, m) jusqu'à H-3  $\delta$  (4,56 ; s élargi) (**23**), le spectre

HETCOR permettant par ailleurs l'attribution des résonances des carbones correspondants C-1  $\delta$  (56,2 ; d) ; C-2  $\delta$  (35,5 ; t) et C-3  $\delta$  (80,5 ; d). (**24**)



Le second système de spin révélé par le spectre COSY s'étend de H-6  $\delta$  (4,60, dq) jusqu'en H-9 $\alpha$   $\delta$  (1,71 ; ddd) et H-9 $\beta$   $\delta$  (1,99 ; ddd) englobant ainsi le système –CH(O-)–CH–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>– dans le cycle B (**25**).

### 3.2.2.2. Etudes des connectivités par corrélation homo- et hétéronucléaires

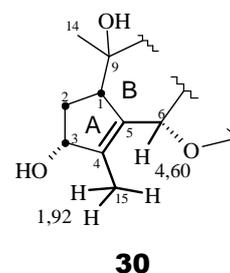
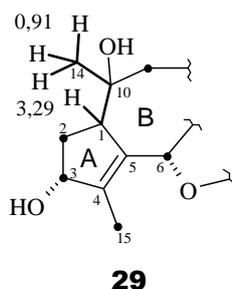
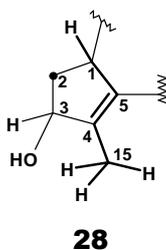
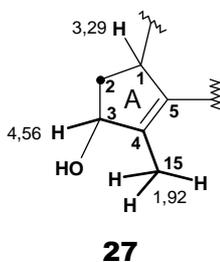
Les corrélations à longue portée ont permis d'une part, d'effectuer sans ambiguïté l'attribution des pics de résonance bien spécifiques et d'autre part, de relier les cycles A et B entre eux et avec le cycle lactonique.

**Etude des connectivités par corrélation proton-proton à longue portée.** Les spectres COSY et les expériences LRCOSY ont permis d'observer les couplages à longue portée comme les couplages allyliques. Des couplages homoallyliques, aussi bien que des couplages entre proton et protons méthyliques  $^4J_{H/Me}$ , très courants et pouvant atteindre jusqu'à 1 Hz<sup>119</sup> ont été en particulier détectés en LRCOSY.

Tableau 17: Couplages à longue portée proton-proton de TD15 dans CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Protons	Corrélations proton-proton
H-1 (3,29, m)	H-14 ; H9 $\beta$
H-3 (4,56 ; d élargi)	H-15
H-15 (1,92 ; dd)	H-1 ; H-6
H-7 (2,90 ; dddd)	H-13 ; H-13'

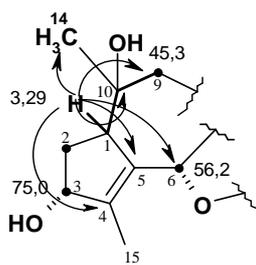
Le LRCOSY a permis ainsi d'observer un couplage  $^4J$  entre le proton H-3 (4,56 ; d élargi) du carbinol secondaire C-3 (80,5 ; d) et les protons H-15 (1,92 ; s) appartenant au méthyle vinylique en C-15 (13,5 ; q). (**27**)



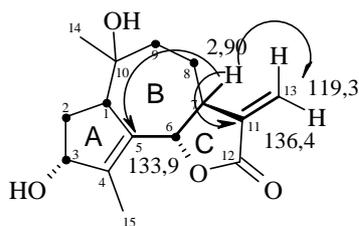
Ce couplage boucle le système A du cyclopentényle (**27**) avec l'observation d'un couplage homoallylique  $^5J$  entre le proton H-1 (3,29 ; m) avec les protons du méthyle vinylique en C-15

(**29**). D'autre part, un faible couplage  $^4J$  entre les protons H-1 (3,29 ; m) et le méthyle en C-14 (0,91 ; s) est détecté en LRCOSY (**29**), reliant ainsi les deux systèmes de spin ci-dessus. Ce fait confirme la connexion du cyclopentène **A** avec le cycloheptyle **B** à travers le carbinol tertiaire C-10 (75,0 ; s). Ceci est supporté en plus par l'observation des couplages homoallyliques (**30**) entre les protons méthyle vinyliques en C-15 et le proton H-6 à 4,60 ppm (dq ;  $J = 10,9 : 1,5$  Hz) en LRCOSY.

**Etude des connectivités des cycles A, B et C par SINEPT.** Quelques expériences SINEPT ont été très utiles dans l'établissement des connexions des fragments déterminés par les systèmes de spin mais aussi dans l'attribution des résonances des carbones quaternaires.

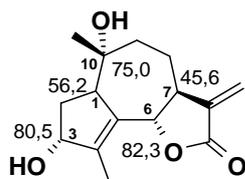
**31**

L'irradiation de H-1 (3,29 ; m) a été particulièrement fructueuse dans l'établissement de la connexion des cycles A et B. Ainsi, l'observation des augmentations des intensités de pics en C-3 (75,0 ; s) et en C-9 (45,3 ; t) a permis de relier les deux systèmes de spin protonique donc des deux cycles (**31**). Ceci est un support évident pour les observations faites en LRCOSY.

**32**

L'irradiation du proton H-7 (2,90 : dddd) en SINEPT a permis de détecter sa corrélation avec les carbones C-5 (133,9 ; s) ; C-11 (139,4 ; s) et C-13 (119,3 ; t). Ces observations ont permis non seulement de connecter les deux systèmes de spin de A et de B mais de les relier avec le cycle lactonique C, bouclant ainsi la molécule tout entière. (**32**)

### 3.2.3. Relations stéréochimiques dans TD15

**33**

La molécule TD 15 possède 5 centres asymétriques dont les deux têtes de pont du cycle lactonique en C-6 (82,2 ; d) et C-7 (45,6 ; d), l'alcool secondaire en C-3 (80,5 ; d) ; l'alcool tertiaire en C-10 (75,0 ; s) ainsi que C-1 (56,2 ; d) point de jonction des deux cycles A et B (**33**)

#### 3.2.3.1. Stéréochimie de la fusion 6,7- du lactone

Les analyses des constantes de couplages et les observations NOE ont déjà permis de vérifier les stéréochimies déjà établies par RX. La fusion *trans*- du lactone est suggérée par la constante relativement importante du couplage vicinal  $^3J = 10,9$  Hz entre les protons H-6 (4,60, dq) et H-7 (2,90 ; dddd) selon les règles de P et Q (Voir p. 9). Les relations de proximité ou de voisinage établies par couplage dipolaire permettent par ailleurs de supporter ces observations.

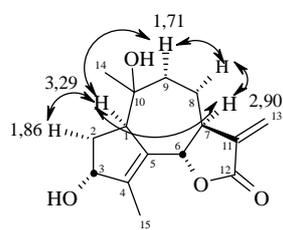
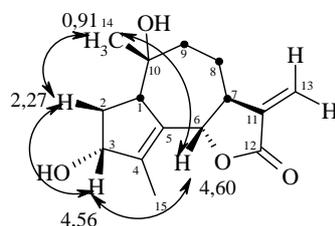
#### 3.2.3.2. Relations de voisinage dans le pyréthroidinine TD15

Les expériences de DNOE et les spectres NOE permettent déterminer les relations de voisinage dans les deux faces  $\alpha$  et  $\beta$  de la molécule de pyréthroidinine.

Tableau 18: Pairs-clés de NOE du pyrethroidinine dans le dichlorométhane-d<sub>2</sub>.

N°	Pairs de NOÉ	N°	Pairs de NOÉ
1	H-7/H-1	4	H-1/H-2 $\alpha$
2	H-7/H-9 $\alpha$	5	H-14/H-2 $\beta$
3	H-6/H-14	6	H-3/H-2 $\beta$

Ces NOEs qui définissent la relation de voisinage sur la face  $\alpha$  et  $\beta$  de la molécule de pyréthroïdinine sont en accord avec les données des constantes de couplage. Ainsi, la constante de couplage vicinal *trans* H-1/H-2 $\beta$  est de 8,0 Hz contre 5,7 Hz pour la constante de couplage *cis* H-1/H-2 $\alpha$  ce qui est supporté par la relation de l'effet NOE (**34**). De proche en proche, H-7, H-9 $\alpha$ , H-2 $\alpha$  se trouvent sur la même face que H-1 et H-2 $\alpha$  (**34**). Le couplage vicinal *trans* pour H-3 est de 5,7 Hz (H2 $\alpha$ ) contre 2,7 Hz pour le *cis* (H-2 $\beta$ ), ceci est en accord avec les données NOE mettant dans la même face  $\beta$  H-3 et H-2 $\beta$  et de proche en proche H-6 et H-14 (**35**).

**34****35**

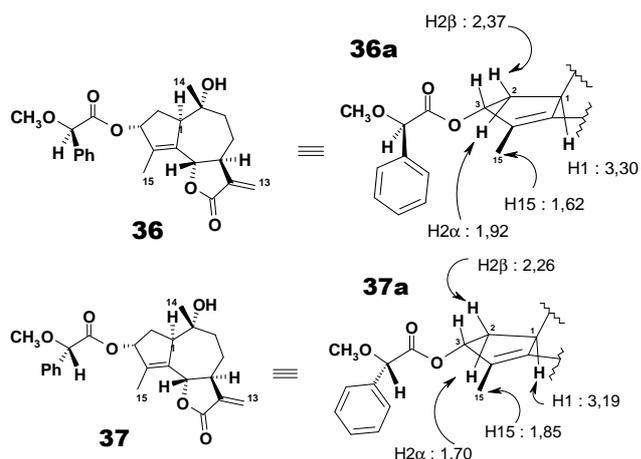
H-6 et H-7 étant alors dans des faces opposées ce qui conduit à une fusion de cycle *trans* en accord avec la constante de couplage vicinal *trans*- de 10,9 Hz de  $^3J_{H6/H7}$ . On a alors les relations de stéréochimie relative sur la face  $\alpha$  (**34**) et sur la face  $\beta$  (**35**) conduisant à la structure du pyréthroïdinine TD15.

### 3.2.3.3. Détermination des stéréochimies absolues dans la TD15

On a toujours admis que la stéréochimie absolue des guaianolides du type isophoto- $\alpha$ -santonique dans la famille des *Asteraceae* est (1R, 6R, 7S, 10R).<sup>120,121</sup> Toutefois, cette affirmation généralement admise est rarement démontrée. Une étude de stéréochimie absolue utilisant la méthode de Mosher-Trost<sup>122</sup> a été entreprise par un autre collaborateur pour la molécule TD15 qui est un alcool secondaire en C-3. On a ainsi observé des non équivalences diastéréoisomériques avec les spectres des esters O-méthylemandélates **36** et **37** synthétisés à partir de TD15 (*Annexes* p. **118-119**)

Tableau 19 :  $\delta$  des protons des esters **36** (R) et **37** (S) dans CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. (D'après Lincoln Scott)

Protons observés	$\delta$ (ppm)		$\Delta\delta$ (ppm)	Protons observés	$\delta$ (ppm)		$\Delta\delta$ (ppm)
	(R)	(S)			(R)	(S)	
H-1	3,30	3,19	0,11	2,37	2,26	0,11	
H-2 $\alpha$	1,92	1,70	-0,22	1,62	1,85	-0,23	



Les protons H-1 ; H-2 $\alpha$  et H-2 $\beta$  de (R) **36a** qui apparaissent à champ plus faible que les protons correspondants dans l'antipode (S) **37a** sont situés du côté opposé au plan contenant le cycle phényle du méthyle mandélate. Le groupement méthyle (H15) qui apparaît au champ plus élevé dans R (**36a**) que celui dans S (**37a**) est situé dans le même plan que le cycle phényle du méthylemandélate. Ainsi, la configuration absolue du C-3 est donc **R**.

Les structures (**38**, **39**) et les encadrés **A** et **B** qui suivent, récapitulent la stéréochimie qui s'écrit (**1R**, **3R**, **6S**, **7S**, **10R**) et les attributions spectrales complètes pour la pyréthroïdine TD15.

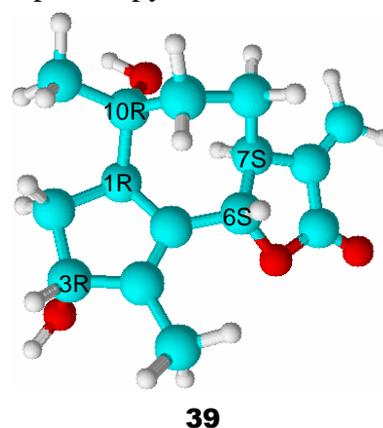
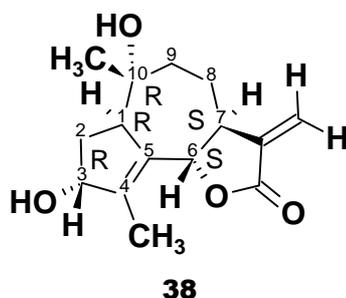


Tableau 20 : Attributions spectrales complètes <sup>1</sup>H de TD15

Proton	$\delta$ (ppm) CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Proton	$\delta$ (ppm) CD <sub>2</sub> Cl <sub>3</sub>
1	3,29	8 $\beta$	1,32
2 $\alpha$	1,86	9 $\alpha$	1,71
2 $\beta$	2,27	9 $\beta$	1,99
3	4,56	13	5,51
6	4,6	13'	6,18
7	2,9	14	0,91
8 $\alpha$	2,17	15	1,92

Tableau 21: Attribution <sup>13</sup>C complète de TD15

<sup>13</sup> C	$\delta$ (ppm) CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	<sup>13</sup> C	$\delta$ (ppm) CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
1	56,2	9	45,3
2	35,5	10	75,0
3	80,5	11	139,4
4	144,3	12	168,5
5	133,9	13	119,3
6	82,2	14	21,3
7	45,6	15	13,5
8	24,8	-	-

## Conclusions

Dans ce chapitre, l'utilisation concertée des techniques 1D et 2D de la RMN a permis l'investigation structurale du germacranolide **A9** et la révision structurale du guaianolide **TD15** qui ont été isolés et purifiés à partir des variétés de l'espèce *Tanacetum densum* selon la méthodologie de purification-identification de la Voie **A**.<sup>123,124</sup> L'usage extensif des techniques 1D de SINEPT et de DNOE a été très fructueux dans l'établissement des connectivités des systèmes de spin, des relations de proximité dans ces lactones sesquiterpéniques contenant l'unité structurale de  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone ainsi que l'attribution spectrale des carbones quaternaires et des protons diastéréotopiques. En particulier, l'attribution spectrale des protons exométhyléniques formant l'empreinte digitale de cette classe de composé a été faite sans ambiguïté par simple expérience SINEPT avec **A9**, en support aux règles empiriques des différents auteurs des années 70 tels que Samek. Dans la foulée, la relation *trans*- de fusion du cycle lactonique a été résolue par l'établissement des relations de proximités des faces  $\alpha$  et  $\beta$  des molécules par expérience DNOE en support des résultats des constantes de couplages et des règles empiriques établies. En marge de nos propres travaux RMN, la détermination de la stéréochimie absolue des molécules a été établie par dichroïsme circulaire du dérivé p-bromobenzoate pour la relation *trans*-diol de **A9** (**5R**, **6S**), celle de la molécule entière étant alors (**1S**, **4S**, **5R**, **6S**, **7S**, **8S**). Pour **TD15**, la méthodologie de Mosher-Trost a permis de vérifier la relation de stéréochimie absolue des guaianolides du type isophoto- $\alpha$ -santonique dans la famille des *Asteraceae* de (**1R**, **3R**, **6S**, **7S**, **10R**) qui est généralement admise mais rarement démontrée.

---

## **Chapitre 2.** Voie C : Analyses qualitative et quantitative par RMN du carbone-13 assistée par Ordinateur des résines de pin et des miels

---

### **1. Généralités sur les mélanges complexes de résine et de miel**

1.1. Oléorésines, valorisation et composition

1.2. Mélanges complexes de miel et sucres

### **2. Principes, matériels et méthodes**

2.1. Matériels et méthodes

2.2. Méthodologies d'analyse par la RMN du carbone-13 assistée par ordinateur

### **3. Résultats et discussions**

3.1 Composés terpéniques des résines provenant des échantillons de *P. kesiya* et *P. patula* d'origine géographique diverse

3.2 Analyse quantitative et équilibre tautomérique des sucres dans les miels dans des miels d'origine botanique et géographique diverse

## 1. GENERALITES SUR LES MELANGES COMPLEXES DES RESINES ET DES MIELS

Les résines et les miels sont des substances très connues et largement utilisées depuis longtemps. Avant d'aborder les études sur les produits issus de la biomasse locale, nous allons donner un aperçu sur les intérêts qu'ils suscitent, leurs caractéristiques, ainsi que les métabolites majeures qu'ils contiennent et pouvant ainsi justifier leur valorisation.

### 1.1. Oléorésines, valorisation et composition

Les oléorésines sont des exsudats de consistance molle ou semi-liquide que l'on peut obtenir par gemmage des arbres. Ce procédé de récolte permet d'obtenir suivant les espèces 2 à 7 kg de résine annuellement.<sup>125</sup> Les oléorésines font partie d'un système de défense des pins comme réponse aux blessures,<sup>126</sup> ou aux infections,<sup>127</sup> contre les insectes ou herbivores.<sup>128</sup> Les résines se composent alors d'une partie volatile servant de solvant aux métabolites qui constituent les composantes non volatiles. Selon le genre d'appartenance, les composantes non volatiles sont formées majoritairement des composés diterpéniques (pour *Pinus*, *Cedrus* ou *Agathis*) ou de triterpénoïdes (pour *Pistacia*, *Boswellia* ou *Commiphora*). Les substances phénoliques et composés diterpéniques sont caractéristiques des métabolites secondaires du genre *Pinus*.<sup>129</sup> La distillation à la vapeur d'eau produit l'essence de térébenthine (qui constitue la partie volatile) et la colophane (résidu). C'est l'industrie des parfums qui absorbe en grande partie la production d'essence de térébenthine, le reste étant utilisé dans des secteurs divers de la chimie comme les solvants, colles, détergents.<sup>130</sup> La colophane peut être valorisée telle qu'elle est ou par modification chimique comme la saponification, l'estérification, l'hydrogénation ou la polymérisation pour la fabrication des colles et adhésifs, d'encres, des peintures et des vernis, ou encore occasionnellement des ciments dentaires.<sup>131</sup>

#### 1.1.1. Constitution de la fraction volatile des résines

L'essence térébenthine est constituée essentiellement des monoterpènes dont en majorité l' $\alpha$ -pinène, le  $\beta$ -pinène qui sont des isolats pour synthèse. En outre, on y observe le limonène et le  $\Delta$ -3-carène possédant des propriétés anti-microbiennes. Le  $\Delta$ -3-carène et ses isomères servent aussi d'intermédiaires pour la synthèse stéréosélective des composés contenant le fragment de cyclopropyl-2,2-diméthyl-1,3-disubstitué.<sup>132</sup> Par ailleurs, on a montré que le 1,8-cinéole contenu dans la partie volatile est un composé possédant une activité cardiovasculaire. On observe habituellement des composés monoterpénique tels que le  $\beta$ -phéllandrène ou le myrcène, à côté des sesquiterpènes comme le longipinène, le longicyclène, le longifolène, le E-caryophyllène,<sup>133</sup> ou le  $\gamma$ -cadinène,<sup>134</sup> les composés diterpéniques comme le cembrène étant signalés plus rarement.<sup>135</sup>

#### 1.1.2. Constitution de la colophane

On observe en général dans cette fraction non volatile des résines des composés diterpéniques tricycliques (abiétane et pimarane), bicycliques (labdanes) et macrocycliques (cembranes) comme constituants majoritaires sous forme acide (acides résiniques) ou neutres (Voir annexes p. 120). Les acides résiniques les plus fréquemment rencontrés sont les acides

abiétique, déhydroabiétique, néoabiétique, lévopimarique, palustrique, pimarique et isopimarique.<sup>136</sup> Ces deux derniers composés sont des agents pharmacologiques potentiels, l'acide 12,14-dichloroabiétique dérivé de l'acide abiétique est un composé de dilatation des canaux K<sup>+</sup>.<sup>137</sup> L'acide sandapicomarique, quoique toujours en quantité minoritaire est aussi fréquemment observé parmi les constituants de la colophane. Les diterpènes neutres correspondent habituellement aux formes réduites : aldéhydes, alcools, oléfines des acides résiniques cités précédemment ou de leurs esters méthyléniques. On observe des alcools ou des oléfines macrocycliques possédant le squelette cembrane (isocembrol, cembrène), ou bien encore d'oxydes comme l'oxyde de manoyl et de 13-épi-manoyl.<sup>138</sup>

### 1.1.3. Analyses classiques des mélanges complexes de résine

L'analyse des mélanges complexes d'acides résiniques en présence des diterpènes neutres, des composés mono- et sesquiterpéniques est réalisée habituellement de manière classique utilisant la CPG ou le couplage CPG-SM. Des étapes préalables de fractionnement sont nécessaires afin de séparer les constituants volatils des diterpènes neutres et acides qui seront indépendamment analysés avec des conditions spécifiques adaptées à chaque famille de composés. Plusieurs auteurs tels que Ucar,<sup>139</sup> Lange ou Arrabal,<sup>140</sup> après distillation à la vapeur d'eau pour collecter les composés volatils ont fractionné les diterpènes neutres et acides par lavage basique ou par chromatographie sur colonne Sephadex des fractions solubles dans l'éther.<sup>141</sup> Les acides résiniques doivent être ensuite dérivatisés, le plus souvent en esters méthyliques pour permettre leur séparation chromatographique. Cependant les problèmes de coélution sur les colonnes de CPG rendent difficiles la séparation et l'identification des composés volatils ou des diterpènes.

Ainsi, Lange *et coll.* n'ont pas pu être différencier le cembrène et l'isocembrène sur la base de leur spectre de masse qui coéluent sur colonne DB-5. Zinckel *et coll.* ont utilisé des conditions de température ou l'utilisation des phases stationnaires spécifiques pour arriver à séparer les esters de lévopimarate et de palustrate de méthyle qui sont des composés fréquemment superposés.<sup>142</sup> Gref a montré que les acides résiniques non dérivatisés sont de séparation délicate sur chromatographie en phase gazeuse, en particulier les acides isopimarique, palustrique et lévopimarique qui ne sont pas séparables par cette méthode.<sup>143</sup>

Les méthodes de séparation par HPLC ont été utilisées mais sans grand succès malgré plusieurs types de dérivatisation utilisés, dont entre autres, les esters de coumarines par Richardson *et coll.* par exemple.<sup>144</sup> Santiago-blay *et coll.* ont utilisé la RMN du solide du carbone-13 pour l'étude taxonomique des plantes produisant des résines, des latex, ou des gommés.<sup>145</sup> Mais ces études qualitatives basées l'allure globale des spectres des exsudats, sont plutôt destinées à la différenciation des familles ou des genres. Ces difficultés nous ont amené à adopter les techniques d'analyse quantitative par RMN du carbone-13 en phase liquide qui constituent une méthodologie non destructive et ne nécessitant pas des séparations préalables ni des opérations de dérivatisation. (Voir parag. 2.2)

## 1.2. Mélanges complexes des miels et sucres

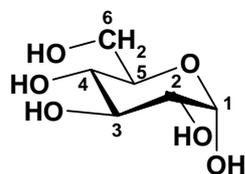
Le miel est un mélange complexe constitué majoritairement de deux monosaccharides, le fructose et le glucose dont les teneurs totales peuvent varier considérablement de 42 à 85%,<sup>146</sup> de di- et trisaccharides (jusqu'à 22 composés) pour une teneur globale entre 2-15%.<sup>147</sup> Ce sont alors des solutions aqueuses sursaturées de sucre où l'eau est

présente à une teneur variant de 14-20%. Les concentrations en ces sucres majoritaires gouvernent avec la teneur en eau l'activité de l'eau  $a_{H_2O}$  qui empêche la fermentation des miels sous l'action des levures sur les sucres et l'oxydation des alcools correspondants en acides.<sup>148</sup> C'est un des facteurs importants pour le contrôle de qualité des miels dans l'industrie alimentaire. Ces concentrations en sucre, le taux d'humidité, contrôlent aussi avec la température, la viscosité des miels qui est également un paramètre physico-chimique et sensoriel important pour leur commercialisation.<sup>149</sup> Par ailleurs, face aux fraudes et aux risques de contaminations diverses, l'authentification des miels et le contrôle de leur qualité deviennent d'autant plus importants que les miels constituent des apports alimentaires et nutritifs appréciés et très répandus dans le monde. L'analyse des sucres dans les miels qui a démarré vers les années 50 avec les chromatographies sur papier<sup>150</sup> en passant sur les chromatographies sur couche mince<sup>151</sup> s'est évoluée vers les techniques de CPG<sup>152,153,154</sup> en couplage ou non avec la SM.<sup>155</sup> Ces méthodologies sont toutefois handicapées par les étapes de dérivation des sucres<sup>156</sup> et les problèmes de coélution des dérivés. Les techniques de HPLC qui se sont développées par la suite<sup>157</sup> se sont heurtées aux problèmes de rupture de colonne avec greffage aminé<sup>158, 159</sup> conduisant au développement de la HPLC à échange d'anion utilisant du détecteur ampérométrique pulsé.<sup>160,161</sup> Malgré l'introduction de l'analyse quantitative en RMN du carbone-13 en analyse des sucres dans les aliments par Coxon,<sup>162</sup> Rathbone,<sup>163</sup> ou Tamate,<sup>164</sup> peu de travaux ont suivi ceux de Low<sup>165</sup> dans le domaine des miels. Les travaux de Mazzoni<sup>166</sup> qui se sont apparus plus tard, font alors suite au développement des protocoles expérimentaux simples par Casanova *et coll.* (en parag. 2.2)

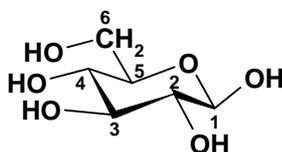
En général, on peut grouper les sucres des miels en deux catégories : l'une, la catégorie du D-glucose et les di- et trisaccharides possédant une unité D-glucose terminale ou non et l'autre, la catégorie du D-fructose avec les di- et trisaccharides possédant une unité D-fructose terminale (réductrice ou non).

### 1.2.1. D-glucose et di- et trisaccharides possédant une unité D-glucose terminale

En mélange naturel, le D-glucose se répartit sous la forme d'un mélange de six isomères à cause de l'équilibre mutarotationnel (Fig. 10, p. 101) dont les formes majoritaires<sup>167</sup>



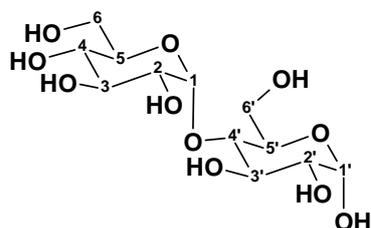
$\alpha$ -D-glucopyranose



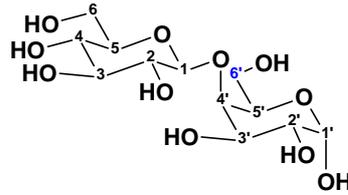
$\beta$ -D-glucopyranose

Forme pyrane  $\alpha$  et  $\beta$  du D-glucose  
Carbone 1 : carbone anomérique

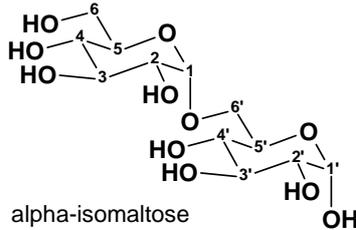
sont les anomères  $\alpha$ -D-glucopyranose et le  $\beta$ -D-fructopyranose. Quelques composés représentatifs des oligosaccharides avec une unité D-glucose terminale sont donnés ci-dessous.



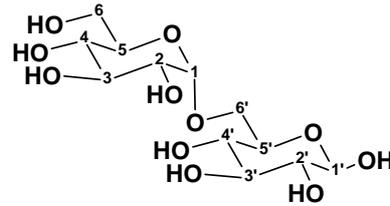
Formes  $\alpha$  et  $\beta$ -pyrane du maltose  
 $\alpha$ -maltose :  $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)-glucopyranose  
 $\beta$ -maltose :  $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)-glucopyranose

$\alpha$ -maltose $\beta$ -maltose

$\alpha$ -isomaltose :  $\alpha$ -D-GP(1  $\rightarrow$  6')  $\alpha$ -D-GP(1'  $\rightarrow$  6')  $\alpha$ -D-GP et le  $\beta$ -isomaltose :  $\alpha$ -D-GP(1  $\rightarrow$  6')  $\alpha$ -D-GP(1'  $\rightarrow$  6')  $\beta$ -D-GP :

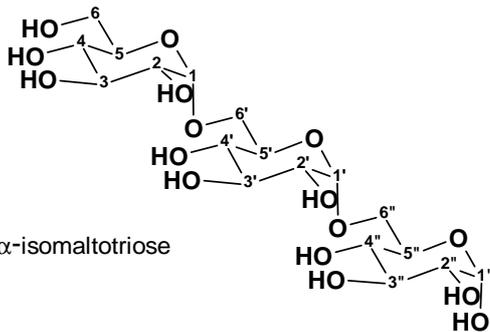
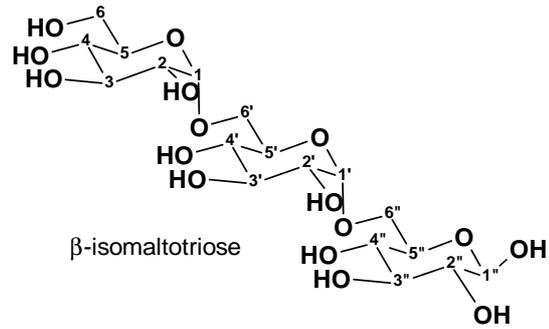
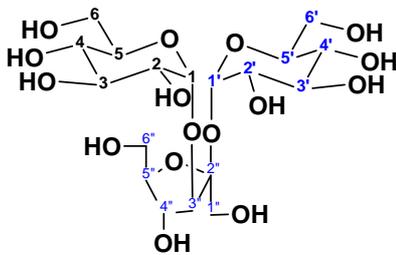


alpha-isomaltose



bêta-isomaltose

(1  $\rightarrow$  6')- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1'  $\rightarrow$  6'')- $\alpha$ -D-glucopyranose et le  $\beta$ -isomaltotriose :  
 $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  6')- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1'  $\rightarrow$  6'')- $\beta$ -D-glucopyranose.

 $\alpha$ -isomaltotriose $\beta$ -isomaltotriose

mélézitose

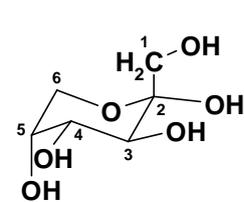
Structure du mélézitose :

$\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)- $\beta$ -D-fructofuranosyl-(3  $\rightarrow$  1)- $\alpha$ -D-glucopyranose

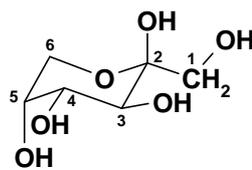
### 1.2.2.

Le D-fructose et le di- et trisaccharides avec une unité D-fructose réductrice terminale

En tant que cétose, le D-fructose s'observe à l'état naturel sous cinq formes tautomériques : la forme cétonique non cyclisée (chaîne ouverte) ; les deux anomères  $\alpha$  et  $\beta$  sous forme pyrane  $\alpha$ -FP (très minoritaire) et  $\beta$ -FP (majoritaire) ; les deux anomères  $\alpha$  et  $\beta$  sous forme furane  $\alpha$ -FF (minoritaire) et  $\beta$ -FF (majoritaire). La forme cétonique ouverte n'est pas détectée en accord avec les données de la littérature selon Horton par exemple.<sup>168</sup>

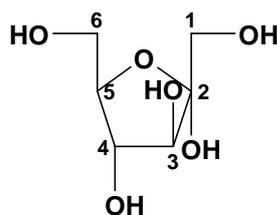
 $\alpha$ -D-fructopyranose $\alpha$ -D-fructopyranose

$^{13}\text{C}$	$\delta$ (Mazzoni)	$\delta$ (Horton)
1	64,84	65,9
2	98,61	99,1
3	70,80	70,9
4	71,10	71,3
5	61,77	62,0
6	61,75	61,9

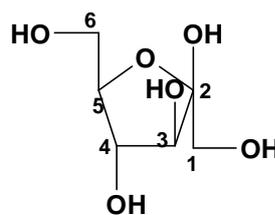
 $\beta$ -D-fructopyranose $\beta$ -D-fructopyranose

$^{13}\text{C}$	$\delta$ (Mazzoni)	$\delta$ (Horton)
1	64,56	64,9
2	98,65	99,0
3	68,26	68,6
4	70,34	70,6
5	69,83	71,0
6	63,93	64,3

Pour les formes furane  $\alpha$  et  $\beta$  :

 $\alpha$ -D-fructofuranose $\alpha$ -D-fructofuranose

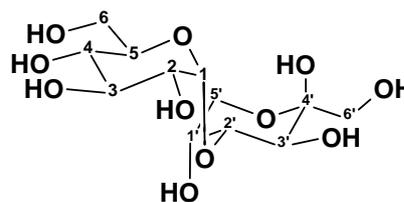
$^{13}\text{C}$	$\delta$ (Mazzoni)	$\delta$ (Horton)
1	63,57	63,7
2	105,02	105,3
3	82,63	82,9
4	76,67	77,0
5	81,87	82,3
6	61,72	62,1

 $\beta$ -D-fructofuranose $\beta$ -D-fructofuranose

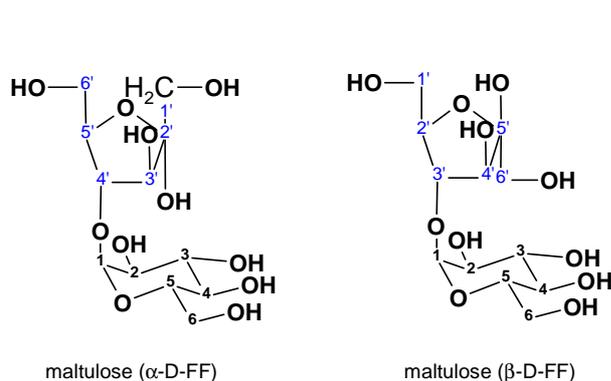
$^{13}\text{C}$	$\delta$ (Mazzoni)	$\delta$ (Horton)
1	63,34	63,7
2	109,99	102,4
3	76,02	76,4
4	75,13	75,4
5	81,26	81,6
6	62,98	63,3

Les tableaux de déplacements chimiques ci-dessus sont tirés des travaux de Mazzoni,<sup>166</sup> et de Horton.<sup>168</sup> La maltulose se trouve sous forme de trois tautomères dont le maltulose ( $\beta$ -D-FP), et les formes anomériques  $\alpha$  et  $\beta$ -fructofuranose de la maltulose.

Maltulose ( $\beta$ -D-FP)					
$^{13}\text{C}$	$\delta$ (M)	$\delta$ (J)	$^{13}\text{C}$	$\delta$ (M)	$\delta$ (J)
1	101,06	101,6	1'	64,41	65,08
2	71,42	73,0	2'	98,88	99,38
3	73,51	74,0	3'	67,51	68,17
4	70,23	70,8	4'	78,62	79,15
5	72,87	73,5	5'	69,79	70,31
6	61,17	61,8	6'	64,00	64,54

 $\beta$ -FP-maltulose

Les tableaux de  $\delta$  pour les anomères  $\alpha$  et  $\beta$ -fructofuranose de la maltulose sont tirés des travaux de Mazzoni<sup>166</sup> ainsi que de Jarrel.<sup>169</sup>

maltulose ( $\alpha$ -D-FF)maltulose ( $\beta$ -D-FF)

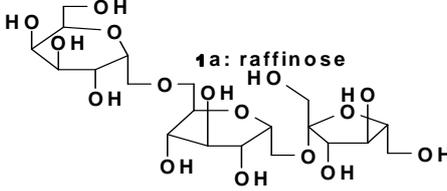
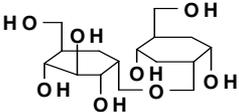
$^{13}\text{C}$	$\delta$	$\delta$	$^{13}\text{C}$	$\delta$	$\delta$
	Mazzoni	Jarrel		Mazzoni	Jarrel
1	98,24 ( $\alpha$ )	98,9	1'	63,31 ( $\alpha\beta$ )	63,7
	98,84 ( $\beta$ )	99,4			
2	71,84 ( $\alpha\beta$ )	72,4	2'	105,85 ( $\alpha$ )	106,4
				102,52 ( $\beta$ )	103,1
3	73,38 ( $\alpha\beta$ )	73,9	3'	81,74 ( $\alpha$ )	83,4
				75,82 ( $\beta$ )	76,5
4	70,04 ( $\alpha\beta$ )	70,6	4'	82,73 ( $\alpha$ )	91,3
				81,74 ( $\beta$ )	82,4
5	72,93 ( $\alpha\beta$ )	73,5	5'	80,71 ( $\alpha$ )	82,3
				80,51 ( $\beta$ )	81,2
6	61,00 ( $\alpha\beta$ )	61,6	6'	61,96 ( $\alpha$ )	62,5
				63,01 ( $\beta$ )	63,9

### 1.2.3.

Bases de données et autres types de sucres rencontrés

Nous avons généralement utilisé les bases de données informatisées SUCRES ou les fiches du laboratoire de chimie et biomasse pour cribler les spectres de miel. Les

investigations sur des bases de données sur *Internet* ont porté sur d'autres types des alditols tels que le D-glucitol ou d'autres trisaccharides tels que le raffinose et le kojibiose.

	N°C	$\delta$ (ppm)		
<b>CH<sub>2</sub>OH</b>			 <p><b>1a: raffinose</b></p>	 <p><b>1b: α-kojibiose</b></p>
<b>OH</b>	1	63,08		
<b>OH</b>	2	71,76		
<b>HO</b>	3	70,29		
<b>OH</b>	4	71,64		
<b>CH<sub>2</sub>OH</b>	5	73,58		
<b>D-glucitol</b>	6	63,47		

## 2. PRINCIPES, MATÉRIELS ET MÉTHODES EN ANALYSE PAR RMN DU CARBONE-13

Nous allons voir ci-après les matériels et méthodes qui ont été utilisés dans nos recherches (2.1.) et les principes de la méthodologie d'analyse avec la RMN du  $^{13}\text{C}$  assistée par ordinateur ou Voie C (2.2.).

### 2.1. Matériels et méthodes

#### Analyse des composés terpéniques dans les mélanges complexes de résine

*Collecte des résines.* Les résines ont été collectées durant la période fin Août-Début septembre 2005 pour les échantillons de *P. kesiya* : Bréville, Andriamena Chrome (Pk1), Marovitsika à Moramanga (Pk2) ; Antsahamarofoza, Ilafy (Antananarivo) pour Pk3 et à Viliahazo, Ilafy (Antananarivo) pour le *P. patula* (Pp). Les résines ont été collectées sans technique spéciale soit par gemmage artisanal (Pk1, Pk2) ou par simple grattage des écorces des pins (Pk3, Pp) et ont été par la suite conservées sans précaution spéciale. L'espèce *P. kesiya* Pk1 a été identifié au service de des forêts du Ministère de l'environnement d'Ambatondrazaka, les autres espèces de *P. kesiya* (Pk2, Pk3) et le *P. patula* ont été identifiés au département des forêts et de pêche de FOFIFA du Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche Scientifique à Ambatobe.

*Analyse directe des résines brutes.* 70 à 100 mg de résine brute sont dissous dans du chloroforme- $d_1$  et filtré sur pipette pasteur avec bout de coton pour enlever les impuretés. 0,5 ml de la solution est utilisé pour analyse RMN dans un tube de 5 mm. (Annexes p.118-119)

*Hydrodistillation et extraction.* Pour chaque résine, 5-7 g ont été soigneusement pesés pour hydrodistillation dans un essencier de 250 mL de type Clavenger et distillé jusqu'à épuisement total de l'huile essentielle (environ 3 à 4 heures en moyenne). L'huile essentielle obtenue est conservée pour analyses ultérieures en CPG et RMN. La partie aqueuse est laissée se refroidir en vue d'extraction à l'éther des composés résiniques. Les phases aqueuses sont ainsi extraites jusqu'à l'obtention d'un pH neutre. Les extraits étherés ont été séchés sur sulfate de sodium pendant toute une nuit et évaporés sous vide partiel d'un rotavapor. Les masses résineuses blanches sont laissées se sécher sous vide partiel avant rebroyage et séchage à l'air libre en vue d'analyse directe par RMN.

*Chromatographie en Phase gazeuse (CPG).* Environ 50 ml de l'huile essentielle formant la fraction volatile sont dilués dans du chloroforme- $d_1$  pour analyse en CPG avant analyse par RMN  $^{13}\text{C}$  sur le même échantillon. Les analyses sont effectuées sur Perkin Elmer Autosystem équipé avec double colonne capillaire (50 m x 0,22 mm d.i. ; épaisseur du film : 0,25  $\mu\text{m}$ ), polaire (BP-20, polyéthylène glycol) et apolaire (BP-1, diméthylsiloxane) et comportant des détecteurs à ionisation de flamme. Conditions opératoires : gaz vecteur hélium ; pression en tête de colonne : 20 psi (1,4 bar) ; température de l'injecteur : 250°C ; programmation de température 60 à 220 °C à 2°C/mn avec un palier de 20 mn à 220 °C ; injection en mode split. Les composés sont identifiés à la base des indices de Kovats (IK) sur colonne apolaire et colonne polaire qui donne par la même occasion le pourcentage en masse.

*Analyse par RMN du carbone-13.* Tous les spectres RMN ont été enregistrés sur appareil Bruker Avance 400 opérant à 9,4 T (400,13 pour  $^1\text{H}$  ; 100,63 MHz pour  $^{13}\text{C}$ ) avec une sonde de 5mm et

à la température ambiante de 21°C. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm ( $\delta$ ) par rapport au TMS pris comme le zéro de référence. Les enregistrements sont effectués avec une largeur spectrale complète de 250 ppm avec découplage en mode CPD (Composite Phase Decoupling) ; résolution digitale : 0,183 Hz/pt ; le nombre d'accumulation est de 3000 pour un échantillon. Les données de FID sont multipliées par une fonction exponentielle (1,0 Hz) avant transformée de Fourier.

*Analyse qualitative directe des résines brutes.* L'analyse directe des résines brutes est effectuée dans le  $\text{CDCl}_3$  utilisé comme solvant et calibré par rapport au TMS ( $^{13}\text{CDCl}_3$  ;  $\delta$  77,00 ppm) Enregistrements des spectres : séquence avec CDP comportant une durée d'impulsion de 5,0  $\mu\text{s}$  correspondant à une angle d'impulsion de 45°, associée à un temps d'acquisition AQ de 1,3 s et un délai de relaxation de 2 s pour un nombre de balayage égal à 4000.

*Analyse qualitative directe fraction volatile.* Conditions identiques aux précédentes. 50 mg d'huile donnant 0,5 ml de solution dans le  $\text{CDCl}_3$  utilisé comme solvant ( $^{13}\text{CDCl}_3$  ;  $\delta$  77,00 ppm) calibrée par rapport au TMS. Enregistrement des spectres : séquence avec CDP comportant une durée d'impulsion de 5,0  $\mu\text{s}$  correspondant à une angle d'impulsion de 45°, associée à un temps d'acquisition AQ de 1,3 s et un délai de relaxation de 2 s pour un nombre de balayage égal à 4000 avec une résolution digitale de 0,763 Hz/point.

*Analyse quantitative des fractions non volatiles.* On pèse soigneusement 50 à 70 mg d'échantillon de fraction non volatile dans un tube de 5 mm RMN. On ajoute soigneusement à l'aide d'une seringue une quantité précise de diglyme entre 5-10 mg utilisé comme référence interne ( $^{13}\text{C}$ -diglyme : 72,00 ppm, 70,50 ppm). Enregistrement des spectres : durée d'impulsion : 2,67  $\mu\text{s}$  (30°) ; temps d'acquisition AQ : 2,6 s pour 128 K de données avec une largeur spectrale de 250 ppm ; temps de relaxation : 0,1 s donnant un temps de répétition de 2,7 s ; découplage en mode CPD (Composite Phase Decoupling) ; résolution digitale : 0,183 Hz/pt ; le nombre d'accumulation est de 5000 pour un échantillon (environ 50 mg dans 0,5 mL de  $\text{CDCl}_3$ ). Les données de FID sont multipliées par une fonction exponentielle (1,0 Hz) avant transformée de Fourier.

*L'analyse des spectres RMN.* L'analyse des spectres RMN se fait sur la liste des pics obtenus qui est introduite dans les bases de données informatiques de l'ordinateur (250 pics maximum). La liste ainsi enregistrée est passée sous crible des différentes bases de donnée développées au laboratoire TERPENES LINEAIRES, PHENOLS, TRITERPENES ou d'autres bases de données accessibles sur Internet (NMRSHFIT, SDBS). Les constituants délivrés par les bases de données sont identifiés par attribution spectrale du squelette carboné. Pour l'analyse des fractions volatiles, les constituants ainsi identifiés sont reportés sur l'analyse en CPG pour quantification. Pour la quantification des fractions non volatiles, les intégrations sont effectuées manuellement en utilisant le programme Windows du Bruker Avance 400. Les calculs quantitatifs et leur évaluation sont effectués en utilisant un simple programme excel.

*Péréquations et caractérisation globale des échantillons de résine.* Connaissant les rendements en huiles essentielles et le rendement de l'extraction par éther de la phase aqueuse acide de

l'hydrodistillation, nous pouvons en déduire les compositions en % par rapport à la résine débarrassée de ses impuretés.

### Analyse des sucres dans les mélanges complexes des miels

*Collecte des miels.* Le miel d'eucalyptus (miel1, Ambositra), le miel de Morondava (miel 4) ont été achetés sur le marché local d'Antananarivo (août **2005**), tandis le letchis (miel2, **2004**) et le miel de forêt (miel3, **2005**) ont été fournis par le département de Biologie Végétale de la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo. Le miel Michaud (miel5) a été acheté en Corse (Novembre **2005**) et les autres miels dont le miel Elisa (miel6), le miel de bruyère (miel7) et le miel de maquis (miel8) ont été fournis par des apiculteurs de Ferrals Les Montagnes (Owen, décembre **2005**). Tous ont été conservés sans précautions spéciales jusqu'à utilisation pour analyse.

*Préparation des échantillons pour analyse.* Environ 50-70 mg de miel (pesé et noté soigneusement) sont dissous dans un bêcher dans du mélange H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 95:5 en volume au l'on ramène ensuite à 0,5 ml après transfert dans un tube RMN de 5mm. On ajoute avec précaution quelques gouttes de dioxanne-1,4 (5-7 mg) et dont on note soigneusement la masse qui va servir de référence interne pour l'enregistrement du spectre RMN. Pour les miels 1-5 (miels locaux et miel Michaud), on laisse le mélange s'équilibrer à la température ambiante de la salle (21°C) avant l'enregistrement RMN. Pour les miels de bruyère et le miel de maquis, les spectres ont été immédiatement enregistrés après la préparation des échantillons

*Analyse par RMN du carbone-13.* Tous les spectres RMN ont été enregistrés sur appareil Bruker Avance 400 opérant à 9,4 T (400,13 pour <sup>1</sup>H ; 100,63 MHz pour <sup>13</sup>C) avec une sonde de 5mm et à la température ambiante de 21°C. Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm par rapport au dioxanne-1,4 comme pris comme référence interne à (<sup>13</sup>C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub> ; 67,12 ppm). Les enregistrements sont effectués avec une largeur spectrale complète de 250 ppm avec découplage standard en mode CPD (Composite Phase Decoupling) avec les paramètres suivants : largeur d'impulsion = 2,67 μs (angle de Ernst égal à 30°); temps d'acquisition = 1,3 s (64K de données) ; temps de relaxation : 1 s (donnant un temps total de répétition de 2,3 s. La résolution digitale est de 0,183 Hz/pt ; le nombre d'accumulation est de 3000 pour un échantillon. Les données de FID sont multipliées par une fonction exponentielle (1,0 Hz) avant transformée de Fourier.

*Identification et quantification des sucres.* Une liste de données RMN du carbone-13 des différents sucres avec les différents oligosaccharides contenus dans des miels d'origine botanique et géographique différente a été préparée à partir des données des bases de données informatiques et des fiches manuelles du Laboratoire de Chimie et Biomasse ainsi que des données provenant des recherches effectuées sur Internet (SDBS ; NMRSHFTDB). L'identification et la quantification des différents sucres ont été alors effectuées à partir de cette liste enregistrée sur simple feuille de calcul Excel en tenant compte des écarts moyens de la

moyenne des pics pour chaque sucre identifié. Les calculs des formes tautomériques ainsi que la simulation graphique des spectres s'effectuent sur la même feuille de calcul Excel.

## **2.2. Principes des méthodologies d'analyse avec la RMN du carbone-13 assistée par ordinateur**

Les évolutions impressionnantes de la RMN qualitative ont fait presque passer inaperçus les progrès dans la RMN quantitative qui, d'ailleurs n'a pas fait l'objet de beaucoup d'attention et a été même plutôt négligée au début surtout par la communauté académique. Pourtant, la RMN quantitative utilisant surtout le proton couvre plusieurs domaines d'étude tels que la quantification dans les mélanges complexes, la validation des produits de référence et de pureté, l'étude de la stabilité des produits, l'étude de mécanisme et de cinétique des réactions et l'étude des biosynthèses ( $^{13}\text{C}$ ). D'autre part, le carbone-13 étant le noyau le plus étudié dans les composés organiques, a une sensibilité quatre fois moindre que celle du proton et est en plus handicapé par son faible abondance naturelle de 1,1%. Dès 1957, quatre ans après la sortie des premiers appareils RMN du proton commerciaux, Lauterbur a obtenu le premier spectre de carbone-13.<sup>170</sup> Mais pour différentes raisons techniques, il a fallu attendre l'introduction des techniques de transformé de Fourier pulsée de Ernst et Anderson<sup>171</sup> en 1966 après les travaux préliminaires de Lowe et Norberg,<sup>172</sup> pour que des avancées majeures dans la pratique de la RMN du carbone-13 se fassent jour. Néanmoins, la RMN du carbone-13 qui a été surtout utilisé pour l'étude des biosynthèses, a peu à peu trouvé ses applications en analyse quantitative.

**Intérêts de l'utilisation de la RMN du carbone-13.** Comparée aux autres méthodologies d'analyse, la RMN présente des avantages indéniables :

1. Les spectres, du moins pour les métabolites issues de la biomasse, sont réalisés habituellement à température ambiante permettant ainsi d'éviter la dégradation ou la transformation des molécules thermosensibles ;
2. Un autre avantage de la RMN est son caractère non invasif permettant de récupérer l'échantillon à fin d'autres expériences.  
Par rapport à la RMN du proton:
3. le carbone constitue le squelette de toutes les molécules organiques et les différents atomes présents sont dans la majorité écrasante des cas magnétiquement non équivalents. Ainsi d'une façon générale, le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  présente autant de raies de résonance qu'il y a de carbones dans la molécule ;
4. l'irradiation totale des protons qui permet de n'observer dans le spectre qu'une raie de résonance par carbone simplifie considérablement les spectres de RMN de  $^{13}\text{C}$  ;
5. Dans le domaine des petites molécules où nous travaillons, les raies des spectres de carbone présentent une bien meilleure résolution que celles des protons grâce au temps de relaxation transversale  $T_2$  plus long pour le carbone que pour le proton ;
6. le domaine de résonance du carbone s'étend sur une plage beaucoup plus vaste (250 ppm) que celle du proton (12 ppm). Ceci procure avantageusement une plus grande dispersion spectrale.

### 2.2.1. Techniques de découplages en RMN du carbone-13 et édition spectrale

Nous allons commencer cette section par une rapide revue sur les fondements des techniques de découplage CDP que nous avons utilisées en analyse qualitative et en analyse quantitative.

#### 2.2.1.1. Techniques de découplage Composite Pulse Decoupling (CPD)

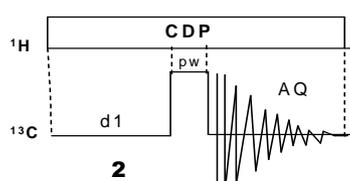
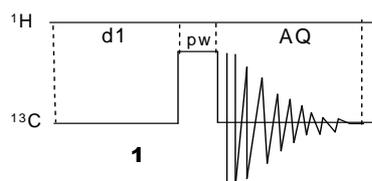
Si la technique de découplage en onde continue (CW), qui s'effectue à partir d'une seule fréquence (notée  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ) ne permet pas de couvrir l'ensemble des protons de tous les carbones, les techniques de découplage à large bande (par bruits) permet de faire un découplage sur tout l'intervalle en entier du spectre de proton. L'utilisation des générateurs de bruits qui opèrent sur une bande de 1000 Hz, suffisamment large pour découpler l'ensemble des protons des spectres de carbones conduit toutefois à des nouveaux problèmes :

- (i) l'élargissement de la bande de fréquence de travail de ces appareillages qui demandent des puissances de plus en plus élevées, provoquant un échauffement excessif et qui peut endommager l'échantillon,
- (ii) un échauffement est inévitable en expérience de découplage inverse  $^1\text{H}(\text{X})$  avec un hétéronoyau de faible  $\gamma$ .

On a ainsi remplacé le découplage par générateur de bruit par le découplage par impulsion donnant ainsi naissance aux techniques de Composite Pulse Decoupling ou CPD élaboré en premier par Elvitt *et coll.* et à qui on a donné le nom de MLEV.<sup>173</sup> Comme les schémas MLEV sont très sensibles au moindre décalage de phase, on lui préfère le schéma WALTZ dont le plus utilisé est le WALTZ16.<sup>174</sup> Le nom « composite » provient du fait que ces techniques sont constituées elles-mêmes d'un certain nombre de séquences d'impulsion de base au nombre de 16 dans notre cas (Il existe par exemple le MLEV17 avec 17 séquences de base). Ces « composites » entrent dans les séquences des techniques plus élaborées, là où l'on aura besoin de découplage du proton tels que le DEPT ou les techniques de corrélation hétéronucléaires 2D.

#### 2.2.1.2. Techniques d'édition spectrale de carbone-13 avec les CDP

Les arrangements des créneaux se traduisant par la position ON et OFF du découpleur du canal  $^1\text{H}$  sur le délai d'acquisition AQ et le temps de relaxation d1 permettent de faire l'édition des spectres selon les besoins de l'utilisateur suivant les schémas **12** ci-dessous.



**1** : Spectre avec couplage et sans NOE. le découpleur est OFF durant les deux phases de relaxation et d'acquisition.

**2** : le découpleur est ON durant toutes les phases d'acquisition et de relaxation On a un

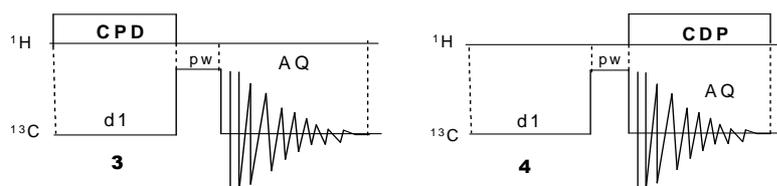


Schéma 12: différents types d'édition de spectre de carbone

Selon les besoins de l'utilisateur, l'appareillage RMN peut fournir différents schémas de CPD tels que le MLEV16 ou le WALTZ16 etc.

spectre découplé avec total NOE (spectre  $^{13}\text{C}$  standard)

**3** : le découpleur est ON durant la phase de relaxation et OFF pendant l'acquisition. On a un spectre couplé et avec NOE (gated spectrum)

**4** : le découpleur est ON durant la phase d'acquisition et OFF durant la relaxation. On a un spectre découplé sans aucun NOE (découplage en créneaux inversés).

### 2.2.2. Analyse qualitative des mélanges complexes par RMN du $^{13}\text{C}$

Trois principaux paramètres directement accessibles par le logiciel d'aide à l'identification déterminent la caractérisation des constituants d'un mélange (Fig. 6) :

- (i) Le nombre de pics observés par rapport au nombre de pics attendus pour chaque molécule ;
- (ii) le nombre de superposition de pics qui peuvent se produire quand deux carbones appartenant à deux molécules différentes ont fortuitement le même déplacement chimique ;
- (iii) les variations des déplacements chimiques des carbones dans le spectre du mélange par rapport aux valeurs de référence ( $\Delta\delta$ ).

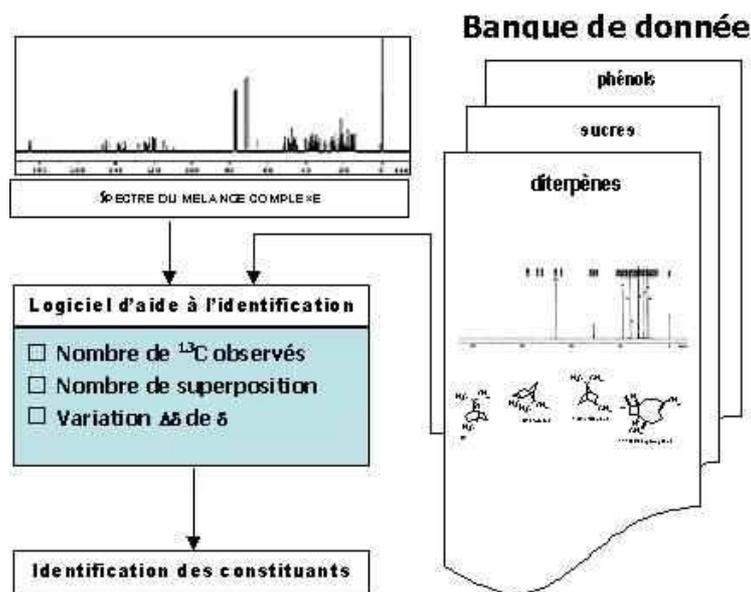


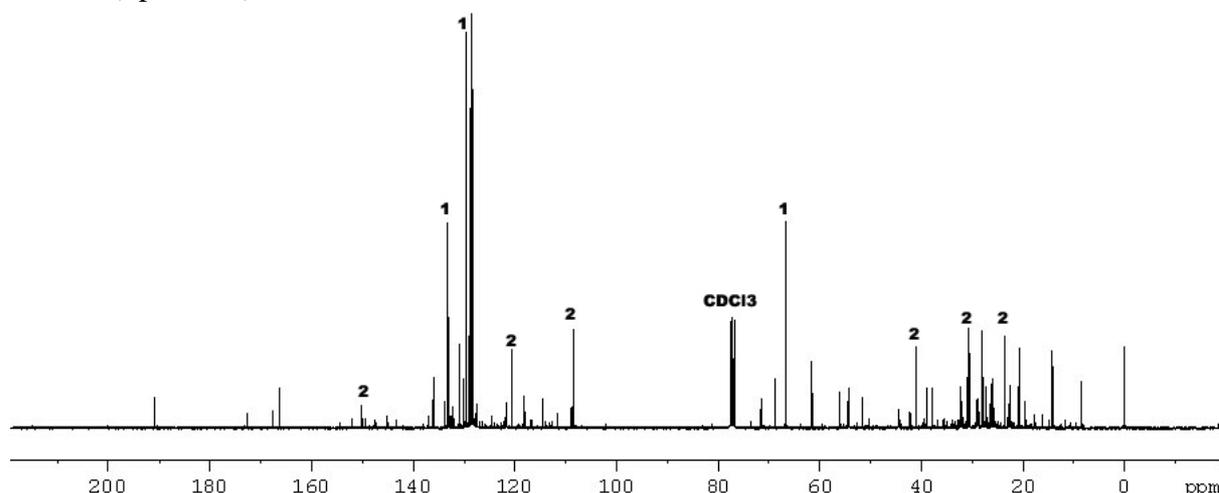
Figure 7 : Protocole expérimentale d'analyse des mélanges complexes par RMN du carbone-13

#### 2.2.2.1. Familles de composés et banques de données

Cette méthodologie a été appliquée à différentes familles de composés (terpènes, lipides, sucres, phénols) selon un protocole expérimental propre et spécifiquement adapté suivant des paramètres précis techniques d'enregistrement des spectres (séquence d'impulsion pour l'acquisition des données), accompagnés des conditions d'analyse (nature du solvant, dilution). Les banques de données de laboratoire sont continuellement enrichies avec des spectres des produits commerciaux, des produits isolés et identifiés ou encore par des produits préparés par hémisynthèse

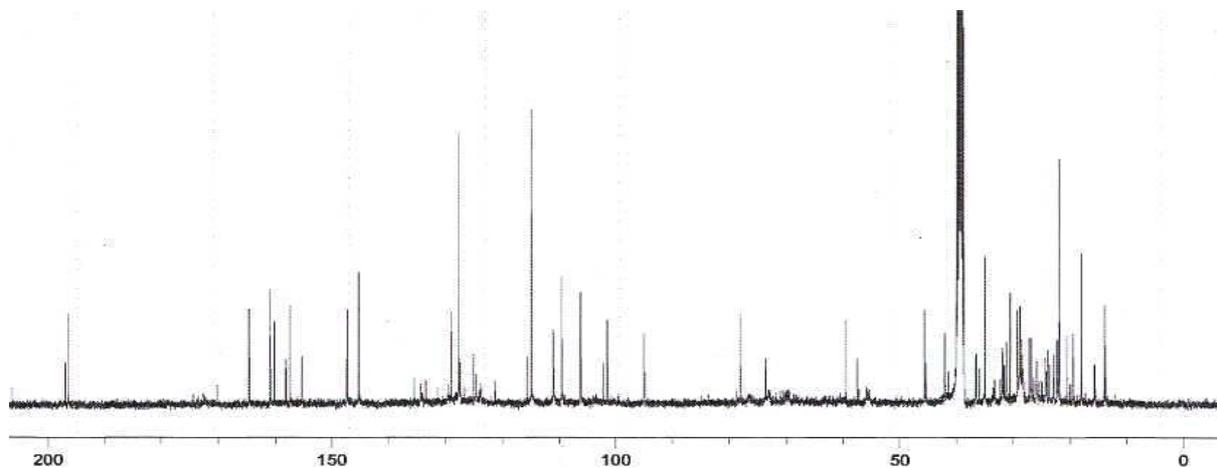
### 2.2.2.2. Potentiels et limites de l'analyse par RMN du carbone-13

Nous avons appliqué la méthodologie d'analyse par RMN  $^{13}\text{C}$  dans divers domaines de la biomasse telles que les résines, les huiles essentielles, les extraits aux solvants des plantes médicinales ou dans le domaine des produits synthétiques complexes comme les parfums. (Spectre 9)



Spectre 9 : Spectre de carbone 13 du parfum "Berlingot" dans le  $\text{CDCl}_3$ .

Enregistrement spectre : Séquence d'impulsion standard CDP sur Bruker Avance 400 (100,625 MHz  $^{13}\text{C}$  ; solvant  $\text{CDCl}_3$ ) ; nombre de balayages : 4000 ; référence triplet des pics résiduels  $\text{CDCl}_3$  à 77,61 ; 77,29 et à 76,97 ppm. Echantillon pris : 78,5 mg dissous dans 0,5ml de solvant dans le tube RMN. Nombre de pics enregistrés : 158. Pics des composés majoritaires : 1 alcool benzylique ; 2 limonène



Spectre 10 : Région de 0-210 ppm du spectre de la fraction PmF-MeOH-AcOEt dans le  $\text{DMSO}-d_6$ .

Enregistrement spectre : Séquence d'impulsion standard sur Bruker Avance 400 (100,63 MHz  $^{13}\text{C}$  ; solvant  $\text{DMSO}$ ) ; 33 mg d'extrait dans 0,5 ml de solvant).

La principale limitation se situe dans la sensibilité qui se traduit par une limite de détection relativement restreinte par rapport aux autres méthodologies spectroscopiques. Ainsi, nous n'avons pas pu déterminer les triterpènes remangilones isolés du *P. madagascariensis* dans les extraits analysés par RMN du carbone-13. (Spectre 10)

### 2.2.3. Méthodologie d'analyse quantitative par RMN du carbone-13

Une des conditions primordiales en RMN pour l'analyse quantitative est une réponse homogène de l'ensemble des noyaux de carbone-13. En général, deux facteurs majeurs

sont responsables de la réponse non uniforme des noyaux : (i) le temps de relaxation longitudinale  $T_1$  des carbones, et (ii) les variations des effets NOE. .

### 2.2.3.1. Revue des quelques considérations expérimentales

En tenant compte des facteurs résultant de  $T_1$  et des effets NOE, diverses considérations expérimentales portant sur les séquences ou l'utilisation des réactifs ont été élaborées pour une meilleure approche de la quantification par RMN du carbone-13. Une relaxation totale des tous les carbones de l'ensemble des molécules supposées présentes dans le mélange est obtenue par un angle d'impulsion de  $90^\circ$  combinée à un délai d'attente égale à 5-7 fois  $T_1$  du temps de relaxation le plus long.<sup>175,176,177</sup> L'application simultanée de ces paramètres et du découplage en créneaux inversés (inverse-gated decoupling), qui provoquera la suppression des effets NOE est reconnue comme étant la séquence standard de la quantification par RMN du carbone-13.<sup>178</sup> La diminution des temps de relaxation  $T_1$  et la suppression des effets NOE peuvent être également obtenues par l'utilisation des réactifs de relaxation paramagnétiques tels que le  $\text{Cr}(\text{acac})_3$  ou le  $\text{Fe}(\text{acac})_3$ . Néanmoins, cette technique nécessite des temps de délai entre les impulsions relativement longs et un nombre d'accumulation suffisamment important pour compenser les pertes d'effet NOE. D'autre part, l'élargissement de raie à certaines concentrations induit par les réactifs de relaxation peut être préjudiciable pour la résolution des pics en analyse des mélanges complexes. Ng<sup>179</sup> puis Kalinoswki<sup>180</sup> ont montré qu'une autre approche de la quantification par RMN du  $^{13}\text{C}$  peut être réalisée avec des séquences mettant en œuvre une série rapide d'impulsion courte. En effet, la diminution de l'angle d'impulsion  $\alpha$  amoindrit les différences d'aimantation entre les noyaux d'inégal temps de relaxation  $T_1$  avec des risques toutefois de baisse du ratio signal sur bruit S/B. Une solution intermédiaire entre les approches ci-dessous constitue une bonne réponse pour l'analyse quantitative des mélanges complexes contenant des noyaux avec des  $T_1$  différents. Les conditions sont obtenues par une séquence optimale permettant de réduire au minimum les différences d'aimantation entre les noyaux de  $T_1$  différents tout en permettant d'obtenir le meilleur rapport S/B suffisant dans un laps de temps le plus court possible. La détermination de ces conditions peut être abordée par un calcul théorique suivant l'équation [1] qui permet de calculer, pour des valeurs de  $T_1$  et des délais de relaxation, l'aimantation restaurée d'un noyau.<sup>181</sup>

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

S/B : rapport signal sur bruit ;  $M_0$  : aimantation initiale ; D : délai de relaxation en secondes (égale à la somme du temps d'acquisition ACQ et du délai d'attente entre deux impulsions  $\Delta$ ) ;  $T_1$  : temps de relaxation longitudinal exprimé en secondes ;  $\alpha$  : angle d'impulsion exprimé en degrés.

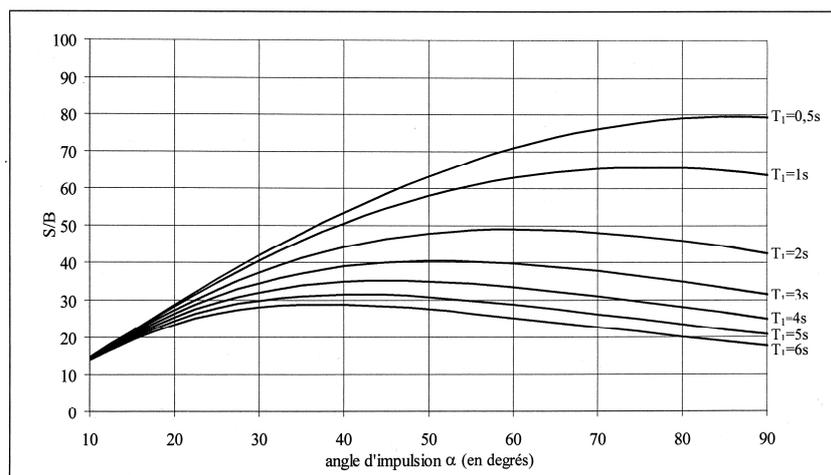


Figure 8: Courbe de restitution de l'aimantation (S/B) des noyaux  $^{13}\text{C}$  en fonction de l'angle d'impulsion  $\alpha$ .

La courbe est tracée en fonction de  $\alpha$  pour un délai de relaxation  $D1 = 1,4\text{s}$  avec le temps de relaxation variant de 0,5 à 6s en application de l'équation 1 (voir application en annexes pin, p.118)

Sur la figure 8, un angle  $\alpha = 90^\circ$  induit une différence de l'ordre de 60% entre les deux valeurs extrêmes de  $T_1$ ; par contre, la réduction de l'angle  $\alpha$  s'accompagne d'une diminution des différences d'aimantation mais également du rapport S/B qui ne doit pas être trop faible pour permettre l'observation des signaux des constituants du mélange. Les méthodologies que nous avons utilisées se sont inspirées de cette approche pour l'étude quantitative des mélanges tout en laissant pleinement jouer l'effet NOE.

#### 2.2.3.2. CPD et méthodologie développés au laboratoire de chimie et biomasse

La méthodologie développée au laboratoire de chimie et biomasse diffère des méthodologies ci-dessus qui, pour la plupart, utilisent les séquences de créneaux inversés pour supprimer les effets NOE. En effet, cette méthodologie repose sur l'observation expérimentale qu'une *différence vraiment significative* de l'effet NOE sur les intensités des carbones ne se produit qu'entre les carbones quaternaires et les carbones protonés.

**Principes et pratiques.** On laisse alors l'effet NOE jouer son rôle principal qui est l'augmentation du rapport signal/bruit d'environ 200%. Ainsi on compense partiellement la faible sensibilité de la RMN  $^{13}\text{C}$  et cela permet d'enregistrer des spectres dans un délai raisonnable. Théoriquement cet effet peut avoir une incidence différente en fonction du carbone considéré. Cependant, les plus gros écarts d'intensité ont lieu entre les carbones portant des hydrogènes et ceux qui n'en portent pas. On ne tient pas donc jamais compte de l'intensité des **carbones quaternaires** dans les calculs quantitatifs. Par ailleurs les facteurs d'accroissement NOE ne sont manifestement pas très différents pour les carbones protonés car lorsqu'on fait la moyenne des intensités de ces carbones on s'aperçoit que l'écart type est toujours faible ce qui indique que les accroissements d'intensités dus à l'effet NOE est comparable pour les carbones pris en compte dans les calculs de quantification. Ces considérations sont à la base des méthodologies utilisées dans le laboratoire de chimie et biomasse. Nous utiliserons alors la séquence de CPD pour tous les enregistrements de spectre de carbone en analyse qualitative ou quantitative.

##### 2.2.3.2.1. Etapes de mise au point d'analyse qualitative et quantitative

Trois étapes sont nécessaires pour la mise au point de l'analyse qualitative et particulièrement de l'analyse quantitative : (i) *création et enrichissement de bibliothèques*

informatisées des spectres de référence enregistrés au laboratoire et décrits dans la littérature; (ii) *Adaptation d'un protocole expérimental* qui permette de réaliser une quantification correcte des constituants en tenant en compte les contraintes techniques en séquence RMN ainsi que les contraintes coûts (temps d'analyse) ; (iii) *Validation du protocole* par l'analyse sur des mélanges artificiels des composés de haut degré de pureté.

**Calcul quantitatif et méthode de validation.** Le calcul quantitatif se base sur l'intégration des pics protonés, non superposés et parfaitement résolus des spectres, réalisée à partir de la *moyenne* des intégrales sélectionnées ( $A_c$ ) pour chaque molécule des constituants du mélange afin d'éviter des variations d'impacts éventuelles d'effet NOE entre les différents signaux de la molécule. Pour chaque moyenne calculée, on teste la moyenne des écart-types pour valider les mesures. L'expérience a montré que l'utilisation des séquences d'impulsion intermédiaire avec des angles variant de  $30^\circ$  à  $45^\circ$  apparaît comme étant la meilleure approche pour la quantification des molécules dont les temps de relaxation des atomes  $T_1$  varient beaucoup entre eux. On quantifie chacun des constituants du mélange par la mesure de l'intégration des leurs signaux par rapport à une *référence interne* de quantité connue que l'on ajoute dans le mélange

La moyenne des intégrales des pics est donc pour une molécule donnée:  $A_c = \sum_1^n A_i / \sum_1^n n_i$  (1);  $n_i$  étant le nombre de pics protonés, non superposés et parfaitement résolus pour une molécule donnée parmi les constituants du mélange (1); l'écart-type  $E$  est donnée par la relation:  $E_c = (A_i)$ ; et l'écart moyen défini en % par:  $E_c = 100A_c / E$ ; pour une mesure valide:  $E_c \leq 10\%$ . On peut procéder ainsi à l'application de la formule des % moyen en masse de chaque constituant.

$$m_c = \frac{A_c \times M_c \times m_R}{A_R \times M_R} \quad \text{Alors, la comparaison des intégrations des signaux des composés et de la}$$

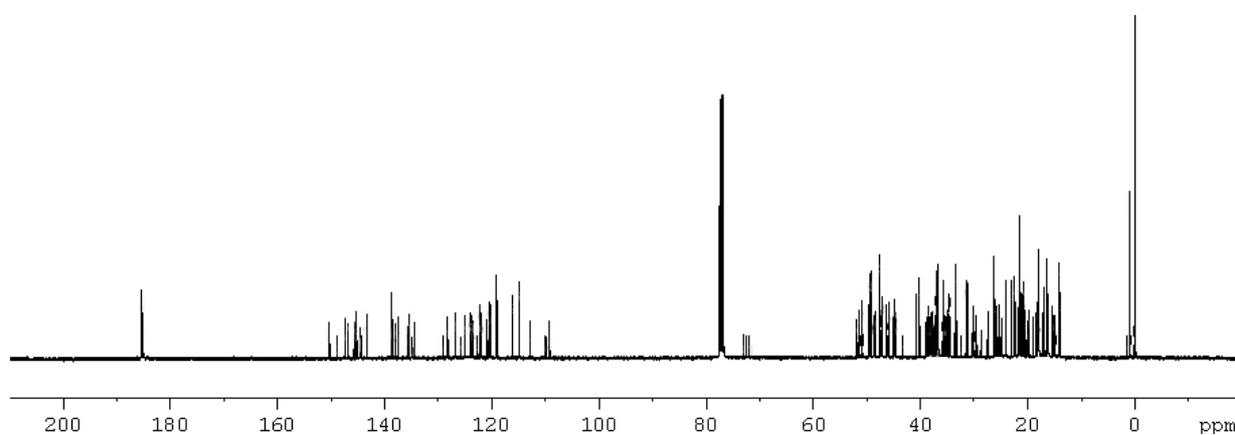
[Équation 2] référence interne permet de calculer la masse de chacun des constituants du  
mélange selon la formule de l'équation [2] :

$m_c$ : masse calculée du composé;  $A_R$  et  $A_c$ : aires du ou des carbones pris en compte respectivement pour la référence interne et pour le composé considéré;  $m_R$ : quantité ajoutée (mg) de référence interne;  $M_R$  et  $M_c$ : masses molaires de la référence interne et du composé considéré. La référence interne utilisée en général est le diglyme; pour les mesures en solutions aqueuses on utilise plutôt le dioxane comme référence interne.

**Cas des composés terpéniques dans les mélanges complexes de résines de pin.** La connaissance des temps de relaxation (par expérience d'inversion récupération) permet de déterminer les conditions de protocoles expérimentaux d'analyse par RMN du carbone-13 des classes de composés. Pour les résines, on utilise le *diglyme* (di-2-méthoxyéthyle) dont les signaux ne provoquent aucune superposition avec les pics des constituants à quantifier (Le temps de relaxation  $T_1$  des carbones méthylénique vaut 3,8 s), le pourcentage en masse pour chaque composé devient :

$$m_c = \frac{2A_c \times M_c \times m_D}{A_D \times M_D} \quad \text{[Équation 3]}$$

Le coefficient 2 provient de la nature symétrique de la molécule de diglyme. La validation de ces calculs se fait selon par simple calcul statistique et suivant les valeurs de l'écart moyen des intégrales des pics.

Spectre 11 : RMN du carbone-13 de la résine brute typique de *P. kesiya*

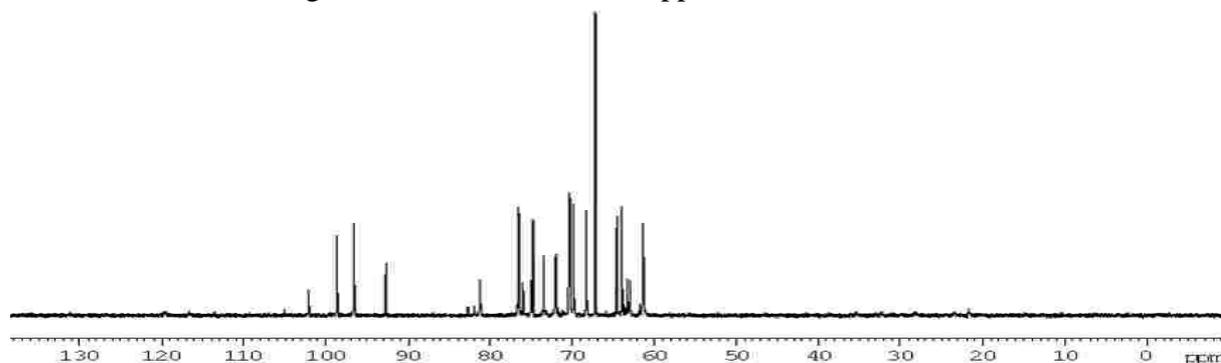
**Cas des sucres dans les mélanges complexes de miel.** La nature des miels rendant impossible l'utilisation de la plupart des solvants organiques, le choix du solvant pour l'analyse directe des sucres dans les miels s'est naturellement orienté vers l'emploi de l'eau deutériée.

Référence interne et mesure quantitative. Tamate et Bradbury ont identifié et quantifié divers sucres simples par l'observation de certaines résonances caractéristiques dont les carbones anomériques et les hauteurs des signaux à la place des intégrations avec le dioxane-1,4 comme référence interne.<sup>164</sup> Cette approche utilisant la moyenne des intensités des signaux de certains carbones caractéristiques similaires possédant des temps de relaxation T1 comparables s'utilise aussi dans l'analyse des huiles végétales avec des *mono-*, *di-* et triglycérides.<sup>182</sup> Mazzoni<sup>166</sup> dans ses études sur les miels par la RMN du carbone-13 a utilisé extensivement les intensités moyennes de signaux RMN des sucres en général et des intensités des carbones anomériques en particulier pour effectuer l'analyse quantitative des sucres :

$$m_s = \frac{4I_s \times M_s \times m_D}{I_D \times M_D} \quad [\text{Équation 4}]$$

$m_s$  : masse du sucre considéré ;  $M_s$  : masse molaire du sucre ;  $I_s$  : intensité moyenne des pics exploitables dus au sucre ;  $m_D$  : masse de la dioxane-1,4 ajoutée comme référence interne ;  $I_D$  : intensité moyenne des pics de dioxane-1,4 (prise égale à 100) ;  $M_D$  : masse molaire de la dioxane. Le chiffre 4 provient de la double symétrie de la dioxane (4 atomes de carbones isochrones à 67,12 ppm).

Les spectres des composés glucidiques dans les mélanges complexes que sont les miels sont en fait confinés dans une région étroite entre 60 et 110 ppm.

Spectre 12 : Spectre RMN de <sup>13</sup>C typique des miels d'échantillon à 100 MHz

Largeur spectrale : 250 ppm ; système de solvant : H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O : 95 : 5 en volume ; référence interne : dioxane-1,4 à 67,12 ppm.

Les spectres de miel possèdent un nombre élevé de superpositions, mais l'expérience montre que ce nombre élevé ne gêne pas, mais associé aux intensités, aide à l'identification par exemple des composés minoritaires isomères.

**3. RESULTATS ET DISCUSSIONS SUR LES RESINES DES PINS ET DES SUCRES DES LES MIELS**

Cette section **3** nous amène aux résultats de l'application des méthodologies d'analyse sur les constituants terpéniques des résines provenant des échantillons de *P. kesiyia* et *P. patula* d'origine géographique diverse (**3.1.**) et sur les constituants glucidiques des miels d'origine botanique et géographique variées (**3.2.**)

**3.1. Analyses des résines provenant des échantillons de *P. kesiyia* et *P. patula***

Cette étude sur les résines de *P. kesiyia* et de *P. patula* se divisera en quatre parties : l'analyse des fractions volatiles des échantillons (**3.1.2.**) ; L'analyse des fractions non volatiles (**3.1.2.**) ; L'étude de l'aspect global de chaque échantillon de résine (**3.1.3.**) et finalement, l'étude comparative des échantillons (**3.1.4.**).

**3.1.1. Analyse des fractions volatiles des résines par CPG et 13C-RMN****3.1.1.1. Analyses des fractions d'échantillons individuels**

Les résultats de l'analyse des fractions volatiles (FV) ou essence de térébenthine après hydrodistillation sont reportés pour chaque échantillon. L'identification de chacun des composés terpéniques des FV se trouve en *annexes*.

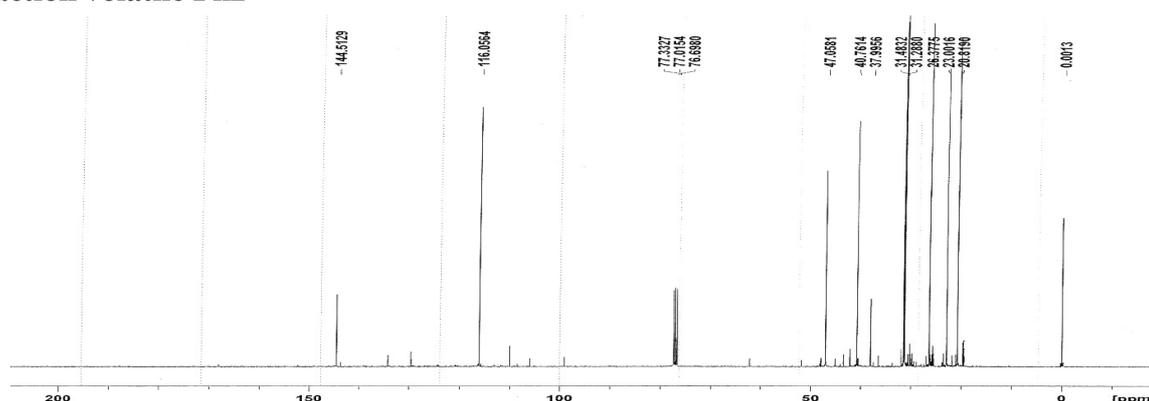
**Fraction volatile Pk1.** La quantification rend compte pour 96,1% (colonne apolaire) et 96,3% (colonne polaire) des 15 constituants terpéniques par rapport à la masse de la fraction volatile. On observe un seul sesquiterpène le longifolène avec 0,4% (Tableau **22**).

Tableau **22**: Constituants terpéniques de la fraction volatile de PK1

Sur les tableaux, l'ordre est donné suivant l'élution sur colonne apolaire (BP-1) déterminé par l'indice de Kovats IK. L'astérisque \* signifie coélution constituants. Les pourcentages en masse sont donnés à la fois sur colonne apolaire (BP-1) et colonne polaire (BP-20). Après validation de l'identification par RMN la quantification se fait par CPG (Voir principes, méthodes et matériels)

N°	Composés	IK (BP-1)	IK (BP-20)	% sur BP-1	% sur BP-20	Identification
1	$\alpha$ -Pinène	936	1034	83,2	83,6	<sup>13</sup> C-RMN, IK
2	Camphène	946	1074	1,1	1,1	<sup>13</sup> C-RMN, IK
3	$\beta$ -Pinène	973	1116	1,6	1,6	<sup>13</sup> C-RMN, IK
4	Myrcène	983	1165	0,5	0,5	<sup>13</sup> C-RMN, IK
5	$\Delta^3$ -carène	1007	1153	0,4	0,4	<sup>13</sup> C-RMN, IK
6	$\beta$ -phellandrène +limonène*	1023*		7,4	0	<sup>13</sup> C-RMN, IK
7	Limonène*	1023*	1204	-	0,8	<sup>13</sup> C-RMN, IK
8	$\beta$ -Phellandrène*	1023*	1206	-	6	<sup>13</sup> C-RMN, IK
9	Terpinolène	1080	1287	0,4	0,4	<sup>13</sup> C-RMN, IK
10	Verbenol-trans	1129	1681	0,4	0,4	<sup>13</sup> C-RMN, IK
11	Bornéol	1151	1704	0,1	0,1	<sup>13</sup> C-RMN, IR
12	Terpinéol-4	1157	1599	0,1	0,1	<sup>13</sup> C-RMN, IR
13	Pinocamphéol-iso	1163	1712	0,2	0,2	<sup>13</sup> C-RMN, IR
14	Longifolène	1409	1571	0,4	0,4	<sup>13</sup> C-RM, IR
15	Thujone- $\alpha$ + tricyclène*	923		-	0,4	<sup>13</sup> C-RM, IR
16	Thujone- $\alpha$ **	923	1034	-	-	<sup>13</sup> C-RMN, IR
17	Tricyclène*	923	1016	0,3	0,3	<sup>13</sup> C-RMN, IR
	Total			<b>96,1</b>	<b>96,3</b>	<b>95,9</b>
	Monoterpènes			<b>95,7</b>	<b>95,9</b>	
	Sesquiterpènes			<b>0,4</b>	<b>0,4</b>	

### Fraction volatile Pk2



Spectre 13 : RMN du carbone-13 de l'essence de térébenthine de Pk2 dans le CDCl<sub>3</sub>

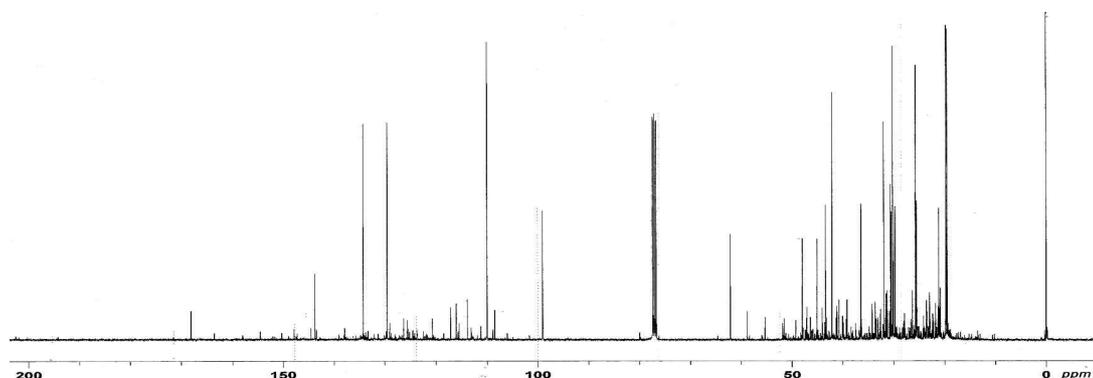
Le spectre 13 montre le profil de la fraction volatile de l'échantillon Pk2 à dominante  $\alpha$ -pinène (tableau 23)

Tableau 23: Constituants terpéniques de la fraction volatile de Pk2

N° Composés	IK (BP-1)	IK (BP-20)	% (BP-1)	% (BP-20)	Identification
1 Tricyclène	920	1012	0,3	0,3	<sup>13</sup> C-RMN, IK
2 $\alpha$ -Pinène	932	1027	81,9	81,6	<sup>13</sup> C-RMN, IK
3 Camphène	943	1068	1,1	1,1	<sup>13</sup> C-RMN, IK
4 $\beta$ -Pinène	970	1112	2,6	2,5	<sup>13</sup> C-RMN, IK
5 Myrcène	979	1160	0,4	0,4	<sup>13</sup> C-RMN, IK
6 Caryophyllène-trans	1418	1593	0,8	0,8	<sup>13</sup> C-RMN, IK
7 $\beta$ -Phéllandrène + 1.8-cinéole + limonène*	1020*		5,2	-	<sup>13</sup> C-RMN, IK
8 1.8-cinéole + limonène*	1020*	1201	-	0,6	<sup>13</sup> C-RMN, IK
9 $\beta$ -Phéllandrène*	1020*	1211	-	4,7	<sup>13</sup> C-RMN, IK
10 Terpinolène	1077	1282	0,3	0,3	<sup>13</sup> C-RMN, IK
11 Longifolène	1406	1565	3,4	3,4	<sup>13</sup> C-RMN, IK
12 $\beta$ -trans-farnesène	1450	1663	0,1	0,1	<sup>13</sup> C-RMN, IK
Total			<b>96,0</b>	<b>95,8</b>	
Monoterpènes			<b>91,7</b>	<b>91,5</b>	
Sesquiterpènes			<b>4,3</b>	<b>4,3</b>	

Identification des composés par RMN <sup>13</sup>C ; analyse quantitative par CPG : effectuée à 0,1près., \* : coélution sur colonnes CPG.

### Fraction volatile de Pk3.



Spectre 14: RMN du carbone-13 de l'essence de térébenthine de Pk3 dans le CDCl<sub>3</sub>

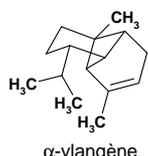
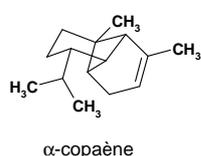
Le spectre 14 montre le profil de Pk3 à dominante  $\beta$ -phéllandrène. Teneur totale en masse pour 21 constituants : 77,1% sur colonne apolaire et 77,6% sur colonne polaire (Voir tableau 24)

Tableau 24 : Identification et quantification des mono- et sesquiterpènes de la fraction volatile de Pk3

N°	Constituants	IK (BP-1)	IK (BP-20)	% (BP-1)	% (BP-20)	Identification
1	acétate de bornyle	1270	1582	0,9	0,9	<sup>13</sup> C-RMN, IK
2	Camphène	945	1072	0,7	0,7	<sup>13</sup> C-RMN, IK
3	cinéole + limonène*	1024	1205	-	2,6	<sup>13</sup> C-RMN, IK
4	cryptone*	1163	1658	-	0,1	<sup>13</sup> C-RMN, IK
5	cymène para	1013	1275	1,0	1,0	<sup>13</sup> C-RMN, IK
6	dodecanal*	1381	1712	0,1	0,0	<sup>13</sup> C-RMN, IK
7	estragole*	1176	1675	2,0	2,0	<sup>13</sup> C-RMN, IK
8	eudesmol-β**	1639	2216	2,6	2,6	<sup>13</sup> C-RMN, IK
9	humulène-γ	1477	1696	1,5	1,5	<sup>13</sup> C-RMN, IK
10	Longifolène	1411	1574	18,2	18,2	<sup>13</sup> C-RMN, IK
11	longipinène-α	1355	1471	4,6	4,7	<sup>13</sup> C-RMN, IK
12	muurolène-α* + dodecanal*	-	1712	-	1,4	<sup>13</sup> C-RMN, IK
13	muurolène-α*	1499	1712	1,3	-	<sup>13</sup> C-RMN, IK
14	Myrcène	982	1164	0,6	0,6	<sup>13</sup> C-RMN, IK
15	phéllandrene + cinéole + limonène*	1024	-	32,2	-	<sup>13</sup> C-RMN, IK
16	phéllandrène-β*	1024	1217	-	29,7	<sup>13</sup> C-RMN, IK
17	Sativène	1393	1529	3,2	3,2	<sup>13</sup> C-RMN, IK
18	terpineol-4* + cryptone*	1163	-	0,6	-	<sup>13</sup> C-RMN, IK
19	terpinéol-4*	1163	1603	-	0,5	<sup>13</sup> C-RMN, IK
20	ylangène-α*	1372	1484	1,0	0,0	<sup>13</sup> C-RMN, IK
21	ylangène-α + copaène-α*	-	1484	-	1,6	<sup>13</sup> C-RMN, IK
22	copaène-α*	1373	1484	0,6	-	<sup>13</sup> C-RMN, IK
23	α-pinène	932	1028	5,3	5,6	<sup>13</sup> C-RMN, IK
24	β-pinène	972	1115	0,7	0,7	<sup>13</sup> C-RMN, IK
	<b>Total</b>			<b>77,1</b>	<b>77,6</b>	
	<b>Monoterpènes</b>			<b>51,1</b>	<b>51,5</b>	
	<b>Sesquiterpènes</b>			<b>26,0</b>	<b>26,1</b>	

(\*\*) signifie recherche sur base de données autres que la base de données TERPENES.

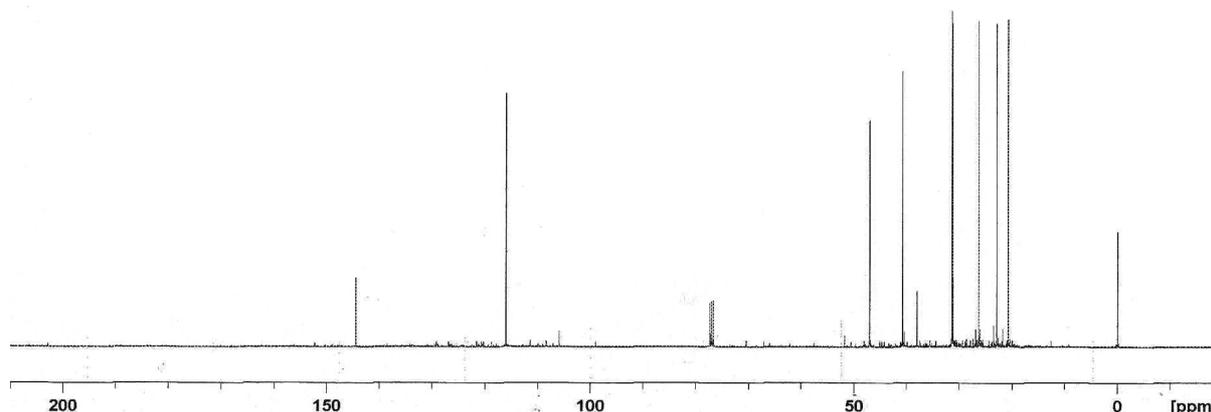
Douze constituants identifiés constituent 77,1% de l'huile essentielle obtenue (colonne apolaire) ou 77,6% (polaire). On note pour l'échantillon Pk3 une plus grande diversité de constituant.



Notons que l'ylangène-α et le copaène-α sont deux isomères très proches dont la complexité structurale en a fait des cibles de synthèse avec le β-ylangène et le β-copaène.<sup>183</sup>

### Fraction volatile *P. patula*.

En plus des trois échantillons de résine provenant des espèces de *P. kesiya*, nous avons un échantillon provenant du *P. patula* dont le spectre clairsemé annonce un profil à dominante α-pinène.

Spectre 15 : Profil  $^{13}\text{C}$ -RMN de l'essence de térébenthine du *P. patula*

Treize constituant: 89,1% sur colonne apolaire ; 89,5% sur colonne polaire. (Tableau 25)

Tableau 25: Individualisation des constituants de la fraction volatile *P. patula*

N°	Constituant	IK (BP-1)	IK (BP-20)	% (BP-1)	% (BP-20)	Identification
1	$\alpha$ -pinène	936	1033	77,2	76,9	$^{13}\text{C}$ -RMN, IK
2	Camphène	946	1073	1,3	1,4	$^{13}\text{C}$ -RMN, IK
3	Verbenène	948	1130	0,6	0,7	$^{13}\text{C}$ -RMN, IK
4	$\beta$ -pinène	972	1116	4,0	4,2	$^{13}\text{C}$ -RMN, IK
5	cymène para	1013	1275	0,2	0,3	$^{13}\text{C}$ -RMN, IK
6	Phéllandrène- $\beta$ + cinéole + limonène*	1022		1,5	-	$^{13}\text{C}$ -RMN, IK
7	phéllandrène- $\beta$ *	1022	1214	-	0,5	$^{13}\text{C}$ -RMN, IK
8	cinéole + limonène*	1022	1205	-	1,1	$^{13}\text{C}$ -RMN, IK
9	campholène- $\alpha$	1106	1494	1,1	1,0	$^{13}\text{C}$ -RMN, IK
10	verbenol trans	1129	1680	1,3	1,4	$^{13}\text{C}$ -RMN, IK
11	mentha-1,5-dien-8-ol-para	1146	1729	1,0	1,1	$^{13}\text{C}$ -RMN, IK
12	Terpineol- $\alpha$	1173	1699	0,5	0,5	$^{13}\text{C}$ -RMN, IK
11	Longifolène	1420	1570	0,4	0,4	$^{13}\text{C}$ -RMN, IK
	<b>Total</b>			<b>89,1</b>	<b>89,5</b>	
	<b>Monoterpènes</b>			<b>88,7</b>	<b>89,1</b>	
	<b>Sesquiterpènes</b>			<b>0,4</b>	<b>0,4</b>	

L'ordre d'élution et l'ordre de pourcentage sont donnés par rapport à la colonne apolaire BP-1 ; (\*) signifie pour co-élution ; les autres constituants à l'état de trace c-à-d : de teneur = 0,03%. On retrouve les coélutions classiques sur colonne apolaire en CPG du phéllandrène- $\beta$  + cinéole + limonène\* et du cinéole + limonène\*.

Les résultats obtenus ci-dessus permettent d'effectuer une étude comparative de la composition des résines des différents échantillons dans le paragraphe qui suit.

### 3.1.1.2. Comparaison des fractions volatiles des échantillons

Trente composés terpéniques ont été donc identifiés pour l'ensemble des quatre échantillons. Le Pk3 possède la plus riche diversité en constituants terpéniques surtout en sesquiterpènes avec 21 composés, dominée par le phéllandrène- $\beta$ , tandis que le Pk2 est la moins dotée avec dix. L' $\alpha$ -pinène, le  $\beta$ -pinène, le camphène sont observés sans coélution dans tous les échantillons à des différentes teneurs. L' $\alpha$ -pinène reste de loin le constituant majoritaire sauf pour le Pk3 où sa teneur chute à 5,3%. (Tableau 26)

**Tableau 26: Comparaison des éluats chromatographiques des fractions volatiles sur colonne apolaire**

N°	Éluats	Pk1	Pk2	Pk3	Pp
1	acétate de bornyle	-	-	0,9	-
2	$\alpha$ -pinène	83,2	81,9	5,3	77,2
3	Bornéol	0,1	-	-	-
4	$\beta$ -pinène	1,6	2,6	0,7	4
5	Camphène	1,1	1,1	0,7	1,3
6	Campholénal- $\alpha$	-	-	-	1,1
7	$\Delta$ 3-carène	0,4	-	-	-
8	caryophyllène- <i>trans</i>	-	0,8	-	-
9	cinéole*	-	-	-	-
10	Cinéole + limonène*	-	0,6	2,6*	1,1
11	cryptone*	-	-	0,1	-
12	Cymène para	-	-	1	0,2
13	Dodecanal*	-	-	-	-
14	estragole	-	-	2	-
15	Eudesmol- $\beta$	-	-	2,6	-
16	Farnesène- <i>trans</i> - $\beta$	-	0,1	-	-
17	Humulène- $\gamma$	-	-	1,5	-
18	limonène*	0,8	-	-	-
19	Longifolène	0,4	3,4	18,2	0,4
20	longipinène- $\alpha$	-	-	4,6	-
21	Mentha-1,5-dien-8-ol- <i>para</i>	1	-	-	1
22	Murolène- $\alpha$	-	-	1,3	-
23	Murolène- $\alpha$ * + dodecanal*	-	-	1,4*	-
24	Myrcène	0,5	0,4	0,6	-
25	Phéllandrène- $\beta$ + cinéole + limonène	-	5,2	32,2	1,5
26	phellandrène- $\beta$ + limonène	7,4	-	-	-
27	phéllandrène- $\beta$	6	4,7*	29,7*	0,5*
28	pinocamphéol- <i>iso</i>	0,2	-	-	-
29	Sativène	-	-	3,2	-
30	Terpinéol- $\alpha$	-	-	-	0,5
31	terpineol-4*	0,1	-	0,5*	-
32	terpineol-4 + cryptone*	-	-	0,6	-
33	Terpinolène	0,4	0,3	-	-
34	thujone*	-	-	-	-
35	thujone- $\alpha$ + tricyclène	0,4*	-	-	-
36	Tricyclène*	0,3	0,3	-	-
37	Verbenène	-	-	-	0,6
38	verbenol trans	0,4	-	-	1,3
39	ylangène- $\alpha$ + copaène- $\alpha$ *	-	-	1,6*	-
40	ylangène- $\alpha$	-	-	1	-
41	copaène- $\alpha$ *	-	-	0,6	-

Les éluats avec \* : en coélution. Pour les valeurs avec \* : valeurs prises sur colonne polaire.

Le phéllandrène- $\beta$  est présent dans tous les échantillons, en coélution ou non. Il représente le second constituant majoritaire des fractions volatiles sauf avec le Pk3 où il prend la tête. Le limonène, considérée comme un des critères de qualité des résines,<sup>184</sup> est détecté en CPG toujours en coélution avec le phéllandrène- $\beta$  ou le cinéole. Ce dernier, source de métabolite doté d'activité cardiovasculaire se détecte toujours en coélution avec le limonène dans tous les échantillons sauf avec le Pk1. Notons que le phéllandrène- $\beta$ , le camphène et le limonène forment un groupe de critère d'âge où leur concentration augmente avec l'âge de l'arbre.<sup>185</sup> On remarque

une teneur relativement non négligeable du eudesmol- $\beta$  qui est un alcool sesquiterpénique possédant une activité antiangiogénique importante.<sup>186</sup> Le  $\Delta$ -carène, possédant des propriétés anti-microbiennes et source d'isomères pour synthèse stéréosélective s'observe seulement comme minoritaire dans le Pk1. Du tableau précédent 24, on peut extraire un aperçu global des teneurs totales en composés hydrocarbonés et oxygénés (Tableau 27).

Tableau 27 : comparaison des teneurs pour total hydrocarboné et total oxygéné

Echantillon	Pk1		Pk2		Pk3		Pp	
% sur colonne CPG	% (AP) <sup>a</sup>	% (P) <sup>b</sup>						
<b>Total hydrocarboné</b>	95,3	95,5	90,9	95,2	38,7	67,5	83,7	84,4
<b>Total mixte<sup>c</sup></b>	-	-	-	-	32,2	4,0	1,5	1,1
<b>Total oxygéné</b>	0,8	0,8	5,2	0,6	6,2	6,1	3,9	4,0
<b>Total</b>	96,1	96,3	96,1	95,8	77,1	77,6	89,1	89,5

a : % des constituants sur colonne apolaire CPG (BP1) ; b : % des constituants sur colonne polaire CPG (BP20) ; c : mélange en coélution de composés hydrocarbonés et oxygénés

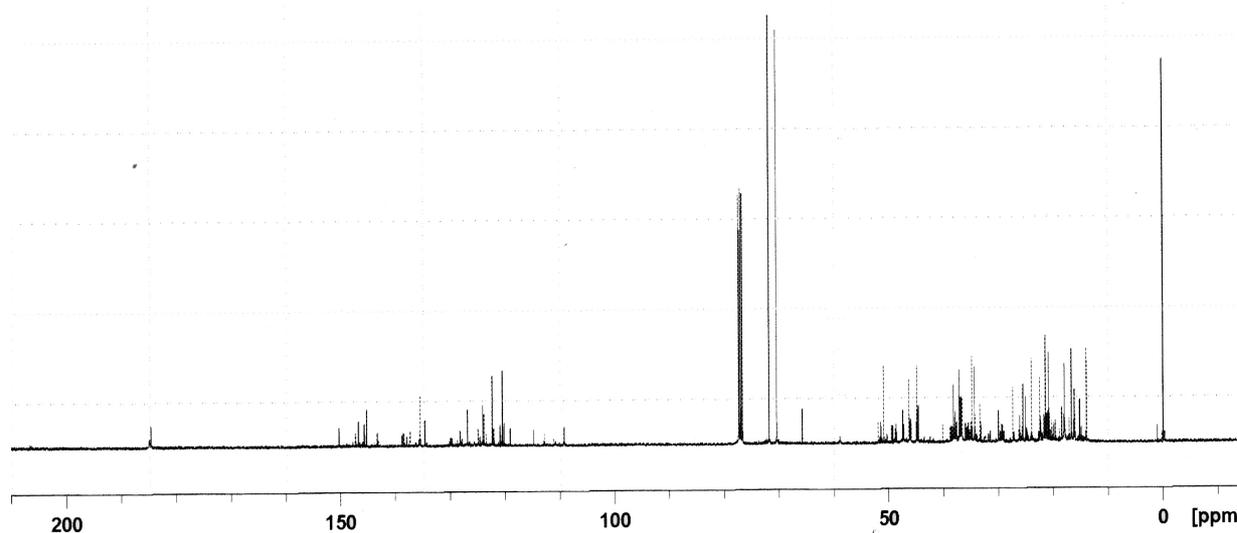
On observe, comme dans le cas général, une prédominance en teneur des constituants hydrocarbonés sur les composés oxygénés.

### 3.1.2. Analyse directe par RMN du <sup>13</sup>C des fractions non volatiles

#### 3.1.2.1. Analyse des fractions individuelles

Les fractions non volatiles (FNV) issues des colophanes après extraction à l'éther de la phase aqueuse de l'hydrodistillation sont soumises directement à l'analyse par RMN du carbone-13. (Voir Matériels et méthodes). Pour l'identification RMN des constituants, voir *annexes* (p.125).

#### Fraction non volatile PK1.

Spectre 16 : RMN-<sup>13</sup>C de la colophane fraction non volatile Pk1

L'analyse directe du mélange complexe de la fraction non volatile rend compte pour neuf acides résiniques et trois constituants diterpéniques neutres. (Profil RMN spectre 16). Le criblage de la fraction volatile conduit aux résultats donnés par le tableau 28.

Tableau 28 : Composés résiniques identifiés à partir du spectre

Composés	<sup>13</sup> C	SUP	Im	Composés	<sup>13</sup> C	SUP	Im
Acide abiétique <sup>a</sup>	20/20	9	15,4	Acide palustrique <sup>f</sup>	20/20	7	5,7
Acide déhydroabiétique <sup>b</sup>	18/20	9	7,9	Acide isopimarique	20/20	8	4,3
Acide déhydro-15(16)-abiétique	19/20	8	1,8	Acide pimarique <sup>g</sup>	18/20	9	2,8
Acide 15-hydroxyabiétique <sup>c</sup>	20/20	12	1,1	IsoPimaral	20/20	10	1,0
Acide lévopimarique <sup>d</sup>	19/20	4	4,0	Pimaral	19/20	5	1,1
Acide néoabiétique <sup>e</sup>	20/20	4	4,1	Pimarol <sup>h</sup>	17/20	9	1,1

Criblage par base de donnée TERPENES : Seuil de <sup>13</sup>C : 70% ; seuil  $\Delta\delta$  : 0,06 ppm. Im : intensité moyenne ; <sup>a</sup> :  $\Delta\delta$  : 0,10 ppm pour la fonction acide à 184,95 ppm, et à 34,87 ppm pour le groupement isopropyle rattaché au cycle en C15 ;  $\Delta\delta$  = 0,09 pour les déplacements à 50,92, 46,30, 38,27 ppm ; C5 44,88 ppm ( $\Delta\delta$  : 0,13). <sup>b</sup> :  $\Delta\delta$  respectivement à 0,08 et 0,07 ppm pour les carbones C5 (44,58 ppm) et C1 (37,91 ppm). <sup>c</sup> : Alcool C15 : déplacé à 72,38 ppm ( $\Delta\delta$  = 0,09 ppm). <sup>d</sup> : C13 138,84 ppm ( $\Delta\delta$  = 0,08) ;  $\Delta\delta$  = 0,09 ppm pour C14 à 119,10 ppm ;  $\Delta\delta$  = 0,09 ppm pour le carbone en tête de jonction de cycle C9 (49,50 ppm) et 0,08 ppm pour le carbone quaternaire C4 (47,46 ppm). <sup>e</sup> : le carbone isopropylidène C15 déplacé à 123,49 ppm avec  $\Delta\delta$  = 0,07 ppm. <sup>f</sup> : Attribution du pic à 35,08 ppm ( $\Delta\delta$  = 0,07 ppm, I = 4,12) pour C1 au lieu de 35,20 ppm ( $\Delta\delta$  = 0,05 ppm, I = 1,15 et en superposition avec pimaral). <sup>g</sup> : Attribution du pic à 47,19 ppm ( $\Delta\delta$  = 0,09, I = 2,71) pour C5 en tête de pont au lieu de  $\delta$  = 47,25 ppm ( $\Delta\delta$  = 0,03 ppm, I = 3,29 en superposition avec l'acide néoabiétique). <sup>h</sup> : Attribution du pic à 127 ppm avec  $\Delta\delta$  = 0,07 ppm pour le carbone oléfinique C14 du cycle C. (Voir annexe, p. 121).

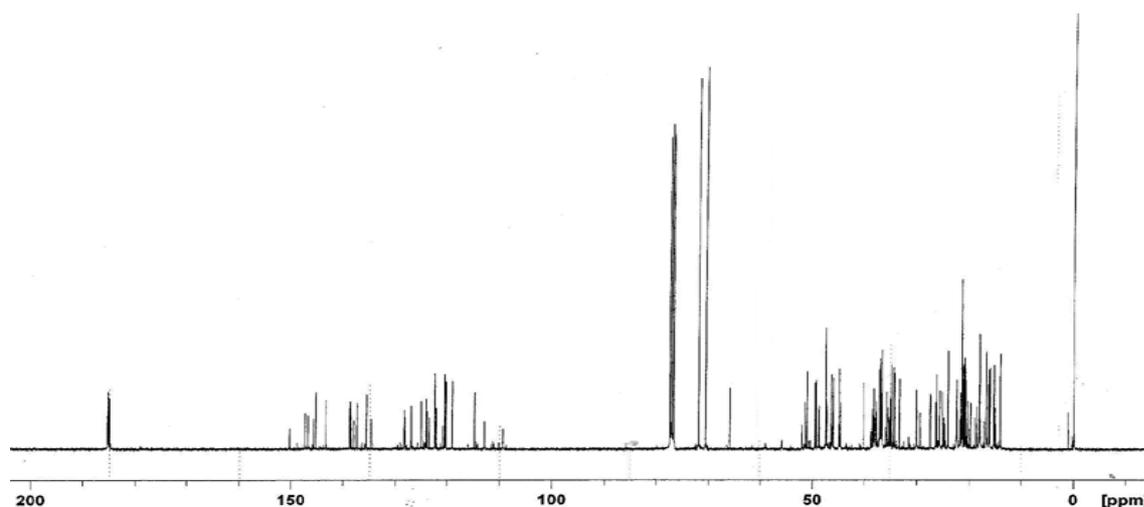
Le total des constituants quantifiés (tableau 29) forme 71,7% de la masse de la fraction non volatile analysée avec 69,1% d'acides diterpéniques et le reste, 2,6% constitués diterpènes neutres, en l'occurrence, le pimaral (1,1%) ; l'isopimaral (0,9%) et le pimarol (0,6%). Les acides possédant le squelette abiétane représentent 55,1% des constituants identifiés et constituent les composantes majoritaires de la fraction non volatile avec l'acide abiétique en tête (26,0%), suivie par l'acide déhydroabiétique (11,4%), l'acide palustrique (7,9%) et l'acide lévopimarique (5,1%) l'acide néoabiétique étant de même teneur que l'acide isopimarique, tous deux à 5,0%, devançant l'acide pimarique (4,0%). (Voir annexes Pk1, p. 121).

Tableau 29: Quantification des constituants de la fraction non volatile Pk1

N°	Constituants	<sup>a</sup> Aire moyen	ET <sup>b</sup>	écart moyen % <sup>c</sup>	M <sub>C</sub> (mg) <sup>d</sup>	% constituants
1	Acide abiétique	24,6	1,98	8,1	12,0	26,0
2	Acide déhydroabiétique	10,9	1,04	9,6	5,3	11,4
3	Acide palustrique	7,5	0,74	9,9	3,6	7,9
4	Acide lévopimarique	4,9	0,19	4,0	2,4	5,1
5	Acide isopimarique	4,8	0,42	8,8	2,3	5,0
6	Acide néoabiétique	4,8	0,47	9,9	2,3	5,0
7	Acide pimarique	3,8	0,38	10,2	1,8	4,0
8	Acide 15(16)-déhydroabiétique	2,8	0,19	7,0	1,3	2,9
9	Acide 15-hydroxy-déhydroabiétique	1,6	0,10	6,3	0,8	1,8
10	Pimaral	1,1	0,07	6,2	0,5	1,1
11	Isopimaral	0,9	0,08	8,8	0,4	0,9
12	pimarol	1,2	0,14	12,0	0,3	0,6
Total :						71,7%

Masse de la fraction non volatile analysée : 46,7 mg, masse du diglyme : 10,8 mg ; aire moyen des intégrales des pics du diglyme : 99,804 ; <sup>a</sup> : aire moyen donné par la moyenne des intégrales retenues donnée par la formule (1) ; <sup>b</sup> : ET ou écart-type ; <sup>c</sup> : écart moyen (écart-type/aire moyen) doit être  $\leq 10$  ; <sup>d</sup> : masse de chaque constituant ; <sup>e</sup> : % de chaque constituant rapporté à la masse de la FNV analysée.

Les deux acides minoritaires sont de la squelette abiétane dont l'acide 15(16)-déhydroabiétique et l'acide 15-hydroxydéhydroabiétique respectivement à 2,9 et à 1,8%.

**Fraction non volatile de Pk2**Spectre 17 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de la fraction non volatile Pk2

Fraction non volatile Pk2 : 49,9 mg ; référence interne diglyme : 7,3 mg ; pics  $\text{CH}_2$  du diglyme respectivement à 71,89 et à 70,50 ppm ; solvant  $\text{CDCl}_3$  ; angle d'impulsion de  $30^\circ$  .

Douze constituants ont été identifiés (tableau **30**) dans le Pk2 dont le spectre 17 montre le profil RMN ; totalisant pour 10 acides résiniques en plus des deux minoritaires neutres, le pimaral et l'isopimaral. (*annexes*, p. 122)

Tableau 30: Identification des constituants de la colophane (fraction non volatile) Pk2

N°	Constituants	Nombre de $^{13}\text{C}$ identifiés	SUP	Intensité moyenne
1	acide abiétique <sup>a</sup>	20/20	7	19,38
2	acide palustrique	20/20	5	19,22
3	acide lévopimarique <sup>b</sup>	20/20	7	17,34
4	acide néoabiétique	20/20	7	11,17
5	acide déhydroabiétique <sup>d</sup>	20/20	12	10,82
6	acide pimarique <sup>e</sup>	20/20	11	9,53
7	acide isopimarique	20/20	8	5,38
9	acide 15(16)-déhydroabiétique	20/20	9	2,16
8	acide sandaracopimarique <sup>f</sup>	20/20	11	1,57
10	Pimaral	18/20	8	1,57
11	acide 15-hydroxydéhydroabiétique <sup>h</sup>	20/20	13	1,34
12	isopimaral <sup>g</sup>	18/20	10	1,07

Seuil maximum de variation de déplacement chimique  $\Delta\delta = 0,06$  ppm ; seuil de % de carbone identifié : 0,7 ; SUP : nombre de superposition.

<sup>a</sup> :  $\Delta\delta$  0,13, 0,10, 0,09 et 0,07 ppm respectivement pour C10 (50,93 ppm), C1 (37,18 ppm), C3 (37,28 ppm) ; <sup>b</sup>  $\Delta\delta$  0,18 (185,31 ppm, COOH), 0,07 (138,25 ppm), 0,08 (119,11 ppm), 0,09 (49,50 ppm), 0,11 (40,23 ppm) ; <sup>c</sup> :  $\Delta\delta$  0,08 (acide : 185,15 ppm) ; <sup>d</sup> :  $\Delta\delta$  0,08 (44,58 ppm), 0,08 (37,90 ppm) ; <sup>e</sup>  $\Delta\delta$  0,10 (128,31 ppm) ; <sup>f</sup> : 0,08 (48,80 ppm), 0,07 (38,27 ppm) ; <sup>g</sup> :  $\Delta\delta$  0,09 (34,44 ppm), 0,10 (25,08 ppm) ; <sup>h</sup> :  $\Delta\delta$  0,24 (184,76 ppm, acide).

**Quantification des constituants dans la fraction non volatile Pk2.** (tableau **31**) Les douze constituants, de teneur variant de 0,5% à 18,5% totalisent pour 90,0% de la masse totale de la fraction non volatile. L'écart moyen des aires mesurées des pics reste inférieur à 10%, sauf pour les constituants minoritaires tels que les diterpènes neutres : le pimaral et l'isopimaral ainsi que les acides diterpéniques : l'acide sandaracopimarique, l'acide 5-hydroxydéhydroabiétique et l'acide 15(16)déhydroabiétique. Les acides possédant le squelette abiétane représentant 71,3 % des constituants identifiés constituent les composantes majoritaires de la fraction non volatile

avec l'acide abiétique en tête (18,5%), suivi par l'acide palustrique (16,4 %), l'acide lévopimarique (16,4 %), l'acide déhydroabiétique (10,5 %), l'acide néoabiétique (10,2 %).

Tableau 31: Quantification des constituants de la fraction non volatile Pk2

N°	Constituants	Aire moyenne	écart-type	écart moyen %	Mc (mg)	% des Composés
1	Acide abiétique	27,8	1,98	7,13	9,21	18,5
2	Acide palustrique	24,7	1,74	7,03	8,20	16,4
3	acide lévopimarique	22,4	2,17	9,68	7,42	14,9
4	Acide déhydroabiétique	16,0	1,25	7,81	5,26	10,5
5	Acide néoabiétique	15,4	1,31	8,51	5,10	10,2
6	Acide pimarique	12,1	1,22	10,09	4,02	8,1
7	Acide isopimarique	7,2	0,64	8,85	2,40	4,8
8	Acide 15(16) déhydroabiétique*	3,6	0,43	11,97	1,19	2,4
9	Acide sandaracopimarique*	2,2	0,30	13,65	0,73	1,5
10	Pimaral*	2,1	0,25	12,01	0,65	1,3
11	Acide 15-hydroxy-déhydroabiétique	1,2	0,08	7,19	0,41	0,8
12	iso-Pimaral*	1,0	0,14	13,76	0,32	0,6

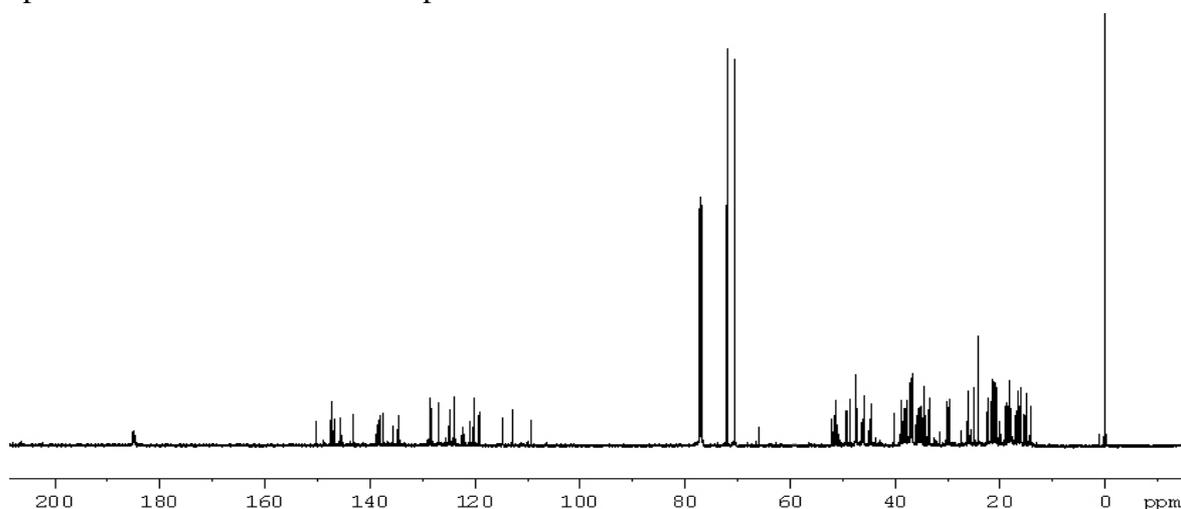
Pourcentage total en masse des constituants identifiés : **90,0%**

Masse de la fraction non volatile analysée : 49.9 mg, masse de diglyme pris comme référence interne : 7,9 mg ; aire moyen des intégrales des pics du diglyme : 99,229.

l'acide 15(16)-déhydroabiétique (2,4%) et l'acide 15-hydroxydéhydroabiétique 0,8 % fermant la série. Les composés de la série de pimarane constituent pour 18,7% du reste des composés identifiés avec l'acide pimarique (8,1%), l'acide isopimarique (4,8 %) et les deux diterpènes neutres L'analyse ainsi effectuée rend compte pour 90% de la masse totale de la fraction non volatile analysée avec 88,1 % d'acides diterpéniques, le reste, 1,9 % étant constitués des deux diterpènes neutres, le pimaral avec 1,3 % ; l'isopimaral 0,6 %.

### Fraction non volatile de Pk3.

Le spectre 18 ci-dessous montre le profil RMN <sup>13</sup>C de la fraction volatile de l'échantillon Pk3.

Spectre 18: RMN du <sup>13</sup>C du mélange complexe de la fraction non volatile de la résine Pk3

Outre le pimarol et le pimaral, dix acides résiniques ont été identifiés directement dans la colophane issue du Pk3 (tableau 32). (Voir aussi *annexes* Pk3, p. 124)

Tableau 32: Constituants de la fraction non volatile de la résine Pk3 par analyse directe RMN du carbone-13

N°	Constituants	<sup>13</sup> C identifiés	SUP	Im	écart-type	écart moyen %
1	Acide palustrique	20/20	7	14,49	1,24	8,55
2	Acide déhydroabiétique	20/20	9	12,58	1,97	15,64
3	Acide pimarique	19/20	12	9,34	0,22	2,32
4	Acide lévopimarique	19/20	6	9,01	0,77	8,57
5	Acide isopimarique	19/20	3	6,59	0,66	10,03
6	Acide abiétique	15/20	5	6,23	0,57	9,22
7	Acide néoabiétique	20/20	5	2,76	0,27	9,73
8	Acide sandapicomarique	20/20	12	1,73	0,13	7,36
9	Pimaral	17/20	8	1,37	0,03	1,93
10	Acide hydroxy-15-déhydroabiétique	20/20	11	1,37	0,19	13,99
11	Pimarol	18/20	12	1,22	0,10	8,31
12	Acide déhydro-15(16)-abiétique	19/20	7	1,15	0,12	10,51

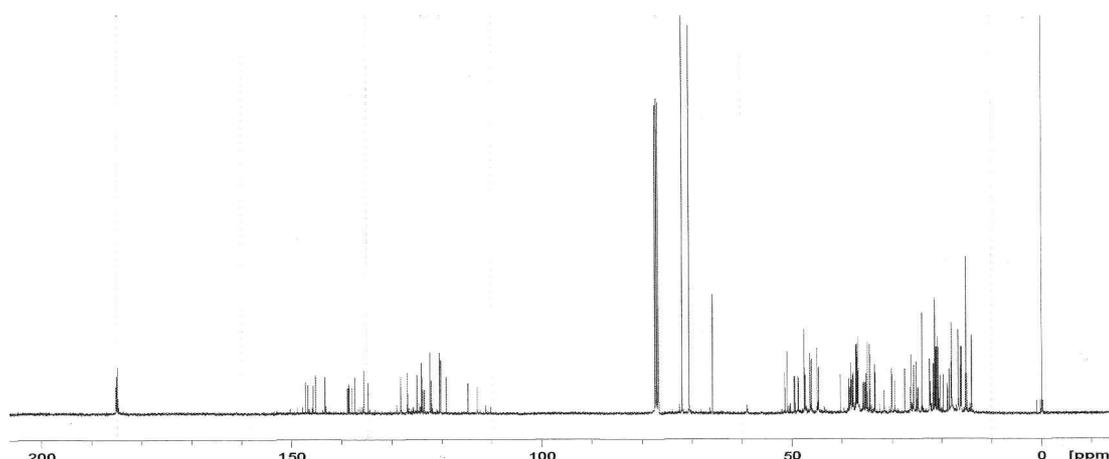
La quantification (tableau 33) donne un pourcentage total en masse de 71,8% de fraction non volatile Pk3 dont le constituant majoritaire est l'acide palustrique (16,0%).

Tableau 33 : Quantification de la fraction non volatile de Pk3

N°	Constituants	Aire moyenne	écart moyen %	écart-type	M <sub>c</sub> (g)	% des Composés
1	Acide palustrique	17,264	7,77	1,34	7,2	16,0
2	Acide déhydroabiétique	13,947	9,14	1,27	5,8	12,9
3	Acide pimarique	13,721	9,31	1,28	5,7	12,8
4	Acide lévopimarique	9,806	6,48	0,64	4,1	9,1
5	Acide isopimarique	7,848	7,01	0,55	3,3	7,3
6	Acide abiétique	5,613	7,79	0,44	2,3	5,2
7	Acide néoabiétique	3,129	8,84	0,28	1,3	2,9
8	Acide hydroxy-15-déhydroabiétique	1,513	0,87	0,01	0,6	1,4
9	Acide sandarapicomarique	1,388	13,83	0,19	0,6	1,3
10	Acide déhydro-15(16)-abiétique	1,234	7,35	0,09	0,5	1,1
11	Pimarol	1,167	7,43	0,09	0,5	1,0
12	Pimaral	0,883	7,63	0,07	0,3	0,8
					TOTAL	71,8%

Masse de la fraction non volatile analysée : 49.9 mg, masse de diglyme : 7.9 mg ; aire moyen des intégrales des pics du diglyme : 99,229.

Le pimaral s'observe avec la teneur la plus faible (0,8%), au-dessous du pimarol (1,0%), la teneur totale en composés diterpéniques neutres se limite donc à 1,8% des constituants identifiés. L'ensemble des composés dérivés du squelette pimarane se chiffre à 23,2% englobant l'acide pimarique (12,8%), l'acide isopimarique (7,3%) et le minoritaire acide sandaracopimarique (1,3%). Les autres acides minoritaires relèvent du squelette abiétane dont l'acide 15-hydroxy-déhydroabiétique (1,4%) et l'acide 15(16)-déhydroabiétique (1,1%) juste derrière l'acide sandaracopimarique. L'ensemble des composés de la classe de l'abiétane qui forment les composés majoritaires s'élève à 48,6%. On observe ainsi l'acide palustrique comme le constituant majeur (16,0 %), suivi par l'acide déhydroabiétique (12,9%). L'acide lévopimarique vient en quatrième place derrière l'acide pimarique avec 9,1%, l'acide abiétique et l'acide néoabiétique se trouvant respectivement à la 6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> place avec 5,2 et 2,9%. (Voir annexes résine Pk3, p.124 )

**Fraction non volatile *P. patula*.**Spectre 19 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de la fraction non volatile provenant de la résine Pp

Par rapport aux résultats précédents, parmi les dix constituants de la fraction non volatile, aucun composé diterpénique neutre n'a été détecté. (Tableau 34)

Tableau 34 : Individualisation des constituants de la fraction non volatile de la résine Pp par RMN  $^{13}\text{C}$ 

N°	Constituant	$^{13}\text{C}$ identifiés	SUP	$I_m$	écart-type	écart moyen %
1	acide palustrique	20/20	6	15,0	2,6	17,4
2	acide abiétique	20/20	5	14,5	2,5	17,1
3	acide levopimarique	20/20	5	10,7	1,4	13,1
4	acide déhydroabiétique	20/20	12	9,8	1,5	15,0
5	acide néoabiétique	20/20	6	8,4	1,2	14,8
6	acide pimarique	19/20	5	7,6	1,2	15,9
7	acide 15-hydroxydéhydroabiétique	20/20	11	2,6	0,7	26,6
8	acide 15(16)-déhydroabiétique	20/20	8	2,5	0,5	20,2
9	acide sandaracopimarique	20/20	9	1,9	0,4	20,5
10	acide isopimarique	17/20	6	1,1	0,3	29,5

La quantification (tableau 35) rend compte pour une teneur totale en masse de 66,8% de l'échantillon Pp dans laquelle l'acide abiétique arrive en tête avec 14,0%. (Voir annexes Pp, p.128)

Tableau 35: Répartition en masse des constituants résiniques Pp

N°	Constituants	Aire moyenne <sup>a</sup>	Ecart -type %	écart-type moyen	$m_c$ (mg)	% des Composés
1	Acide abiétique	19,7	1,4	7,3	6,5	14,0
2	Acide palustrique	17,1	1,1	6,3	5,7	12,1
3	Acide déhydroabiétique	14,3	0,7	4,8	4,7	10,0
4	Acide néoabiétique	11,4	1,1	9,4	3,8	8,1
5	Acide lévopimarique	11,3	0,4	3,6	3,7	8,0
6	Acide pimarique	10,9	1,0	9,5	3,6	7,7
7	Acide déhydro-15(16)-abiétique	3,5	0,3	8,4	1,2	2,5
8	Acide 15-hydroxy-déhydroabiétique	2,9	0,0	1,2	1,0	2,1
9	Acide sandaracopimarique	1,9	0,1	5,2	0,6	1,4
10	Acide isopimarique	1,3	0,2	18,3	0,4	0,9
<b>Total</b>						<b>66,8%</b>

Masse de la fraction non volatile analysée : 46,7 mg, masse de diglyme pris comme référence interne : 7,3 mg ; aire moyen des intégrales des pics du diglyme : 99,425.

Le second constituant majoritaire est l'acide palustrique (12,1%); suivi par l'acide déhydroabiétique (10,0%), l'acide néoabiétique (8,1%), l'acide pimarique (7,7%). Le groupe des acides minoritaires est constitué par l'acide 15(16)-déhydroabiétique (2,5%), suivi de l'acide 5-hydroxydéhydroabiétique (2,1%) et avec l'acide sandaracopimarique (1,4%) devançant l'acide

isopimarique (0,9%). L'ensemble des acides dérivant du squelette d'abiétane constitue évidemment la majeure fraction du mélange complexe de la colophane avec 56,8% tandis que les acides dérivant du pimarane ne constituent que 10% de l'ensemble.

### 3.1.2.2. Comparaison des fractions non volatiles des échantillons

Pour l'ensemble des échantillons, dix acides résiniques et trois composés diterpéniques neutres, le pimaral, l'isopimaral et le pimarol ont été détectés et quantifiés. (Tableau 36)

**Tableau 36: Comparaison des quantifications des constituants dans les fractions non volatiles**

N°	Constituants*	Pk1	Pk2	Pk3	Pp
1	Acide 15-hydroxy-déhydroabiétique	1,8	0,8	1,4	2,1
2	Acide abiétique	26,0	18,5	5,2	14,0
3	Acide déhydro-15(16)-abiétique	2,9	2,4	1,1	2,5
4	Acide déhydroabiétique	11,4	10,5	12,9	10,0
5	Acide isopimarique	5,0	4,8	7,3	0,9
6	Acide lévopimarique	5,1	14,9	9,1	8,0
7	Acide néoabiétique	5,0	10,2	2,9	8,1
8	Acide palustrique	7,9	16,4	16,0	12,1
9	Acide pimarique	4,0	8,1	12,8	7,7
10	Acide sandaracopimarique	-	1,5	1,3	1,4
11	Isopimaral	0,9	0,6	-	-
12	Pimaral	1,1	1,3	0,8	-
13	Pimarol	0,6	-	1,0	-

\* : composition rapportée à la masse des fractions volatiles obtenue par quantification.

L'acide abiétique de teneur globale variant de 10,4-16,3% sauf pour le Pk3 (4,0%), l'acide palustrique (5,0-13,6%) et l'acide déhydroabiétique (7,2-9,9%) sont parmi les trois premiers composés majoritaires du lot d'échantillons toutes espèces confondues. Avec ces résultats, nous sommes en mesure de donner pour chaque échantillon de résine un aspect qualitatif global et un aspect quantitatif global.

### 3.1.3. Aspect qualitatif et quantitatif global des résines

Les résultats précédents nous ont donné les teneurs des fractions volatiles, les teneurs des fractions non volatiles. Connaissant le rendement en huile et le rendement d'extraction, on peut établir la composition globale par rapport à la masse totale de chaque résine purifiée par utilisation d'une péréquation. Pour chacun des échantillons qui vont suivre, nous donnerons les alors les résultats globaux décrivant l'aspect de chaque résine.

**Echantillon PK1.** Les acides diterpéniques constituent 43,4% de la résine, contre 1,7% pour les diterpènes neutres et 9,8 % pour les monoterpènes constitués majoritairement par l' $\alpha$ -pinène (9,4%), le  $\beta$ -pinène forme 0,2% de l'ensemble et deux minoritaires le camphène et le myrcène sont présents avec la même teneur de 0,1%. Le tableau 37 récapitule la composition globale de l'échantillon Pk1 avec l'ensemble des 16 constituants identifiés formant 54,8% de la résine. Dans la résine ainsi analysée, l'acide abiétique forme le constituant majoritaire parmi les composés identifiés avec 16,3% de la masse totale, il est suivi par l' $\alpha$ -pinène rendant compte pour 9,4%.

Tableau 37: Composition globale de la résine Pk1 de Briéville

N°	Constituants	% résine <sup>a</sup>	N°	Constituants	% résine <sup>a</sup>
1	Acide abiétique	16,3	9	Acide 15(16)-déhydroabiétique	1,8
2	$\alpha$ -Pinène	9,4	10	Acide 15-hydroxy-déhydroabiétique	1,1
3	Acide déhydroabiétique	7,2	11	Pimaral	0,7
4	Acide palustrique	5,0	12	Isopimaral	0,6
5	Acide lévopimarique	3,2	13	Pimarol	0,4
6	Acide isopimarique	3,2	14	$\beta$ -Pinène	0,2
7	Acide néoabiétique	3,2	15	Camphène	0,1
8	Acide pimarique	2,5	16	Myrcène	0,1

<sup>a</sup> : teneur en masse par rapport à la résine analysée ; % total : 54,8%.

Les autres acides de structure abiétane se suivent après avec 7,2%, 5,0%, 3,2% respectivement pour l'acide déhydroabiétique, l'acide palustrique et l'acide lévopimarique. L'acide néoabiétique et l'acide isopimarique sont présents à la même teneur de 3,2% de l'acide lévopimarique, tandis que l'acide pimarique les suit avec 2,5%, précédant les deux acides minoritaires, l'acide 15(16)-déhydroabiétique (1,8%) et l'acide 15-hydroxy-déhydroabiétique (1,1%). Les composés diterpéniques se situent devant les monoterpènes cités précédemment avec le pimaral (0,7%), l'isopimaral (0,6%) et pimarol (0,4%).

**Echantillon Pk2.** Les composés diterpéniques constituent 74,2 % de la résine, contre 4,5 % pour les constituants volatils Le tableau **38** donne la récapitulation globale de la composition de l'échantillon Pk2 avec l'ensemble des 16 constituants quantifiés formant 78,7 % de la résine.

Tableau 38: Composition globale de la résine Pk2

N°	Constituants	% résine <sup>a</sup>	N°	Constituants	% résine <sup>a</sup>
1	acide abiétique	15,2	9	Acide 15(16) déhydroabiétique	2,0
2	Acide palustrique	13,6	10	Acide sandaracopimarique	1,2
3	acide lévopimarique	12,3	11	Pimaral	1,1
4	Acide déhydroabiétique	8,7	12	Acide 15-hydroxy-déhydroabiétique	0,7
5	Acide néoabiétique	8,4	13	iso-Pimaral	0,5
6	Acide pimarique	6,7	14	$\beta$ -Phéllandrène	0,2
7	Acide isopimarique	4,0	15	Longifolène	0,2
8	$\alpha$ -Pinène	3,8	16	$\beta$ -Pinène	0,1
Composition globale identifiée					78,7%

Rendement en volatile : 4,71% ; rendement en extraction de la phase aqueuse : 82,6% ; <sup>a</sup> : rendement global par rapport à l'échantillon.

Les acides résiniques forment ainsi les composantes majoritaires identifiées dans cette résine avec l'acide abiétique en tête (15,2%), suivi de l'acide palustrique (13,6%), l'acide lévopimarique (12,3%), l'acide déhydroabiétique (8,7%), L'acide néoabiétique (8,4%), l'acide pimarique (6,7%) et l'acide isopimarique (4,0%). L' $\alpha$ -pinène ne vient qu'en 8<sup>ème</sup> rang avec 3,8% contre 9,4% pour Pk1 ceci pouvant être à cause du rendement en volatil plus faible (4,71%) par rapport à l'échantillon Pk1 (11,31%). On détecte les monoterpènes le  $\beta$ -phéllandrène (0,2%) après l' $\alpha$ -pinène et le sesquiterpène longifolène 0,2% comme l'acide sandaracopimarique (1,2%) absents dans l'échantillon Pk1. Par contre, le pimaral (1,1%) et l'isopimaral (0,5%)

apparaissent constamment en minoritaires à des teneurs relativement comparables dans les deux échantillons.

**Echantillon Pk3.** Le tableau final **39** illustre la composition globale de la résine

**Tableau 39: composition globale de la résine provenant de l'échantillon Pk3**

N°	Constituants	<sup>a</sup> % résine	N°	Constituants	<sup>a</sup> % résine
1	Acide palustrique	12,4%	9	Acide sandarapicomarique	1,0%
2	Acide déhydroabiétique	9,9%	10	Acide déhydro-15(16)-abiétique	0,9%
3	Acide pimarique	9,8%	11	Pimarol	0,8%
4	Acide lévopimarique	7,0%	12	Pimaral	0,6%
5	Acide isopimarique	5,6%	13	phéllandrène-β	0,3%
6	Acide abiétique	4,0%	14	Longifolène	0,2%
7	Acide néoabiétique	2,2%	15	α-pinène	0,1%
8	Acide hydroxy-15-déhydroabiétique	1,1%	16	longipinène-α	0,1%

Rendement en huiles : 1,12% ; rendement extraction à l'éther : 77,08% ; % total des constituants provenant de la fraction non volatile : 55,4% ; % total des constituants provenant de la fraction volatile : 0,7% ; % globale de la résine : 56,1%

La description globale montre d'une manière significative la composition globale de la résine atteignant jusqu'à 56,1%. Les composantes non volatiles constitués des dérivés résiniques forment les 55,4% de la résine, alors que les composés de la fraction volatile n'en constituent que 0,7%. L'acide palustrique en est ainsi la composante majoritaire avec une teneur de 12,4% ; suivi par l'acide déhydroabiétique avec 9,9% suivie de près par l'acide pimarique (9,8%), celui-ci devançant l'acide lévopimarique à 7,0%. Les acides, isopimarique, abiétique avec respectivement 5,6%, 4,0% terminent cette série de composantes « majoritaires ». Les acides minoritaires, constitués par l'acide néoabiétique, l'acide 15-hydroxydéhydroabiétique, l'acide sandacopimarique, ainsi que l'acide 15(16)-déhydroabiétique sont détectés à des teneurs respectivement égales à 2,2%, 1,1% ; 1,0% et 0,9%. Deux dérivés résiniques neutres, le pimaral, ainsi que le pimarol sont également présents à des concentrations relativement faibles de 0,8% et de 0,6%, pourtant supérieur à l'ensemble des constituants volatils. Ces derniers sont représentés à des taux significatifs de 0,3% pour le β-phéllandrène, 0,2% pour le longifolène, 0,1% pour l'α-pinène et 0,1% pour longipinène-α

**Echantillon de *P. patula*** Aperçu sur l'aspect qualitatif et l'aspect quantitatif global de la résine sir le tableau **40**.

**Tableau 40: Composition globale de la résine provenant de l'échantillon *P. patula***

N°	Constituants	% résine <sup>a</sup>	N°	Constituants	% résine <sup>a</sup>
1	Acide abiétique	10,4	7	Acide déhydro-15(16)-abiétique	1,8
2	Acide palustrique	9,0	8	Acide 15-hydroxy-déhydroabiétique	1,6
3	Acide déhydroabiétique	7,5	9	α-pinène	1,2
4	Acide néoabiétique	6,0	10	Acide sandaracopimarique	1,0
5	Acide lévopimarique	5,9	11	Acide isopimarique	0,7
6	Acide pimarique	5,7	12	β-pinène	0,1

Rendement en huiles : 1,62% ; rendement extraction : 74,27% ; Total : 50,9 % en masse ; <sup>a</sup> : teneur en masse rapportée à la masse de résine.

La méthodologie utilisée sur la résine brute suivie de la péréquation nous a donc permis de déterminer la composition jusqu'à 50,9% de la résine de l'échantillon de *Pinus patula*. L'acide abiétique est le constituant majoritaire avec 10,4% suivi par l'acide palustrique (9,0%), l'acide déhydroabiétique (7,5%), l'acide néoabiétique (6,0%), l'acide lévopimarique (5,9%). L'acide

pimarique (5,7%) sépare cette série d'acides dérivés du squelette d'abiétane des autres acides du groupe des minoritaires dont vient en tête l'acide 15(16)-déhydroabiétique (1,8%), suivi de l'acide 5-hydroxydéhydroabiétique (1,6%). C'est là que vient se placer l' $\alpha$ -pinène avec 1,2% et qui sépare cette série d'acides du squelette d'abiétane minoritaires des autres acides du squelette pimarine dont l'acide sandaracopimarique (1,0%), l'acide isopimarique (0,7%). Le  $\beta$ -pinène termine la liste des constituants de la résine ainsi analysée avec une teneur de 0,1%.

Après ces descriptions globales, nous sommes en mesure d'effectuer une étude comparative sur les teneurs des constituants par rapport à la masse entière des résines purifiées.

### 3.1.4. Etude comparative des échantillons de *Pinus* et discussions

Ce paragraphe termine le chapitre sur l'analyse des résines des pins par RMN du carbone-13 par une étude comparative des résultats sur les échantillons individuels de *P. kesiya* et l'échantillon de *P. patula*. Le tableau 41 résume une comparaison des compositions en classe de composés terpéniques des fractions volatiles et non volatiles des échantillons

**Tableau 41: Comparaison des compositions des fractions volatiles et non volatiles des échantillons**

Constituants	Composition %			
	PK1	Pk2	Pk3	Pp
total fraction non volatile <sup>a</sup>	71,8	90,0	71,9	66,8
– Acides diterpéniques	69,1	88,1	70,1	66,8
– diterpènes neutres	2,7	1,9	1,8	0,0
total fraction volatile <sup>b</sup>	96,0	96,3	76,4	89,2
– monoterpènes	95,7	91,7	51,1	88,7
– sesquiterpènes	0,4	4,3	26,0	0,4

<sup>a</sup> : % rapportée aux FNV obtenues après hydrodistillation ; <sup>b</sup> : % rapportés par rapport aux essences obtenus par hydrodistillation.

Une comparaison des % des constituants des fractions non volatiles est donnée par le tableau 42.

**Tableau 42: Comparaison des constituants dans les fractions non volatiles**

N°	Constituants*	Pk1	Pk2	Pk3	Pp
1	Acide 15-hydroxy-déhydroabiétique	1,8	0,8	1,4	2,1
2	Acide abiétique	26,0	18,5	5,2	14,0
3	Acide déhydro-15(16)-abiétique	2,9	2,4	1,1	2,5
4	Acide déhydroabiétique	11,4	10,5	12,9	10,0
5	Acide isopimarique	5,0	4,8	7,3	0,9
6	Acide lévopimarique	5,1	14,9	9,1	8,0
7	Acide néoabiétique	5,0	10,2	2,9	8,1
8	Acide palustrique	7,9	16,4	16,0	12,1
9	Acide pimarique	4,0	8,1	12,8	7,7
10	Acide sandaracopimarique	-	1,5	1,3	1,4
11	Isopimaral	0,9	0,6	-	-
12	Pimaral	1,1	1,3	0,8	-
13	Pimarol	0,6	-	1,0	-

\* : composition rapportée à la masse des fractions non volatiles obtenue par quantification.

L'acide abiétique de teneur globale variant de 10,4-16,3% sauf pour le Pk3 (4,0%), l'acide palustrique (5,0-13,6%) et l'acide déhydroabiétique (7,2-9,9%) sont parmi les trois premiers composés majoritaires du lot d'échantillons toutes espèces confondues. Finalement, le tableau 43 donne le résumé des % globaux des quatre échantillons par rapport aux masses des résines utilisées.

**Tableau 43: Comparaison des compositions globales des échantillons de résine**

Constituants	Pk1	Pk2	Pk3	Pp	constituants	Pk1	Pk2	Pk3	Pp
Acide 15(16)-déhydroabiétique	1,8	2,0	0,9	1,8	Isopimaral	0,6	0,5	-	-
Acide 15-hydroxy-déhydroabiétique	1,1	0,7	1,1	1,6	Pimaral	0,7	1,1	0,6	-
Acide abiétique	16,3	15,2	4,0	10,4	Pimarol	0,4	-	0,8	-
Acide déhydroabiétique	7,2	8,7	9,9	7,5	$\alpha$ -pinène	9,4	3,8	0,0	1,2
Acide isopimarique	3,2	4,0	5,6	0,7	$\beta$ -pinène	0,2	-	0,1	0,1
Acide lévopimarique	3,2	12,3	7,0	5,9	$\beta$ -phellandrène	-	0,2	0,0	-
Acide néoabiétique	3,2	8,4	2,24	6,0	Camphène	0,1	-	-	-
Acide palustrique	5,0	13,6	12,4	9,0	Longifolène	-	0,2	0,0	-
Acide pimarique	2,5	6,7	9,8	5,7	Longipinène- $\alpha$	-	-	0,0	-
Acide sandacopimarique	-	1,2	1,0	1,0	Myrcène	0,1	-	-	-
					Total	54,8	60,1	55,3	50,9

Les acides pimarique (2,5-8%) et isopimarique (0,7-5,6%) qui ont été suggérés comme marqueurs chimiques avec les espèces de pin<sup>187,188</sup> sont présents dans les échantillons à des teneurs assez variables. Les principaux acides minoritaires l'acide 15(16)-déhydroabiétique (0,9-2,0%) ; l'acide 15-hydroxydéhydroabiétique (0,7-1,6%) sont tous présents dans chaque échantillon sauf l'acide sandacopimarique (1,0-1,2%) qui n'a pas été détecté avec l'échantillon Pk1. On a observé les composés diterpéniques neutres à des teneurs plus faibles que celles des acides minoritaires. Le pimaral est présent dans les trois échantillons de *P. kesiya* (0,6-1,1%), le pimarol dans le Pk1 (0,4%) et le Pk3 (0,8%) et l'isopimaral dans le Pk1 (0,6%) et le Pk2 (0,5%), tous les trois étant absents dans le Pp. Les volatiles sont détectées dans chaque résine à des teneurs globales relativement faibles sauf pour l' $\alpha$ -pinène dans le Pk1 avec 9,4%, mais ce % diminue rapidement avec les autres échantillons (0,0-3,2%). Le  $\beta$ -pinène (0,1-0,2%) n'est détecté qu'à l'état de trace dans le Pk2 ; il en est de même pour le camphène qui n'est visible à 0,1% dans le Pk1 tout comme le myrcène. Des deux composés sesquiterpéniques, le longifolène n'est présent qu'à 0,2% dans le Pk2 pour l'ensemble tandis que le longipinène- $\alpha$  reste négligeable. Les résultats de Rezzi *et coll.*<sup>189</sup> sur le *P. nigra* de la littérature dans le tableau 44 ci-dessous nous permettent d'établir une comparaison et de continuer la discussion.

**Tableau 44: Etude de variabilité intraspécifique de *P. nigra* par RMN carbone-13**

N°	Constituants	I	II	III	N°	constituants	I	II	III
1	Acide abiétique	5,5	9,2	4,2	9	Pimaral	1,2	1,3	-
2	Acide déhydroabiétique	8,7	8,9	3,2	10	Pimarol	-	-	-
3	acide néoabiétique	9,0	7,0	8,2	11	Isopimaral	-	0,9	-
4	acide palustrique	9,3	8,4	12,9	12	Isocembrol	10,5	6,2	-
5	Acide lévopimarique	12,8	7,3	26,0	13	4-épi-isocembrol	11,0	7,2	1,7
6	Acide isopimarique	5,2	4,5	3,6	14	Cembrène	-	-	-
7	Acide pimarique	5,5	5,7	3,6	15	$\alpha$ -Pinène	5,5	14,9	6,7
8	Acide sandacopimarique	0,6	0,7	0,7		Total	84,8	82,2	70,8

On observe une composition globale variant de 70,8 à 84,8 % avec le teneur en  $\alpha$ -pinène variant de 5,5 à 14,9%. D'autre part, on observe des composés diterpéniques dérivant du squelette de cembrène pouvant être de teneur importante comme le 4-épi-isocembrol (1,7-11,0%). Par contre on note l'absence des acides minoritaires tels que l'acide 15(16)-déhydroabiétique ou l'acide 15-hydroxydéhydroabiétique. La seule publication que nous avons pu trouver concernant l'espèce

*P. kesiya* a été effectuée par une firme industrielle chinoise mentionnant des analyses après dérivatisation des acides résiniques sur CPG.<sup>190</sup> (tableau 45)

Tableau 45: Etude de variabilité intraspécifique des espèces de **P. Kesiya** de Chine

N° constituants	I	II	III	IV	N° constituants	I	II	III	IV
1 Acide pimarique	6,3	6,4	6	6,3	7 Acide abiétique	25,5	33,6	40,6	29,8
2 Acide sandaracopimarique	1,5	1,4	1,4	1,4	8 Acide déhydroabietique	4,5	4,1	4,7	4
3 Acide communiqué	0	0	0	0	9 Acide néoabietique	21,8	20,6	19,6	21,7
4 Acide lévopimarique	8,6	1,1	0,4	3,5	10 Merkussii	0	0	0	0
5 Acide palustrique	26	26,3	20,6	27	11 $\alpha$ -pinène	73,7	72,4	76,2	70,9
6 Acide isopimarique	4,3	4,4	4,3	4	12 $\beta$ -pinène	16,7	15,2	9,7	18,2

On observe la présence d'acide communiqué ainsi que du merkussi à l'état de trace par CPG. L' $\alpha$ -pinène domine largement la composition de la fraction volatile avec des teneurs variant respectivement de 70,9 à 76,2% suivi par et le  $\beta$ -pinène variant de 9,7 à 16,7%.

**Remarques et conclusions.** Comme nous l'avons déjà mentionné, les échantillons ont été collectés dans différentes localités, d'écologie différente ce qui, sans doute, a eu déjà des impacts sur la composition chimique des résines des pins de même espèce (variabilité chimique intraspécifique). Aucune considération spécifique comme l'âge qui est un paramètre important n'a pas été pris en compte lors de ces collectes effectués « au hasard ». Par ailleurs, on a suggéré que les sols moins riches en éléments nutritifs, azote-phosphore provoquent un enrichissement de la teneur en monoterpènes dans les fractions volatiles. De même, les conditions climatiques telles que la sécheresse sont connues pour avoir des effets importants sur la composition en monoterpènes et en acides diterpéniques,<sup>191</sup> dont sont affectés particulièrement les composés de type abiétane.<sup>192</sup> Des variations en composition de composés sesquiterpéniques et de constituants monoterpéniques peuvent aussi survenir à la suite des attaques des insectes herbivores.<sup>193</sup> Les incidences des activités humaines tels les feux de brousse peuvent avoir également des impacts sur la composition des résines.<sup>194</sup> Ainsi, nos résultats, montrant le potentiel de la méthodologie d'analyse directe par RMN du carbone-13, ouvrent la voie à d'autres études plus poussées appuyées par des méthodes statistiques sur un plus grand nombre d'échantillons.

### 3.2. Analyse quantitative des sucres et étude comparative des miels d'origines botanique et géographique diverse

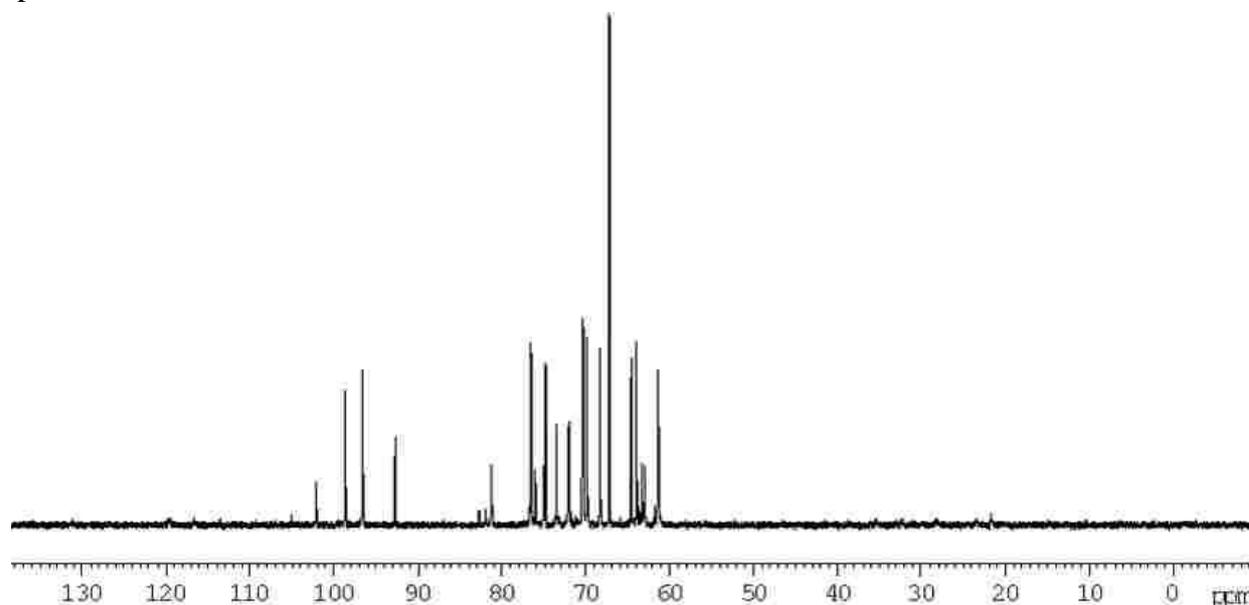
Cette étude sur les sucres dans les miels se divisera en deux parties dont la première concernera sur l'analyse quantitative des sucres dans les divers échantillons de miel d'origine botanique et géographique différente (**3.2.1**). La deuxième partie portera sur le calcul des répartitions tautomériques, l'analyse comparative des miels et l'étude de quelques propriétés physiques (**3.2.2**).

#### 3.2.1. Quantification des sucres dans les échantillons de miel d'origine botanique et géographique diverse

Nous allons étudier successivement dans cette partie les teneurs en sucres majoritaires et minoritaires des différents échantillons de miel dont ceux qui proviennent de Madagascar : le miel d'eucalyptus (**3.2.1.1**), le miel de letchis (**3.2.1.2**), le miel de forêts (**3.2.1.3**) ; le miel commercial de Morondava (**3.2.1.4**) ; les miels provenant de France : le miel commercial Michaud de Corse (**3.2.1.5**), le miel Elisa (**3.2.1.6**), le miel de bruyère (**3.2.1.7**) et le miel de maquis (**3.2.1.8**) de Ferrals les Montagne.

##### 3.2.1.1. Miel d'eucalyptus de Madagascar

Le miel d'eucalyptus est le miel commercial le plus répandu à Madagascar. L'enregistrement du spectre RMN de carbone-13 sur un échantillon du miel nous donne le spectre **20** ci-dessous



Spectre 20 : Spectre RMN carbone-13 du miel d'eucalyptus de Madagascar

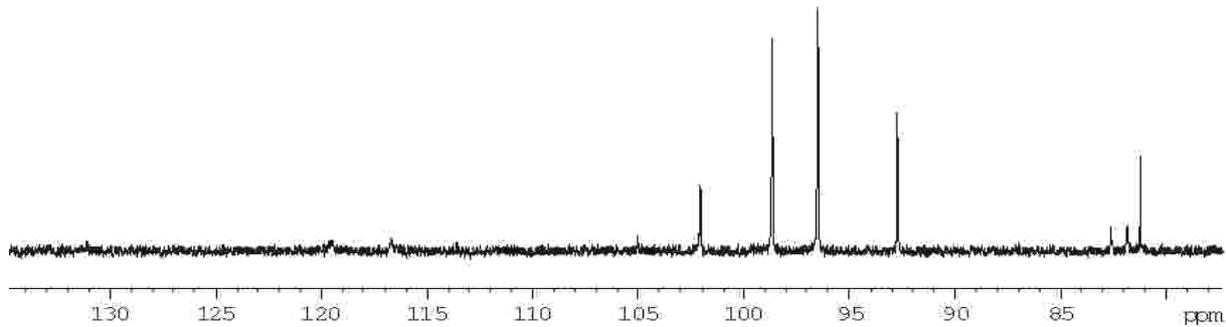
La zone spectrale des carbones anomériques est parfaitement dégagée entre 92-105 ppm, elle contient aussi les résonances de carbones engagées dans des liaisons glycosidiques formant avec les premiers « l'empreinte digitale » des miels. Le tableau **46** montre le criblage des sucres du miel d'eucalyptus.

Tableau 46: Criblage des sucres dans le miel d'eucalyptus pour identification

N°	Constituants	pics identifiés	SUP	N°	Constituants	pics identifiés	SUP
1	$\alpha$ -D-glucopyranose	6/6	5	13	$\beta$ -F-P-maltulose	9/12	6
2	$\beta$ -D-glucopyranose	6/6	4	14	$\alpha$ -F-F-Turanose	8/12	5
3	$\alpha$ -D-fructofuranose	6/6	1	15	$\beta$ -F-P-turanose	10/12	4
4	$\alpha$ -D-fructopyranose	6/6	3	16	$\beta$ -F-F-Turanose	10/12	6
5	$\beta$ -D-fructofuranose	6/6	3	17	$\alpha$ -G-Nigérose	10/12	9
6	$\beta$ -D-fructopyranose	6/6	4	18	$\beta$ -G-nigérose	11/12	9
7	$\alpha$ -maltose	9/12	9	19	$\alpha$ -iso-maltotriose	12/18	12
8	$\beta$ -maltose	10/12	7	20	$\beta$ -iso-maltotriose	13/18	12
9	$\alpha$ -isomaltose	11/12	11	21	Mélézitose	10/18	9
10	$\beta$ -isomaltose	11/12	10	22	Erlose	10/18	8
11	$\alpha$ -F-F-maltulose	6/12	6	23	D-glucitol	6/6	1
12	$\beta$ -F-F-maltulose	9/12	8	24	Raffinose	9/18	8

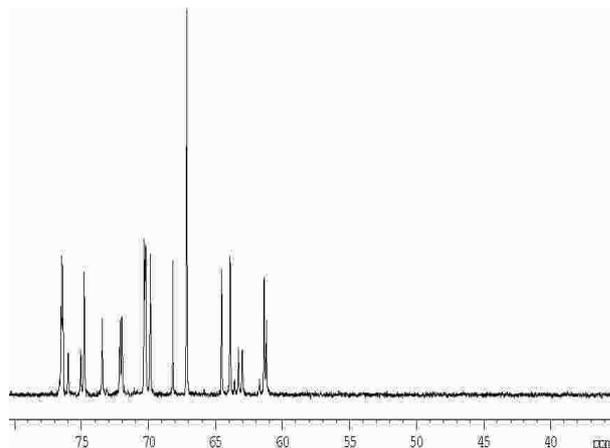
$\Delta\delta$  variant jusqu'à 0,08 ppm. 1 : aDGP; 2 : bDGP; 3 : aDFF; 4 : aDFP; 5 : bDFF; 6 : bDFP, 4pics; 7 : aM; 8 : bM; 9 : aiM; 10 : biM; 11 : aFFM; 12 : bFFM; 13 : bFPM; 14 : aFFT; 15 : bFPT; 16 : bFFT; 17 : aGPN; 18 : bGPN; 19 : aiMt; 20 : biMt; 21 : Me; 22 : Erlose; 23 : D-glucitol; 24 : R, raffinose.

Le spectre **21** ci-dessus montre la région entre 90 et 105 ppm des carbones anomériques et des carbones impliqués dans les liaisons glycosidiques.



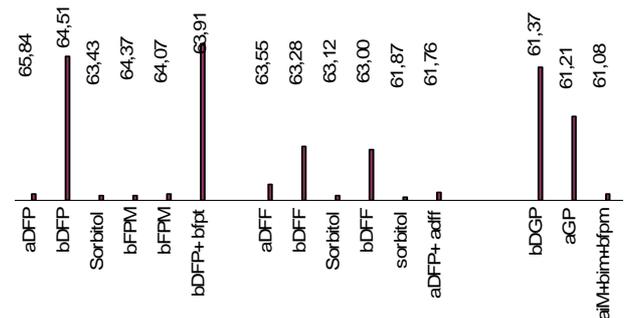
Spectre 21: Région des carbones anomériques et glycosiques du miel à 100,625 MHz

L'inspection des régions entre 40 et 80 ppm (Spectre **22**) et surtout celle à gauche du pic du dioxanne-1,4 permet de détailler les particularités du miel (Figure **9**)



Spectre 22: Région de 40-80 ppm du spectre de carbone-13 du miel d'eucalyptus

le pic à 67,12 ppm est celui du dioxanne-1,4 rapporté à 100

Figure 9: **minoritaires** de la sous-région spectrale entre 60-66 ppm du miel d'eucalyptus

Les valeurs portées en étiquette expriment  $\delta$  en ppm. Les hauteurs des pics expriment les intensités relatives. Les pics trop intenses sont omis pour faire ressortir les minoritaires. (intervalle dynamique)

Les résultats de l'identification et de la quantification des constituants en utilisant les intensités sont alors consignés dans le tableau **47** qui suit. On y voit que l'anomère  $\beta$ -D-fructopyranose (bDFP), est le premier des composantes majoritaires des composés glucidiques avec 22,0 % des sucres totaux identifiés. Le second constituant majoritaire est le  $\beta$ -D-glucopyranose (20,3%),

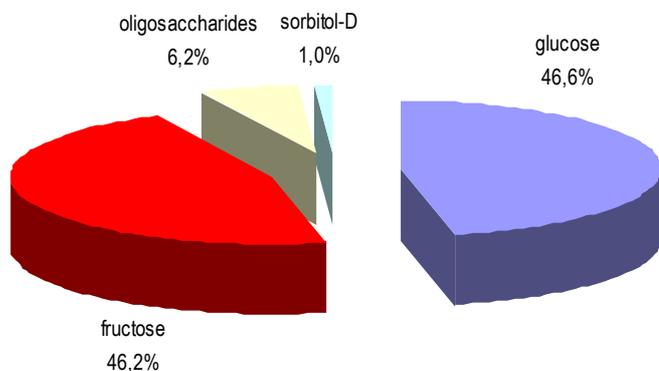
suivi par son anomère alpha (11,9%). Ce dernier précède alors le  $\beta$ -D-fructofuranose qui ferme la série des sucres majoritaires avec 7,2%.

Tableau 47: Quantification miel d'eucalyptus par la moyenne des intensités

N°	sucres	<sup>b</sup> Em	% sucres	N°	Sucres	<sup>b</sup> Em	% sucres <sup>a</sup>
1	$\alpha$ -D-glucopyranose	8,5%	11,9%	7	$\beta$ -maltose	5,0%	1,2%
2	$\beta$ -D-glucopyranose	6,6%	20,3%	8	$\beta$ -F-P-maltulose	19,7%	1,1%
3	$\alpha$ -D-fructofuranose	2,8%	1,9%	9	$\beta$ -F-P-turanose	1,7%	1,0%
4	$\alpha$ -D-fructopyranose	9,7%	0,8%	10	$\beta$ -F-F-Turanose	5,0%	1,0%
5	$\beta$ -D-fructofuranose	7,2%	7,2%	11	D-glucitol	3,4%	0,7%
6	$\beta$ -D-fructopyranose	5,1%	22,0%	Total			69,0%

<sup>a</sup> ; Intensité moyenne des sucres ; <sup>b</sup> : écart moyen des mesures sur les intensités ; <sup>a</sup> : teneur des constituants exprimé en % par rapport aux masses.

A côté des sucres minoritaires habituels, le  $\alpha$ -D-fructofuranose (1,9%) et le  $\alpha$ -D-fructopyranose(0,8%), on observe une série constituée par le  $\beta$ -maltose (1,2%), le  $\beta$ -F-P-maltulose (1,1%), le  $\beta$ -F-P-turanose (1,0%),  $\beta$ -F-F-turanose (1,0%) et le D-glucitol (0,8%).



Classe des sucres	teneur
G (agp+bgp)	32,1%
F (aff+afp+bff+bfpm)	31,9%
<u>oligosaccharides</u>	
- maltose (bm)	1,2%
- maltulose (bfpm)	1,1%
- turanose (bfpt + bfft)	2,0%
autres monosaccharides	
- D-glucitol	0,7%
Total	69,0%

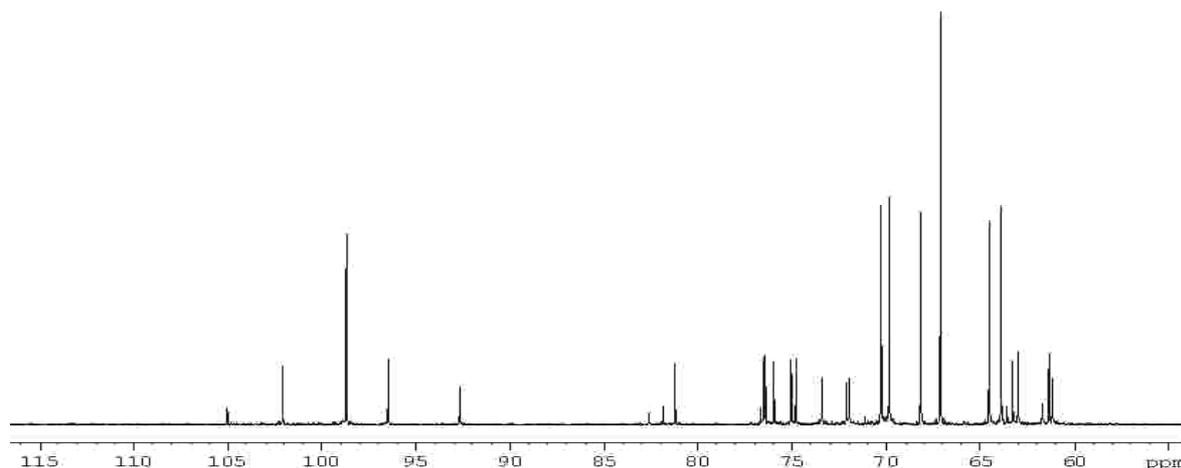
Graphique 1: pourcentage en masse des sucres par rapport aux sucres totaux du miel d'eucalyptus

F+G	64,0%
F/G	0,99
oligosaccharides	4,3%

L'ensemble des sucres identifiés constitue ainsi 69,0% en masse de l'échantillon du miel d'eucalyptus étudié que l'on peut représenter avec le graphique 1 ci-dessus. L'ensemble glucose et fructose (F+G) rend compte pour 64,0% de la masse totale de miel tandis que le rapport F/G vaut 0,99. Par rapport aux sucres totaux, les composés du D-glucose et du D-fructose forment respectivement les 46,3 et les 46,2% de la composition.

### 3.2.1.2. « Miel des forêts » de Madagascar

Le spectre 23 enregistré à 238 ppm présente 292 pics sous les conditions de sélection de pics de façon à voir les pics des minoritaires. Le criblage par les bases de données du laboratoire et les bases de données disponibles sur Internet suivi d'identification conduisent à 23 composés outre le raffinose, l' $\alpha$ -gentibiose et le  $\beta$ -mélibiose, absents dans miel d'eucalyptus précédent. (Tableau 48)



Spectre 23: Spectre **RMN de carbone-13 miel de forêt de Madagascar**

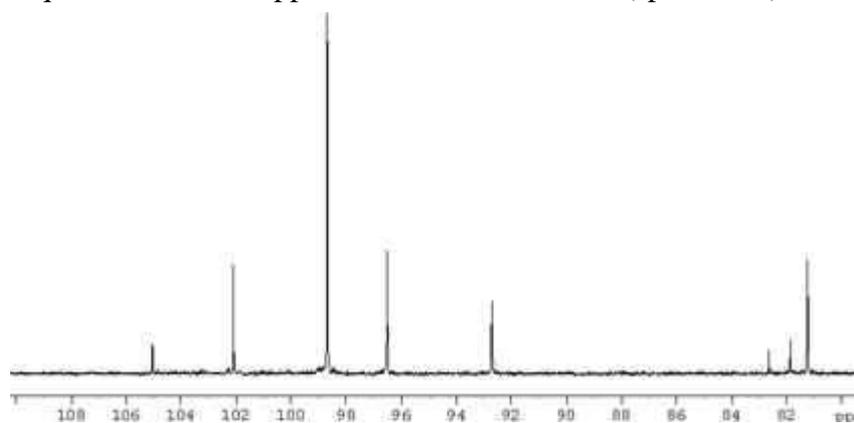
Le spectre présente grosso modo 3 régions distinctes : la région anomérique et glycosidique entre 90-105 ppm ; la région en amont du pic de dioxanne entre 67,5ppm et 83 ppm ; la région en aval de 60-66 ppm.

Tableau 48: **Criblage et identification des sucres dans le miel de forêt**

N°	Constituants	pics identifiés	SUP	N°	Constituants	pics identifiés	SUP
1	α-D-glucopyranose	6/6	5	14	α-F-F-turanose	10/12	2
2	β-D-glucopyranose	6/6	4	15	β-F-P-turanose	12/12	5
3	α-D-fructofuranose	6/6	1	16	β-F-F-Turanose	11/12	5
4	α-D-fructopyranose	6/6	2	17	α-G-Nigérose	9/12	7
5	β-D-fructofuranose	6/6	1	18	β-G-nigérose	10/12	8
6	β-D-fructopyranose	6/6	2	19	α-iso-maltotriose	15/18	14
7	α-Maltose	10/12	8	20	β-iso-maltotriose	15/18	15
8	β-maltose	9/12	6	21	Mélézitose	14/18	8
9	α-isomaltose	10/12	9	22	Erlöse	16/18	8
10	β-isomaltose	11/12	6	23	D-glucitol	5/6	2
11	α-F-F-maltulose	9/12	8	24	Raffinose	12/18	5
12	β-F-F-maltulose	10/12	8	25	α-gentibiose	12/12	8
13	β-F-P-maltulose	9/12	4	26	β-mélibiose	12/12	8

Criblage par base de données informatisées et dépouillement spectral. Δδ variant jusqu'à 0,08 ppm. 1 aDGP; ; 2 : bDGP; ; 3 : aDFF, 5 pics ; 4 : aDFP ; 5 : bDFF; 6 : bDFP; 7 : aM, 1 pics ; 8 : bM; 9 : aiM ; 10 : biM; 11 : aFFM; 12 : bFFM; 13 : bFPM; 14 : aFFT; 15 : bFPT ; 16 : bFFT; 17 : aGPN; 18 : bGPN; 19 : aiMt; 20 : biMt; 21 : Me; 22 : Erlöse; 23 : D-glucitol; 24 : R, raffinose ; 25 : alpha-gentibiose; 26 : bêta-mélibiose

Un zoom du spectre de la région des carbones anomériques et des carbones impliqués dans les liaisons glycosidiques entre 90-105 ppm est montré ci-dessous (spectre 24).



Spectre 24: **Région des carbones anomériques du miel des forêts**

Une simulation d'une partie du spectre ci-dessus qui renferme les pics des carbones anomériques et des carbones engagés dans des liaisons glycosidiques est montrée ci-dessous entre deux oses simples. (Fig.9)

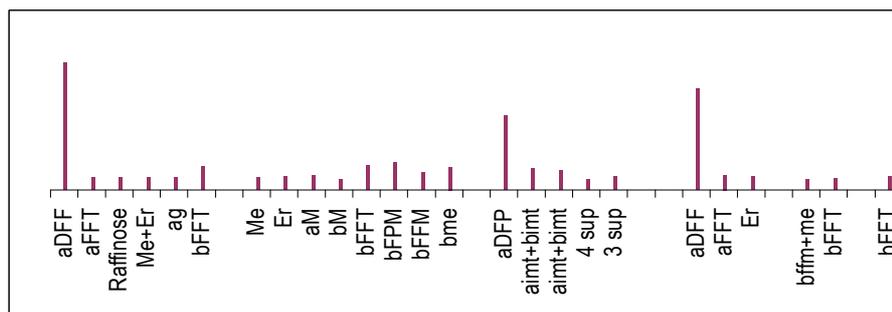
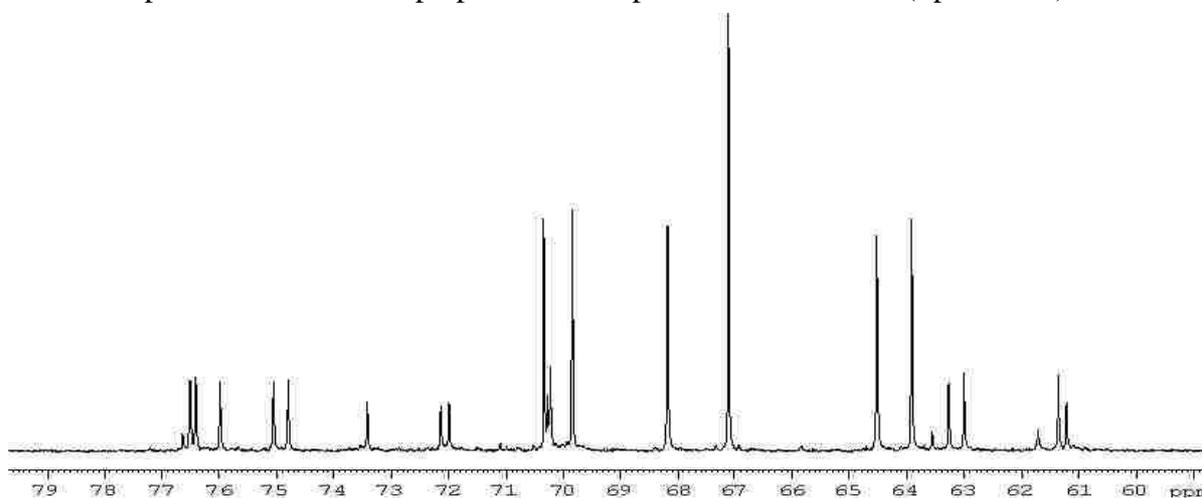


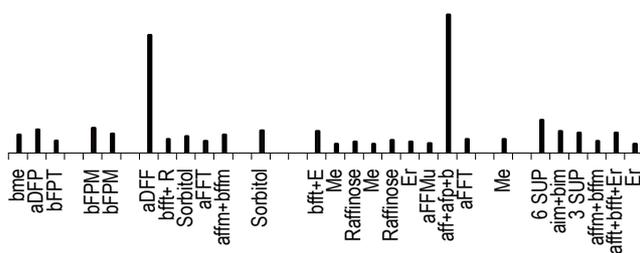
Figure 10: minoritaires de la sous-région anomérique entre 90 et 105 ppm du miel des forêts  
Pics des minoritaires (on omet les pics majoritaires) de la région anomérique 0-105 ppm et de la région de 81-83 ppm. L'intensité des pics est référée à celle des pics de l'α-fructofuranose aDFF respectivement à 105,02 , 98,62 et à 82,62 ppm. Ce constituant rappelons-le, a le moins de pics en superposition. A noter les pics des minoritaires tel que l'ertose bien visible à 61,80 et à 100,41 ppm. De la même façon, la β-mélibiose qui n'a été détecté que dans cet échantillon est identifié par ses pics à 98,70 ppm dans la région anomérique. Les pics de l'isomère bêta de la forme fructofuranose du turanose sont aussi bien visibles dans cette région à 81,40, 98,00, 98,38, et à 102,28 ppm. On observe aussi le pic du carbone glycosidique du raffinose à 104,17 ppm

Les deux autres spectres de la région séparés par le pic du dioxanne-1,4 peuvent aussi être reconstitués pour visualiser les superpositions des pics des constituants (Spectre 25).



Spectre 25: région spectrale de 80-60 ppm du miel des forêts de Madagascar

L'examen de la liste des pics traduits en graphique (Grap. 2) permet d'illustrer encore une fois par la différence entre les différents types de miels.



Région spectrale à champ fort (entre 67-60 ppm) du miel2. Comme précédemment, les pics des gros constituants sont omis et on garde le pic de l'α-fructofuranose à 63,55 ppm pour référence avec celui qui est à 61,70 ppm en superposition avec les pics de l'α-fructopyraniose et le β-mélibiose. Comme les autres régions du spectre, cette partie dénote la richesse en constituant de l'échantillon. En dehors du D-glucitol avec ses pics à 63,46 ppm ; 63,06 ppm, on les pics de l'ertose à 61,82 et 60,73 ppm, ceux de mélézitose à 62,80 et 61,26 ppm tandis que ceux du raffinose se démarquent respectivement à 62,77 et à 62,15 ppm.

Graphique 2: Simulation graphique de la région spectrale entre 67-60 ppm du miel des forêts de Madagascar

L'analyse des superpositions, des nombres de carbones identifiés avec la cohérence des intensités avec la prise en compte des écarts moyens permet de valider 20 composés résumés dans le tableau 49 ci-après.

Tableau 49 : Analyse des intensités des pics des sucres du miel de forêt de Madagascar

N°	Sucres	Im <sup>a</sup>	Em <sup>b</sup>	N°	Sucres	Im	Em
1	α-D-glucopyranose	10,335	9,3%	11	α-F-F-turanose	0,435	9,7%
2	β-D-glucopyranose	17,050	7,0%	12	β-F-P-turanose	0,355	8,5%
3	α-D-fructofuranose	4,045	6,1%	13	β-F-F-turanose	0,683	9,7%
4	α-D-fructopyranose	0,810	5,2%	14	β-G-nigérose	0,715	3,0%
5	β-D-fructofuranose	15,557	7,8%	15	Mélézitose	0,340	7,8%
6	β-D-fructopyranose	50,990	7,5%	16	Erllose	0,376	8,8%
7	β-maltose	0,357	9,8%	17	D-glucitol	0,540	13,1%
8	β-isomaltose	0,427	11,1%	18	raffinose	0,414	9,4%
9	β-F-F-maltulose	0,410	-	19	α-gentibiose	0,385	1,8%
10	β-F-P-maltulose	0,893	7,3%	20	β-mélibiose	0,653	3,5%

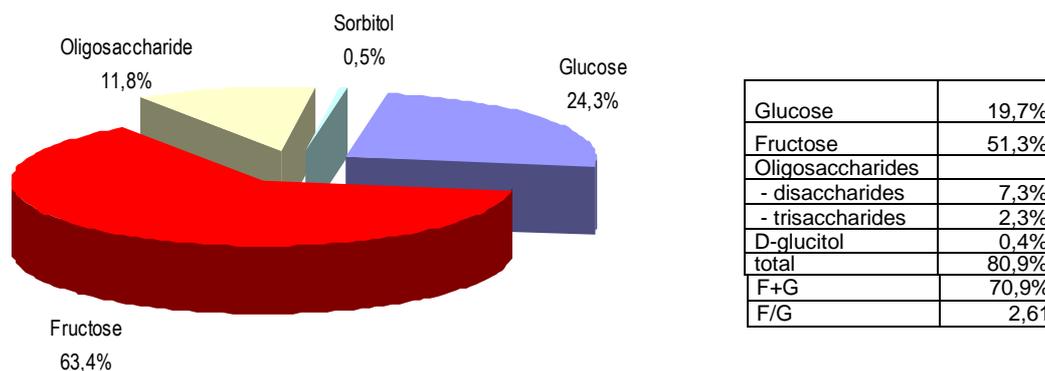
Analyse des intensités moyennes des pics. <sup>a</sup> : Im intensité moyenne ; <sup>b</sup> : Ecart moyen Ems ; <sup>c</sup> : % sucre : pourcentage en masse des sucres par rapport à l'échantillon de miel

Ces résultats de quantification permettent alors de classer les divers sucres du miel d'après leur teneur exprimée en % en masse, avec le β-D-fructopyranose (36,6%) comme premier constituant majoritaire de ce miel. (Tableau 50)

Tableau 50: Classement des constituants en sucres du miel des forêts de Madagascar

N°	Sucres	% sucres	N°	sucres	% sucres (en masse)
1	β-D-fructopyranose	36,6%	11	Erllose	0,8%
2	β-D-glucopyranose	12,2%	12	Mélézitose	0,7%
3	β-D-fructofuranose	11,2%	13	α-F-F-turanose	0,6%
4	α-D-glucopyranose	7,4%	14	β-isomaltose	0,6%
5	α-D-fructofuranose	2,9%	15	α-D-fructopyranose	0,6%
6	β-F-P-maltulose	1,2%	16	β-F-F-maltulose	0,6%
7	β-G-nigérose	1,0%	17	α-gentibiose	0,5%
8	β-F-F-Turanose	0,9%	18	β-maltose	0,5%
9	β-mélibiose	0,9%	19	β-F-P-turanose	0,5%
10	raffinose	0,8%	20	D-glucitol	0,4%
Total teneur en sucre					80,9 %

Le second constituant majoritaire est le β-D-glucopyranose avec une teneur de 12,2% suivi par le β-D-fructofuranose à 11,2% et le α-D-glucopyranose présent à 7,4%. La série des constituants majoritaires est fermée par le α-D-fructofuranose avec 2,9%. L'isomère bêta de la forme fructopyranose du maltulose est le seul représentant de ce type de sucre avec une teneur de 1,2% ce qui le classe à la tête des constituants des sucres minoritaires des miels dans cet échantillon, suivi respectivement par le β-nigérose avec 1,0% et le β-F-F-turanose à 0,9%. Ce dernier avec le β-mélibiose ouvre la série des minoritaires en dessous de 1,0%. Les trois trisaccharides quantifiés dans cet échantillon sont représentés par le raffinose (0,8%), l'erlose ainsi que le mélézitose présents respectivement à 0,8 et à 0,7%. La majorité des sucres qui restent est constituée des disaccharides : le α-F-F-Turanose, le β-isomaltose, le α-D-fructopyranose, le β-F-F-maltulose tous estimés à la même teneur de 0,6% ; à 0,5%. Notons en outre les autres disaccharides dont le α-gentibiose, le β-maltose ainsi que le β-F-P-turanose. Le D-glucitol qui est un alditol termine la série des sucres minoritaires avec une teneur de 0,4% presque à la limite de détection de l'appareil.

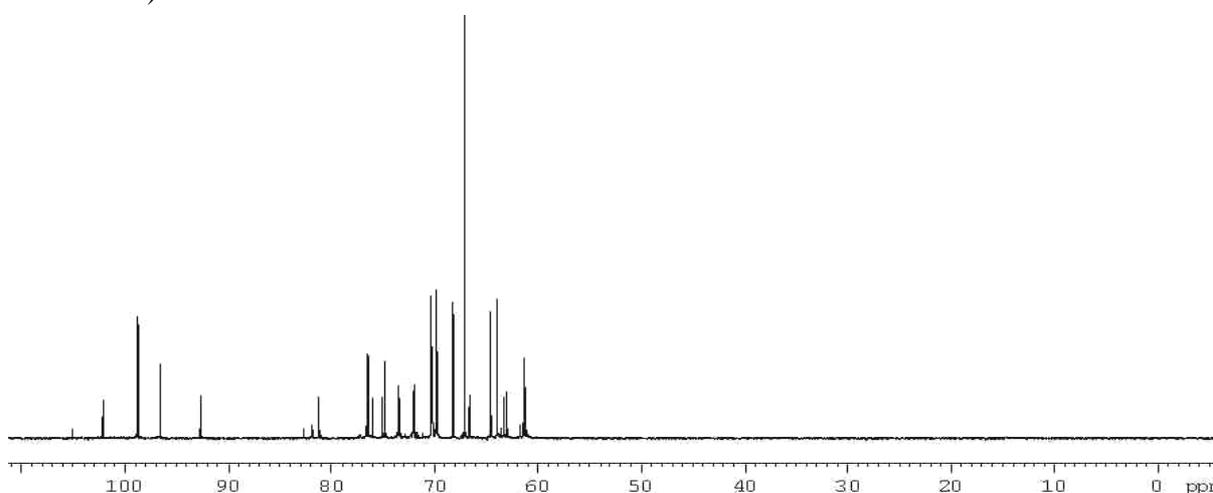


Graphique 3 Composition par classe de sucre par rapport aux sucres totaux du miel des forêts de Madagascar

Le total des composés du D-glucose forme 19,7% de cet échantillon de miel de forêt tandis que l'ensemble des isomères du D-fructose en forme les 51,3%. Par rapport aux sucres totaux ces classes de constituants majoritaires forment respectivement 24,3 et 63,4% pour les composés du D-glucose et ceux du D-fructose. (Graphique 3). Le total fructose et glucose constitue ainsi jusqu'à 70,9% du miel conduisant à un rapport F/G élevé égal à 2,61. Les oligosaccharides constituent 9,5% tandis qu'on le D-glucitol en forme 0,4%. L'ensemble de ces différentes classes de constituant glucosique forme alors 80,9% de la composition chimique de l'échantillon de miel des forêts de Madagascar.

**3.2.1.3. «Miel de letchis» de Madagascar**

Les groupes de pic du spectre (Spectre 26) sont fortement groupés dans la région de 60 à 110 ppm avec le pic unique du dioxanne-1,4 bien visible à 67,12 ppm. Immédiatement à droite et à gauche de ce pic de référence se situent, bien dégagés, les pics des composés majoritaires dont les deux pics du β-fructopyranose à champ plus faible respectivement à 68,82 et 68,18 ppm et à champ plus fort à 64,52 et 63,91 ppm respectivement, le pic du β-fructopyranose et un autre pic de ce constituant en superposition avec celui du sucre minoritaire le β-F-P-turanose. Dans la région des carbones anomériques et glycosidiques, le pic à 98,67 ppm qui domine cette région de spectre résulte de la superposition des pics de l'α-D-fructopyranose et du β-D-fructopyranose. (Tableau 51).



Spectre 26 : Spectre RMN de carbone-13 du miel de letchis de Madagascar

Tableau 51: Criblage et identification des sucres du miel de letchis de Madagascar

N°	Sucres	pics identifiés	SUP	N°	sucres	pics identifiés	SUP
1	$\alpha$ -D-glucopyranose	6/6	4	13	$\beta$ -F-P-maltulose	10/12	6
2	$\beta$ -D-glucopyranose	6/6	2	14	$\alpha$ -F-F-turanose	9/12	5
3	$\alpha$ -D-fructofuranose	6/6	2	15	$\beta$ -F-P-turanose	10/12	6
4	$\alpha$ -D-fructopyranose	6/6	4	16	$\beta$ -F-F-Turanose	8/12	5
5	$\beta$ -D-fructofuranose	6/6	2	17	$\alpha$ -G-Nigérose	9/12	9
6	$\beta$ -D-fructopyranose	6/6	3	18	$\beta$ -G-nigérose	10/12	9
7	$\alpha$ -Maltose	9/12	7	19	$\alpha$ -iso-maltotriose	15/18	15
8	$\beta$ -maltose	10/12	6	20	$\beta$ -iso-maltotriose	15/18	14
9	$\alpha$ -isomaltose	11/12	11	21	Mélézitose	15/18	12
10	$\beta$ -isomaltose	12/12	10	22	Erllose	12/18	9
11	$\alpha$ -F-F-maltulose	7/12	7	23	D-glucitol	6/6	4
12	$\beta$ -F-F-maltulose	10/12	8	24	raffinose	13/18	7

Contrairement au miel des forêts précédent, nous n'avons pas identifié des raies de résonance pour l'alpha-gentibiose et le bêta-mélibiose, ce qui nous ramène à 24 sucres comme constituants possibles de ce miel. L'analyse des intensités avec les écarts moyens va nous permettre de valider l'identification des constituants à quantifier (Tableau 52).

Tableau 52: Validation des constituants du miel de letchis de Madagascar

N°	Sucres	Im	Em	N°	Sucres	Im	Em
1	$\alpha$ -D-glucopyranose	5,262	7,5%	9	$\beta$ -isomaltose	0,250	22,6%
2	$\beta$ -D-glucopyranose	8,717	2,4%	10	$\beta$ -F-P-maltulose	0,265	2,7%
3	$\alpha$ -D-fructofuranose	1,745	10,5%	11	$\alpha$ -F-F-turanose	0,160	6,3%
4	$\alpha$ -D-fructopyranose	0,445	14,3%	12	$\beta$ -F-P-turanose	0,270	0,0%
5	$\beta$ -D-fructofuranose	6,785	1,9%	13	$\beta$ -F-F-Turanose	0,270	10,5%
6	$\beta$ -D-fructopyranose	22,317	7,8%	14	Mélézitose	0,153	10,0%
7	$\alpha$ -Maltose	0,205	3,4%	15	Raffinose	0,165	7,8%
8	$\beta$ -maltose	0,320	13,3%	16	D-glucitol	0,179	13,0%

Résultats d'analyse des intensités des pics des sucres identifiés dans le miel de forêt de Madagascar. <sup>a</sup> : intensité moyenne Im ; <sup>b</sup> : Ecart moyen des intensités individuelles des pics par rapport à l'intensité moyenne Im.

On obtient ainsi finalement 16 constituants parmi les 24 sucres recensés ci-dessus. La teneur en masse respective de ces constituants est résumée dans le tableau 53.

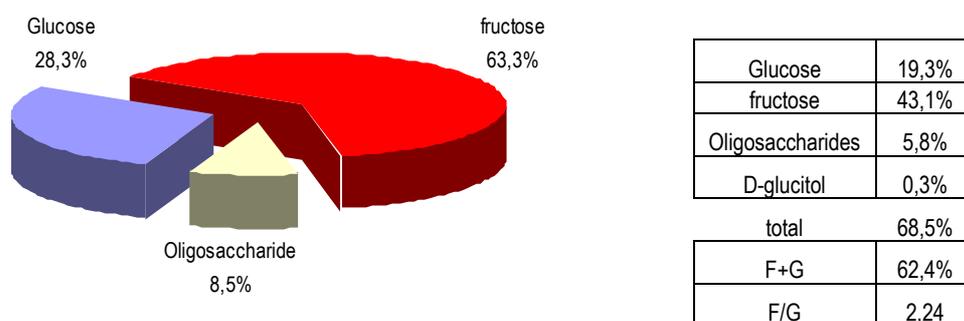
Tableau 53: Classement des constituants en sucre du miel de letchis

N°	sucres	% sucres	N°	Sucres	% sucres (en masse)
1	$\beta$ -D-fructopyranose	30,7%			
2	$\beta$ -D-glucopyranose	12,0%	10	$\beta$ -F-P-maltulose	0,7%
3	$\beta$ -D-fructofuranose	9,3%	11	Raffinose	0,6%
4	$\alpha$ -D-glucopyranose	7,2%	12	$\alpha$ -D-fructopyranose	0,6%
5	$\alpha$ -D-fructofuranose	2,4%	13	Mélézitose	0,6%
6	$\beta$ -maltose	0,8%	14	$\alpha$ -Maltose	0,5%
7	$\beta$ -isomaltose	0,7%	15	$\alpha$ -F-F-Turanose	0,4%
8	$\beta$ -F-P-turanose	0,7%	16	D-glucitol	0,3%
9	$\beta$ -F-F-Turanose	0,7%		Total	68,5%

Quantification des sucres. <sup>a</sup> : % pourcentage des sucres en masse

Les 16 sucres identifiés et quantifiés rendent compte pour 68,5% de la composition chimique du miel de letchis. On dénombre 5 constituants majoritaires dont le premier est le  $\beta$ -F-fructopyranose (30,7%), suivi par le  $\beta$ -D-glucopyranose estimé à 12,0% et le  $\beta$ -D-fructofuranose (9,3%). Les deux derniers parmi les constituants majoritaires sont respectivement le  $\alpha$ -D-glucopyranose (6,8%) et le  $\alpha$ -D-fructofuranose (2,4%). Parmi les sucres minoritaires, on

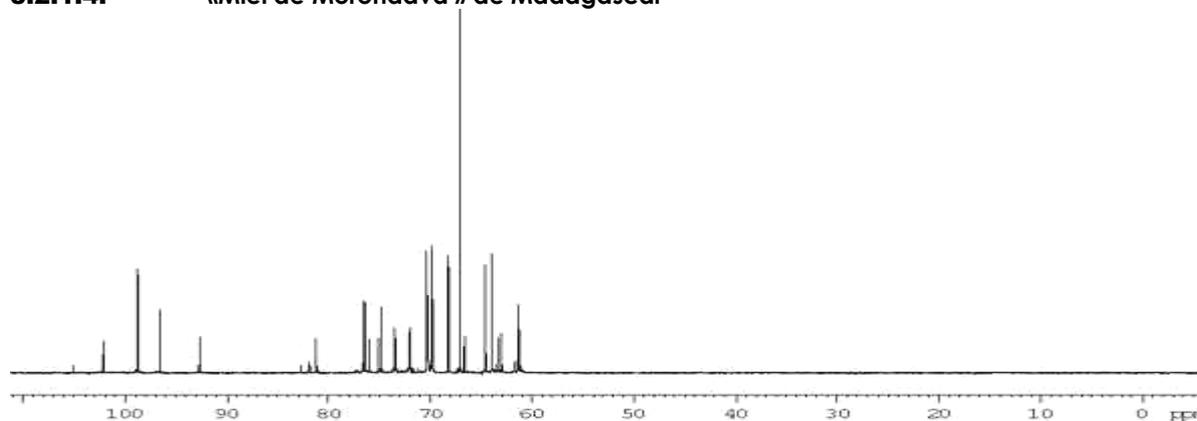
observe en premier lieu les disaccharides du maltose avec le  $\beta$ -maltose (0,8%) et le  $\beta$ -isomaltose (0,7%). On a enregistré successivement avec la même teneur de 0,7% les autres disaccharides tels que le b-F-P-turanose, le b-F-F-turanose ainsi que le  $\beta$ -isomaltulose. On a aussi observé à la teneur de 0,6% les deux trisaccharides, le raffinose et le mélézitose à côté de l' $\alpha$ -D-fructopyranose. L'isomère  $\alpha$ -maltose (0,5%) et l'anomère  $\alpha$  de la forme fructofuranose du turanose (0,4%) terminent cette série de sucres identifiés et quantifiés dans l'échantillon de miel de letchis.



**Graphique 4** : Composition par classe de sucre par rapport aux sucres totaux du miel de letchis

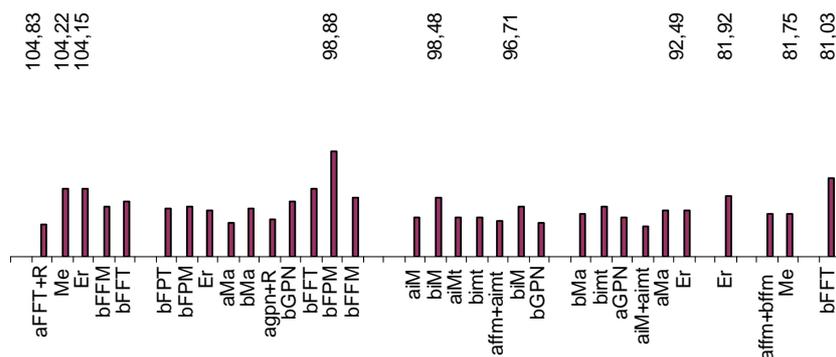
L'ensemble de glucose et fructose F+G forme 62,0% du miel tandis que le rapport F/G vaut 2,29 dans ce cas du miel de letchis. Ces constituants majoritaires des miels forment respectivement 28,3 et 63,3% des sucres totaux dans le miel de letchis, tandis que les oligosaccharides en constituent les 8,5% (Graphique 4) alors qu'ils forment les 5,8% en masse du miel total.

#### 3.2.1.4. «Miel de Morondava » de Madagascar



Spectre 27 : Spectre RMN de carbone-13 du miel de Morondava à 100 MHz

Le miel 4 montre les trames habituelles des miels avec les régions respectives des « empreintes digitales ». (Spectre 27) L'inspection des zones de la région anomérique et glycosidique montre les pics des minoritaires disséminés entre les pics intenses des constituants majoritaires. Une reconstruction des sous-régions spectrales avec la liste des pics RMN après criblage (Tableau 54) et identification montre les pics des minoritaires et les superpositions (Graphique 5).

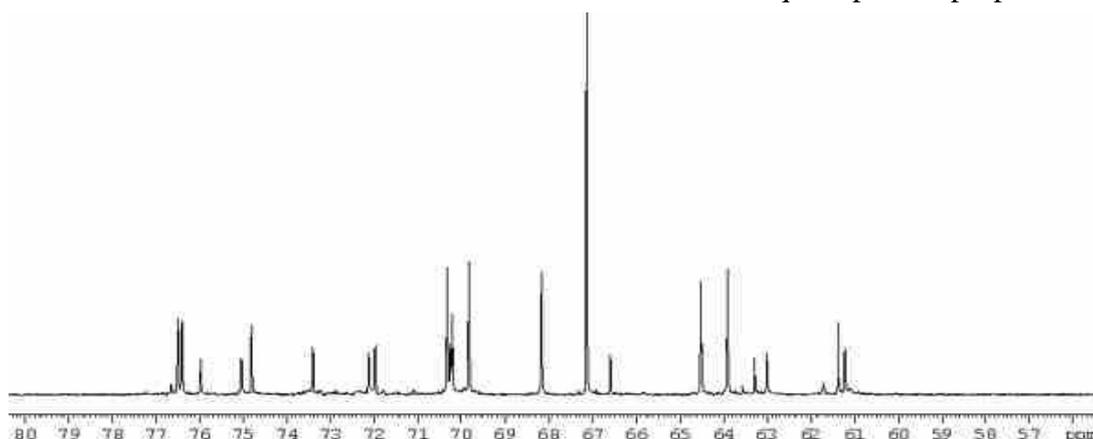


Graphique 5: Simulation du spectre de la région 80-105 ppm des minoritaires du miel Morondava

Tableau 54: Criblage des sucres du miel commercial de Morondava et identification

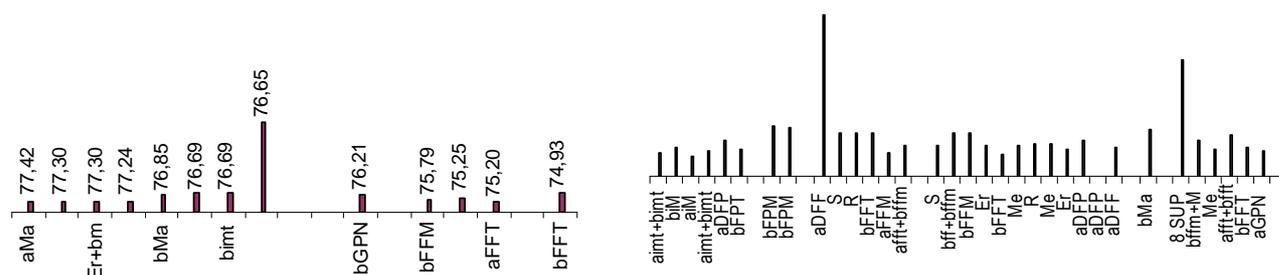
N°	Constituants	pics identifiés	SUP	N°	Constituants	pics identifiés	SUP
1	$\alpha$ -D-glucopyranose	6/6	5	13	$\beta$ -F-P-maltulose	11/12	4
2	$\beta$ -D-glucopyranose	6/6	2	14	$\alpha$ -F-F-turanose	9/12	5
3	$\alpha$ -D-fructofuranose	6/6	0	15	$\beta$ -F-P-turanose	11/12	5
4	$\alpha$ -D-fructopyranose	6/6	2	16	$\beta$ -F-F-Turanose	12/12	6
5	$\beta$ -D-fructofuranose	6/6	2	17	$\alpha$ -G-Nigérose	11/12	8
6	$\beta$ -D-fructopyranose	6/6	3	18	$\beta$ -G-nigérose	11/12	7
7	$\alpha$ -Maltose	12/12	8	19	$\alpha$ -iso-maltotriose	18/18	16
8	$\beta$ -maltose	12/12	6	20	$\beta$ -iso-maltotriose	17/18	13
9	$\alpha$ -isomaltose	12/12	8	21	Mélézitose	15/18	9
10	$\beta$ -isomaltose	12/12	6	22	Erllose	17/18	5
11	$\alpha$ -F-F-maltulose	9/12	4	23	D-glucitol	6/6	3
12	$\beta$ -F-F-maltulose	9/12	6	24	raffinose	12/18	7

24 constituants ont été ainsi recensés comportant les six isomères majoritaires du glucose et du fructose. L' $\alpha$ -glucopyranose, a été identifié avec 6 pics sur 6 comme tous les autres composés majoritaires avec cinq superpositions comme dans les études précédentes. On remarque que les sucres minoritaires la classe de maltose ont été aussi identifiés avec 12 pics sur 12. Par ailleurs, l' $\alpha$ -isomaltotriose a été identifié avec 18/18 mais avec seulement que 2 pics en propre.



Spectre 28 : Région 60-77 du spectre de miel Morondava

Le spectre 28 montre les régions de part et d'autre du pic du dioxane-1,4 qui domine le spectre à 67,12 ppm. Les pics environ à mi-hauteur du pic de référence appartiennent aux sucres majoritaires du D-glucose et du D-fructose.



Graphique 6: **Simulation des spectres des pics des minoritaires de la région 60-80 ppm du miel Morondava**

A gauche : la région 73-75 ppm en amont du pic de référence du dioxane-1,4 à 67,12 ppm. A droite, région de 69-60 ppm en aval du pic de référence. Les pics de l'α-fructofuranose t à 76,68 et à 63,56 ppm sont pris comme référence d'intensité, les autres pics des composés majoritaires sont enlevés.

La région entre 74 et 78 ppm (Graphique 6) montre des pics appartenant en propre à différents sucres minoritaires non identifiés dans le miel précédent tels que le pic du β-isomaltotriose à 78,68 ppm. La région de 66,40 à 60,70 comporte des multitudes de pics appartenant à des différents minoritaires tels que le D-glucitol avec des pics à 63,47 (en superposition avec le raffinose) et à 63,11 ppm, l'erlose présent avec des pics à 62,88 et à 61,92 ppm tandis qu'on observe un pic du mélézitose à 62,68 ppm.

Tableau 55: Validation des sucres du miel commercial de Morondava

N°	Constituants	Im <sup>a</sup>	Em % <sup>b</sup>	N°	Constituants	Im	Em %
1	α-D-glucopyranose	11,010	10,9%	13	β-F-P-maltulose	0,653	26,7%
2	β-D-glucopyranose	18,260	6,4%	14	α-F-F-turanose	0,260	-
3	α-D-fructofuranose	2,180	5,0%	15	β-F-P-turanose	0,530	6,8%
4	α-D-fructopyranose	0,500	4,0%	16	β-F-F-turanose	0,588	7,0%
5	β-D-fructofuranose	9,148	2,9%	17	α-G-nigérose	0,307	1,9%
6	β-D-fructopyranose	28,270	3,0%	18	β-G-nigérose	0,430	3,3%
7	α-Maltose	0,390	33,8%	19	α-iso-maltotriose	0,250	-
8	β-maltose	0,605	5,8%	20	β-iso-maltotriose	0,433	29,2%
9	α-isomaltose	0,390	15,6%	21	Mélézitose	0,333	7,5%
10	β-isomaltose	0,550	10,8%	22	Erlose	0,393	9,7%
11	α-F-F-maltulose	0,387	1,5%	23	D-glucitol	0,395	12,5%
12	β-F-F-maltulose	0,424	12,7%	24	raffinose	0,430	19,5%

Validation des sucres du miel de Morondava. <sup>a</sup> : Intensité moyenne de l'ensemble des pics propres à chaque constituant ; <sup>b</sup> : écart moyen des intensités moyennes des pics.

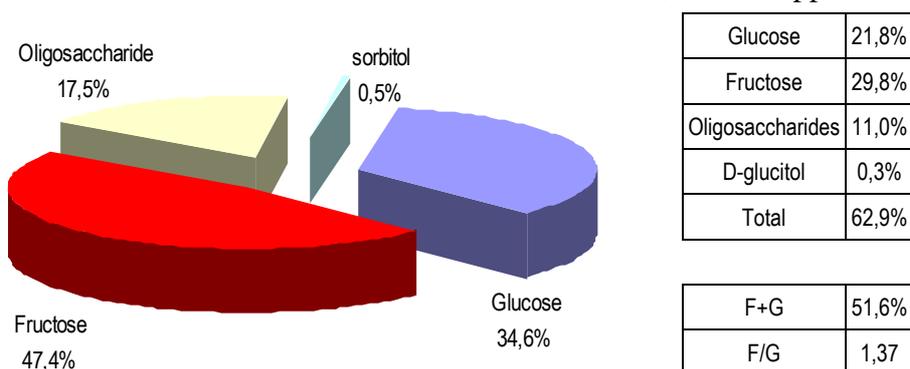
La validation (Tableau 55) suivie de la quantification nous donne les résultats des teneurs de chaque sucre dans le miel de Morondava ainsi que sa composition totale en sucre (Tableau 56). Ainsi, comme l'on s'y attend, le β-D-fructopyranose est le premier constituant majoritaire (21,0%) suivi par le β-D-glucopyranose (13,6%) et l'isomère-α de ce dernier (8,2%). Le β-D-fructofuranose et le α-D-fructofuranose fermant la série des constituants majoritaires ont respectivement 6,8% et 1,6%. Les trois premiers minoritaires avec 0,9% sont respectivement le β-isomaltulose, le trisaccharide β-isomaltotriose et un disaccharide, le β-maltose. Ces derniers sont suivis par une série de 3 constituants présents à une teneur de 0,8% dont le β-F-F-turanose, le trisaccharide erlose, et le disaccharide β-isomaltose précédant le β-entre et le trisaccharide mélézitose à 0,7%.

Tableau 56: Classement des sucres du miel de Morondava

N°	Constituants	% sucre <sup>a</sup>	N°	Constituants	% sucre <sup>a</sup>
1	$\beta$ -D-fructopyranose	21,0%	13	Mélézitose	0,7%
2	$\beta$ -D-glucopyranose	13,6%	14	$\beta$ -G-nigérose	0,6%
3	$\alpha$ -D-glucopyranose	8,2%	15	$\beta$ -F-F-maltulose	0,6%
4	$\beta$ -D-fructofuranose	6,8%	16	$\alpha$ -maltose	0,6%
5	$\alpha$ -D-fructofuranose	1,6%	17	$\alpha$ -isomaltose	0,6%
6	$\beta$ -F-P-maltulose	0,9%	18	$\alpha$ -F-F-maltulose	0,5%
7	$\beta$ -iso-maltotriose	0,9%	19	$\alpha$ -iso-maltotriose	0,5%
8	$\beta$ -maltose	0,9%	20	$\alpha$ -G-nigérose	0,4%
9	$\beta$ -F-F-turanose	0,8%	21	$\alpha$ -D-fructopyranose	0,4%
10	Erlose	0,8%	22	$\alpha$ -F-F-turanose	0,4%
11	$\beta$ -isomaltose	0,8%	23	D-glucitol	0,3%
12	$\beta$ -F-P-turanose	0,7%	24	raffinose	0,3%
Composition totale en sucre					62,9%

Classement des sucres du miel de Morondava. <sup>a</sup>: composition donnée par le pourcentage en masse.

Une série de quatre constituants à 0,6% dont le  $\beta$ -nigérose, le  $\beta$ -F-F-maltulose, le  $\alpha$ -maltose et le  $\alpha$ -isomaltose précède le  $\alpha$ -F-F-maltulose et le  $\alpha$ -iso-maltotriose présents à une teneur de 0,5% dans le miel. Presque à la limite de détection de l'appareil RMN se situent le  $\alpha$ -nigérose, le  $\alpha$ -fructopyranose et le  $\alpha$ -F-F-turanose avec une teneur de 0,4%. On observe une fois de plus le D-glucitol avec le trisaccharide raffinose à la limite *minimale* de 0,3% de l'appareil.

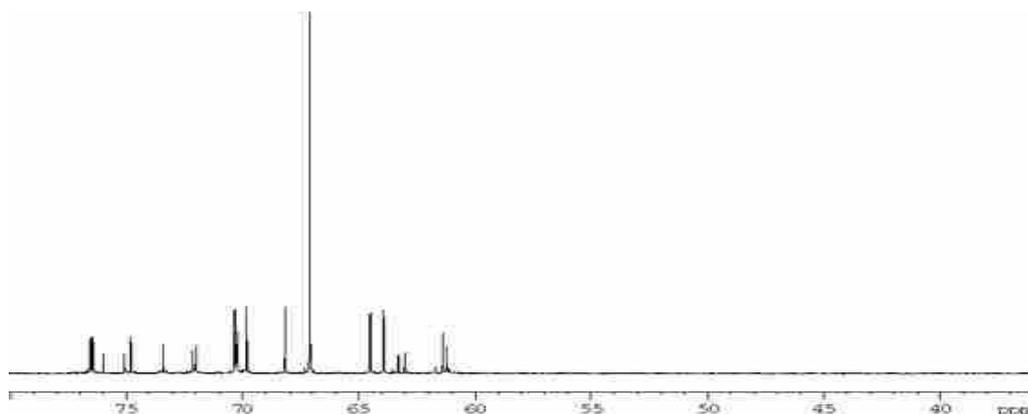


Graphique 7 : composition par classe de sucre par rapport aux sucres totaux du miel de Morondava

Nous voyons ainsi que l'ensemble des composés glucose forme 21,8% du miel soit 34,6% des sucres totaux (Graphique 7), les composés de la classe de fructose en forme les 29,8% (47,4% des sucres totaux). Leur somme F+G constitue 51,6% du miel et le rapport F/G vaut ici 1,37. Les oligosaccharides forment 11,0% de ce miel et tandis que le D-glucitol constitue les 0,3%. En conclusion, les sucres forment alors 62,9% en masse de l'échantillon de miel de Morondava, le reste étant constitué par de l'eau, par d'autres composés organiques et des composés minéraux.

### 3.2.1.5. Miel commercial « famille Michaud » de Corse

Ce miel est le premier de la série des miels de Corse et de France que nous avons étudié au cours de nos travaux en décembre 2005. Le profil 13C-RMN de ce miel est donné par le spectre 29 ci-dessous.

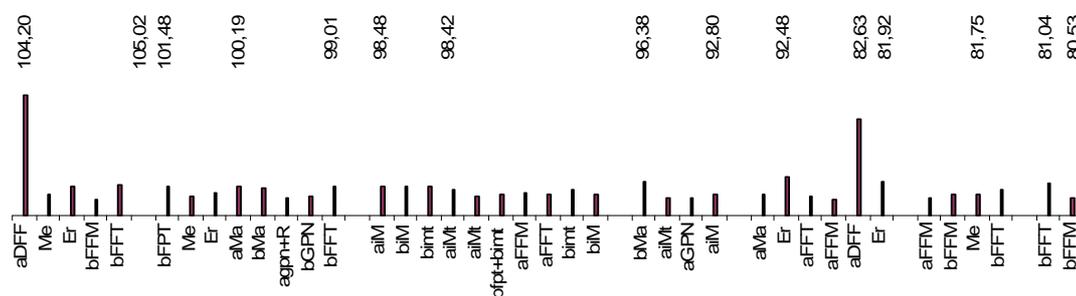


**Spectre 29** : Région du spectre <sup>13</sup>C-RMN entre 60-80 ppm du miel Michaud à 100 MHz (<sup>13</sup>C)  
On remarquera d'emblée chez les trisaccharides l'augmentation des proportions des pics identifiés par rapport à ceux des miels précédents. Ainsi, avec l'erlose, on assiste à 15 pics identifiés sur 18 avec seulement 7 superpositions ; avec le mélézitose et les isomères α- et β- isomaltotriose, ce nombre varie de 16 à 17 pics identifiés sur 18. (Tableau 57)

Tableau 57: **Criblage du spectre du miel 5 et possibles constituants**

N° sucres	Pics identifiés	SUP	N° sucres	Pics identifiés	SUP
1 α-D-glucopyranose	6/6	4	13 β-F-P-maltulose	11/12	5
2 β-D-glucopyranose	6/6	3	14 α-F-F-turanose	10/12	3
3 α-D-fructofuranose	6/6	2	15 β-F-P-turanose	12/12	4
4 α-D-fructopyranose	6/6	4	16 β-F-F-turanose	12/12	5
5 β-D-fructofuranose	6/6	3	17 α-G-nigérose	11/12	6
6 β-D-fructopyranose	6/6	4	18 β-G-nigérose	11/12	8
7 α-maltose	12/12	7	19 α-iso-maltotriose	17/18	10
8 β-maltose	12/12	6	20 β-iso-maltotriose	16/18	10
9 α-isomaltose	12/12	9	21 Mélézitose	16/18	9
10 β-isomaltose	12/12	7	22 Erlose	18/18	7
11 α-F-F-maltulose	10/12	7	23 D-glucitol	6/6	2
12 β-F-F-maltulose	12/12	8	24 raffinose	11/18	5

Chez les disaccharides aussi, le nombre de pic identifié est maximum pour les isomères α- et β- du maltose, ainsi que pour B-F-P-turanose, le B-F-F-turanose et le B-F-F-maltulose. La simulation graphique qui suit (Graphique 8) montre la plupart des pics des carbones anomériques et glycosidiques des constituants minoritaires présents dans l'échantillon.

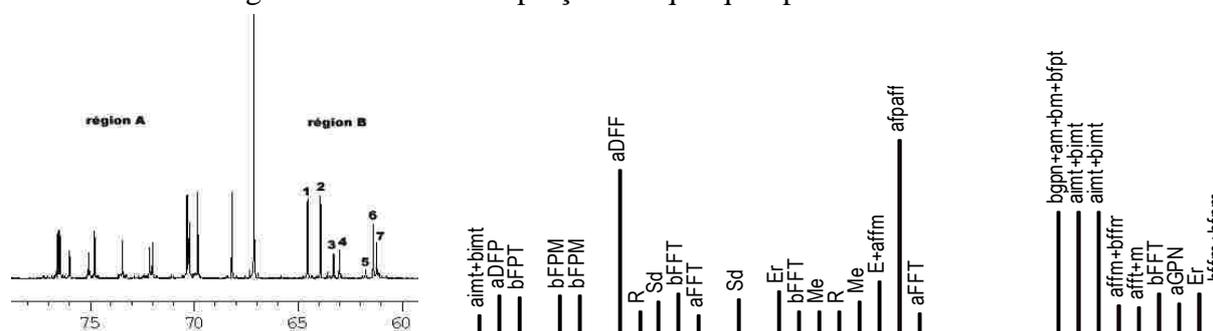


Graphique 8: **Minoritaires dans la région anomérique de 105-80 ppm du miel 5**

Les pics des constituants majoritaires sont omis pour augmenter le gain dynamique. Les déplacements chimiques δ sont en haut en ppm ; Les intensités des pics sont référées par rapport à celle de l'α-fructofuranose aDFF dont la moyenne vaut 1,29.

Par exemple, après le pic du carbone C1 de l'α-fructofuranose à 105,02 ppm on voit le pic du carbone C2' de mélézitose (Me) à 104,20 ppm, le pic C1'' à 100,76 ppm et en dehors de la région anomérique le pic C3' à 81,75 ppm. De la même façon, pour l'erlose (Er) le pic du

carbone C2'' est bien visible à 104,15 ppm, celui du carbone C1 et C1' ainsi que C5'' respectivement à 100,31 ppm, 92,48 et 81,92 ppm et ainsi de suite. Le spectre **30** et la simulation de la région B donnent des aperçus des quelques pics des minoritaires.



Spectre 30 : Région 80-60 ppm du spectre du miel 5

**A gauche** : région 80-60 ppm du spectre, la région est divisée en deux par le pic du dioxane-1,4 à 67,12 ppm. **A droite** : simulation de la région B du spectre. Dans cette simulation de graphique les pics 1, 2, 6 et 7 sont omis. Le pic 3 et 4 sont respectivement le pic carbone C1 à 63,57 ppm du carbone C6 à 61,70 ppm de l'α-D-fructofuranose (aDFF).

Tableau 58: Validation des sucres identifiés dans le miel5

N°	Sucres	Im	Em (%)	N°	saucers	Im	Em
1	α-D-glucopyranose	6,305	6,6%	13	β-F-P-maltulose	0,323	3,0%
2	β-D-glucopyranose	10,786	8,2%	14	α-F-F-turanose	0,178	8,3%
3	α-D-fructofuranose	1,290	30,2%	15	β-F-P-turanose	0,303	9,9%
4	α-D-fructopyranose	0,305	11,6%	16	β-F-F-turanose	0,293	9,8%
5	β-D-fructofuranose	5,332	9,5%	17	α-G-nigérose	0,200	8,7%
6	β-D-fructopyranose	18,594	4,7%	18	β-G-nigérose	0,220	6,4%
7	α-maltose	0,250	11,3%	19	α-iso-maltotriose	0,197	15,5%
8	β-maltose	0,385	5,5%	20	β-iso-maltotriose	0,328	16,8%
9	α-isomaltose	0,283	4,1%	21	Mélézitose	0,218	18,8%
10	β-isomaltose	0,370	7,6%	22	Erlose	0,300	20,8%
11	α-F-F-maltulose	0,170	8,3%	23	D-glucitol	0,295	10,5%
12	β-F-F-maltulose	0,160	0,0%	24	raffinose	0,203	2,5%

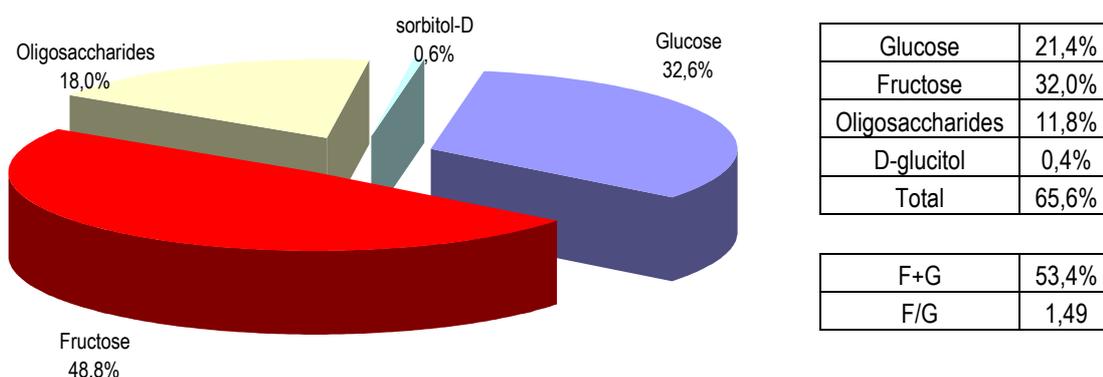
Les 24 composés identifiés, validés sont alors quantifiés (Tableau **58**) et le résultat est reporté dans le tableau **59** final ci-dessous. Les trois premiers constituants majoritaires sont respectivement le β-fructopyranose (23,3%), le β-D-glucopyranose (13,5%) et l'α-glucopyranose (7,9%).

Tableau 59: Classement des sucres du miel commercial Michaud de Corse

N°	constituants	% (en masse)	N°	constituants	% (en masse)
1	β-D-fructopyranose	23,3%	13	Raffinose	0,7%
2	β-D-glucopyranose	13,5%	14	β-F-F-turanose	0,7%
3	α-D-glucopyranose	7,9%	15	α-iso-maltotriose	0,7%
4	β-D-fructofuranose	6,7%	16	α-iso-maltose	0,7%
5	α-D-fructofuranose	1,6%	17	α-maltose	0,6%
6	β-iso-maltotriose	1,1%	18	β-G-nigérose	0,5%
8	β-maltose	0,9%	20	α-F-F-turanose	0,4%
9	β-iso-maltose	0,9%	21	α-F-F-maltulose	0,4%
10	β-F-P-maltulose	0,8%	22	α-D-fructopyranose	0,4%
11	Mélézitose	0,8%	23	β-F-F-maltulose	0,4%
12	β-F-P-turanose	0,7%	24	D-glucitol	0,4%

Ceux-ci sont suivis par le β-fructofuranose (6,7%) et l'α-fructofuranose (1,6%). On trouve le β-iso-maltotriose et l'erlose, présents à une teneur de 1,1%, suivis par le β-maltose et le β-iso-maltose, à 0,9%. Avec le β-entre, on retrouve un autre trisaccharide, le mélézitose avec 0,8 %, et la raffinose à 0,7%.

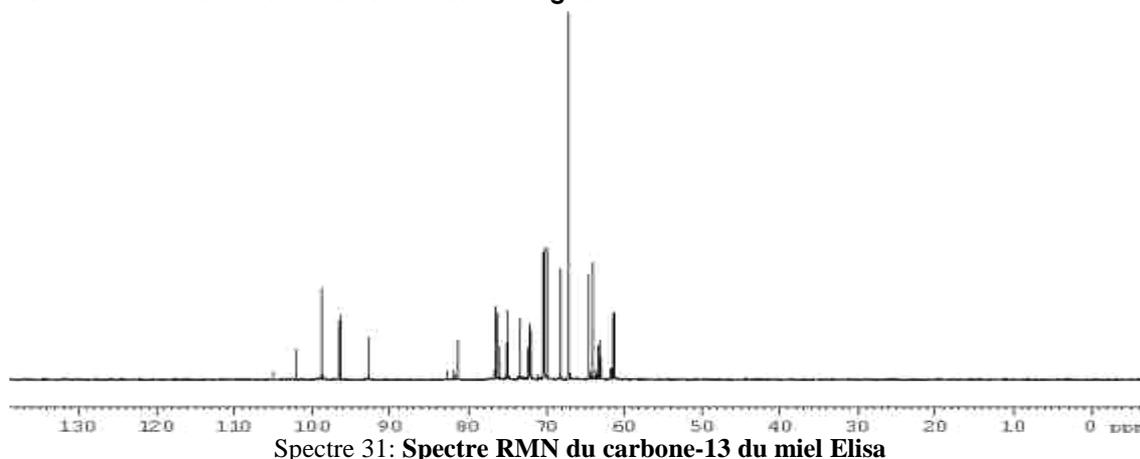
devançant une série de minoritaires à 0,7%. Ces derniers sont constitués par le  $\beta$ -entre, un quatrième trisaccharide, le raffinose, ensuite le  $\beta$ -entre, le  $\beta$ -F-F-maltulose, et le cinquième et dernier trisaccharide l' $\alpha$ -isomaltotriose précédant ainsi l' $\alpha$ -maltose (0,6%) et les isomères  $\beta$ - et l' $\alpha$ - du nigérose à 0,5%. Une série de composés à 0,4% termine ce classement des constituants avec l' $\alpha$ -F-F-turanose, l' $\alpha$ -F-F-maltulose, l' $\alpha$ -D-fructofuranose, le  $\beta$ -F-F-maltulose et enfin le D-glucitol qui ferme la liste.



Graphique 9 : Composition par classe de sucres par rapport aux sucres totaux du miel Michaud de Corse

L'étude montre donc que les sucres forment 65,6% de la composition chimique globale du miel dit « miel de la famille Michaud ». Les composés de glucose présentent 21,4% de la composition globale du miel contre 32,0% pour les composés du fructose formant ainsi respectivement 32,6% et 48,8% des sucres totaux quantifiés dans le miel (Graphique 9). Ils présentent à eux un total F+G valant 53,4% et le rapport F/G dans ce cas est égal à 1,49. Les oligosaccharides forment 11,8% de la composition totale du miel soit 18,0% des sucres totaux, ce qui représente le taux le plus élevé enregistré jusqu'à maintenant, le D-glucitol en forme le 0,4% c'est-à-dire 0,6% des sucres totaux.

**3.2.1.6. « Miel « Elisa » de Ferrals les Montagnes**



Le miel « Elisa » d'origine multiflorale est le premier du lot de cinq miels provenant de Ferrals Les Montagnes. Le criblage de la liste de spectre 31 représenté ci-dessus est alors résumé dans le tableau 60 qui suit.

Tableau 60: Criblage des sucres du miel Elisa

N°	Constituants	Pics*	SUP**	N°	Constituants	Pics*	SUP**
1	α-D-glucopyranose	6/6	5	13	β-F-P-maltulose	12/12	5
2	β-D-glucopyranose	6/6	2	14	α-F-F-turanose	10/12	4
3	α-D-fructofuranose	6/6	3	15	β-F-P-turanose	12/12	6
4	α-D-fructopyranose	6/6	4	16	β-F-F-turanose	12/12	6
5	β-D-fructofuranose	6/6	2	17	α-G-nigérose	10/12	8
6	β-D-fructopyranose	6/6	3	18	β-G-nigérose	11/12	5
7	α-maltose	9/12	7	19	α-isomaltotriose	17/18	16
8	β-maltose	11/12	5	20	β-isomaltotriose	17/18	16
9	α-isomaltose	11/12	10	21	Mélézitose	15/18	9
10	β-isomaltose	12/12	11	22	Erlöse	12/18	6
11	α-F-F-maltulose	9/12	7	23	D-glucitol	6/6	2
12	β-F-F-maltulose	10/12	7	24	Raffinose	9/18	4

Criblage des sucres de l'échantillon de miel Elisa : Pics\* : pics identifiés ; \*\* : SUP : nombre de superposition.

Les constituants des classes du glucose et de fructose ont été identifiés à 100% Le tableau **61** qui suit résume la validation des constituants.

Tableau 61: Validation des sucres du miel Elisa

N°	Sucres	Pics <sup>a</sup>	SUP <sup>b</sup>	Im <sup>c</sup>	Em% <sup>d</sup>	N°	Sucres	Pics	SUP	Im	Em %
1	α-D-glucopyranose	6/6	5	11,420	-	13	β-F-P-maltulose	12/12	5	0,329	24,9%
2	β-D-glucopyranose	6/6	2	19,013	6,1%	14	α-F-F-turanose	10/12	4	0,360	10,0%
3	α-D-fructofuranose	6/6	3	2,297	8,4%	15	β-F-P-turanose	12/12	6	0,488	14,2%
4	α-D-fructopyranose	6/6	4	0,680	6,2%	16	β-F-F-turanose	12/12	6	0,567	13,5%
5	β-D-fructofuranose	6/6	2	9,515	11,1%	17	α-G-nigérose	10/12	8	0,350	10,3%
6	β-D-fructopyranose	6/6	3	32,730	10,9%	18	β-G-nigérose	11/12	5	0,407	14,4%
7	α-maltose	9/12	7	0,000	-	19	α-isomaltotriose	17/18	16	0,000	-
8	β-maltose	11/12	5	0,322	-	20	β-isomaltotriose	17/18	16	0,000	-
9	α-isomaltose	11/12	10	0,270	-	21	Mélézitose	15/18	9	0,273	10,3%
10	β-isomaltose	12/12	11	0,550	-	22	Erlöse	12/18	6	0,260	9,9%
11	α-F-F-maltulose	9/12	7	0,000	0,0%	23	D-glucitol	6/6	2	0,440	3,2%
12	β-F-F-maltulose	10/12	7	0,270	10,5%	24	Raffinose	9/18	4	0,388	10,4%

Validation des sucres du miel Elisa. <sup>a</sup>: Pics identifiés par rapport aux pics attendus ; <sup>b</sup>: l nombre de superposition ; <sup>c</sup>: Im intensité moyenne de chaque constituant ; <sup>d</sup>: écart moyen des intensités moyennes en %

Après cette validation, il reste 20 composés dont le tableau **62** qui suit en résume le classement.

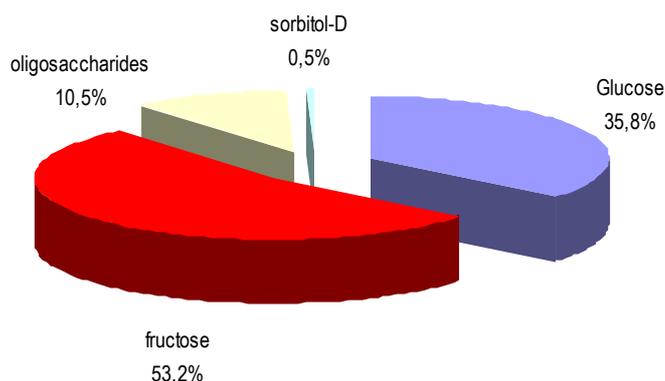
Tableau 62: Classement des sucres du miel de Elisa

N°	Sucres	% sucres	N°	Sucres	% sucres (masse)
1	β-D-fructopyranose	23,4%	11	Erlöse	0,5%
2	β-D-glucopyranose	13,6%	12	α-F-F-Turanose	0,5%
3	α-D-glucopyranose	8,2%	13	α-D-fructopyranose	0,5%
4	β-D-fructofuranose	6,8%	14	α-G-Nigérose	0,5%
5	α-D-fructofuranose	1,6%	15	α-F-P-maltulose	0,4%
6	β-F-F-Turanose	0,8%	16	α-maltose	0,4%
7	β-isomaltose	0,7%	17	α-isomaltose	0,4%
8	β-F-P-turanose	0,7%	18	α-F-F-maltulose	0,4%
9	β-G-nigérose	0,6%	19	D-glucitol	0,3%
10	Mélézitose	0,50%		Total	60,7%

Classement des sucres du miel « Elisa » d'après les intensités moyennes des pics. <sup>a</sup>: les pourcentages sont les pourcentages en masse par rapport donc aux masses des échantillons de miel analysé.

On observe donc toujours le β-D-fructose comme le premier constituant majoritaire (23,4%) de la masse totale en miel. Il est suivi selon le classement habituel vu auparavant par le β-D-

glucopyranose (13,6%) ; l'α-D-glucopyranose (8,2%) ; le β-D-fructopyranose (6,8%) et l'α-D-fructo-furanose présent à 1,6%. Vient après une série des sucres minoritaires avec le β-F-F-turanose (0,8%), le β-isomaltose et le B-F-P-turanose à 0,7% et le β-g-nigérose (0,6%). Cinq composés les suivent avec une teneur de 0,5% dont des trisaccharides le mélézitose, l'erlose, l'α-F-F-turanose, l'α-D-fructofuranose et l'α-g-nigérose. Cette série est suivie par une autre comportant quatre composés présents à une teneur de 0,4% et qui sont le β-entre, le β-maltose, l'α-isomaltose et le β-F-F-maltulose. Le D-glucitol ferme la série des sucres du miel « Elisa » à la limite de détection de 0,3% de l'appareil. Le graphique **10** résume les % par rapport aux sucres totaux après calculs à partir des ratios des classes de sucre par rapport au miel.



Glucose	21,7%
Fructose	32,3%
Oligosaccharides	6,4%
D-glucitol	0,3%
Composition totale en sucre	60,7%

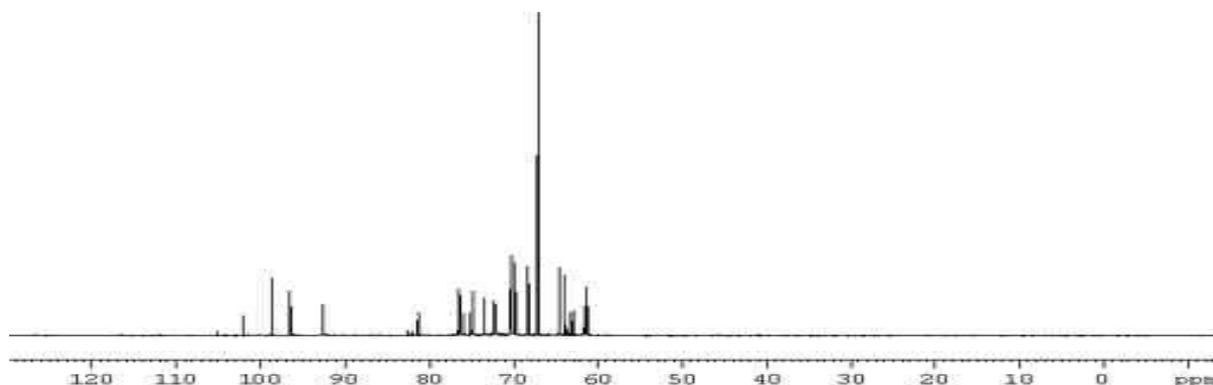
F+G	54,0%
F/G	1,49

Graphique **10** : Proportion en masse des classes de sucre par rapport au total des sucres quantifiés du miel « Elisa »

Ainsi, les composés du glucose forment 21,7% du miel ou 36,3% des sucres totaux quantifiés, ceux du fructose en forment les 32,3% soit 52,5% des sucres totaux, les oligosaccharides constituent 6,4% du miel ou encore 10,5% des sucres totaux, enfin le D-glucitol a été identifié ici à une teneur de 0,3% du miel soit 0,5% des sucres totaux. Les sucres forment ainsi 61,5% en masse du miel « Elisa » avec F+G constituant les 54,0% avec le rapport F/G égal à 1,49.

### 3.2.1.7. «Miel de bruyère » de Ferrals les Montagnes

Le miel de bruyère est répandu dans les pays européens. L'échantillon que nous avons reçu fait partie du lot qui nous a été envoyé de Ferrals Les Montagnes.



Spectre 32 : RMN du carbone-13 du miel de bruyère

Le criblage et le dépouillement de la liste des pics provenant du spectre **32** représenté ci-dessus fait état de 24 composés glucidiques menées par le D-glucose et le D-fructose. (Tableau 63)

Tableau 63: Criblage et analyse des intensités du miel de bruyère

N° Sucres	Pics <sup>a</sup>	SUP	Im <sup>b</sup>	Em (%) <sup>c</sup>	N° Sucres	Pics	SUP	Im	Em (%)
1 $\alpha$ -D-glucopyranose	6/6	5	9,150	-	13 $\beta$ -F-P-maltulose	9/12	4	0,293	16,6%
2 $\beta$ -D-glucopyranose	6/6	2	13,710	2,2%	14 $\alpha$ -F-F-turanose	9/12	6	-	-
3 $\alpha$ -D-fructofuranose	6/6	2	1,480	17,4%	15 $\beta$ -F-P-turanose	9/12	4	0,267	10,8%
4 $\alpha$ -D-fructopyranose	6/6	2	0,435	4,9%	16 $\beta$ -F-F-turanose	10/12	6	0,283	8,9%
5 $\beta$ -D-fructofuranose	6/6	2	6,530	6,0%	17 $\alpha$ -G-nigérose	8/12	8	-	-
6 $\beta$ -D-fructopyranose	6/6	3	22,040	8,9%	18 $\beta$ -G-nigérose	10/12	8	0,330	12,9%
7 $\alpha$ -maltose	9/12	7	0,220	25,7%	19 $\alpha$ -iso-maltotriose	15/18	14	-	-
8 $\beta$ -maltose	9/12	7	0,335	6,3%	20 $\beta$ -iso-maltotriose	15/18	14	-	-
9 $\alpha$ -isomaltose	10/12	7	0,245	2,9%	21 Mélézitose	15/18	12	-	-
10 $\beta$ -isomaltose	10/12	8	0,420	-	22 Erlose	13/18	7	0,297	3,9%
11 $\alpha$ -F-F-maltulose	9/12	8	0,000	0,0%	23 D-glucitol	6/6	5	-	-
12 $\beta$ -F-F-maltulose	9/12	8	0,176	5,1%	24 raffinose	11/18	8	-	-

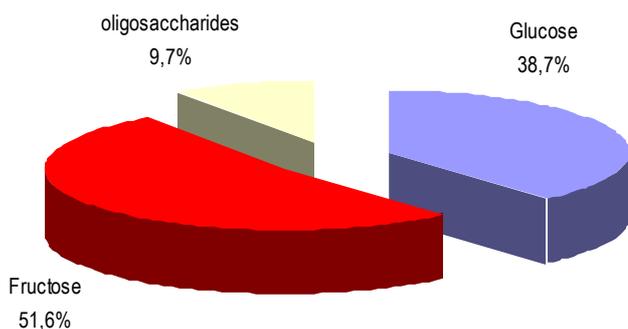
<sup>a</sup> : pics identifiés par constituants sur le nombre de pics attendus ; <sup>b</sup> : intensité moyenne de l'ensemble des pics appartenant en propre à chaque constituant ; <sup>c</sup> : Em : écart moyen des intensités des pics par rapport à l'intensité moyenne.

On obtient dans tableau **64** suivant après quantification, seize constituants dominés par le  $\beta$ -fructopyranose comme constituant majoritaire (27,1%), suivi par le couple  $\beta$ -D-glucopyranose et  $\alpha$ -D-glucopyranose avec respectivement 16,8 et 11,2%. Les deux anomères  $\beta$  et  $\alpha$  du fructofuranose terminent la série des composantes majoritaires avec respectivement 8,0 et 1,8%. L'erlose commence la série des oligosaccharides (1,0%), la même teneur que le  $\beta$ -isomaltose ; suivi par le  $\beta$ -maltose et le  $\beta$ -nigérose avec 0,8% qui précèdent le  $\beta$ -entre et le  $\beta$ -entre, détectés à une teneur de 0,7% contre 0,6% pour le  $\beta$ -entre et l' $\alpha$ -isomaltose.

Tableau 64 : Classement des sucres du miel de bruyère

N°	Sucres	% sucres	N°	Sucres	% sucres (en masse)
1	$\beta$ -D-fructopyranose	27,1%	9	$\beta$ -G-nigérose	0,8%
2	$\beta$ -D-glucopyranose	16,8%	10	$\beta$ -F-P-maltulose	0,7%
3	$\alpha$ -D-glucopyranose	11,2%	11	$\beta$ -F-F-turanose	0,7%
4	$\beta$ -D-fructofuranose	8,0%	12	$\beta$ -F-P-turanose	0,6%
5	$\alpha$ -D-fructofuranose	1,8%	13	$\alpha$ -isomaltose	0,6%
6	Erlose	1,0%	14	$\alpha$ -D-fructopyranose	0,5%
7	$\beta$ -isomaltose	1,0%	15	$\alpha$ -maltose	0,5%
8	$\beta$ -maltose	0,8%	16	$\beta$ -F-F-maltulose	0,4%
Composition totale en sucre					72,5%

Les deux derniers minoritaires précédant le  $\beta$ -F-F-maltulose présent à une teneur de 0,4% sont l' $\alpha$ -D-fructofuranose et l' $\alpha$ -maltose, quantifiés à 0,5%. Le graphique **11** qui suit résume la composition en masse des classes de sucres par rapport aux sucres totaux identifiés après calculs des proportions de ces classes de sucre par rapport à l'échantillon de miel.



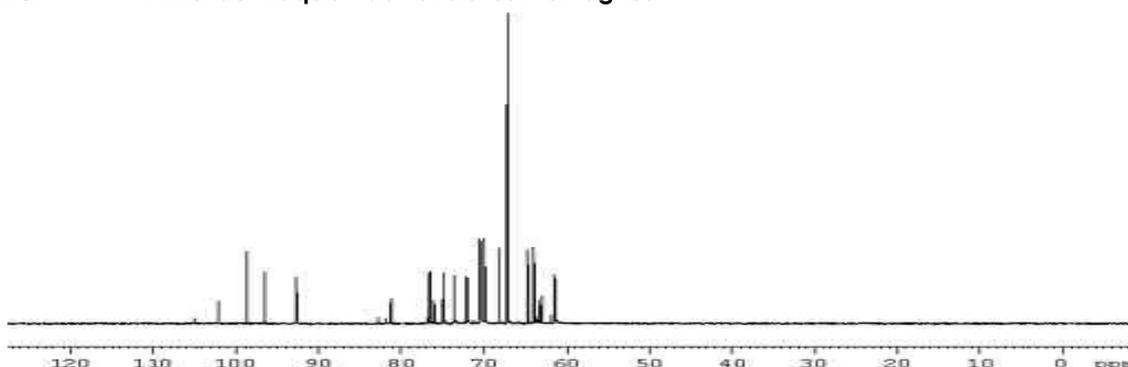
Glucose	28,1%
Fructose	37,4%
oligosaccharides	7,0%
total	72,5%

F+G	65,5%
F/G	1,33

**Graphique 11:** ratio des classes des sucres par rapport aux sucres totaux quantifiés du miel de bruyère

L'ensemble des sucres rend compte pour 72,5% de la masse du miel de bruyère ainsi analysée. Les composés du D-glucose forment les 28,1% (38,7% des sucres totaux), contre 37,4% des composés du D-fructose du miel (71,6% des sucres totaux). La somme de ces sucres majoritaires F+G constitue 65,5% du miel, tandis que leur rapport F/G vaut 1,33. Pour leur part, les oligosaccharides constituent 7,0% du miel ou 9,7% des sucres totaux.

**3.2.1.8. « Miel de maquis » de Ferrals les Montagnes**



Spectre 33 : Spectre RMN de carbone-13 du miel de maquis

Le profil <sup>13</sup>C-RMN du miel de maquis est donné par le spectre **33** et dont les résultats de criblage par les bases de données se résument dans le tableau **65** qui suit.

Tableau 65 : Criblage et étude des intensités des sucres du miel de maquis

N° Sucres	Pics <sup>a</sup>	SUP <sup>b</sup>	Im <sup>c</sup>	Em(%) <sup>d</sup>	N° sucres	Pics	SUP	Im	Em(%)
1 α-D-glucopyranose	6/6	4	14,647	1,3%	13 β-F-P-maltulose	11/12	5	0,348	17,0%
2 β-D-glucopyranose	6/6	3	16,990	4,6%	14 α-F-F-turanose	8/12	5	-	-
3 α-D-fructofuranose	6/6	2	1,695	0,4%	15 β-F-P-turanose	9/12	7	-	-
4 α-D-fructopyranose	6/6	3	0,370	0,0%	16 β-F-F-turanose	10/12	5	0,375	22,9%
5 β-D-fructofuranose	6/6	3	7,593	6,7%	17 α-G-nigérose	9/12	8	-	-
6 β-D-fructopyranose	6/6	2	25,795	7,5%	18 β-G-nigérose	11/12	9	0,275	12,9%
7 α-maltose	11/12	9	-	-	19 α-isomaltotriose	15/18	15	-	-
8 β-maltose	12/12	6	0,283	7,3%	20 β-isomaltotriose	15/18	12	0,290	-
9 α-isomaltose	11/12	10	0,270	0,0%	21 Mélézitose	16/18	10	0,302	12,0%
10 β-isomaltose	11/12	9	0,390	-	22 Erlose	13/18	10	0,277	2,1%
11 α-F-F-maltulose	9/12	8	0,230	-	23 D-glucitol	5/6	3	-	-
12 β-F-F-maltulose	10/12	8	0,280	15,2%	24 raffinose	10/18	5	0,270	6,8%

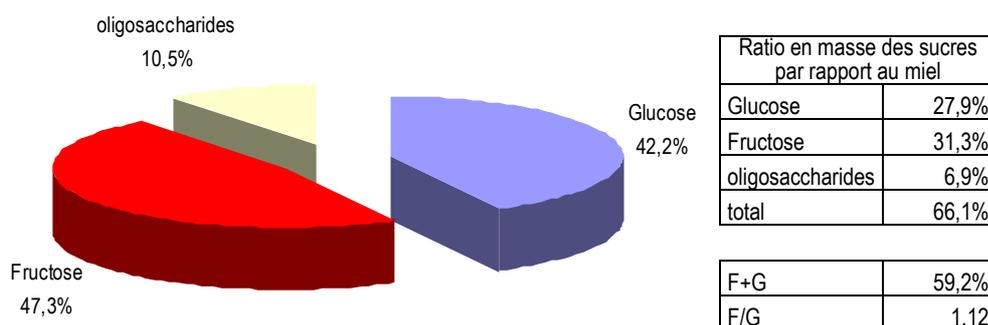
Criblage et étude des intensités des composés glucidiques de l'échantillon de miel de maquis. <sup>a</sup> : Pics identifiés par rapport aux pics attendus ; <sup>b</sup> : nombre de superposition par composé ; <sup>c</sup> : Intensité moyenne Im des pics non superposés de chaque composé ; <sup>d</sup> : écart moyen des intensités individuelles des pics par rapport à l'intensité moyenne pour un composé.

Il reste 18 constituants après validation qui conduit au classement donné dans le tableau 66.

Tableau 66: Classement des sucres du miel de maquis

N°	Sucres	% sucres	N°	Sucres	% sucres
1	β-D-fructopyranose	22,8%	10	β-isomaltose	0,7%
2	β-D-glucopyranose	15,0%	11	β-F-F-turanose	0,6%
3	α-D-glucopyranose	12,9%	12	β-F-P-maltulose	0,6%
4	β-D-fructofuranose	6,7%	13	β-maltose	0,5%
5	α-D-fructofuranose	1,5%	14	β-F-F-maltulose	0,5%
6	Mélézitose	0,7%	15	β-G-nigérose	0,5%
7	β-isomaltotriose	0,7%	16	α-isomaltose	0,5%
8	Erllose	0,7%	17	α-F-F-maltulose	0,4%
9	Raffinose	0,7%	18	α-D-fructopyranose	0,3%
Composition totale en sucre du miel					66,10%

Les cinq composés majoritaires sont le β-D-fructopyranose (22,8%) ; suivi par le β-glucopyranose (15,0%) ; l'α-D-fructopyranose **3**, 12,9% ; le β-D-Fructofuranose (6,7%) ; et l'α-D-fructofuranose (1,5%). Vient après, une série de quatre trisaccharides à 0,7% dont le mélézitose, le β-isomaltotriose, l'erlose et le raffinose, le disaccharide β-isomaltose qui précède ainsi le β-F-F-turanose et le β-entre détectés à une teneur de 0,6%. On a une autre série de quatre disaccharides à 0,5% comprenant le β-maltose, le β-F-F-maltulose, le β-G-nigérose, et l'α-isomaltose. On observe le α-F-F-maltulose, 0,4% et l'α-D-fructofuranose à 0,3%.



Graphique 12: Ratio en masse des sucres du miel de maquis par rapport aux sucres totaux

Ainsi, les composés du glucose forment 27,9% du miel de maquis contre 31,3% pour ceux du fructose ; les oligosaccharides en constituent les 6,9%. Les sucres rendent compte alors pour 66,1% de la masse du miel de maquis. L'ensemble de glucose et du fructose s'élève à 59,2% du miel, tandis que le rapport F/G 1,12. Par rapport aux sucres totaux, les oligosaccharides constituent les 10,5%, tandis que les composés du glucose et du fructose forment respectivement 42,2 et 47,3%. (Graphique 12)

### 3.2.2. Répartitions tautomériques des sucres et études comparatives des miels

Les résultats précédents vont permettre de déterminer les teneurs des tautomères des sucres. Le cas échéant où les isomères ne sont pas identifiables à cause de leur faible concentration, on peut calculer leur teneur en introduisant des termes correctifs. Les travaux de Mazzoni<sup>166</sup> sur les miels qui sont basés sur ces observations se sont révélés tout à fait raisonnables en pratique. (Voir tableau 67 suivant)

Tableau 67: Répartition tautomérique du D-glucose et du D-fructose mélange artificiel<sup>a</sup> par <sup>13</sup>C-RMN

mélange artificiel <sup>a</sup>	tous les carbones <sup>b</sup>			carbones anomériques <sup>c</sup>		
	Intervalle	Moyenne % <sup>d</sup>	Réf. <sup>e</sup>	Intervalle	Moyenne % <sup>d</sup>	Réf. <sup>e</sup>
α-D-glucopyranose	[37,3-38,5]	38,0%	37,5%	[35,2-37,6]	36,6%	37,0%
β-D-glucopyranose	[61,5-62,7]	62,8%	62,5%	[62,2-64,8]	63,4%	63,0%
α-D-fructofuranose	[5,7-6,2]	5,8%	5,2%	[4,8-5,5]	5,2%	4,8%
β-D-fructofuranose	[22,8-24,0]	23,1%	22,7%	[21,1-22,4]	21,7%	23,0%
α-D-fructopyranose	[1,9-2,5]	2,2%	1,9%	[1,9-2,2]	2,0%	2,4%
β-D-fructopyranose	[67,7-69,6]	68,8%	70,2%	[70,6-72,0]	71,0%	69,8%

<sup>a</sup>: Mélange artificiel de glucose : fructose 59,5/40,5 à la température ambiante ; <sup>b</sup> : mesures utilisant la moyenne des intensités des pics de chaque isomère ; <sup>c</sup> : mesures utilisant uniquement l'intensité des pics des carbones anomériques ; <sup>d</sup> : moyenne des valeurs des quatre mesures successives ; <sup>e</sup> : proportions relatives entre les formes tautomériques de chaque composé seul en solution par RMN du carbone-13.

On peut quantifier pour les isomères du D-glucose les formes pyraniques des anomères α et β contre les deux formes furanne et pyrane pour le D-fructose. Les formes ouvertes ne le sont pas conformément aux données de la littérature (Fig. 10) et aux travaux de Mazzoni.<sup>166</sup>

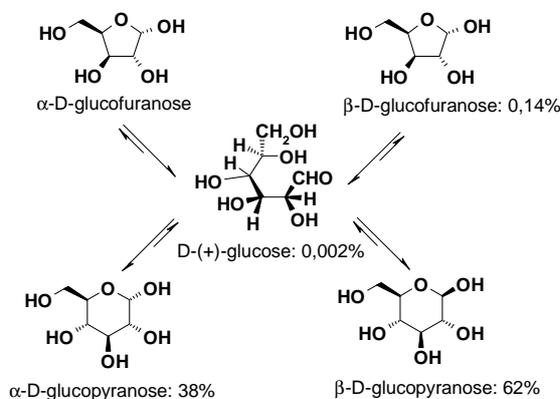


Figure 11 : Equilibre mutarotationnel du glucose en solution dans le D<sub>2</sub>O à 31°C d'après Angyal<sup>195</sup>

On va donc utiliser les résultats obtenus ci-dessus pour effectuer une simple étude des répartitions tautomériques expérimentales à l'équilibre des différents sucres dans les miels.

### 3.2.2.1. Répartition des formes tautomériques à l'équilibre

Sauf pour le miel de bruyère 7 et le miel de maquis 8, les mesures ont été effectuées après que l'équilibre mutarotationnel soit établi à la température ambiante de 21°C (Tableau 68).

Tableau 68: Ratios des formes tautomériques à l'équilibre du glucose et du fructose de miel

Formes tautomères	Miels								Réfs.	
	miel1	miel2	miel3	miel4	miel5	miel6	miel7 <sup>a</sup>	miel8 <sup>a</sup>	Mazzoni	Horton
α-D-glucopyranose	37,0%	37,7%	37,6%	37,6%	36,9%	37,5%	40,0%	46,3%	37,5%	34,0%
β-D-glucopyranose	63,0%	62,3%	62,4%	62,4%	63,1%	62,5%	60,0%	53,7%	62,5%	66,0%
α-D-fructofuranose	5,9%	5,7%	5,6%	5,4%	5,1%	5,1%	4,9%	4,8%	5,2%	5,0%
β-D-fructofuranose	22,6%	21,8%	21,7%	22,8%	20,9%	21,0%	21,4%	21,4%	22,7%	23,0%
α-D-fructopyranose	3,2%	1,1%	1,4%	1,2%	1,2%	1,5%	1,4%	1,0%	1,9%	2,4%
β-D-fructopyranose	68,3%	71,4%	71,3%	70,5%	72,9%	72,4%	72,3%	72,8%	70,2%	70,0%

<sup>a</sup> : les mesures RMN ont été prises après dissolution des échantillons dans le tube. Pour le D-glucose : 4h environ

On observe ainsi des valeurs correctes pour les pourcentages de chaque forme isomère identifiée et quantifiée. Pour l'α-D-glucose, ce pourcentage varie entre 36,9% et 37,7%, tandis qu'il varie entre 62,3% à 63,1% pour le β-D-glucose avec un écart moyen valant 0,3% ce qui est très bon.

Pour les composés majoritaires du D-fructose, il varie de 68,3% à 72,9% pour le  $\beta$ -D-fructopyranose contre 20,9% à 22,8% pour le  $\beta$ -D-fructofuranose pour des écarts moyens relativement plus élevés que ceux des composés du D-glucose et valant respectivement 1,2% et 0,6%. Pour les composés minoritaires, ce pourcentage varie de 5,1% à 5,9% ; pour l' $\alpha$ -D-fructofuranose et enfin pour le  $\alpha$ -fructopyranose, il varie de 1,1% à 3,2% (miel 1) avec un écart moyen respectivement égal à 0,3 et 0,5% . Pour les oligosaccharides, la teneur des isomères minoritaires (l'anomère  $\alpha$  en majorité) non identifiés ne sont pas évidemment disponibles. Nous avons eu alors recours aux ratios obtenus à partir des résultats expérimentaux provenant des travaux de Mazzoni pour compléter les données. (Tableau 69)

Tableau 69: Répartition expérimentale et calculée des formes tautomériques des oligosaccharides

sucres	miel1	miel2	miel3	miel4	miel5	miel6	miel7	miel8	Réf. <sup>a</sup>
$\alpha$ -Maltose	39,4%	<i>39,4%*</i>	39,0%	39,2%	39,4%	<i>39,4%*</i>	39,6%	<i>39,4%*</i>	<i>39,7%</i>
$\beta$ -maltose	60,6%	<i>60,6%*</i>	61,0%	60,8%	60,6%	<i>60,6%*</i>	60,4%	<i>60,6%*</i>	<i>60,3%</i>
$\alpha$ -isomaltose	-	<i>41,8%*</i>	<i>41,8%*</i>	41,5%	43,4%	32,9%	36,8%	40,9%	<i>42,1%</i>
$\beta$ -isomaltose	-	<i>58,2%*</i>	<i>58,2%*</i>	58,5%	56,6%	67,1%	63,2%	59,1%	<i>57,9%</i>
$\alpha$ -F-F-maltulose	<i>8,2%*</i>	<i>8,2%*</i>	<i>8,2%*</i>	26,4%	26,1%	<i>8,3%*</i>	<i>8,6%*</i>	26,8%	<i>8,9%</i>
$\beta$ -F-F-maltulose	<i>29,1%*</i>	<i>29,1%*</i>	<i>29,1%*</i>	29,0%	24,5%	<i>45,9%*</i>	<i>34,4%*</i>	32,7%	<i>26,7%</i>
$\beta$ -F-P-maltulose	<i>62,7%*</i>	<i>62,7%*</i>	<i>62,7%*</i>	44,6%	49,4%	<i>45,9%*</i>	<i>57,1%*</i>	40,5%	<i>64,4%</i>
$\alpha$ -F-F-Turanose	<i>17,7%*</i>	29,5%	22,9%	22,9%	23,0%	34,3%	<i>17,7%*</i>	<i>17,7%</i>	<i>17,0%</i>
$\beta$ -F-P-turanose	<i>38,9%*</i>	24,1%	38,6%	38,6%	39,1%	31,4%	<i>39,9%*</i>	<i>38,9%</i>	<i>40,9%</i>
$\beta$ -F-F-Turanose	<i>43,4%*</i>	46,4%	38,6%	38,6%	37,8%	34,3%	<i>42,4%*</i>	<i>43,4%*</i>	<i>42,1%</i>
$\alpha$ -G-Nigérose	-	<i>39,1%*</i>	-	-	47,6%	46,3%	-	<i>39,1%*</i>	<i>38,6%</i>
$\beta$ -G-nigérose	-	<i>60,9%*</i>	-	-	52,4%	53,7%	-	<i>60,9%*</i>	<i>61,4%</i>
$\alpha$ -iso-maltotriose	-	-	-	-	37,5%	-	-	<i>36,4%*</i>	<i>36,4%</i>
$\beta$ -iso-maltotriose	-	-	-	-	62,5%	-	-	<i>63,6%*</i>	<i>63,6%</i>

Répartition expérimentale et calculée des formes tautomériques des oligosaccharides.; \*les pourcentages en italique marqués avec l'astérisque \* sont calculés à partir des teneurs des isomères qui ont été identifiés et en utilisant les proportions relatives des tautomères issues des travaux de Mazzoni. <sup>a</sup> : valeurs de référence provenant des travaux de Mazzoni.

Les proportions relatives sont excellentes pour les composés du maltose qui présentent un écart moyen de 0,1% par rapport aux valeurs moyennes valant respectivement 39,3% et 60,3% pour les anomères  $\alpha$  et  $\beta$ -. Des écarts subsistent pour les autres probablement à cause des temps d'inversion mutarotationnel relativement plus long des ces derniers constituants par rapport aux autres. En conclusion, le calcul de ces proportions tautomériques expérimentales permettent une bonne autocontrôle de notre méthode de quantification et apportent la preuve que la méthode est bonne et fiable. D'autre part, l'application des ratios de référence permet de déterminer les teneurs des isomères non détectés par nos analyses et compléter ainsi nos résultats expérimentaux. Ce sera alors l'objet du paragraphe qui va suivre.

### 3.2.2.2. Etude comparative des teneurs en sucres des échantillons de miel

Dans ce paragraphe, nous allons compléter les données sur les compositions en sucre de chaque miel en faisant intervenir des corrections portant sur les teneurs des tautomères non identifiés.

**3.2.2.2.1.** Teneur expérimentale et teneur calculée des composés isomères des sucres

A partir des résultats du tableau **69** précédent, on calcule pour chaque isomère la teneur des composés minoritaires non identifiés à partir des teneurs connues et la relation tautomérique à l'équilibre comme on l'a mentionné précédemment (Tableau **70**).

Tableau 70: Isomères et composition des différents échantillons de miel

Isomères glucidiques	miel1	miel2	miel3	miel4	miel5	miel6	miel7	miel8
$\alpha$ -D-glucopyranose	11,9%	7,4%	6,8%	8,2%	7,9%	8,2%	11,2%	12,9%
$\beta$ -D-glucopyranose	20,3%	12,2%	12,0%	13,6%	13,5%	13,6%	16,8%	15,0%
$\alpha$ -D-fructofuranose	1,9%	2,9%	2,4%	1,6%	1,6%	1,6%	1,8%	1,5%
$\beta$ -D-fructofuranose	0,8%	0,6%	0,6%	0,4%	0,4%	0,5%	0,5%	0,3%
$\alpha$ -D-fructopyranose	7,2%	11,2%	9,3%	6,8%	6,7%	6,8%	8,0%	6,7%
$\beta$ -D-fructopyranose	22,0%	36,6%	30,7%	21,0%	23,3%	23,4%	27,1%	22,8%
$\alpha$ -Maltose	0,8%*	0,3%*	0,5%	0,6%	0,6%	0,3%*	0,5%	0,3%*
$\beta$ -maltose	1,2%	0,5%	0,8%	0,9%	0,9%	0,4%	0,8%	0,5%
$\alpha$ -isomaltose	-	0,4%*	0,5%*	0,6%	0,7%	0,4%	0,6%	0,5%
$\beta$ -isomaltose	-	0,6%	0,7%	0,8%	0,9%	0,7%	1,0%	0,7%
$\alpha$ -F-F-maltulose	0,1%*	0,2%*	0,1%*	0,5%	0,4%	0,1%*	0,1%*	0,4%
$\beta$ -F-F-maltulose	0,5%*	0,6%	0,3%*	0,6%	0,4%	0,4%	0,4%	0,5%
$\beta$ -F-P-maltulose	1,1%	1,2%	0,7%	0,9%	0,8%	0,4%	0,7%	0,6%
$\alpha$ -F-F-Turanose	0,4%*	0,6%	0,4%	0,4%	0,4%	0,6%	0,3%*	0,3%*
$\beta$ -F-P-turanose	1,0%	0,5%	0,7%	0,7%	0,7%	0,6%	0,6%	0,6%*
$\beta$ -F-F-Turanose	1,0%	0,9%	0,7%	0,8%	0,7%	0,6%	0,7%	0,6%
$\alpha$ -G-Nigérose	-	0,6%*	-	0,4%	0,5%	0,5%	-	0,3%*
$\beta$ -G-nigérose	-	1,0%	-	0,6%	0,5%	0,6%	-	0,5%
$\alpha$ -iso-maltotriose	-	-	-	0,5%	0,7%	-	-	0,4%*
$\beta$ -iso-maltotriose	-	-	-	0,9%	1,1%	-	-	0,7%
Mélézitose	-	0,7%	0,6%	0,7%	0,8%	0,5%	-	0,7%
Erlose	-	0,8%	0,6%	0,8%	1,1%	0,5%	1,0%	0,7%
D-glucitol	0,7%	0,4%	0,3%	0,3%	0,4%	0,3%	-	-
Raffinose	-	0,8%	0,6%	0,3%	0,7%	-	-	0,7%
$\alpha$ -gentibiose	-	0,5%	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -mélibiose	-	0,9%	-	-	-	-	-	-

Composition glucidique des différents échantillons de miel. Miel 1 : miel d'eucalyptus de Madagascar ; miel2 : miel des forêts de Madagascar ; miel3 : miel de letchis de Madagascar ; miel4 : miel 5 : miel commercial Michaud de Corse ; miel6 : miel Elisa Ferrals les Montagnes, France ; miel7 : miel de bruyère, Ferrals les Montagnes, France ; miel8 : miel de maquis, Ferrals les Montagnes, France. Les valeurs avec astérisque \* proviennent des calculs à partir des proportions relatives des équilibres tautomériques

A part les isomères des composés du D-glucose et du D-fructose, on observe des disaccharides tels que le  $\beta$ -maltose, le  $\beta$ -F-F-turanose ainsi que  $\beta$ -F-P-maltulose qui sont présents à des teneurs variables dans tous les échantillons. Par contre, les disaccharides  $\alpha$ -gentibiose et le  $\beta$ -mélibiose ne sont présents que dans le miel de forêt de Madagascar. Pour une interprétation globale, on va grouper les constituants par classe de composés. Les résultats résumés dans le

tableau **71** ci-dessous donnent en définitif la composition globale en sucre des différents échantillons de miel étudiés.

Tableau 71: **composition par classe de composé glucidique des différents échantillons de miel**

N°	Composés	miel1	miel2	miel3	Miel4	miel5	miel6	miel7	miel8
1	D-Glucose*	32,1%	19,7%	18,9%	21,8%	21,4%	21,7%	28,1%	27,9%
2	D-fructose*	31,9%	51,3%	43,1%	29,8%	32,0%	32,3%	37,4%	31,3%
3	Maltose	2,0%	0,8%	1,4%	1,4%	1,5%	0,7%	1,3%	0,8%
4	Isomaltose	-	1,0%	1,1%	1,3%	1,6%	1,1%	1,6%	1,1%
5	Maltulose	1,8%	1,9%	1,1%	2,1%	1,6%	0,9%	1,2%	1,4%
6	Turanose	2,4%	2,0%	1,8%	1,9%	1,8%	1,8%	1,6%	1,4%
7	Nigérose	-	1,6%	-	1,0%	1,0%	1,0%	-	0,8%
8	Isomaltotriose	-	-	-	1,4%	1,8%	-	-	1,1%
9	Mélézitose	-	0,7%	0,6%	0,7%	0,8%	0,5%	-	0,7%
10	Erlose	-	0,8%	0,6%	0,8%	1,1%	0,5%	1,0%	0,7%
11	D-glucitol**	0,7%	0,4%	0,3%	0,3%	0,4%	0,3%	-	0
12	Raffinose	-	0,8%	0,6%	0,3%	0,7%	-	-	0,7%
13	Gentibiose	-	0,5%	-	-	-	-	-	-
14	Mélibiose	-	0,9%	-	-	-	-	-	-
	Composition sucres totaux	70,9%	82,4%	69,5%	62,9%	65,7 %	60,8 %	72,2 %	67,9 %

\* : monosaccharides ; \*\* : polyol ; le reste étant des oligosaccharides. Miel 1 : miel d'eucalyptus de Madagascar ; miel2 : miel des forêts de Madagascar ; miel3 : miel de letchis de Madagascar ; miel4 : miel de Morondava ; miel 5 : miel commercial Michaud de Corse ; miel6 : miel Elisa Ferrals les Montagnes, France ; miel7 : miel de bruyère, Ferrals les Montagnes, France ; miel8 : miel de maquis, Ferrals les Montagnes, France.

Ces résultats définitifs vont permettre alors de faire une étude comparative simple de ces miels à partir des paramètres fournis par les différentes compositions dans le dernier paragraphe.

### 3.2.2.3. Etude comparative des paramètres et propriétés physico-chimiques des échantillons de miel

On voit d'après les résultats obtenus que le miel de forêt de Madagascar (miel2) contient le pourcentage le plus élevé en sucres parmi le lot d'échantillons étudiés avec 82,4%. Il est suivi par une série de miel monofloral : le miel de bruyère de France (miel7 ; 72,2%,) puis le miel d'eucalyptus (miel1 ; 70,9%) et le miel de letchis de Madagascar (miel3 ; 69,5%). Vient ensuite la série contenant des miels multif floraux tel que le miel de maquis (miel8 ; 67,9%); le miel « Michaud » (miel5 ; 65,7%), le miel de Morondava (miel4) ainsi que le miel « Elisa » (miel6) avec respectivement 62,9% et 60,8%. Dans ses études portant sur des échantillons de miel de Corse avec la RMN du carbone-13, Mazzoni<sup>166</sup> a trouvé des pourcentages variant de 60,4 à 71,4% dont le miel de maquis avec 69,3% mais où manquent le mélézitose, l'erlose ainsi que le nigérose mais où l'isomaltotriose a été identifié à une teneur de 2,5%. Le D-glucitol a été aussi absent de tous ses échantillons.

#### 3.2.2.3.1. Diversité chimique des sucres dans les échantillons de miel

Les échantillons de miel analysés renferment 6 à 13 constituants différents dont un alditol, le D-glucitol. Outre le D-glucose et le D-fructose, on a observé des disaccharides tels que le maltose, l'isomaltose, le nigérose, le raffinose ainsi que des trisaccharides. La

combinaison de leurs teneurs est à la base des paramètres d'études pour le classement les échantillons de miel selon leur origine botanique et géographique.

### 3.2.2.3.2. Paramètres oligosaccharides observés et quantifiés

Pour l'ensemble des miels étudiés, le nombre des oligosaccharides identifiés et/ou quantifiés s'élève à onze. Le miel de forêt de Madagascar est le plus riche avec 13 constituants dont 10 oligosaccharides (avec l'isomaltotriose en moins) et qui rendent compte alors pour 82,4% en masse de ce miel. Ceci est en accord avec l'expérience où les miels de forêts sont généralement très riches en sucres. On note en outre un taux remarquablement élevé du fructose qui forme 51,3% du miel contre 19,7% en glucose. Par contre, le miel d'eucalyptus (monofloral) ne renferme que 6 constituants identifiés qui, outre le D-glucose et le D-fructose, comprennent le maltose, le maltulose, le turanose et le D-glucitol mais dont la composition en sucres totaux est relativement élevée avec 70,8%. Les études par CPG-MS des dérivés silylés des sucres sur 12 échantillons de miel d'eucalyptus marocains par Terrab *et coll.* ont montré la présence de 4 constituants de plus dont le sucrose dans un intervalle de 0 à 0,16%; le gentibiose entre 0 et 0,04%, l'erlose entre 0-0,13%, le raffinose compris entre 0 et 0,16%, tous hors de la limite de détection RMN ainsi que le kojibiose entre 0,02 et 0,97%.<sup>196</sup> Cette étude a permis également de détecter dans d'autres miels le tréhalose à des teneurs comprises entre 0-0,1%.

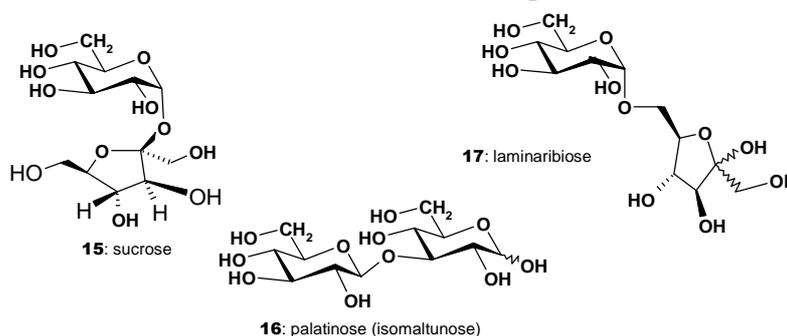


Figure 12: Quelques oligosaccharides rapportés dans des échantillons de miel de Maroc et de France

Ces constituants n'ont pas été détectés dans les échantillons de la présente étude. 15 : sucrose ou saccharose détecté dans les miels du Maroc (Terrab *et coll.*) et de France (Réf. Cotte) ; 16 palatinose ou isomaltulose détecté dans les échantillons des miels de France étudiés par Cotte *et coll.* ; 17 : laminaribiose détecté dans les échantillons des miels de France étudiés par Cotte *et coll.*

Pour le miel3 (miel de letchis), on n'a identifié que sept constituants dont le D-glucitol et quatre oligosaccharides. Le miel de Morondava (4) et le miel Michaud (5) possèdent une composition qualitative en sucre tout à fait identique avec tous les neuf oligosaccharides et le D-glucitol présents (sauf le gentibiose et le mélibiose qui n'ont été détectés que dans le miel de forêt 2). Même dans leurs compositions quantitatives, on n'observe entre les deux miels que des différences relativement faibles, les écarts plus significatifs concernent le D-fructose, l'isomaltose, le maltulose, l'isomaltotriose et le raffinose. Le miel de maquis, miel8, possède onze constituants avec la présence des neuf oligosaccharides, il lui manque le D-glucitol. Le miel6 Elisa (6) a été caractérisé avec dix constituants avec le raffinose et l'isomaltotriose absents, ramenant ainsi le nombre d'oligosaccharides quantifiés à huit. Quant au miel de bruyère (7), en tout, sept constituants ont été identifiés et quantifiés dont un seul trisaccharide, l'erlose avec le trio disaccharide maltose, maltulose et turanose, mais il lui manque aussi le D-

glucitol. A titre de comparaison, Cotte *et coll.* ont déterminé par CPG-FID des dérivés silylés, sept autres sucres minoritaires à des teneurs moyennes variées dans 280 échantillons de miel dont des oligosaccharides tels que le palatinose entre 0,1-0,5%, le laminaribiose entre 0,1-1,3%, le maltotriose entre 0,1-0,8%, le panose entre 0,1-0,4% ainsi que des cétooses dont le 1-cétoose entre 0,1-0,3% et le néo-cétoose entre 0,0-0,5%.<sup>197</sup> (Voir Fig. 12)

Tableau 72: total oligosaccharides dans les échantillons de miel

sucres	miel1	miel2	miel3	miel4	miel5	miel6	miel7	miel8
total oligosaccharides	6,1%	11,0%	7,3%	11,0%	11,8%	6,7%	6,6%	8,8%

Ainsi, dans les limites de détection RMN, notre méthode a permis de détecter et de quantifier une diversité relativement large de constituant glucidique dans des différents miels d'origine botanique et géographique différente dans laquelle les oligosaccharides occupent un pourcentage moyen relativement élevé de 8,7% pour une plage de valeur comprise entre 6,1-11,8% des échantillons de miel. (Tableau 72)

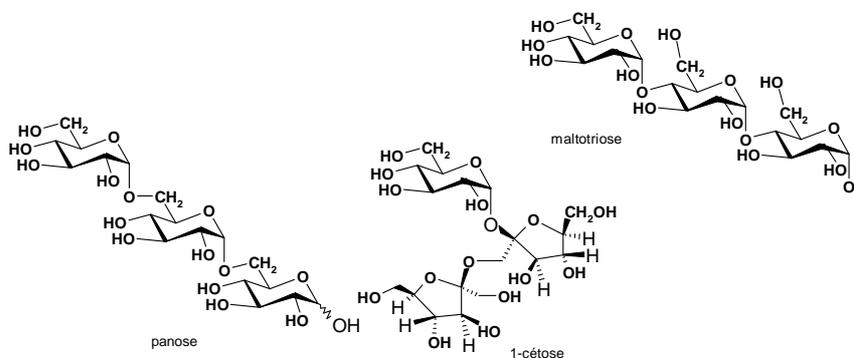


Figure 13 : Quelques trisaccharides identifiés dans des miels de France étudiés par Cotte *et coll.*

Nous avons déjà noté que le gentiobiose et le mélibiose ne sont présents que dans le miel de forêt et ne sont pas détectés dans tous les autres échantillons de miel. Par contraste, pour tout l'ensemble des échantillons de miel, outre le D-glucose et le D-fructose formant les composantes majoritaires des miels, on observe trois oligosaccharides présents à des teneurs diverses dans chaque miel dont le maltose, le maltulose et le turanose. Ces trois oligosaccharides représentent entre 5,8-8,6% des sucres totaux pour les miels de provenance de Madagascar et entre 5,4-7,5% des miels de France. (Tableau 73) On sait que les teneurs en oligosaccharides peuvent être étudiées comme paramètres de discrimination des origines botaniques ou géographiques des miels.<sup>198</sup>

Tableau 73: Paramètre Maltose-maltulose-turanose dans les échantillons de miel

sucres	miel1	miel2	miel3	miel4	miel5	miel6	miel7	miel8
maltose	2,0%	0,8%	1,4%	1,4%	1,5%	0,7%	1,3%	0,8%
maltulose	1,8%	1,9%	1,1%	2,1%	1,6%	0,9%	1,2%	1,4%
turanose	2,4%	2,0%	1,8%	1,9%	1,8%	1,8%	1,6%	1,4%
Total (1) <sup>a</sup>	6,1%	4,8%	4,3%	5,4%	4,9%	3,4%	4,1%	3,7%
% (2) sur oligosaccharides <sup>b</sup>	100,0%	43,0%	59,2%	49,2%	41,5%	51,8%	61,2%	41,9%

Paramètre Maltose-maltulose-turanose dans les échantillons de miel avec % en masse. <sup>a</sup>: total (1) total des teneurs en maltose+maltulose+turanose ; <sup>b</sup>: %(2) composition en maltose+maltulose+turanose des oligosaccharides

Parmi les oligosaccharides, nous avons déterminé trois trisaccharides pour l'ensemble des échantillons de miel, l'isomaltotriose, le mélézitose et l'erlose (Tableau 74). La somme de leur pourcentage peut être pris comme paramètre de discrimination géographique.

Tableau 74: Paramètres trisaccharides des échantillons de miel

Trisaccharides	miel1	miel2	miel3	miel4	miel5	miel6	miel7	miel8
isomaltotriose	-	-	-	1,4%	1,8%	-	-	1,1%
Mélézitose	-	0,7%	0,6%	0,7%	0,8%	0,5%	-	0,7%
Erlose	-	0,8%	0,6%	0,8%	1,1%	0,5%	1,0%	0,7%
total trisaccharides	0,0%	1,4%	1,2%	2,9%	3,7%	1,1%	1,0%	2,6%
total oligosaccharides	6,1%	11,0%	7,3%	11,0%	11,8%	6,7%	6,6%	8,8%
rapport trisaccharide/oligo	0,0%	13,0%	16,7%	26,6%	30,9%	16,0%	15,4%	29,2%

Les trois trisaccharides n'ont pas été détectés dans le miel d'eucalyptus. En revanche, l'erlose a été détecté pour des teneurs variant de 0,5 à 1,1% pour l'ensemble de tous les miels restants. La présence du mélézitose a été détectée à des teneurs entre 0,5 et 0,8% sauf dans le miel de bruyère (7) où il est absent. Par contre, l'isomaltotriose n'a été détecté qu'avec le miel4, le miel5 et le miel8 avec une teneur respectivement égale à 1,4%, 1,8% et 1,1%. L'ensemble de ces trois trisaccharides forme 0 à 3,7% des échantillons de miel, rendant compte pour 0 à 30,9% des oligosaccharides totaux. Enfin, à titre de référence, nous reproduisons ci-dessous un tableau 75 comparatif des oligosaccharides provenant des miels de Brésil et d'Espagne.

Tableau 75: Comparaison des teneurs en oligosaccharides des miels de Brésil et d'Espagne

N°	Sucres	Miels Brésil	Miels Espagne	N°	Sucres	Miels Brésil	Miels Espagne
1	Maltose	0,21-6,88%	0,77-1,98%	13	Cellobiose	nd	0,06-0,28%
2	Turanose	0,78-2,03%	0,72-2,87%	14	Laminaribiose	nd	0,06-0,21%
3	Nigérose	1,11-2,81%	0,35-0,90%	15	Maltulose	nd	0,66-3,52%
4	Mélibiose	0,05-0,15%	0,00-0,00%	16	Kojibiose	nd	0,86-2,19%
5	Sucrose	0,07-0,77%	0,04-1,38%	17	Tréalulose	nd	0,56-2,43%
6	Isomaltose	0,18-0,71%	0,64-3,07%	18	Palatinose	nd	0,12-0,62%
7	Maltotriose	0,24-1,03%	0,00-0,03%	19	1-cétose	nd	0,07-0,48%
8	Panose	0,03-0,08%	0,00-0,27%	20	6-cétose	nd	0,01-0,16%
9	Mélézitose	0,21-0,37%	0,00-0,16%	21	Néo-cétose	nd	0,01-0,13%
10	Raffinose	0,10-0,25%	0,05-0,73%	22	Erlose	nd	0,04-2,47%
11	$\alpha,\alpha$ -tréhalose	nd	0,00-0,32%	23	Isomaltotriose	nd	0,01-0,14%
12	$\beta,\beta$ -tréhalose	nd	0,17-0,65%	24	Par	nd	0,01-0,45%

Teneurs en oligosaccharides minoritaires dans des miels de Brésil et d'Espagne. % pourcentage en masse ; nd : non détecté ; <sup>a</sup> : Da Costa et coll. <sup>199</sup>, analyse des sucres par HPLC sur 70 échantillons de miel ; <sup>b</sup> : Martinez-Castro et coll. <sup>200</sup>, analyse par CPG et spectrométrie de masse.

### 3.2.2.3.3. Observation et quantification du D-glucitol dans les échantillons

Nous avons détecté et quantifié dans six échantillons sur les huit analysés d'échantillons de miel la présence du D-glucitol. (Tableau 76) C'est un polyol résultant de la réduction de la fonction aldéhyde du D-glucose ou de la fonction cétone du D-fructose.

Tableau 76: Répartition du D-glucitol dans les échantillons de miel étudiés

Origine géographique	Madagascar				Corse	France		
	miel1	miel2	miel3	miel4		miel5	miel6	miel7
Echantillon de miel								
% en D-glucitol	0,7%	0,4%	0,3%	0,3%	0,4%	0,3%	-	-

Les teneurs observées sont à la limite de détection de l'appareil RMN : le miel des forêts 2 et miel Michaud 5 avec 0,4% ; le miel de letchis 3 et miel « Elisa » 6 avec 0,4% sauf pour le miel

d'eucalyptus **1** dont la teneur monte à 0,7%. Si ce constituant s'analyse en CPG/SM après silylation ou acétylation avec d'autres sucres polyols par exemple dans les fluides métaboliques,<sup>201</sup> sa présence n'a jamais été mise en évidence auparavant dans les miels. Les polyols forment une classe de sucres très difficiles à analyser par HPLC<sup>202</sup> sauf avec les récentes techniques d'échange anionique et là encore, ces techniques s'utilisent surtout pour quantifier le fructose et le glucose dans les miels.<sup>203</sup> C'est donc pour la première fois qu'une étude a permis de déceler et de quantifier le D-glucitol dans les mélanges complexes que sont les miels. (Voir annexe D-glucitol p. 132)

Cette remarque sur le D-glucitol ferme ce paragraphe sur la diversité des sucres des miels où nous avons un peu délaissé de côté les sucres majoritaires que sont le D-glucose et le D-fructose. Mais ils sont très importants par leurs impacts sur les propriétés physico-chimiques du miel dont la cristallisation qui sera l'objet du dernier paragraphe.

#### 3.2.2.3.4. Solubilité des sucres et paramètres de cristallisation des miels

Les sucres sont des molécules très polaires qui possèdent des sites hydrophiles avec les fonctions OH et aussi les fonctions éthers C-O-C. Selon les positions de ces sites, les sucres seront plus ou moins hydratés. De cette hydratation vont dépendre les différentes solubilités des sucres. Les oligosaccharides possèdent en plus des possibilités de rotation qui favorisent la rotation autour des liaisons glycosidiques des différents sucres simples selon les positions les plus favorables. Bien entendu, les solubilités vont dépendre et croître avec la température. Le tableau **77** ci-dessous donne quelques exemples de solubilité des sucres dans l'eau.

Tableau 77: Valeurs de solubilité de quelques sucres purs dans de l'eau

Sucres	Solubilité	Solubilité décroissante (à saturation) des quelques sucres dans l'eau à la température de 20°C exprimée en gramme de sucres par 100 g d'eau. Le D-fructose présente donc la meilleure solubilité avec 78,9 g/100 g d'eau, suivie par le saccharose (ou sucrose) avec 66,7. Le D-glucose ne vient qu'en troisième position avec 47,2 g/100 g d'eau suivie par le maltose (43,8). Le raffinose présente la plus faible solubilité avec 2,0g/100 g d'eau.
D-fructose	78,9	
Saccharose	66,7	
D-glucose	47,2	
maltose	43,8	
Raffinose	12,0	

Dans les miels qui peuvent être considérés comme des solutions d'eau *supersaturées* de sucre, la tendance à se cristalliser est ainsi un processus naturel<sup>204</sup> qui dépend surtout du rapport des deux sucres majoritaires que sont le D-fructose et le D-glucose. Plus particulièrement, White, a montré que la vitesse de cristallisation dépend de la teneur en glucose du miel<sup>205</sup> vu que celui-ci a une solubilité presque deux fois moindre que le D-fructose. Ainsi, les miels avec du glucose ayant une teneur inférieure à 28% ou un rapport glucose/eau < 1,7 restent plus longtemps liquide. Le tableau **78** résume les teneurs en glucose et en fructose et les différents paramètres associés.

Tableau 78: Comparaison des paramètres dérivés des teneurs en glucose et fructose

Paramètres	miel1	miel2	miel3	miel4	miel5	Miel6	miel7	miel8
<b>G</b>	32,1%	19,7%	18,9%	21,8%	21,4%	21,7%	28,1%	27,9%
<b>F</b>	31,9%	51,3%	43,1%	29,8%	32,0%	32,3%	37,4%	31,3%
<b>F+G</b>	64,0%	70,9%	62,0%	51,6%	53,4%	54,0%	65,5%	59,2%
<b>F/G</b>	0,99	2,61	2,29	1,37	1,49	1,49	1,33	1,12

G : D-glucose, F : D-fructose ; % en masse des constituants

Pour le miel<sup>1</sup>, les teneurs en fructose et en glucose sont presque égales, ce dernier étant légèrement supérieur au premier et dont l'ensemble F+G, égale à 64,0% de la masse totale du miel est compris dans la plage d'intervalle des miels des eucalyptus entre 63,7-77,0%.<sup>206</sup> Ainsi, le rapport F/G égal à 0,99 est très voisin de 1 et on assiste à un miel d'aspect résineux facilement cristallisable. Le miel<sup>8</sup>, a un rapport F/G proche de 1 avec 1,12, la teneur du D-fructose étant légèrement supérieur à celui du D-glucose. Le miel de forêt de Madagascar possède le rapport F/G le plus élevé avec 2,69 du à la teneur exceptionnelle en D-fructose de 51,3%, et l'ensemble de ses constituants majoritaires rend compte pour 70,9% de la masse totale du miel. Il est suivi en terme de F/G par le miel de letchis avec un rapport égal à 2,61 avec la teneur en fructose égale à 43,1% contre 18,9% pour le glucose, formant ainsi 62,0% de la masse du miel. Pour le miel de maquis de Corse étudié par Mazzoni,<sup>166</sup> on a un rapport F/G de 1,3. [166] Les miels **4-7** ont un rapport F/G intermédiaire de 1,30 à 1,50. (Tableau **79**)

Tableau 79: Paramètres F/G déterminé par <sup>13</sup>C-RMN sur des miels de Corse

Echantillons de miel	maquis	Châtaignier 1	châtaignier 2	acacia	asphodèle	anthyllis	clémentinier
Fructose	35,60%	37,10%	36,6	32,40%	32,70%	31,50%	33,40%
Glucose	26,80%	23,00%	17,2	25,90%	22,70%	28,70%	28,40%
F/G	1,33	1,61	2,1	1,25	1,44	1,10	1,18

Paramètres F/G déterminé par RMN <sup>13</sup>C sur des miels de Corse (Mazzoni) : les teneurs sont des % en masse par rapport aux miels. Analyse effectuée sur RMN 200 MHz (50MHz <sup>13</sup>C, H<sub>2</sub>O :D<sub>2</sub>O)

Mazzoni a ainsi observé les valeurs les plus élevés du rapport F/G pour les miels de châtaignier 1 et 2 avec respectivement 1,61 et 2,1. Ce dernier résultat pour le miel de châtaignier 2 associé avec une teneur exceptionnellement faible de 17,2% et à une teneur totale en oligosaccharides élevée de 17,6% est en accord avec les données de Doner qui décrit une corrélation négative des teneurs entre monosaccharides et oligosaccharides en faveur de ces derniers au cours de stockage prolongé des miels.<sup>207</sup> Dans les miels résineux dits « miels de mélézitose » où la présence de ce trisaccharide peu soluble à des teneurs relativement élevé allant jusqu'à 10% rendent aussi les miels facilement plus cristallisables. Le tableau **80** montre des rapports F/G des miels d'origine géographique et d'origine botanique différentes.

Tableau 80: Comparaison des valeurs F/G des miels d'origine botanique et géographique différentes

Pays	France <sup>a</sup>		Maroc <sup>b</sup>			Nepal <sup>c</sup>
Origine botanique	Acacia (50)	Tournesol (36)	Eucalyptus (12)	Citrus (10)	Umbellifera (7)	Apis
F/G*	1,67	1,05	1,23	1,21	1,01	1,56

Comparaison des valeurs F/G des miels d'origine botanique et géographique différente. \* : valeurs moyennes de F/G ; <sup>a</sup> : Cotte *et coll.* ; teneur déterminée acide palustrique HPLC avec détecteur PAD ; <sup>b</sup> : Terrab *et coll.* ; données obtenues par CPG-SM ; <sup>c</sup> : Joshi *et coll.*,<sup>208</sup> données obtenues par HPLC à partir des miels provenant des miels produits sur deux espèces *A. mellifera* (27 échantillons), *A. dorsata* (28) et *A. cerana* (26).

Bien entendu, la cristallisation dépend aussi d'autres facteurs tel que le taux d'humidité, et de la température de stockage des miels. Mais la teneur en d'autres substances dont sont plus ou moins pourvus les miels tels que les composés organiques, les éléments minéraux influe également sur la cristallisation. On peut assister alors au phénomène de relargage qui fait accaparer les molécules d'eau par d'autres entités autres que les sucres ou par le phénomène de mélassigène selon lequel ces autres entités, en se liant aux sucres peuvent augmenter leur solubilité.

## CONCLUSIONS

Cette deuxième partie de notre travail (chap. 2.) a porté sur l'application de l'analyse directe des mélanges complexes sans séparation préalable par la RMN du carbone-13 assistée par ordinateur (parag. 2.2.).

L'analyse concertée avec CPG et RMN a permis de déterminer pour les fractions volatiles de l'ensemble des échantillons de résines de pin provenant des espèces *P. kesiya* et *P. patula* 30 composés *mono-*, *di-* et sesquiterpéniques. L'analyse directe par RMN du carbone-13 des fractions non volatiles de ces résines ont permis l'identification et la quantification des 10 acides résiniques et 7 composés diterpéniques neutres minoritaires. L'ensemble des constituants de la résine, déterminé par péréquation rend compte pour 51-60% de la masse totale des échantillons analysés (parag. 3.1.). La revue de la littérature nous a montré que c'est pour la première fois que des techniques RMN ont été appliquées à l'étude chimique de l'espèce de *P. kesiya* et à l'espèce *P. patula*. Sur le plan national, c'est aussi la première fois, que l'on s'intéresse à des études portant sur les possibles valorisations des espèces forestières. Ce travail ouvre ainsi la voie à l'étude extensive sur les espèces forestières résineuses susceptibles de valorisation économique.

Avec le support des différentes bases de données dont celles accessibles sur Internet, il nous a été aussi rendu possible de quantifier directement les constituants en sucre des différents échantillons de miel (parag. 3.2). La méthodologie nous a permis également de vérifier les équilibres tautomériques des composés identifiés par la RMN du carbone-13, rendant ainsi compte de la fiabilité de la méthode atteignant jusqu'à une teneur limite détectable de 0,3% (3.2.1). Pour l'ensemble des échantillons comprenant des miels d'origines botaniques et géographiques différentes de Madagascar et de France, 24 tautomères dont 12 oligosaccharides minoritaires ont été ainsi identifiés et quantifiés rendant compte pour 60-81% de la teneur en masse des miels. Peu de travaux portant sur les miels et utilisant la méthodologie de la RMN du carbone-13 ont été publiés jusqu'à ce jour et nous croyons savoir que ce travail fait figure de pionnier dans ce domaine sur les miels de Madagascar, ouvrant des perspectives dans le cadre de contrôle de qualité, de détection de fraude et de mise en normes des produits nutritionnels englobant les miels, les fruits ou breuvages. Finalement, il ouvre la voie pour l'étude des plantes susceptibles de contenir des sucres en vue de valorisation industrielle ou pour le recyclage des agro-ressources dans le cadre de protection et de gestion environnementale.

## CONCLUSION GENERALE

Dans ce travail nous avons fait usage et illustré deux démarches analytiques opposées utilisant des approches différentes de méthodologie RMN. Nous avons ainsi caractérisé une diversité de petites molécules formées de composés terpéniques et des sucres pouvant être réparties dans deux espaces chimiques différents.

Dans le *premier* chapitre, nous avons appliqué la méthodologie classique de purification-identification (Voie **A**). Nous avons fait un usage concerté des techniques 1D et 2D de la RMN pour l'étude structurale du germacranolide A9 et la révision structurale du guaianolide TD15 qui ont été isolés et purifiés à partir des variétés de l'espèce *Tanacetum densum*. L'utilisation extensive de SINEPT et DNOE ont permis particulièrement de désigner sans ambiguïté les protons diastéréotopiques et des carbones quaternaires ainsi que déterminer les relations spatiales sur les faces  $\alpha$  et  $\beta$  des molécules. Ces résultats ont validé les règles empiriques des auteurs tels que Samek concernant les caractéristiques structurales induites par la présence de l'unité pharmacophore  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone conduisant à la stéréochimie absolue (**1S**, **4S**, **5R**, **6S**, **7S**, **8S**) pour A9 et (**1R**, **3R**, **6S**, **7S**, **10R**) pour TD15.

Le chapitre **2** concerne l'application de l'analyse directe des mélanges complexes sans séparation préalable par la RMN du carbone-13 assistée par ordinateur (Voie **C**). A l'aide de cette technique, nous avons pu quantifier les composés *mono-* *di-* et *sesquiterpéniques* des essences de térébenthine et les constituants diterpéniques acides et neutres des colophanes issues des résines provenant des espèces locales de *P. kesiya* et de *P. patula* rendant compte pour 54 à 60% de la masse totale en résine. A notre connaissance, c'est pour la première fois qu'un tel travail utilisant l'analyse directe par RMN du  $^{13}\text{C}$  a été accomplie pour le *P. kesiya* et le *P. patula*. De même, nous avons pu quantifier directement les constituants en sucre des huit échantillons de miel comptant pour 60-81% en masse des miels et de vérifier les équilibres tautomériques des composés identifiés par la RMN du carbone-13. Grâce à cette méthode, le D-glucitol a pu être pour la première fois détecté et quantifié dans cinq de nos huit échantillons de miel, ce qui n'a pas été possible auparavant avec les méthodes classiques de chromatographie et de spectrométrie de masse. Nous croyons savoir que ce travail est le premier dans son genre à être entrepris sur des produits de la biomasse locale de Madagascar.

La Voie **A** de purification-identification a été toujours la méthodologie de choix surtout dans l'exploitation des plantes médicinales en vue d'isoler des nouvelles petites molécules d'intérêt biologique. Mais elle est handicapée par de longs processus laborieux d'isolement et de purification pour l'identification aussi fastidieux que coûteux en moyen, matériels et temps des substances déjà connues accompagnant inévitablement les substances nouvelles.

L'avènement des techniques de haut débit avec les méthodologies de couplages<sup>209</sup> supportés par les bases de données informatiques,<sup>210,211,212</sup> ont permis de faciliter les techniques de déréplication<sup>213</sup> et l'on voit une migration progressive vers l'analyse des mélanges complexes sans séparation préalable.<sup>214</sup> Parmi ces méthodologies, la mise en couplage des techniques de chromatographie avec un système parallèle de SM et de RMN constitue un des plus puissants moyens d'investigation<sup>215</sup> mais qui peuvent se révéler très coûteux. Aussi, assiste-on au développement de la RMN en microgramme, permettant l'analyse des très faibles quantités de

produits,<sup>216,217</sup> et qui, associée aux méthodologies de statistiques de covariation,<sup>218</sup> appuyées par des bases de données informatiques permet l'analyse directe des constituants des mélanges complexes. Ces innovations reflètent l'une des grandes tendances actuelles qui, dans un souci à la fois d'écologie et d'économie, est d'arriver à identifier les métabolites à partir des mélanges complexes que ce soit chimiques, ou biologiques d'origine diverse en évitant ou en simplifiant le maximum possible de traitements préalables.

C'est dans ce cadre de compatibilité environnementale et de coûts que s'est développé l'analyse directe par RMN du carbone-13 (Voie **C**) dont nous avons fait un usage pionnier sur les ressources renouvelables locales dans nos travaux. Cette méthodologie par excellence non invasive permet d'autre d'aboutir à des objectifs de valorisation académique et de valorisation industrielle. En effet, à la différence de la Voie **A**, essentiellement qualitative, sa capacité d'analyse quantitative sur un grand nombre de constituants chimiques en fait par ailleurs un outil important d'écologie chimique. On peut ainsi déboucher sur une valorisation industrielle de la biomasse dans le cadre de la chimie durable, soit comme source d'isolats pour synthèse chimique, de molécules plates-formes pour les bioraffineries ou comme sources de bioénergies. D'autre part, le formidable progrès dans la génomique<sup>219</sup> qui permet la découverte de nouveaux récepteurs biologiques ouvre la voie aux nouvelles thérapeutiques utilisant les « vieilles molécules » parfaitement connues aussi bien qu'à leur utilisation pour l'étude des interactions macromoléculaires.<sup>220</sup>

Annexes

Listes des illustrations

Glossaires

Références

## Annexes Germacranolide

Extraction *T. densum*. (Dr Gören *et coll.*) L'isolement et la purification à partir de 4,16 kg de poudre séchée de la partie aérienne *Tanacetum densum* ont passé par des étapes traditionnelles d'extractions successives par ordre de polarité croissante (Ether de pétrole, CHCl<sub>3</sub> et MeOH). Le résidu obtenu par évaporation à partir des extraits combinés de chloroforme et de méthanol a été redissout dans du méthanol et la solution obtenue placée à 4°C pendant 24 h. Après filtration des précipités, le filtrat méthanolique concentré sous vide, a conduit à un résidu visqueux. Ce résidu de mélange complexe contenant les lactones a été utilisé pour le fractionnement chromatographique en vue d'isolement du lactone germacranolide **A9**.

*Fractionnement du résidu de mélange complexe contenant les lactones (Dr Gören et coll.)*. Le résidu visqueux a été soumis à un fractionnement chromatographique sur gel de silice, utilisant un gradient de solvant d'éther dans de l'éther de pétrole (éther de pétrole 100%-Et<sub>2</sub>O 100%) puis un autre gradient de solvant de méthanol dans de l'éther (Et<sub>2</sub>O 100%-MeOH 100%) fournissant ainsi huit fractions. Les deux dernières fractions ont été recombinaées pour une séparation par chromatographie en couche mince sur gel de silice avec de l'éther comme éluant. La bande la plus polaire contenant les lactones sesquiterpènes a été alors purifiée par «chromatographie flash» sur gel de silice avec le système d'éluant CHCl<sub>3</sub> : MeOH (15:1) donnant ainsi 23 mg du germacranolide **A9**.

*Germacranolide A9*. Cristaux incolores ; IR[KBr]  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>, 3220 (OH), 1760 ( $\gamma$ -lactone C=O), 1660 (C=C). UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  nm ( $\epsilon$ ) 209 (2050), 263 (240). CD (MeOH)  $\lambda_{\max}$  nm ( $\Delta\epsilon$ ) 250 (-0,6) ; HRMS (CI, NH<sub>3</sub>) m/z 281,1351 ; [M+1]<sup>+</sup> (281,1389, calculé pour C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>O<sub>5</sub>).

*Préparation de l'ester de bis-p-bromobenzoate 16* à partir du germacranolide A9 **1** (selon Lincoln Scott) pour stéréochimie absolue de A9. A une solution agitée à 0°C de **1** (2,8 mg ; 0,01 mmol), de DCC (5,7 mg ; 0,028 mmol), DMAP (3,1 mg ; 0,025 mmol) dans du dichlorométhane anhydre est ajoutée une solution d'acide de p-bromobenzoïque (4,4 mg ; 0,022 mmol) dans du dichlorométhane anhydre (1 ml). Le mélange réactionnel est agité à 0°C pour 15 mn, avant qu'il s'équilibre avec la température ambiante. Ensuite, il est agité pour 45 mn jusqu'à ce que la plaque CCM montre que **16** a été totalement consommé (Gel de silice 60-PF<sub>254</sub> ; Hexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1 :1). On évapore le solvant sous vide et le résidu solide est purifié par TLC préparative (Hexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1 :1) pour donner quantitativement l'ester de bis-p-bromobenzoate **16** comme cristaux incolores (6,5 mg, 100%).

*Ester de bis-p-bromobenzoate 16 (Lincoln Scott)*. PF 210°C ;  $[\alpha]_{D}^{20}$  -23,3 (c 0,06g/100 ml, MeOH) ; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  208 nm (fin d'absorption) ; 248 ( $\epsilon$  44 200) ; CD (MeOH) 210 nm ( $\Delta\epsilon$  -20,0), 242 (-39,4) ; 258 (+19,4) ; IR (KBr) 1765 (C=O) cm<sup>-1</sup> ;

RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 400 MHz)  $\delta$  7,61 (d, J = 8,7 Hz ; 1H) ; 7,60 (d ; J = 8,7 Hz ; 1H) ; 7,38 (d ; J = 8,7 Hz) ; 7,35 (d ; J = 8,7 Hz) ; 6,14 (dd, J = 3,1 ; 0,6 Hz ; H-13') ; 5,64 (dd ; J = 2,7 ; 0,6 Hz ; H-13) ; 5,57 (dd ; J = 9,2 ; 7,7 Hz ; H-6) ; 5,32 (superposé avec CDHCl<sub>2</sub> ; H-5) ; 5,22 (ddd ; J = 8,3 ; 6,6 ; 4,9 Hz ; H-8) ; 5,15 (bs ; H-14') ; 5,12 (bs ; H-14) ; 4,77 (dd ; J = 7,1 ; 7,1 Hz ; H-1) ; 3,50 (dddd, J = 9,2 ; 6,6 ; 3,1 ; 2,7 Hz ; H-7) ; 3,06 (dd, J = 14,4 ; 4,9 ; H-9 $\beta$ ) ; 2,60 (dd, J = 14,4 ; 8,3 ; H-9 $\alpha$ ) ; 2,23 (dddd ; J = 13,1 ; 9,3 ; 7,1 ; 4,1 Hz ; H-2 $\beta$ ) ; 2,19 (dddd ; J = 13,1 ;

9,3 ; 7,3 ; 7,1 Hz ; H-2 $\alpha$ ) ; 2,03 (ddd, J = 12,9 ; 7,3 ; 4,1 Hz ; H-3 $\alpha$ ) ; 1,84 (ddd ; J = 12,9 ; 9,3 ; 9,3 Hz ; H-3 $\beta$ ) ; 1,54 (s ; H-15) ; RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  ; 100 MHz)  $\delta$  178,5 ; 165,4 ; 164,5 ; 147,1 ; 136,0 ; 132,1 (2 x C) ; 131,3 ; 131,3 ; 128,8 ; 128,3 ; 128,1 (2 x C) ; 126,8 ; 115,5 ; 83,8 ; 82,9 ; 80,7 ; 76,6 ; 72,1 ; 48,6 ; 37,5 ; 29,5 ; 21,9 :

LRMS (CI ;  $\text{NH}_3$  ; 150 eV) m/z (intensité relative) 649 (58 ;  $[\text{M}+1]^+$ ) ; 647 (100 ;  $[\text{M}+1]^+$ ) ; 645 (645 ;  $[\text{M}+1]^+$ ) ; 569 (46 ;  $[\text{M}+1-^{79}\text{Br}]^+$ ) ; 567 (42 ;  $[\text{M}+1-^{81}\text{Br}]^+$ ) ; 489 (71) ; 185 (63) ; 183(64) ; 102 (72) ;

HRMS (EI ; 70 eV) m/z 645,0113 ( $[\text{M}+1]^+$ ) ; calculé pour  $\text{C}_{29}\text{H}_{27}^{79}\text{Br}_2\text{O}_7$  645,0123.

## Annexes Guaianolide

Extraction de la partie aérienne de *T. densum*. (Gören *et coll.*) Les extraits séquentiels à l'éther de pétrole, puis à l'éther ensuite au méthanol ont été obtenus à partir de 10kg de la partie aérienne de *Tanacetum densum ssp. amani* séchés et réduits en poudre. Les extraits à l'éther et au méthanol ont été combinés, évaporés sous vide, redissout dans le méthanol sous chauffage doux. Les précipités récupérés à 4° par filtration ont été lavés avec du méthanol froid et les solutions ainsi obtenues ont été recombinaées pour être évaporées sous vide pour donner finalement de l'extrait brut contenant les lactones sésquiterpéniques en vue de fractionnement par chromatographie.

*Isolement et purification pour TD15.* (Gören *et coll.*) L'extrait brut a été soumis aux fractionnements chromatographiques par gravité sur gel de silice, utilisant un gradient croissant d'élution d'éther dans de l'éther de pétrole, puis méthanol dans l'éther de pétrole donnant 9 fractions, la fraction 4 obtenue a été de nouveau soumise à une autre chromatographie par gravité sur gel de silice utilisant le même gradient d'éther dans de l'éther de pétrole. La quatrième fraction obtenue de cette colonne à 25% d'éther a été soumise à une chromatographie sur Sephadex LH-20 utilisant le système de solvant {éther de pétrole : CHCl<sub>3</sub> : EtOH}(7 : 4 : 1) conduisant à 9 fractions dont la troisième a été purifiée par chromatographie préparative sur couche mince avec le système de solvant {C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> : CHCl<sub>3</sub> : EtOH}(2 : 1 : 0,1) pour donner le pyréthroïdine **17** comme de l'huile ( $R_f$ :0,2). La fraction 8 provenant de la colonne initiale de gel de silice a été chromatographiée sur Sephadex LH-20 pour donner une seule fraction. Cette dernière a été purifiée par chromatographie préparative sur couche mince en éluant avec le système de solvant EtOAc : C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> 1:1 pour donner le parishine **18** comme de l'huile ( $R_f$ : 0,5).

*Préparation de l'ester (R)-O-méthylmandélate **36** à partir de guaianolide **17** pour stéréochimie absolue selon la méthode de Moscher (Lincoln Scott):*

A une solution de **17** (2,1 mg ; 0,008 mmol), de DCC (3,8 mg ; 0,02 mmol) et de DMAP (2,2 mg, 0,02 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (0,5 ml) à 0°C, on a ajouté une solution de d'acide de (-)(R)-O-méthylemandelique (1,5 mg ; 0,009 mmol) dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (0,5 ml) refroidi à 0°C. Le mélange réactionnel a été agité à 0°C pour 15 mn, puis laissé s'équilibrer à la température ambiante. La mixture a été alors agitée pour un temps additionnel de 45 mn au bout duquel la plaque CCM montre que **17** est totalement consommé (SiO<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub> : MeOH ; 100 :15). Le solvant a été évaporé sous vide et le résidu purifié par CCM préparative (SiO<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub> : MeOH ; 100 :15) pour donner l'ester (R)-O-méthylemandélate **36** (2,9 mg ; 88%). *La même méthode ci-dessus a été utilisée pour préparer l'ester (S)-O-méthylmandélate **37** à partir de **17**(2,6 mg ; 79%).*

*Ester (R)-O-méthylmandélate **36** (Lincoln Scott):*

2,9 mg, solide amorphe incolore ; LRMS (Cl, NH<sub>3</sub>)  $m/z$  (intensité relative) 430,1 (8 ; [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>) ; 264,1 (28) ; 247,1 (33) ; 229,1 (45) ; 184,1 (100) ; 121,1 (97) ;

HRMS (Cl, NH<sub>3</sub>)  $m/z$  (intensité relative) 430,2250 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> (calculé pour C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>O<sub>6</sub> : 430,4839)

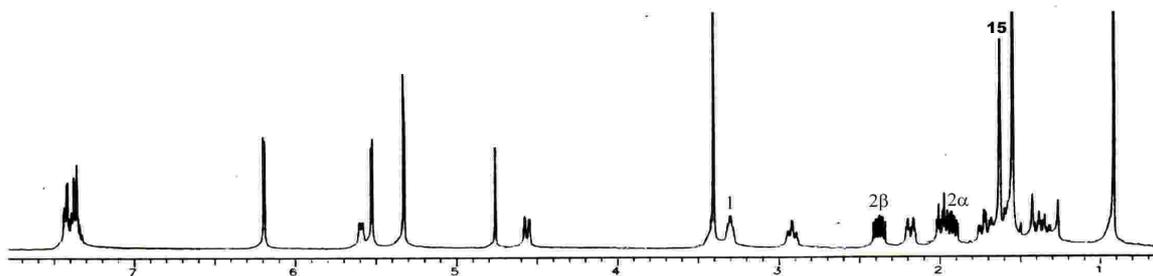
<sup>1</sup>H RMN (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (mult. ; J<sub>HH</sub> Hz) 7,30-7,45 (m, 5H) ; 6,19 (d ; 3,4 ; H-13') ; 5,59 (d ; 7,8 ; 2,5 ; H-3) ; 5,52 (d ; 3,1 ; H-13) ; 4,75 (s, H-2') ; 4,56 (dq ; 11,0 ; 1,7 ; H-6) ; 3,39 (s ; -OCH<sub>3</sub>) ; 3,30 (m ; 1H) ; 2,92 (dddd, 11,0 ; 10,8 ; 3,4 ; 3,1 ; 1,6 ; H-7) ; 2,37 (ddd, 15,4 ; 7,8 ; 5,6 ; H-2 $\beta$ ) ; 2,18 (dddd, 14,5 ; 4,0 ; 3,9 ; 1,6 ; H-8 $\alpha$ ) ; 1,99 (ddd ; 13,5 ; 3,9 ; 3,6 ; H-9 $\beta$ ) ; 1,92 (ddd ; 15,4 ; 8,0 ; 2,5 ; H-2 $\alpha$ ) ; 1,72 (ddd ; 13,5 ; 13,3 ; 4,0 ; H-9 $\alpha$ ) ; 1,62 (bs ; H<sub>3</sub>-15) ; 1,36 (dddd ; 14,5 ; 13,3 ; 4,0 ; 3,6 ; H-8 $\beta$ ) ; 0,91 (s ; H<sub>3</sub>-14) .

*Ester (S)-O-méthylemandélate 37* (Lincoln Scott):.

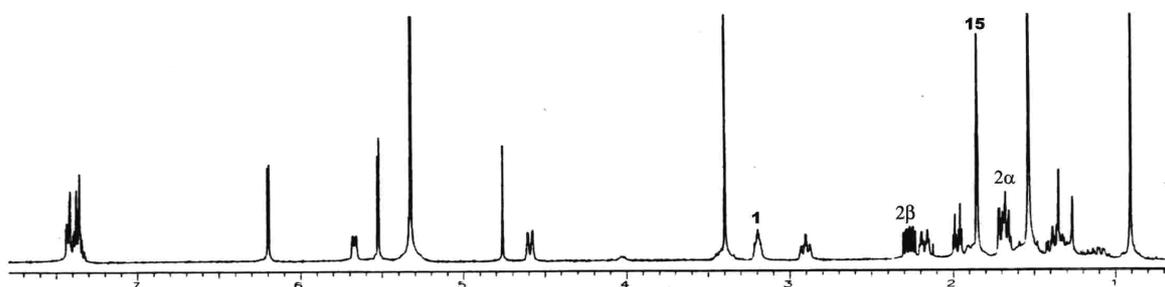
2,6 mg, solide amorphe incolore ; LRMS (Cl, NH<sub>3</sub>)  $m/z$  (intensité relative) 430,1 (8 ; [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>) ; 264,1 (28) ; 247,1 (33) ; 229,1 (45) ; 184,1 (100) ; 121,1 (97) ;

HRMS (Cl, NH<sub>3</sub>)  $m/z$  (intensité relative) 430,2250 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> (calculé pour C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>O<sub>6</sub> : 430,4839)

<sup>1</sup>H RMN (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (mult. ; J<sub>HH</sub> Hz) 7,30-7,45 (m, 5H) ; 6,19 (d ; 3,3 ; H-13') ; 5,67 (d ; 7,8 ; 2,5 ; H-3) ; 5,52 (d ; 3,1 ; H-13) ; 4,76 (s, H-2') ; 4,59 (dq ; 11,0 ; 1,7 ; H-6) ; 3,39 (s ; -OCH<sub>3</sub>) ; 3,19 (m ; 1H) ; 2,90 (dddd, 11,0 ; 10,9 ; 3,3 ; 3,1 ; 1,6 ; H-7) ; 2,26 (ddd, 15,4 ; 7,8 ; 5,7 ; H-2 $\beta$ ) ; 2,17 (dddd, 14,6 ; 4,0 ; 3,9 ; 1,6 ; H-8 $\alpha$ ) ; 1,97 (ddd ; 13,5 ; 3,9 ; 3,6 ; H-9 $\beta$ ) ; 1,85 (bs ; H<sub>3</sub>-15) ; 1,70 (m ; H-2 $\alpha$ ) ; 1,66 (m ; H-9 $\alpha$ ) ; 1,36 (m ; H-8 $\beta$ ) ; 0,90 (s ; H<sub>3</sub>-14) .



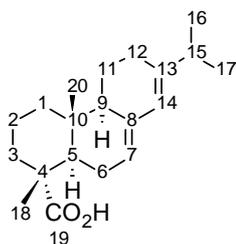
**Spectre 34** : Spectre de proton de l'ester (R)-O-méthylemandélate dans le dichlorométhane-d2.



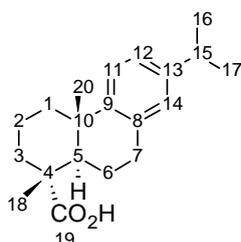
**Spectre 35** : Spectre de proton de l'ester (S)-O-méthylemandélate dans le dichlorométhane-d2

## Annexes résines des pins

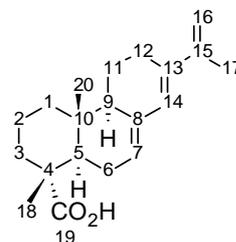
### Acides résiniques et numérotation



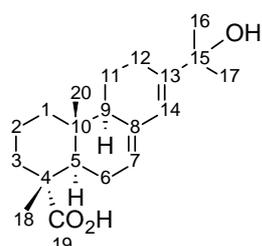
acide abiétique



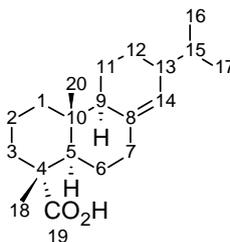
acide déhydroabiétique



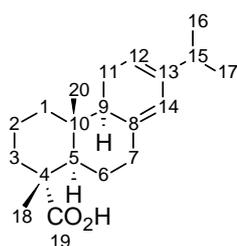
acide 15(16)-déhydroabiétique



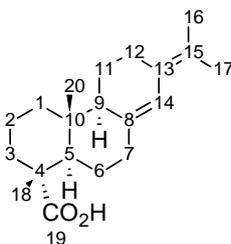
acide 5-hydroxy-déhydroabiétique



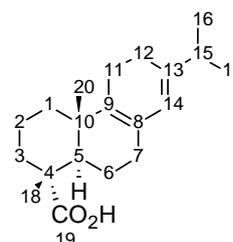
acide dihydro-8,14-ène-abiétique



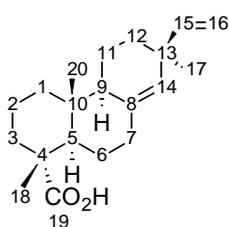
acide lévopimarique



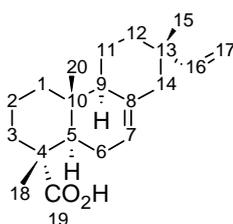
acide néoabiétique



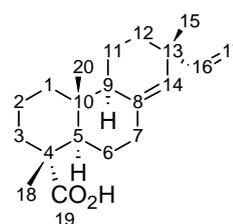
acide palustrique



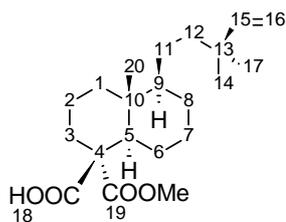
acide pimarique



acide *iso*-pimarique



acide sandaracopimarique



acide imbricatoloïque

Constituants résiniques neutres et numérotation

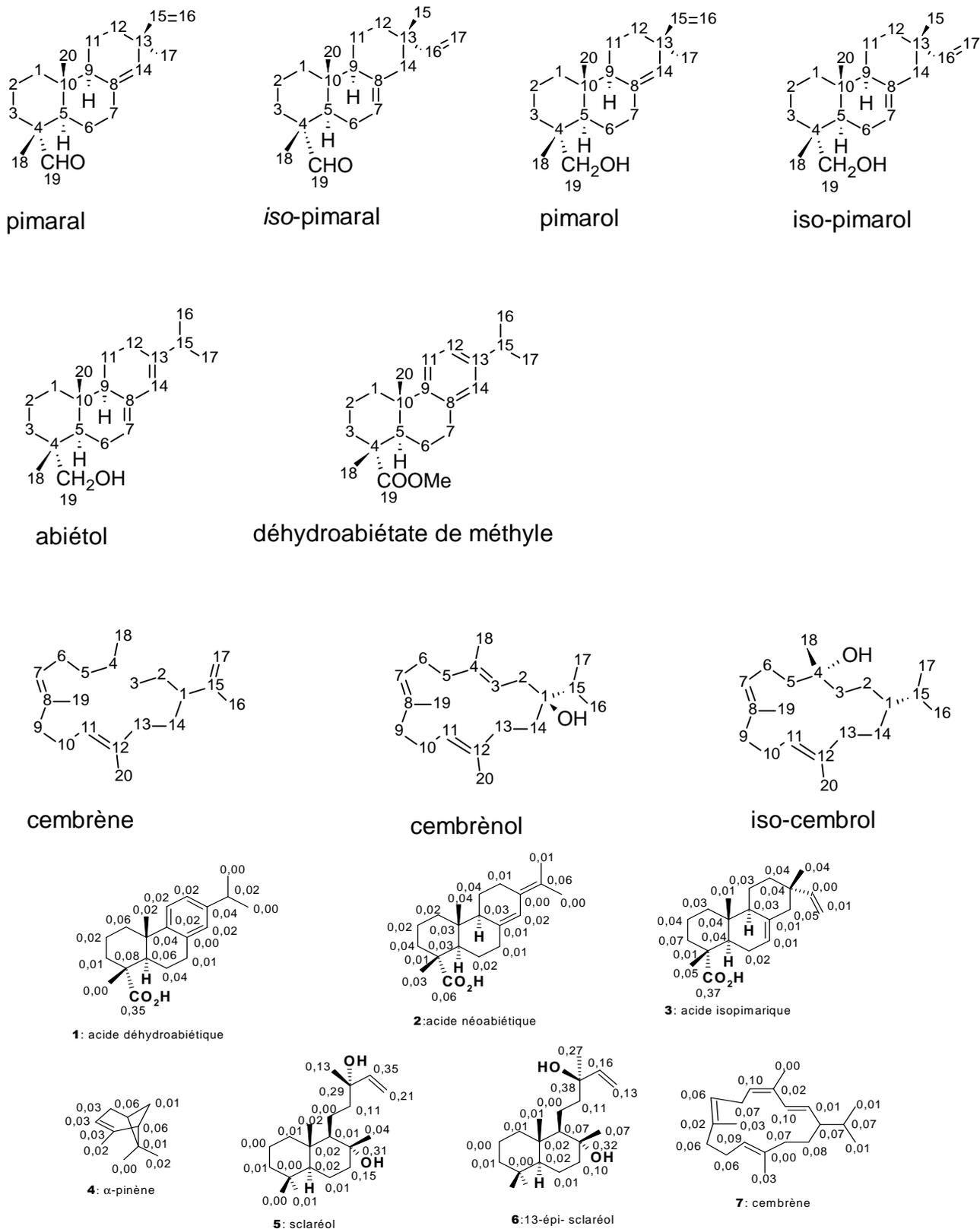
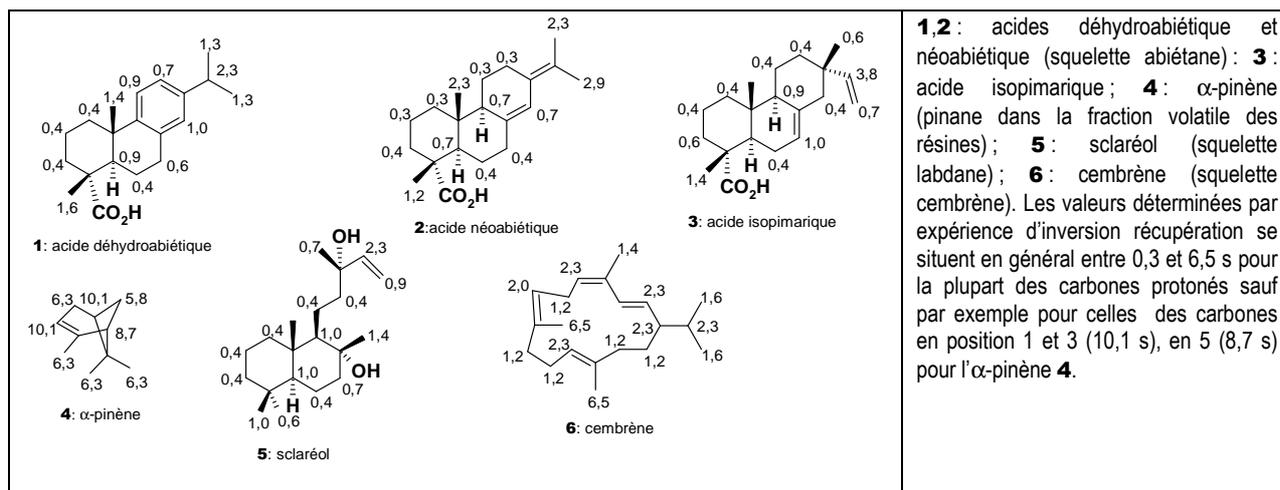
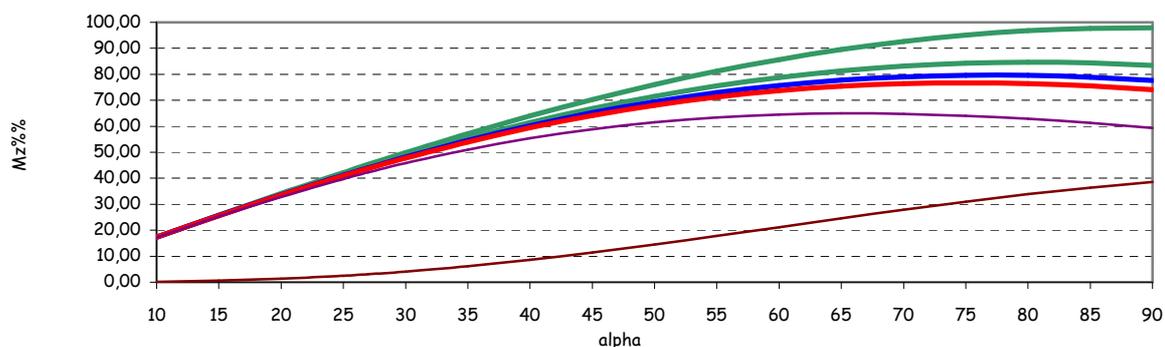


Figure 14 : Variation des déplacements chimiques pour les carbones des différents constituants représentatifs d'une résine. (Réf. Rezzi)

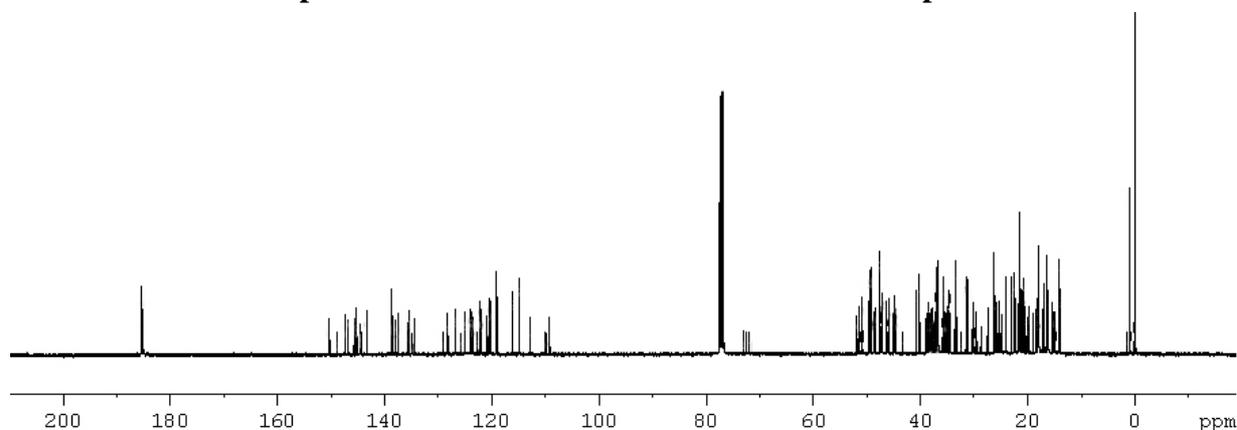


**Figure 10 :** Temps de relaxation longitudinale  $T_1$  des carbones protonés de quelques constituants représentatifs des molécules dans les résines. (Réf. Rezzi)

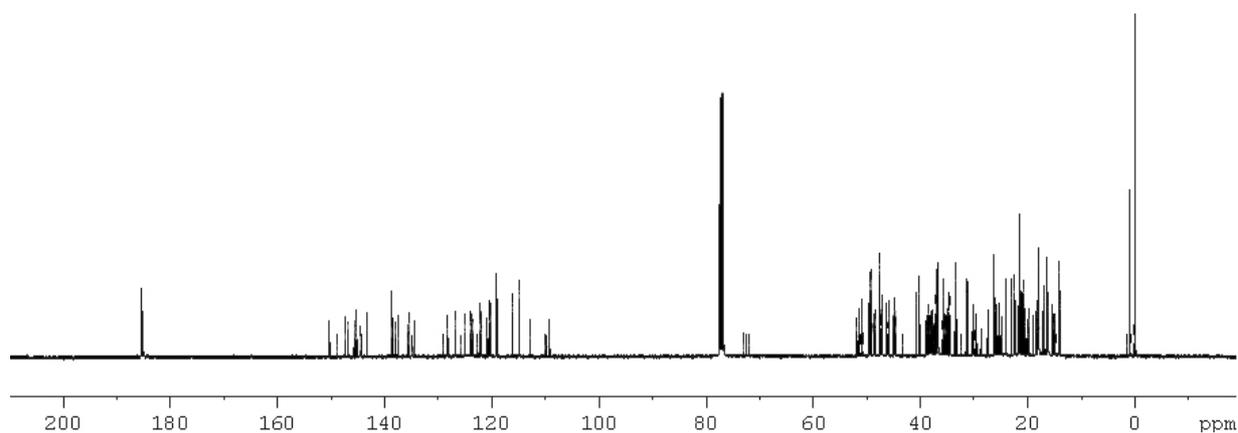


Graphique 13 : Courbe de restitution de magnétisation expérimentale à 400 MHz  
L'expérience est effectuée avec un appareil RMN 400MHz avec D1+AQ = 2.8 sec. M%% représente la ratio S/B en pourcentage

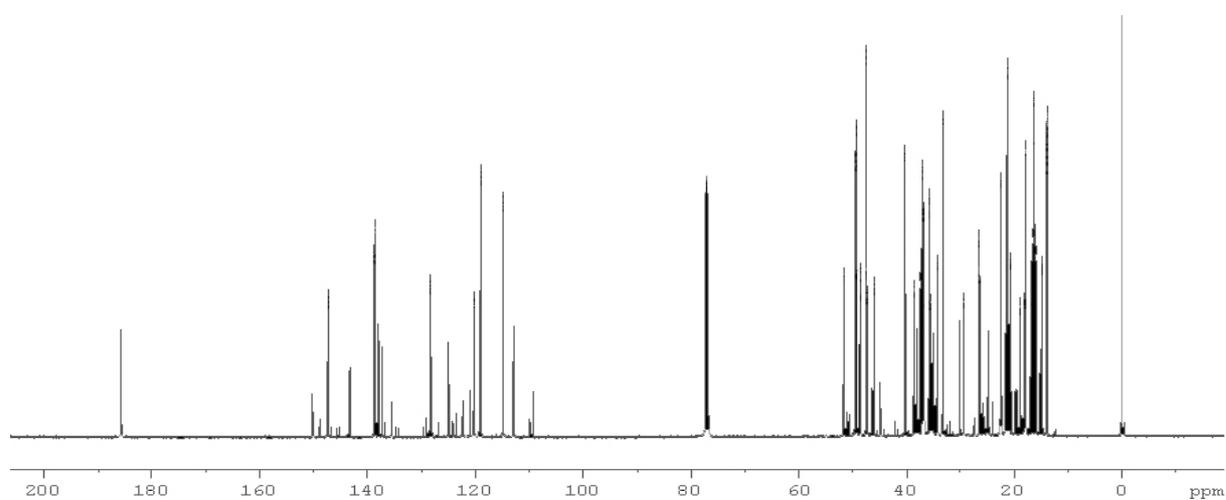
### Spectres des résines brutes des échantillons de pin



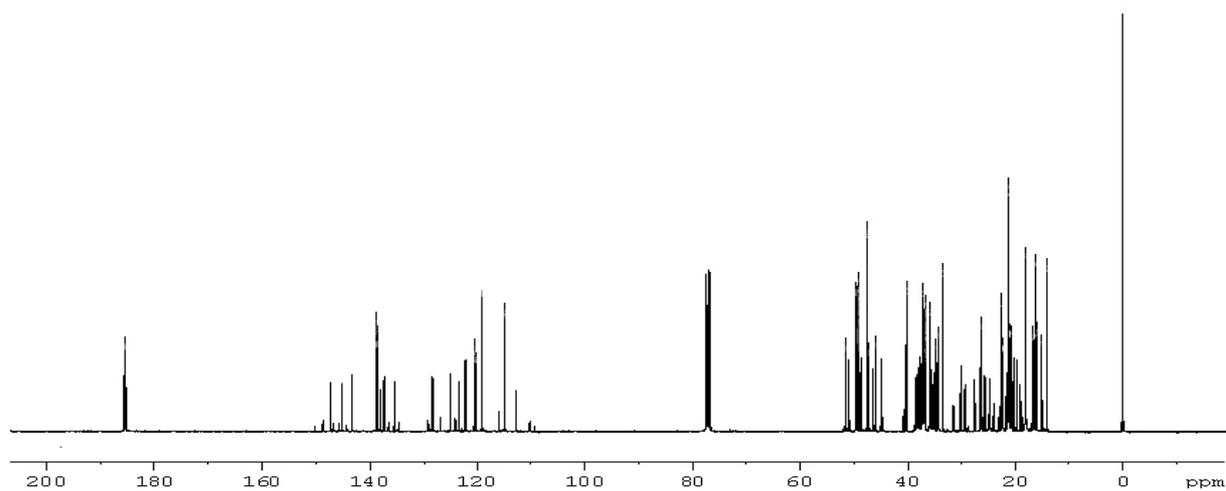
Spectre 36 : RMN du carbone-13 de la résine brute de *P. kesiya* Briéville



Spectre 37: RMN du carbone-13 de la résine brute RP2 provenant de Marovitsika



Spectre 38: RMN du carbone-13 de la résine brute Pk3 dans le CDCl<sub>3</sub>



Spectre 39: spectre RMN du carbone-13 de la résine brute de *Pinus patula*

### Résine *P. kesiya* Pk1 provenant de Bréville

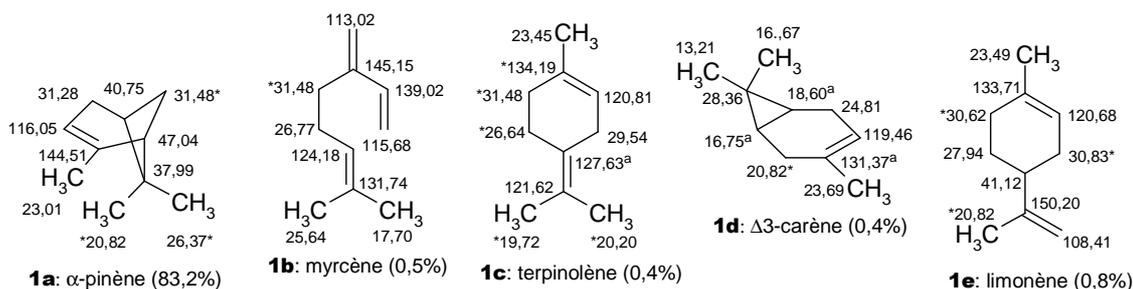


Figure 15: Individualisation des composés 1a-1e fraction volatile Pk1

après \* : pics en superposition communs à différents composés ; <sup>a</sup> : pic absent sur le spectre RMN

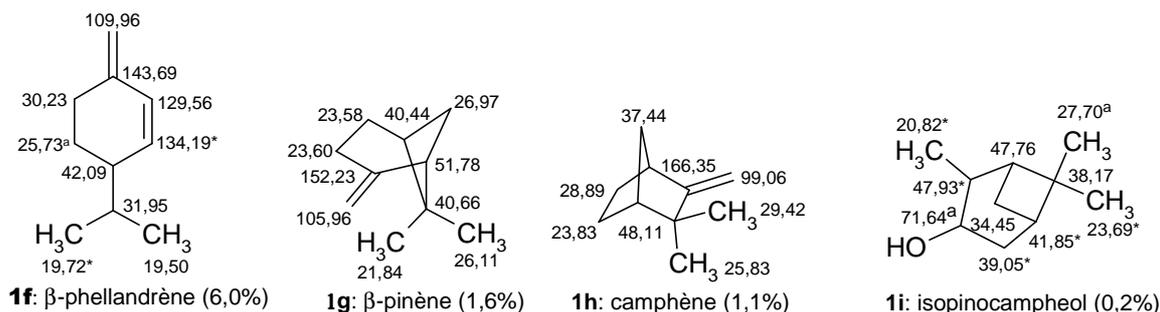


Figure 16 : Identification des constituants 1f-1i de la fraction volatile Pk1

pics des différents constituants en superposition ; <sup>a</sup> : pic absent sur le spectre RMN

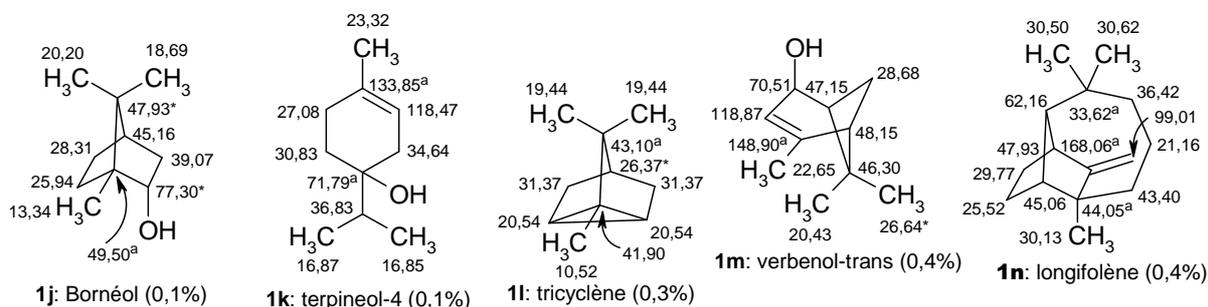
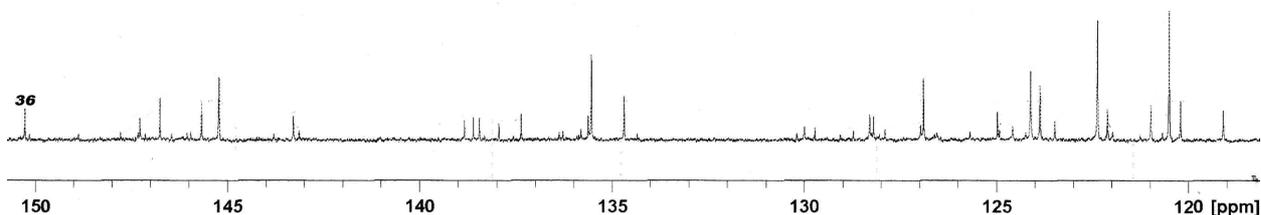


Figure 17: Identification des constituants 1j-1n de la fraction volatile PK1

\*: pics des différents constituants en superposition ; <sup>a</sup> : pic absent sur le spectre RMN.



Spectre 40: Portion du spectre de RMN-<sup>13</sup>C 155-110 ppm de la fraction non volatile de la résine Pk1

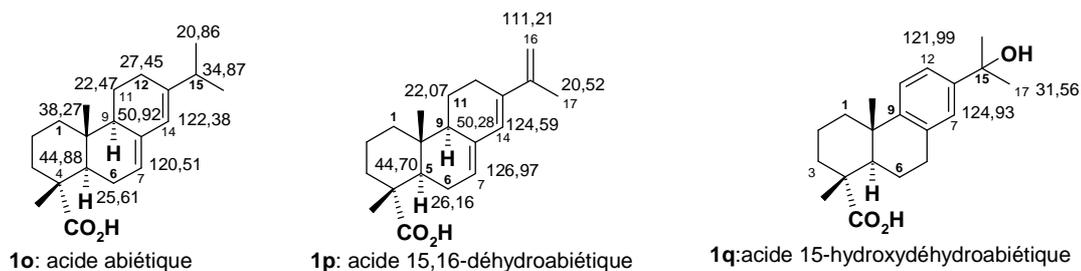


Figure 18: Identification des acides résiniques 1o-1q dérivant de l'abiétane de la fraction non volatile Pk1

On a rapporté seulement les déplacements chimiques  $\delta$  pour les pics appartenant en propre à chaque composé et qui serviront pour l'intégration en vue de la quantification.

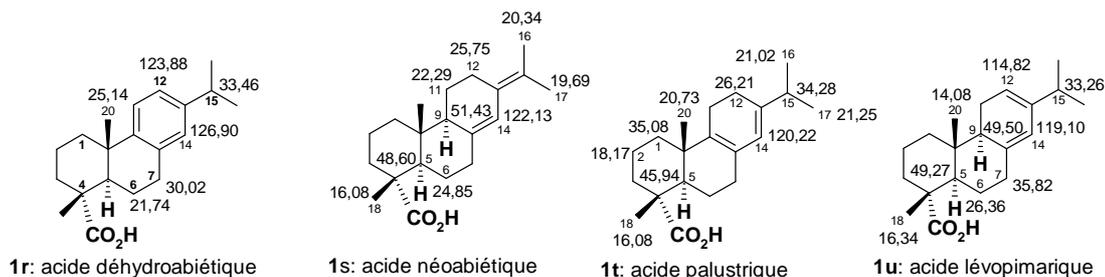
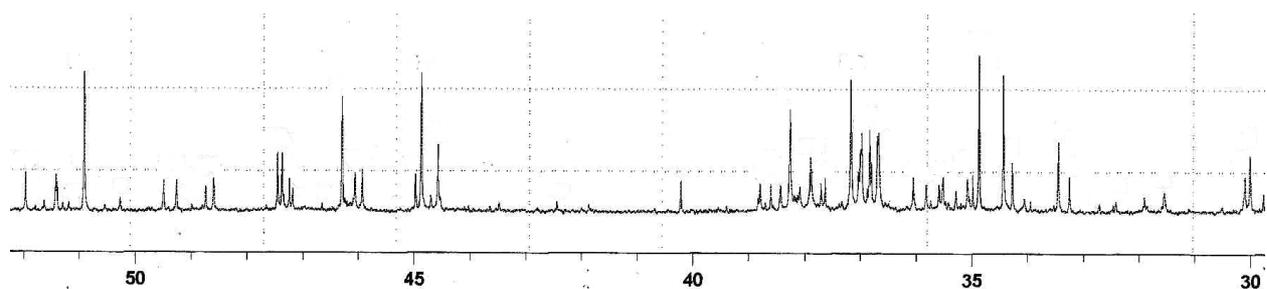
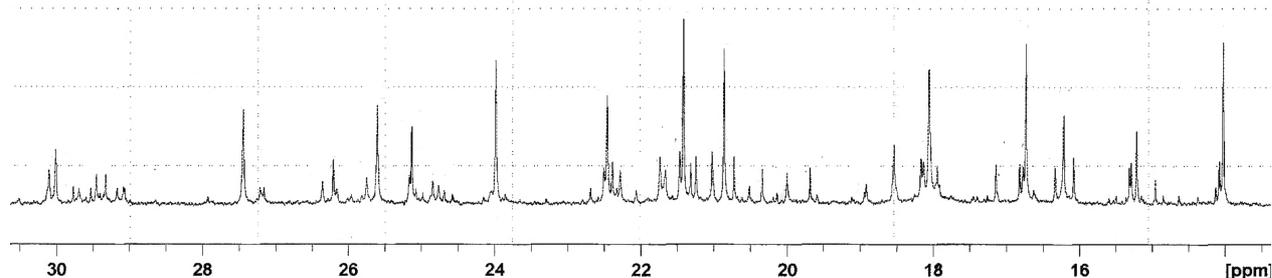


Figure 19: Identification des acides résiniques 1r-1u dérivant de l'abiétane de la fraction non volatile Pk1



Spectre 41: Portion de spectre 52-29 ppm de  $^{13}\text{C}$ -RMN de la fraction non volatile Pk1



Spectre 42 : Région 14-35 ppm de la fraction non volatile Pk1

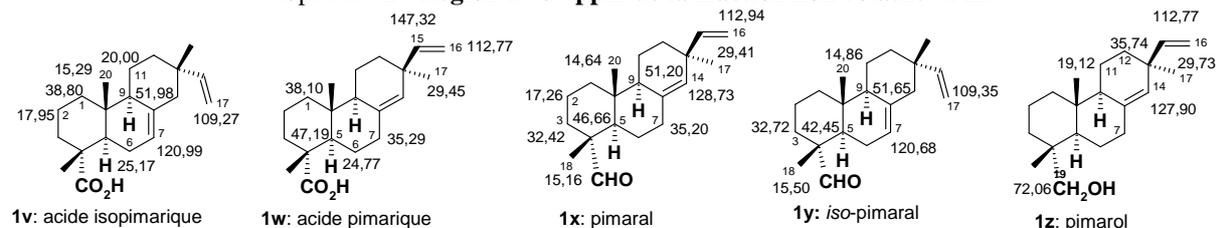


Figure 20: Acides et composés diterpéniques neutres de la fraction non volatile de Pk1

Seuls les carbones *protonés* appartenant en propre à chaque molécule et qui serviront plus tard pour l'intégration sont reportés sur la figure ci-dessus.

### Résine *P. kesiya* Pk2 provenant de Marovitsika

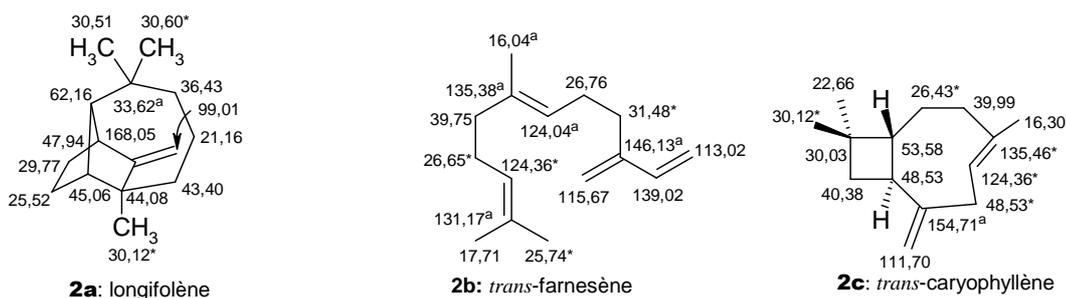


Figure 21: Identification des sesquiterpènes dans la fraction volatile Pk2

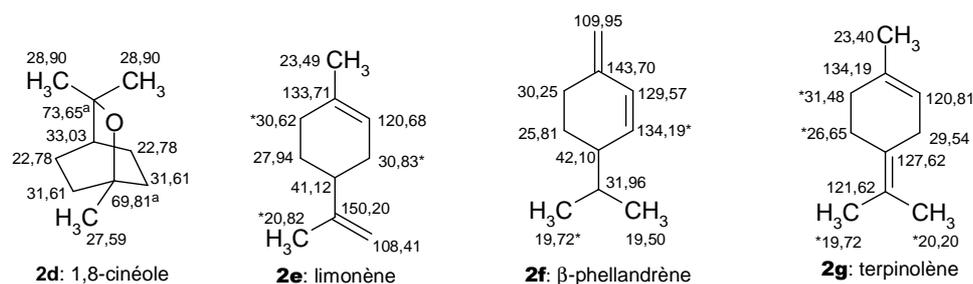


Figure 22: Identification du 1,8-cinéole, limonène et β-phéllandrène (coéluaux sur CPG) et le terpinolène

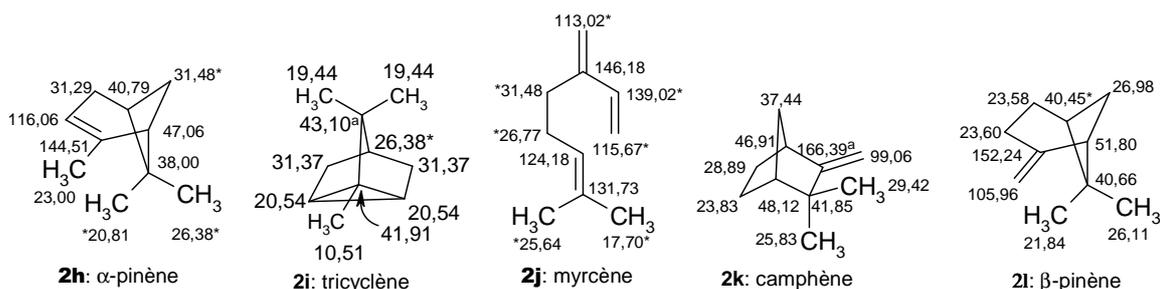
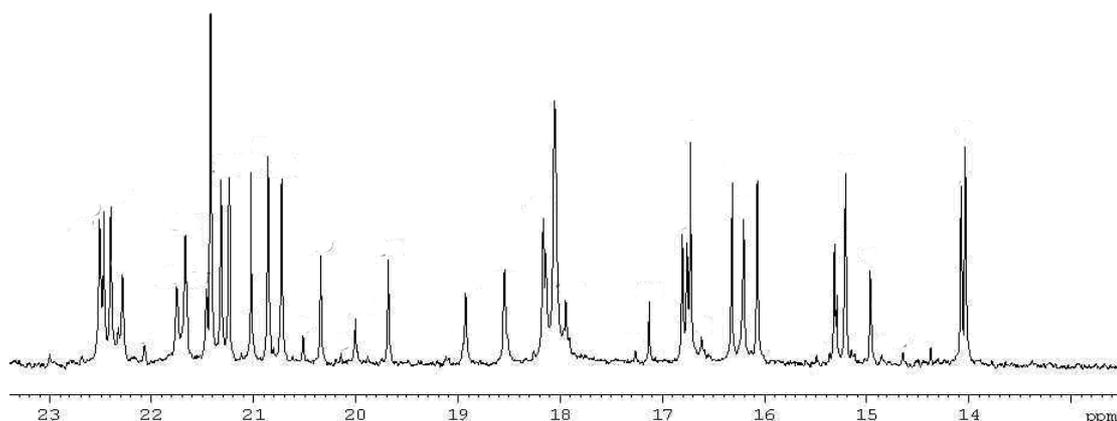


Figure 23 : Identification de l'α-pinène, tricyclène, myrcène, camphène et du β-pinène.



Spectre 43: Région du spectre de 14-23 ppm de la fraction non volatile Pk2.

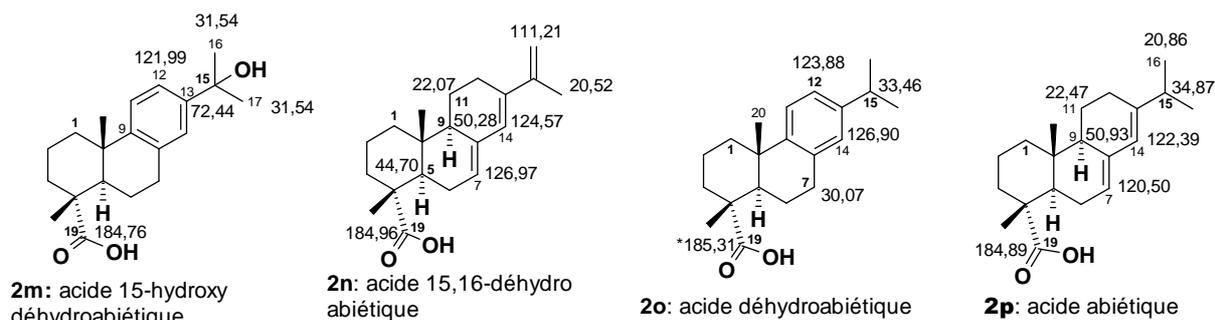
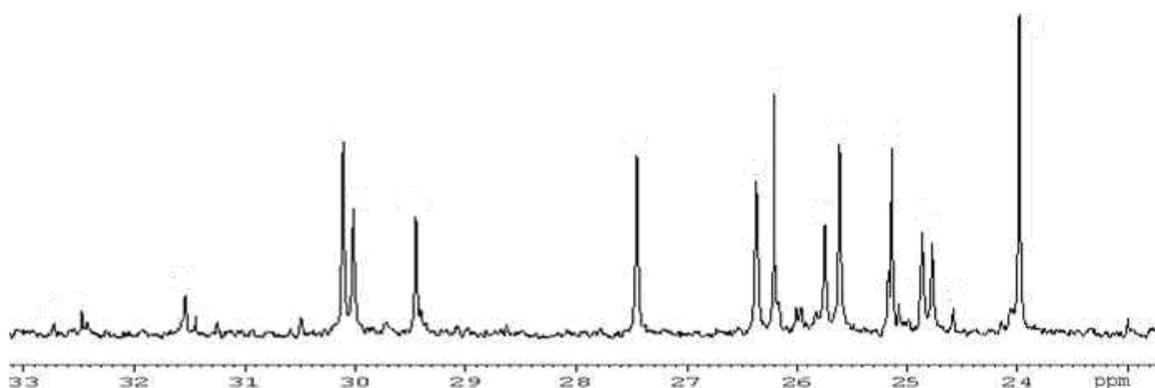


Figure 24: **Identification des acides 2m-2p dérivant du squelette abiétane de la fraction non volatile de Pk2**

Seuls les carbones *protonés* appartenant en propre à chaque molécule et qui serviront plus tard pour l'intégration sont reportés sur la figure à part des fonctions acides pouvant être communes et marquées alors par un astérisque.



Spectre 44 : Région 23-33 ppm de la fraction non volatile Pk2

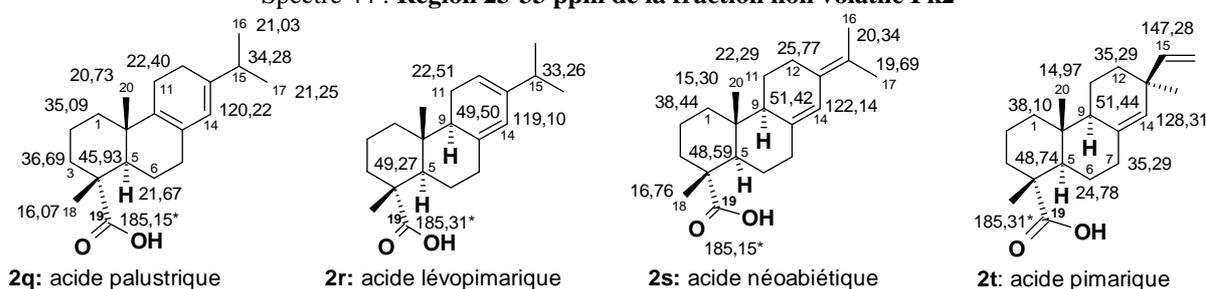
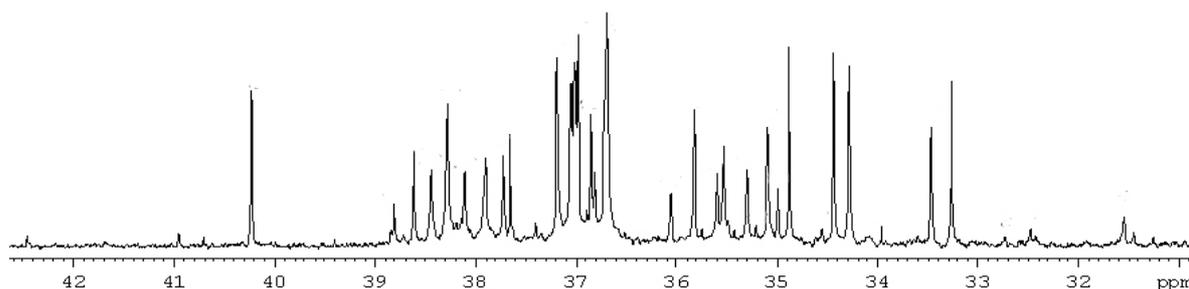


Figure 25: acides résiniques majeures 2q-2t de la fraction non volatile Pk2



Spectre 45: Portion 30-45 ppm du spectre de carbone-13 de la fraction non volatile Pk2

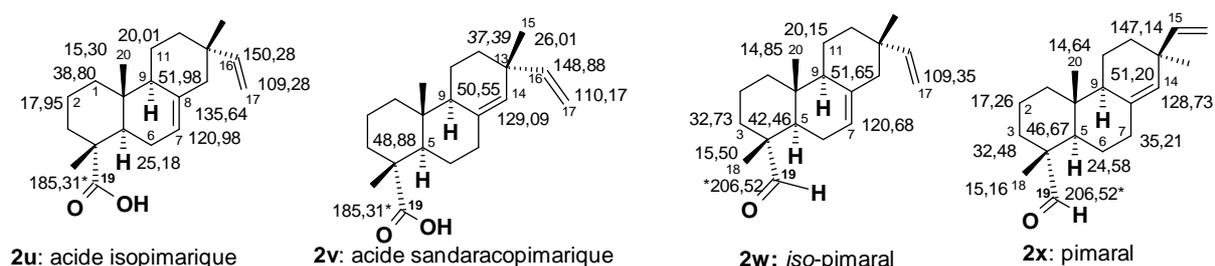
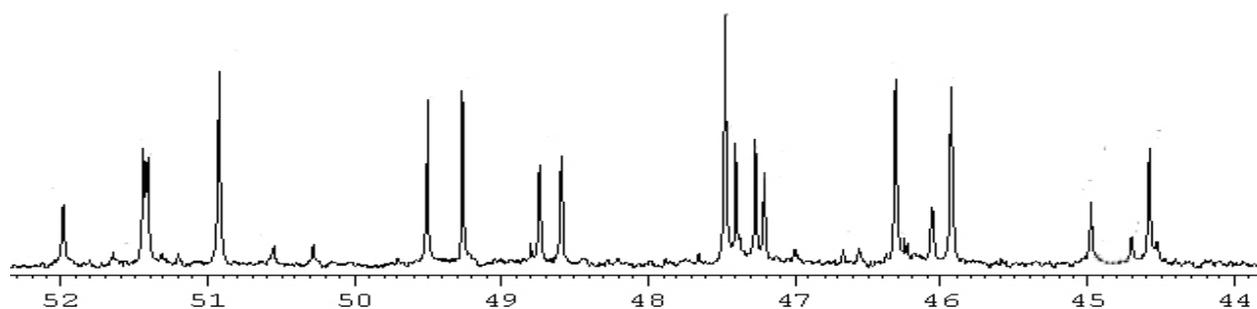
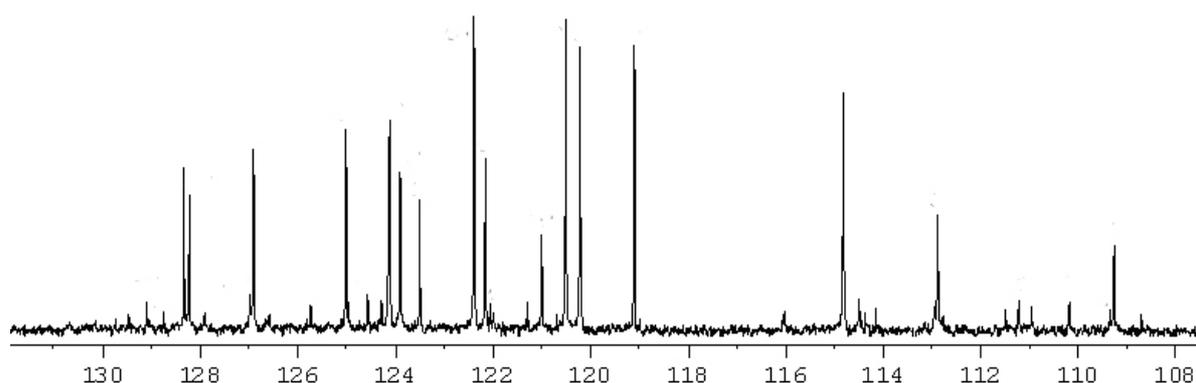


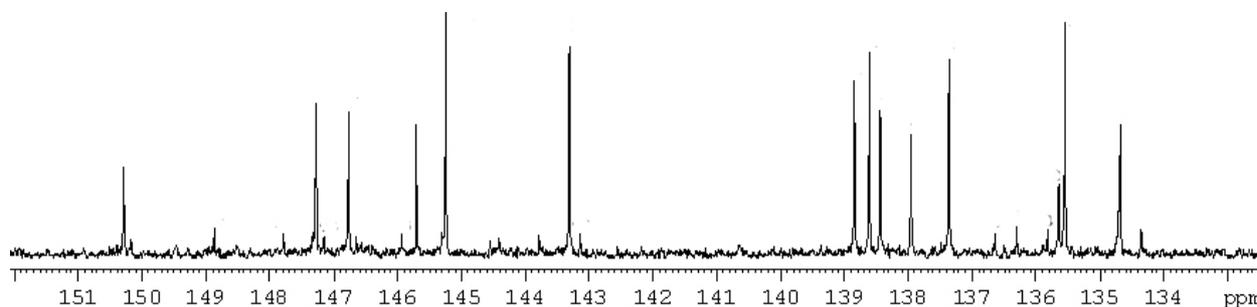
Figure 26: acides et diterpènes neutres 2u-2x de la fraction résinique de Pk2



Spectre 46: Région de 44 à 53 ppm des carbones asymétriques C4, C5 et C9 des constituants résiniques Pk2



Spectre 47: région 109-130 ppm des carbones oléfiniques protonés du spectre des constituants résiniques Pk2



Spectre 48: Région 133-151 ppm des carbones oléfiniques des constituants résiniques Pk2

### Résine *P. kesiya* Pk3 provenant de Viliahazo

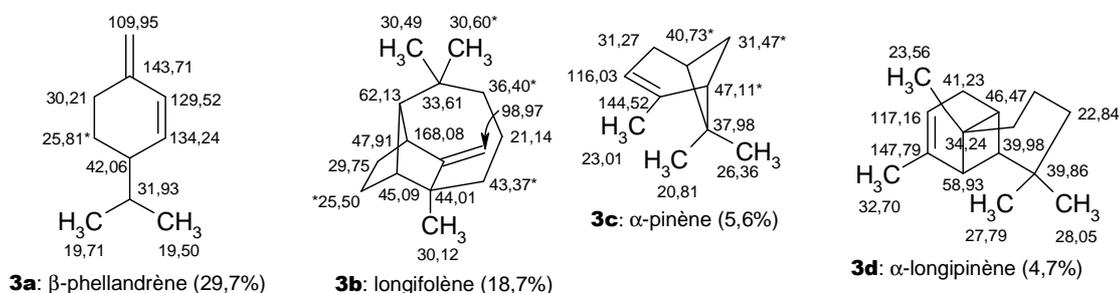


Figure 27: Individualisation des composés majoritaires 5-30% **3a-3d** de l'essence de térébenthine de Pk3

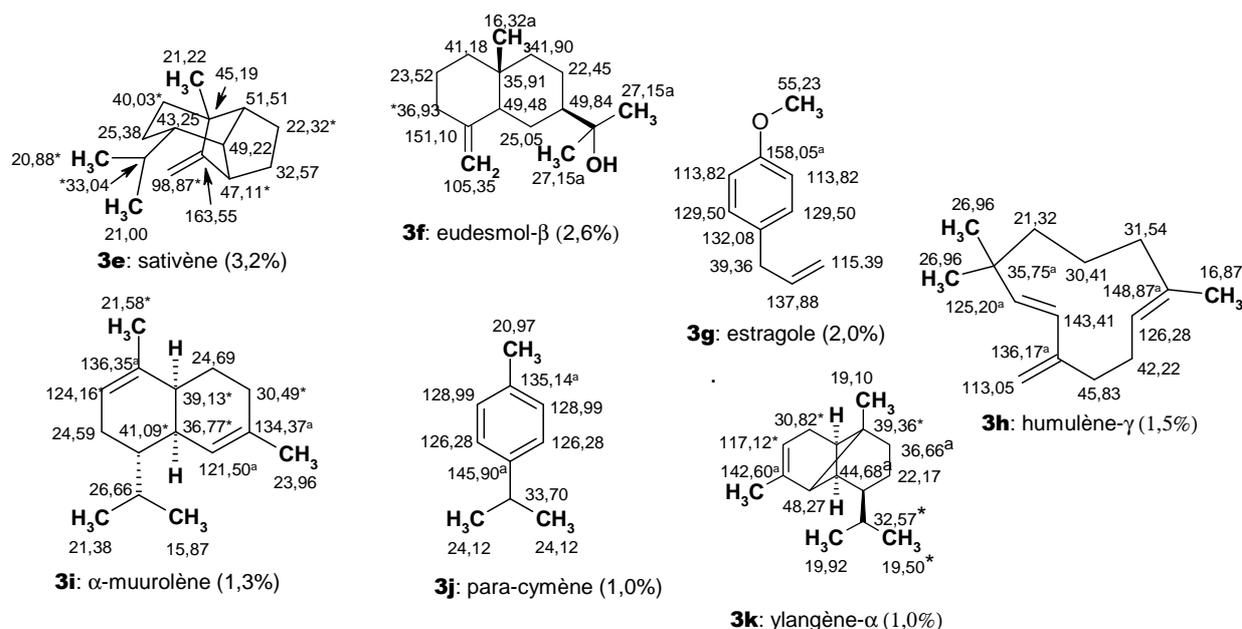


Figure 28 : Individualisation des monoterpènes et sesquiterpènes 1-3,2% de la fraction volatile Pk3

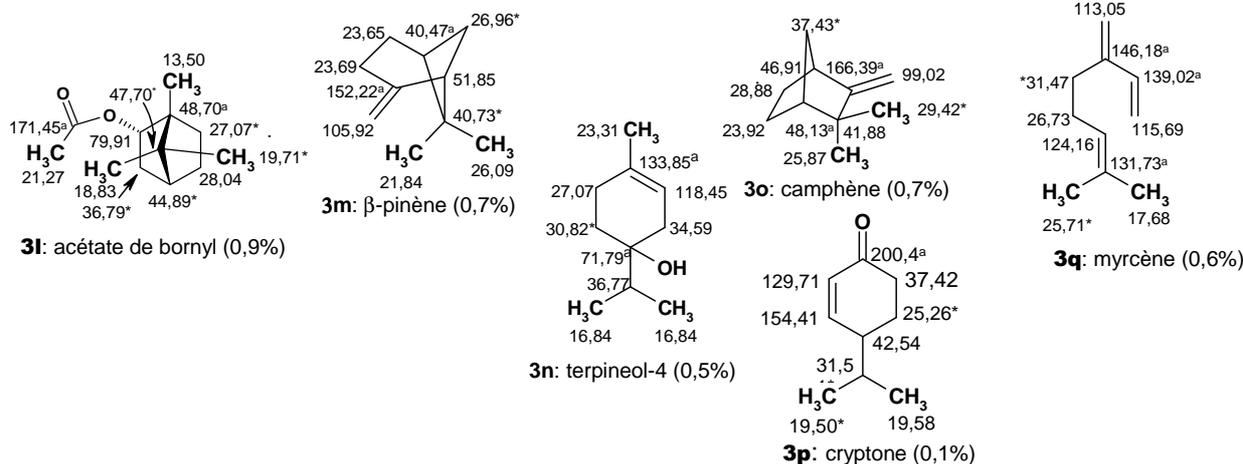


Figure 29 : individualisation des monoterpènes 3l-3q de la fraction volatile Pk3

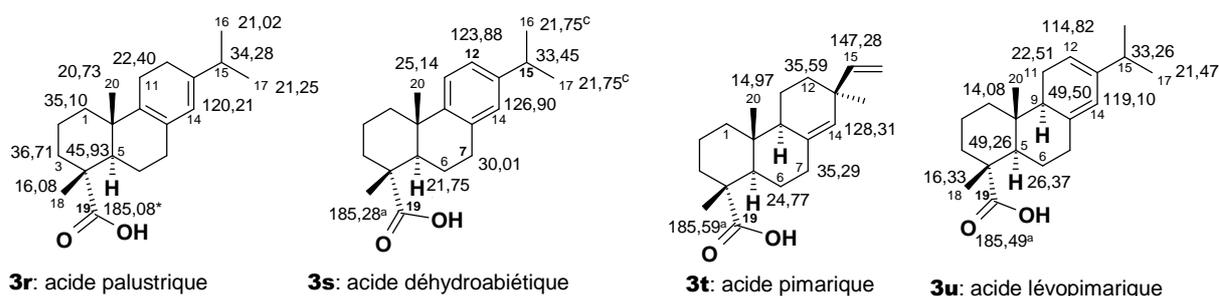
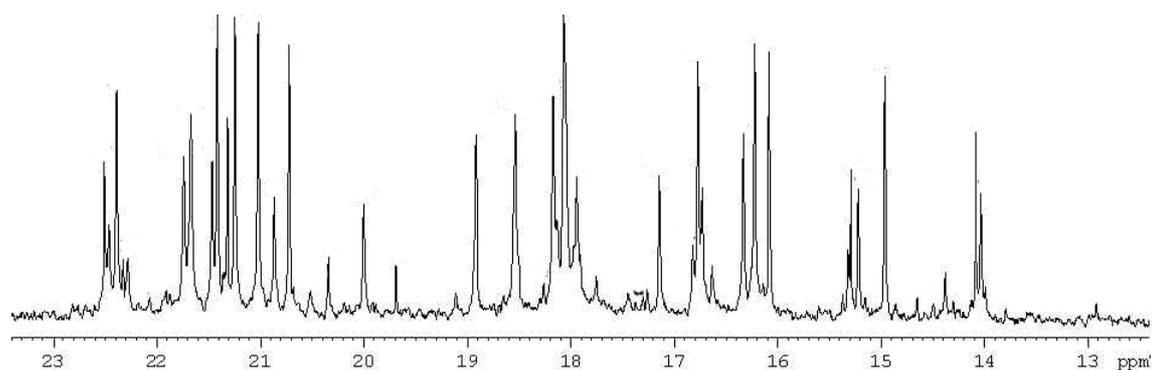
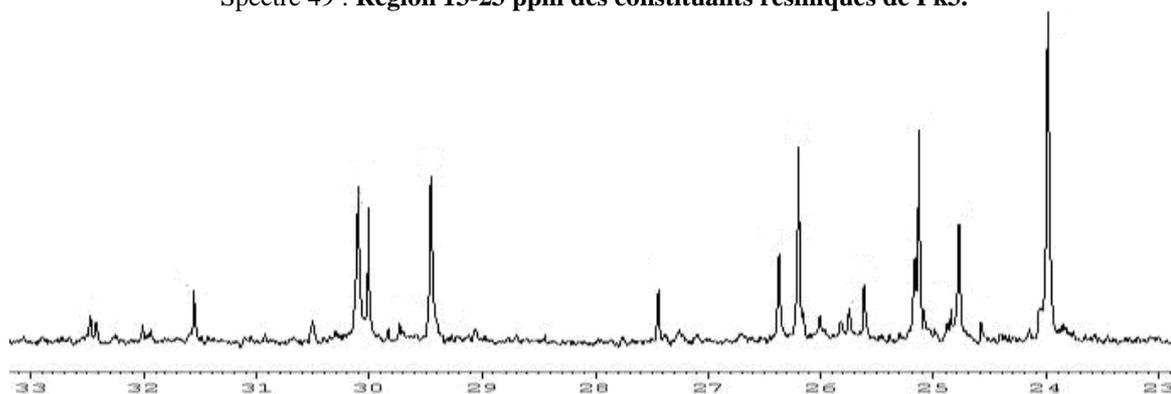


Figure 30: Individualisation des acides résiniques majeures dans la fraction non volatile Pk3

Les déplacements chimiques reportés concernent les pics des carbones protonés appartenant en propre à chaque constituant et servant par la suite à la quantification; avec astérisque sont ceux des fonctions acides en superposition, avec a signifie « absent » ; les pics avec c sont des caractéristiques aux constituants.



Spectre 49 : Région 13-23 ppm des constituants résiniques de Pk3.



Spectre 50: région 23-33 ppm des constituants résiniques de Pk3.

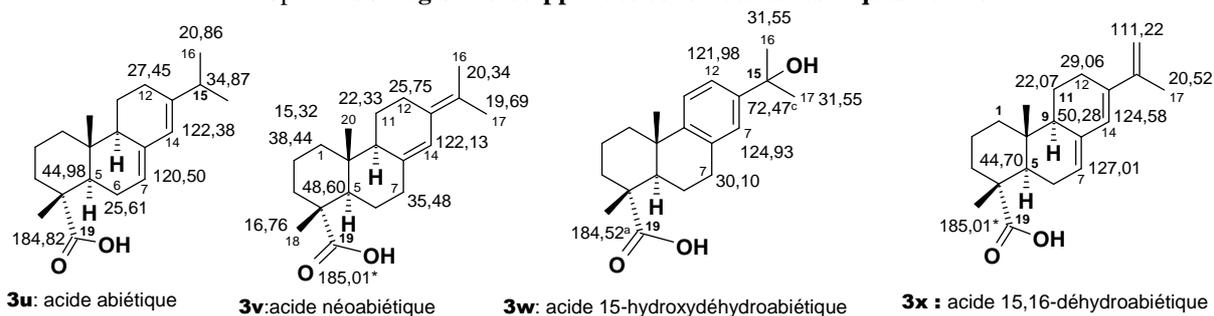
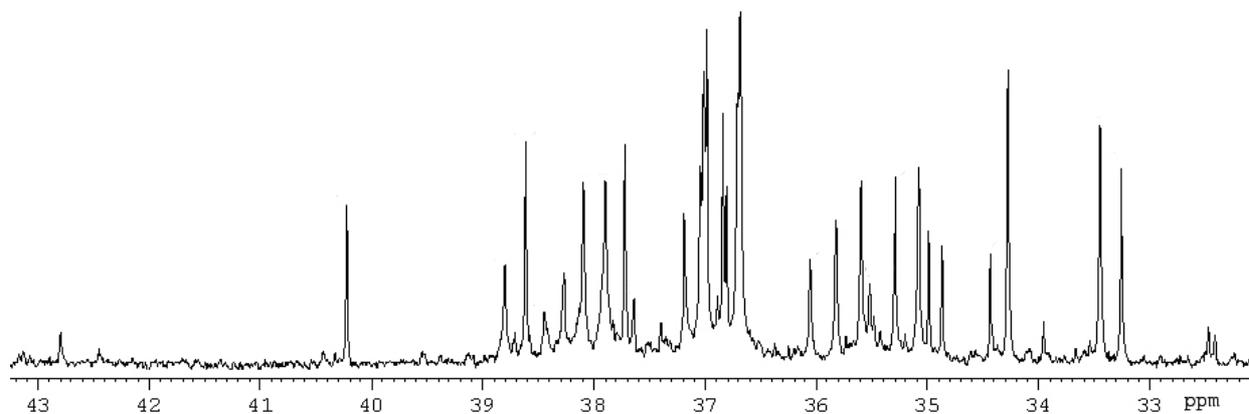
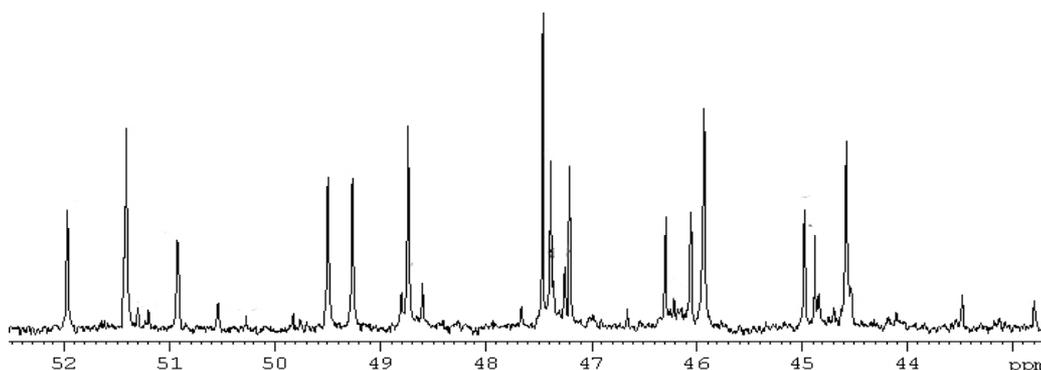


Figure 31: Individualisation des autres acides résiniques dérivant du squelette abiétane.

Les déplacements chimiques reportés concernent les pics des carbones protonés appartenant en propre à chaque constituant et servant par la suite à la quantification; avec astérisque sont ceux des fonctions acides en superposition, avec a signifie « absent » ; les pics avec c sont des caractéristiques aux constituants.



Spectre 51 : Région 30-44 ppm des constituants résiniques de Pk3



Spectre 52: région 43-53 ppm des carbones asymétriques C4, C5 et C9 des constituants résiniques de Pk3

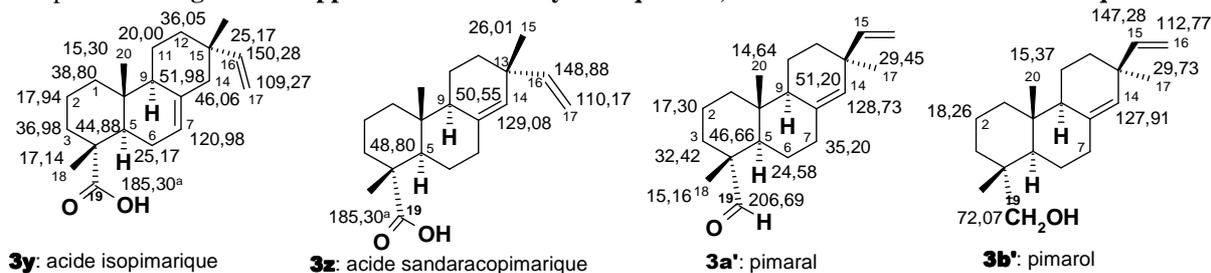
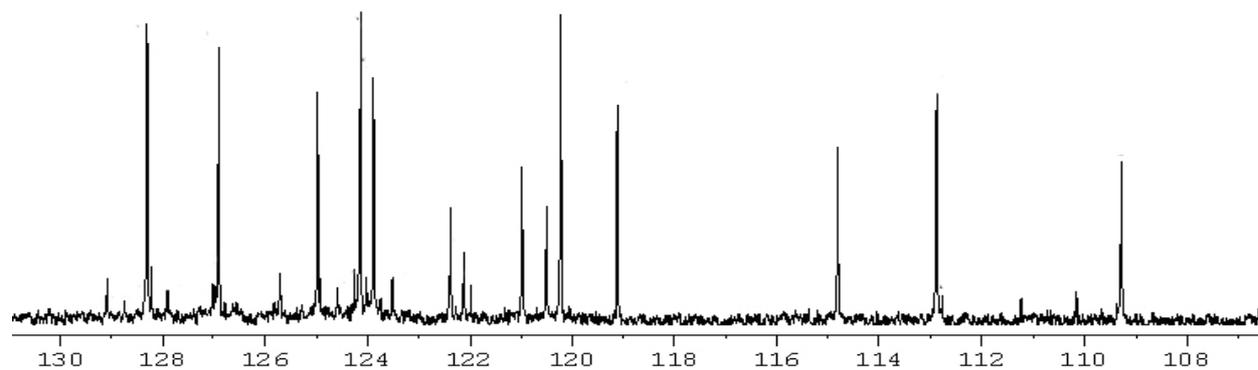
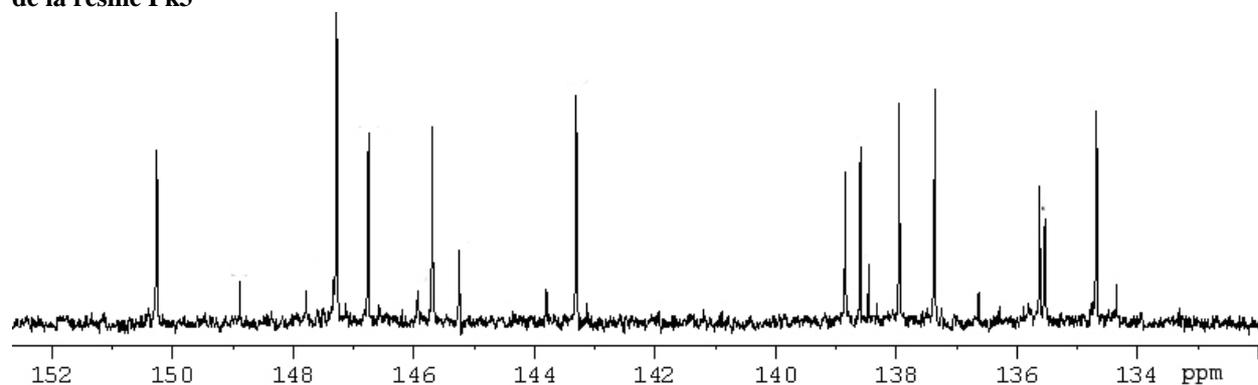


Figure 32: Individualisation de l'acide isopimarique et des dérivés minoritaires issus du pimarane

Les déplacements chimiques reportés concernent les pics des carbones protonés appartenant en propre à chaque constituant et servant par la suite à la quantification; avec astérisque sont ceux des fonctions acides en superposition, avec a signifie « absent » ; les pics avec c sont des caractéristiques aux constituants.



Spectre 53: région 110-130 ppm des carbones oléfiniques du cycle C des constituants de la fraction non volatile de la résine Pk3



Spectre 54 : Région 133-151 ppm des carbones oléfiniques des constituants résiniques de Pk3

### Annexes résine de *P. patula* provenant de Antsahamarofoza

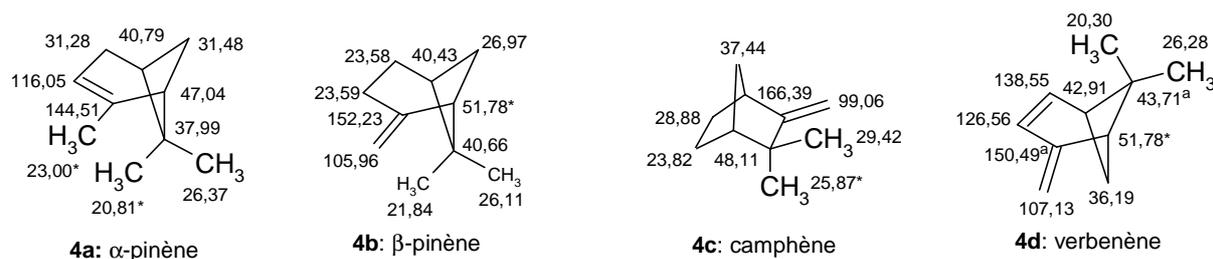


Figure 33: Individualisations des monoterpènes 4a-4d de la fraction volatile de l'échantillon *P. patula*

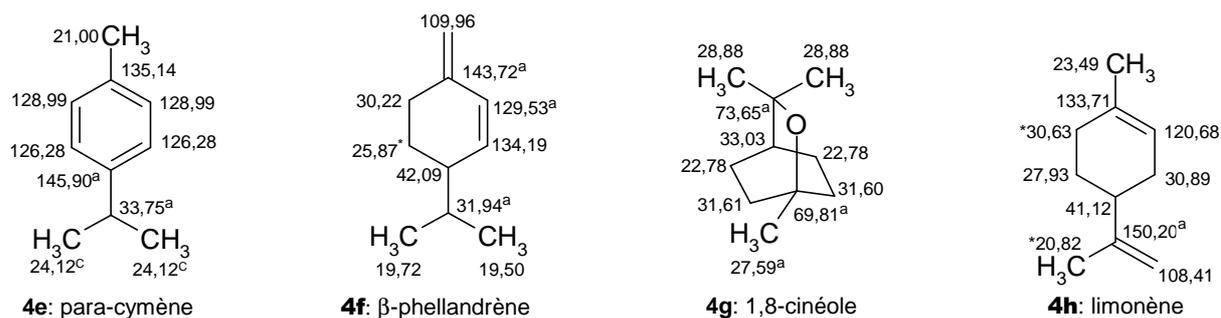


Figure 34: Individualisation des monoterpènes 4e-4h de la fraction volatile de l'échantillon *P. patula*

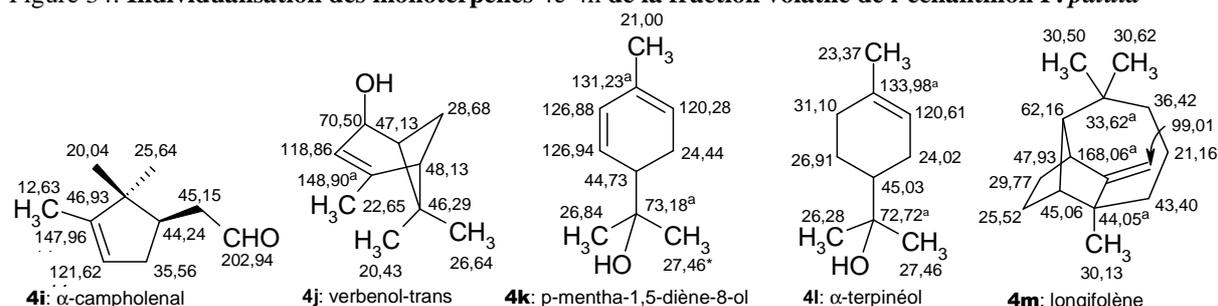
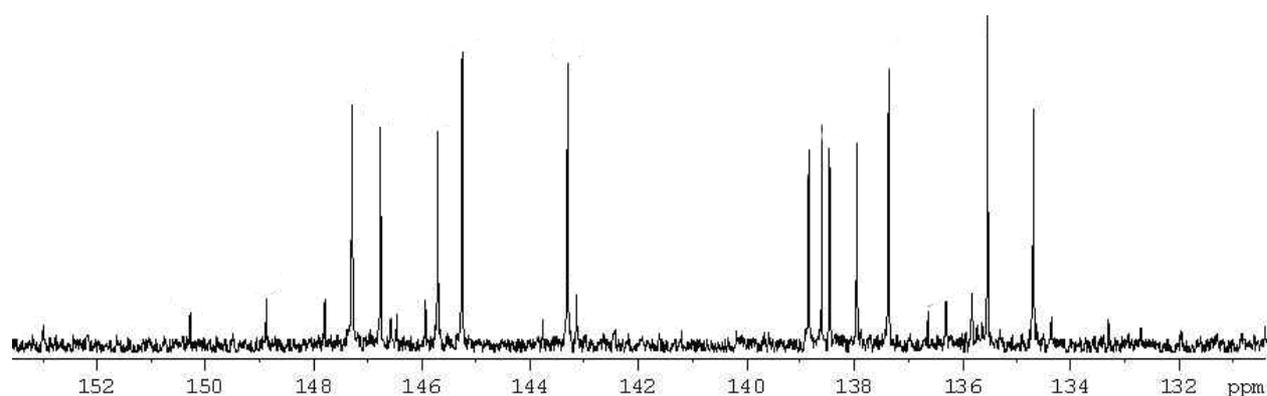
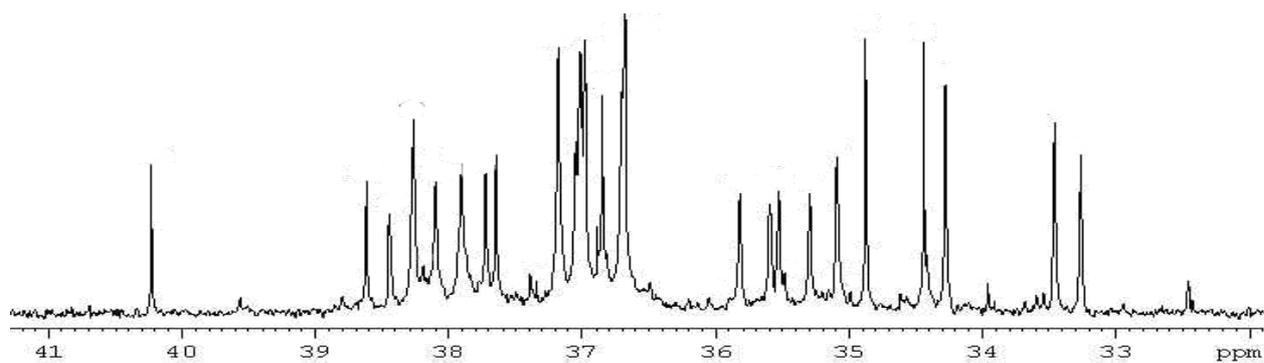


Figure 35: Individualisation des monoterpènes 4i-4m de la fraction volatile de l'échantillon *P. patula*



Spectre 55 : région 132-152 ppm comprenant les carbones oléfiniques IV des constituants résiniques Pp





Spectre 58 : région 32-41 ppm du spectre  $^{13}\text{C}$  des constituants résiniques de Pp

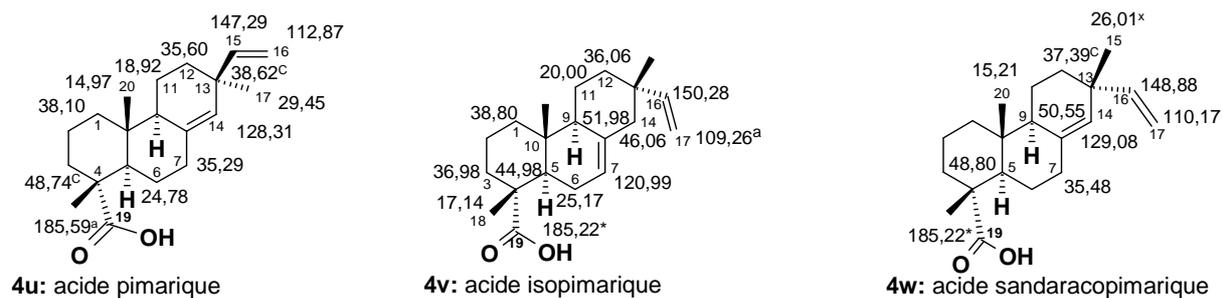
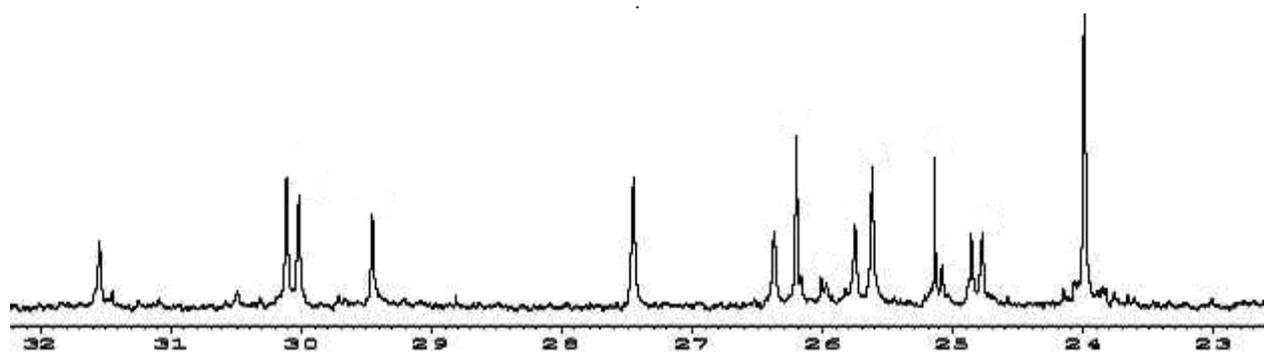
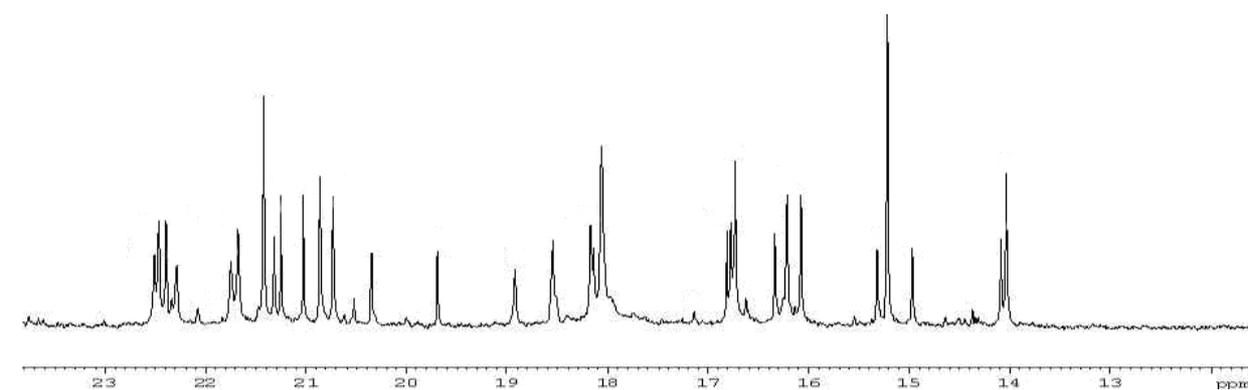


Figure 38 : identification des acides dérivés de squelette pimarane dans la fraction non volatile du Pp



Spectre 59: région 23-32 ppm des constituants résiniques de Pp



Spectre 60 : Région 13-23 ppm des constituants résiniques de Pp

## Annexes miels

**Tableau 81 : Déplacement chimique des formes tautomères du  $\alpha$ -et  $\beta$ -maltose selon Mazzoni et Bremer**

carbone	$\delta$ (Mazzoni)	$\delta$ (Bremsler)	carbone	$\delta$ (Mazzoni)	$\delta$ (Bremsler)
1	100,18( $\alpha$ )	100,63	1'	92,51 ( $\alpha$ )	92,92
	100,11( $\beta$ )	100,63		96,38 ( $\beta$ )	96,81
2	73,25 ( $\alpha\beta$ )	73,67	2'	71,95 ( $\alpha$ )	72,27
				74,67 ( $\beta$ )	75,01
3	73,52 ( $\alpha\beta$ )	73,85	3'	73,85 ( $\alpha$ )	74,16
				76,83 ( $\beta$ )	77,13
4	69,97 ( $\alpha\beta$ )	70,30	4'	77,48 ( $\alpha$ )	78,10
				77,31 ( $\beta$ )	77,92
5	72,39 ( $\alpha$ ) 72,30 ( $\beta$ )	72,64	5'	70,51 ( $\alpha$ )	70,94
				75,12 ( $\beta$ )	75,55
6	61,12 ( $\alpha\beta$ )	92,92 96,81	6'	61,22 ( $\alpha$ )	61,71
				61,36 ( $\beta$ )	61,71

**Tableau 82: Comparaison des déplacements chimiques des tautomères  $\alpha$ - et  $\beta$ -pyrane de l'isomaltose**

carbone	$\delta$ (Mazzoni)	$\delta$ (Bremsler)	carbone	$\delta$ (Mazzoni)	$\delta$ (Bremsler)
1	98,47 ( $\alpha\beta$ )	99,64 ( $\alpha\beta$ )	1'	92,80 ( $\alpha$ )	73,3 ( $\alpha$ )
				96,69 ( $\beta$ )	
2	72,33 ( $\alpha\beta$ )	73,3 ( $\alpha\beta$ )	2'	72,08 ( $\alpha$ )	75,9 ( $\beta$ )
				74,83 ( $\beta$ )	
3	73,73 ( $\alpha\beta$ )	75,0 ( $\alpha\beta$ )	3'	73,69 ( $\alpha$ )	75,0 ( $\alpha$ )
				76,61 ( $\beta$ )	
4	70,03 ( $\alpha\beta$ )	71,3 ( $\alpha\beta$ )	4'	70,12 ( $\alpha\beta$ )	77,7 ( $\beta$ )
				70,58 ( $\alpha$ )	
5	72,08 ( $\alpha\beta$ )	73,8 ( $\alpha\beta$ )	5'	74,72 ( $\beta$ )	71,3 ( $\alpha\beta$ )
				66,22 ( $\alpha\beta$ )	
6	61,08 ( $\alpha\beta$ )	62,5 ( $\alpha\beta$ )	6'	66,22 ( $\alpha\beta$ )	71,3 ( $\alpha$ )

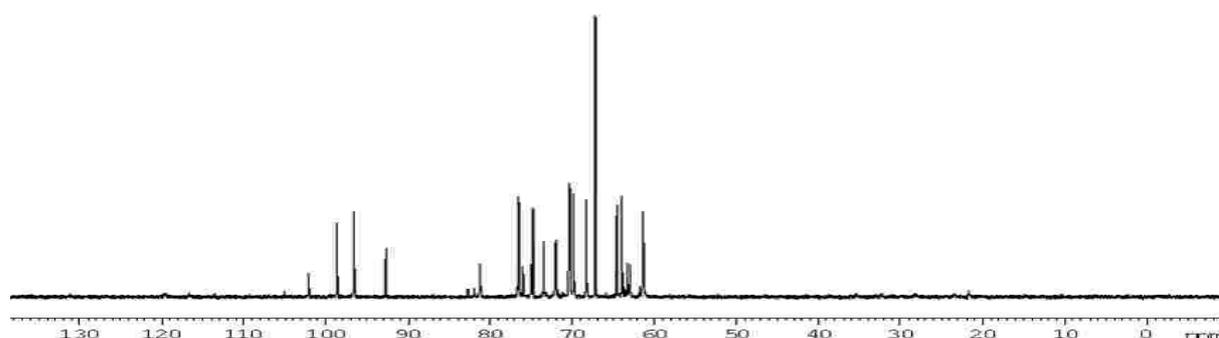
**Tableau 83: Déplacements chimiques des tautomères de l'isomaltriose selon Mazzoni et Friebohn**

<sup>13</sup> C	$\delta$ (Mazzoni)	$\delta$ (Friebohn)	<sup>13</sup> C	$\delta$ (Mazzoni)	$\delta$ (Frieb.)	<sup>13</sup> C	$\delta$ (Mazzoni)	$\delta$ (Frieb.)
1	98,43 ( $\alpha\beta$ )	98,5	1'	98,28 ( $\alpha\beta$ )	98,2	1''	92,81 ( $\alpha$ )	92,2
							96,69 ( $\beta$ )	96,8
2	72,38 ( $\alpha\beta$ )	72,2	2'	72,38 ( $\alpha\beta$ )	72,2	2''	72,02 ( $\alpha$ )	72,3
							74,76 ( $\beta$ )	76,7
3	73,75 ( $\alpha\beta$ )	73,3	3'	73,75 ( $\alpha\beta$ )	73,3	3''	73,75 ( $\alpha$ )	73,3
							76,64 ( $\beta$ )	76,7
4	*70,14 ( $\alpha\beta$ )	70,3	4'	70,76 ( $\alpha\beta$ )	70,3	4''	*70,08 ( $\alpha\beta$ )	70,3
5	72,10 ( $\alpha\beta$ )	72,0	5'	*70,23 ( $\alpha\beta$ )	70,3	5''	70,50 ( $\alpha$ )	70,8
							74,01 ( $\beta$ )	74,7
6	61,12 ( $\alpha\beta$ )	60,9	6'	66,04 ( $\alpha\beta$ )	66,3	6''	66,30 ( $\alpha\beta$ )	67,0

\* : Valeurs interchangeables selon les travaux de Mazzoni.

**Tableau 84: Déplacements chimiques du mélézitose selon Mazzoni et Bresmer**

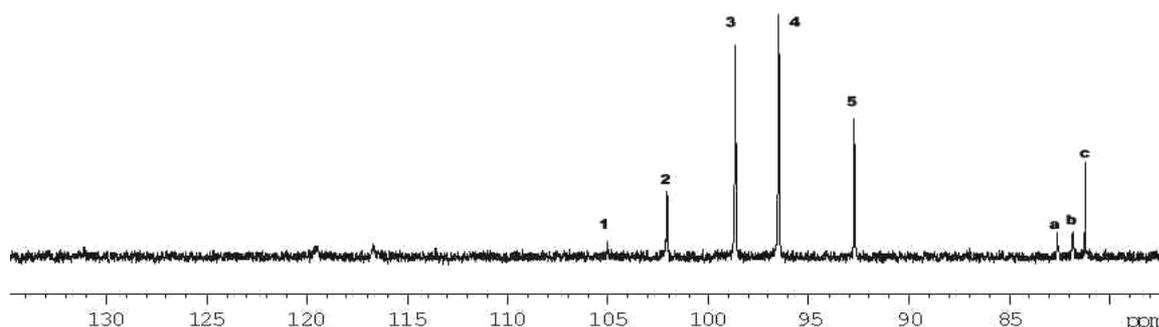
<sup>13</sup> C	$\delta$ (Mazzoni)	$\delta$ (Bremsler)	<sup>13</sup> C	$\delta$ (Mazzoni)	$\delta$ (Bremsler)	<sup>13</sup> C	$\delta$ (Mazzoni)	$\delta$ (Bremsler)
1	92,29	93,59	1'	62,65	63,67	1''	100,82	99,95
2	71,62	73,45	2'	104,22	106,07	2''	72,09	73,72
3	73,49	74,88	3'	81,75	83,20	3''	73,85	75,31
4	70,26	71,77	4'	73,76	75,02	4''	70,14	
5	72,88	74,33	5'	83,81	84,42	5''	72,76	74,18
6	61,23	62,45	6'	62,8		6''	60,97	



**Spectre 61 : Spectre en entier typique des miels d'échantillon à 100 MHz**

Largeur spectrale : 250 ppm ; système de solvant : H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O : 95 :5 en volume ; référence interne : dioxane-1,4 à 67,12 ppm.

Un spectre d'un échantillon de miel, dominé par les pics des isomères du D-glucose et du D-fructose et qui sont les constituants majoritaires des miels enregistrés dans les conditions standard ne diffère pas dans l'apparence générale à un spectre d'un autre échantillon de miel.

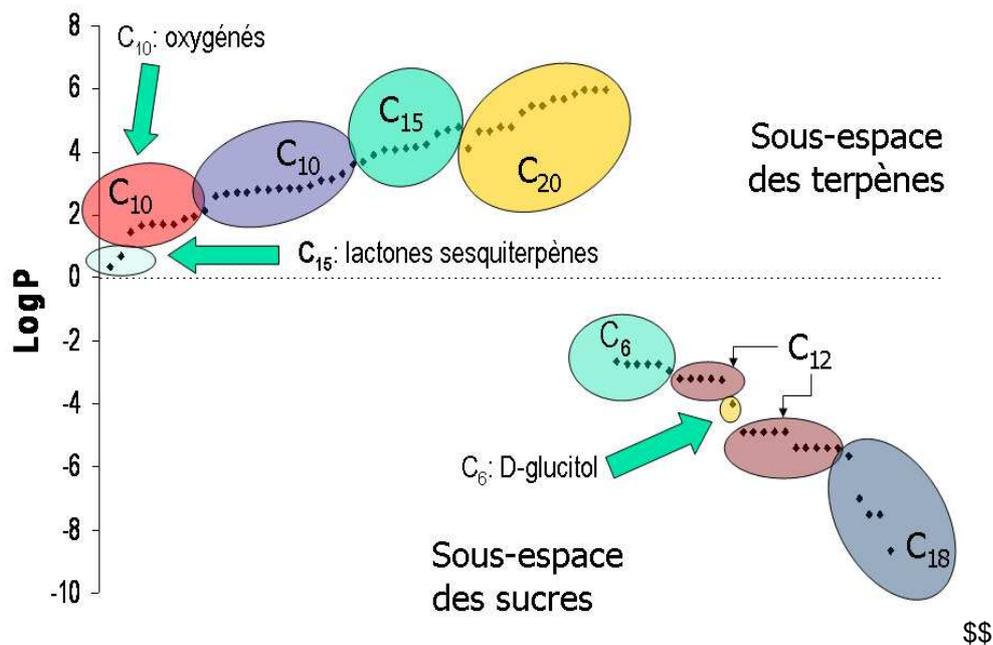


**Spectre 62: Spectre typique de la région des carbones anomériques et glycosidiques des miels à 100 MHz**

**1-5** : pics des carbones anomériques et glycosidiques. **1** : carbone glycosidique C2  $\alpha$ -fructofuranose (aFF), 105,02ppm ; **2** : carbone glycosidique C2  $\beta$ -fructofuranose (bFF), 102,09 ppm ; **3** : carbone anomérique C2  $\beta$ -fructopyranose (bFP), 98,67 ppm ; **4** : carbone anomérique C1  $\beta$ -glucopyranose, 96,51 ppm ; **5** : carbone anomérique C1,  $\alpha$ -glucopyranose (aGP), 92,70 ppm. - **a** : C3  $\alpha$ -fructofuranose, 82,63 ppm ; **b** : C5  $\alpha$ -fructofuranose, 81,85 ppm ; **c** : C5  $\beta$ -fructofuranose à 81,23 ppm.

## Identification du D-glucitol dans les échantillons de miel 1-6

Le carbone <sup>13</sup>C identifié est suivi de son déplacement chimique en ppm, puis de l'intensité relative de son pic par rapport au pic de dioxane-1,4 (ramenée à 100) et du nombre de superposition. *D-glucitol miel1 (Eucalyptus)*, teneur 0,7% : C-1(73,58 ; 1,58 ; 3); C-2(71,75 ; 0,86 ; 0); C-3 (71,72; 0,80; 0) ; C-4 (70,29; 1,13; 0) ; C-5(  $\delta$  3,43; 1,07; 3) ; C-6 (63,12 ; 1,14 ; 0). *D-glucitol miel2 (forêts)*, teneur 0,4% : C-1 (73,58 ; 0,41 ;3) ; C-2 (71,74 ; 0,49 ;0) ; C-3(-) ; C-4 (70,32 ;53,64 ;2) ; C-5 (63,46 ; 0,59 ;0) ; C-6 (63,08 ; 0,79 ;0). *D-glucitol miel3 (letchis)*, teneur 0,3% : C-1 (73,54 ; 0,27, 5) ; C-2 (71,76 ; 0,97 ; 2) ; C-3 (71,65 ; 0,16 ; 2) ; C-4 (70,26 ; 5,94 ; 4) ; C-5 (63,46 ; 0,17 ; 0) ; C-6 (63,11 ; 0,19 ; 0). *D-glucitol miel4 (Morondava)* teneur 0,3% : C-1 (73,59 ; 0,37 ; 2) ; C-2 (71,78 ; 1,34 ; 0) ; C-3 (71,55 ; 0,36 ; 0) ; C-4 (70,26 ; 12,81 ; 4) ; C-5 (63,47 ;0,62 ;2) ; C-6 (63,11 ; 0,43 ; 0). *D-glucitol miel5 (Famille Michaud)*, teneur : 0,4% : C-1 (73,54 ; 0,68 ; 4) ; C-2 (71,78 ; 0,34 ; 0) ; C-3 (71,68 ; 0,27 ;0) ; C-4 (70,26 ; 8,22 ; 2) ; C-5 (63,46 ; 0,28 ; 0) ; C-6 (63,07 ; 0,29 ; 0). *D-glucitol miel 6 (Elisa)*, teneur 0,3% : C-1 (73,58 ; 0,68 ; 4) ; C-2 (71,78 ; 0,34 ; 0) ; C-3 (-) ;C-4 (70,29 ; 16,10 ; 4) ; C-5 (63,47 ; 0,42 ; 0) ; C-6 (63,16 ; 0,28 ; 0)



Graphique 14 : Espaces chimiques des diversités moléculaires provenant des ressources étudiées

LogP : variable descripteur d'hydrophobicité basé sur le coefficient de partition octanol :H<sub>2</sub>O calculé avec la méthode de Marvin utilisant les conditions suivantes :

$$\text{LogP} = \frac{[\text{soluté}]_{\text{oc tan ol}}}{[\text{soluté}]_{\text{eau}}} ;$$

pour les solutés ionisables, on ajuste le pH de telle façon que la forme non ionisée du soluté prédomine dans la phase aqueuse :

$$\text{LogP} = \frac{[\text{soluté}]_{\text{oc tan ol}}}{[\text{soluté non ionisé}]_{\text{eau}}} ; \text{ avec } [\text{Cl}^-] = [\text{Na}^+] = [\text{K}^+] = 0,01$$

## Listes des illustrations

### Diagrammes

Diagramme <b>1</b> : Séquence d'impulsion de base d'expérience de spin écho .....	12
Diagramme 2 : séquence d'impulsion APT.....	12
Diagramme <b>3</b> : séquence DEPT avec découplage .....	14
Diagramme 4 : séquence de base HETCOR.....	15
Diagramme 5 : séquence FLOCK .....	16
Diagramme <b>6</b> : Séquence de base NOESY .....	17
Diagramme <b>7</b> : Séquence de différence NOE ou DNOE .....	17

### Figures

Figure 1: représentation schématiques des Voies A, B et C .....	4
Figure <b>2</b> : Quelques composés lactones sesquiterpéniques avec activités biologiques représentatives .....	7
Figure <b>3</b> : Exemples de route synthétique assymétrique vers l'unité $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone.....	8
Figure 4: Différents types de squelette des lactones sesquiterpènes naturels .....	8
Figure 5: Connectivité en expérience SINEPT.....	14
Figure 6: Conformations du germacranolide <b>A9</b> .....	32
Figure 7 : Protocole expérimentale d'analyse des mélanges complexes par RMN du carbone-13.....	56
Figure 8: Courbe de restitution de l'aimantation (S/B) des noyaux $^{13}\text{C}$ en fonction de l'angle d'impulsion $\alpha$ .....	59
Figure 9: <b>minoritaires</b> de la sous-région spectrale entre 60-66 ppm du miel d'eucalyptus .....	81
Figure 10: <b>minoritaires</b> de la sous-région anomérique entre 90 et 105 ppm du miel des forêts .....	84
<b>Figure 11</b> : Equilibre mutarotationnel du glucose en solution dans le $\text{D}_2\text{O}$ à $31^\circ\text{C}$ d'après Angyal.....	100
Figure 12: <b>Quelques oligosaccharides rapportés dans des échantillons de miel de Maroc et de France</b> .....	104
Figure 13 : <b>Quelques trisaccharides identifiés dans des miels de France étudiés par Cotte et coll.</b> .....	105
Figure <b>14</b> : Variation des déplacements chimiques pour les carbones des différents constituants représentatifs d'une résine. (Réf. Rezzi).....	117
Figure 15: Individualisation des composés 1a-1e fraction volatile Pk1 .....	120
Figure <b>16</b> : <b>Identification des constituants 1f-1i de la fraction volatile Pk1</b> .....	120
Figure 17: Identification des constituants 1j-1n de la fraction volatile PK1.....	120
Figure 18: <b>Identification des acides résiniques 1o-1q dérivant de l'abiétane de la fraction non volatile Pk1</b> .....	121
Figure 19: <b>Identification des acides résiniques 1r-1u dérivant de l'abiétane de la fraction non volatile Pk1</b> .....	121
Figure 20: <b>Acides et composés diterpéniques neutres de la fraction non volatile de Pk1</b> .....	121
Figure 21: Identification des sesquiterpènes dans la fraction volatile Pk2 .....	122
Figure 22: Identification du 1,8-cinéole, limonène et $\beta$ -phéllandrene (coéluaants sur CPG) et le terpinolène.....	122
Figure 23 : Identification de l' $\alpha$ -pinène, tricyclène, myrcène, camphène et du $\beta$ -pinène. ....	122
Figure 24: <b>Identification des acides 2m-2p dérivant du squelette abiétane de la fraction non volatile de Pk2</b> .....	123
Figure 25: <b>acides résiniques majeures 2q-2t de la fraction non volatile Pk2</b> .....	123
Figure 26: <b>acides et diterpènes neutres 2u-2x de la fraction résinique de Pk2</b> .....	123
<b>Figure 27</b> : <b>Individualisation des composés majoritaires 5-30% 3a-3d de l'essence de térébenthine de Pk3</b> .....	124
<b>Figure 28</b> : <b>Individualisation des monoterpènes et sesquiterpènes 1-3,2% de la fraction volatile Pk3</b> .....	125
Figure 29 : individualisation des monoterpènes 3l-3q de la fraction volatile Pk3 .....	125
Figure 30: <b>Individualisation des acides résiniques majeures dans la fraction non volatile Pk3</b> .....	125
Figure 31: <b>Individualisation des autres acides résiniques dérivant du squelette abiétane</b> .....	126
Figure 32: <b>Individualisation de l'acide isopimarique et des dérivés minoritaires issus du pimarane</b> .....	127
Figure 33: <b>Individualisations des monoterpènes 4a-4d de la fraction volatile de l'échantillon P. patula</b> .....	128
Figure 34: <b>Individualisation des monoterpènes 4e-4h de la fraction volatile de l'échantillon P. patula</b> .....	128
Figure 35: <b>Individualisation des monoterpènes 4i-4m de la fraction volatile de l'échantillon P. patula</b> .....	128
Figure 36 : <b>identification des acides 4n-4q du squeletteabiétane de la fraction non volatile Pp</b> .....	129
Figure 37 : <b>Caractérisation des autres acides du squelette abiétane de la fraction non volatile provenant de Pp</b> .....	129
Figure 38 : <b>identification des acides dérivés de squelette pimarane dans la fraction non volatile du Pp</b> .....	130

### Graphiques

Graphique 1: pourcentage en masse des sucres par rapport aux sucres totaux du miel d'eucalyptus.....	82
<b>Graphique 2</b> : Simulation graphique de la région spectrale entre 67-60 ppm du miel des forêts de Madagascar .....	84
Graphique 3 <b>Composition par classe de sucre par rapport aux sucres totaux du miel des forêts de Madagascar</b> .....	86
<b>Graphique 4</b> : <b>Composition par classe de sucre par rapport aux sucres totaux du miel de letchis</b> .....	88
Graphique 5: Simulation du spectre de la région 80-105 ppm des minoritaires du miel Morondava.....	89

Graphique 6: <b>Simulation des spectres des pics des minoritaires de la région 60-80 ppm du miel Morondava</b> .....	90
Graphique 7 : composition par classe de sucre par rapport aux sucres totaux du miel de Morondava .....	91
Graphique 8: <b>Minoritaires dans la région anomérique de 105-80 ppm du miel 5</b> .....	92
Graphique 9 : Composition par classe de sucres par rapport aux sucres totaux du miel Michaud de Corse.....	94
Graphique 10 : Proportion en masse des classes de sucre par rapport au total des sucres quantifiés du miel « Elisa » .....	96
<b>Graphique 11</b> : ratio des classes des sucres par rapport aux sucres totaux quantifiés du miel de bruyère.....	98
Graphique 12: Ratio en masse des sucres du miel de maquis par rapport aux sucres totaux.....	99
Graphique 13 : Courbe de restitution de magnétisation expérimentale à 400 MHz.....	118
Graphique 14 : Espaces chimiques des diversités moléculaires provenant des ressources étudiées .....	133
<b>Schémas</b>	
<b>Schéma 1</b> : Résonance du lactone et conjugaison dans l'unité $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone.....	9
Schéma 2: séquence de COSY90.....	15
Schéma 3: séquence de LRCOSY.....	15
<b>Schéma 4</b> : pics croisés entre les protons en C2 et C3 en COSY .....	26
<b>Schéma 5</b> système de spin 1 établi par couplage 1H COSY, expérience HETCOR et LRCOSY.....	26
Schéma 6 : 2 <sup>ème</sup> système de spin $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ de A9 .....	26
<b>Schéma 7</b> : Etablissement des connectivités par couplage allylique détectés par LRCOSY.....	27
Schéma 8: étude de connectivité par détection des corrélations hétéronucléaires par FLOCK .....	28
<b>Schéma 9</b> : Connectivité de la face $\beta$ par DNOE et NOESY .....	29
Schéma 10: relation de connectivité de la face $\alpha$ utilisant DNOE et NOESY.....	30
<b>Schéma 11</b> : relation de proximité des faces $\alpha$ et $\beta$ démontrant le relation trans de la jonction C7-C8.....	31
Schéma 12: <b>différents types d'édition de spectre de carbone</b> .....	56
<b>Spectres</b>	
Spectre 1 : Individualisation des signaux $^1\text{H}$ dans le dichlorométhane- $d_2$ de A9.....	18
Spectre 2 : Spectre de carbone-13 de A9 dans $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ .....	19
<b>Spectre 3</b> : Spectre APT de <b>A9</b> dans le dichlorométhane- $d_2$ .....	20
Spectre 4 : Spectre partiel de COSY montrant les couplages entre les protons H-13, H-13' et 7 .....	21
Spectre 5 : Attribution des pics dans le spectre de proton de A9.....	23
Spectre 6 : Attribution des pics de résonance des carbones de A9 dans $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ .....	24
Spectre 7: <b>2D <math>^1\text{H}</math>-<math>^1\text{H}</math> COSY de A9 dans le dichlorométhane de A9</b> .....	26
Spectre 8: Attribution des quelques pics du spectre proton de TD15 dans le $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ .....	35
Spectre 9 : <b>Spectre de carbone 13 du parfum "Berlingot" dans le <math>\text{CDCl}_3</math></b> .....	57
Spectre 10 : <b>Région de 0-210 ppm du spectre de la fraction PmF-MeOH-AcOEt dans le <math>\text{DMSO}-d_6</math></b> .....	57
Spectre 11 : RMN du carbone-13 de la résine brute typique de <i>P. kesiya</i> .....	61
<b>Spectre 12</b> : Spectre RMN de $^{13}\text{C}$ typique des miels d'échantillon à 100 MHz.....	61
Spectre 13 : <b>RMN du carbone-13 de l'essence de térébenthine de Pk2 dans le <math>\text{CDCl}_3</math></b> .....	64
Spectre 14: RMN du carbone-13 de l'essence de térébenthine de Pk3 dans le $\text{CDCl}_3$ .....	64
Spectre 15 : Profil $^{13}\text{C}$ -RMN de l'essence de térébenthine du <i>P. patula</i> .....	66
Spectre 16 : <b>RMN-<math>^{13}\text{C}</math> de la colophane fraction non volatile Pk1</b> .....	68
Spectre 17 : Spectre RMN $^{13}\text{C}$ de la fraction non volatile Pk2.....	70
Spectre 18: RMN du $^{13}\text{C}$ du mélange complexe de la fraction non volatile de la résine Pk3.....	71
Spectre 19 : <b>Spectre RMN <math>^{13}\text{C}</math> de la fraction non volatile provenant de la résine Pp</b> .....	73
<b>Spectre 20</b> : <b>Spectre RMN carbone-13 du miel d'eucalyptus de Madagascar</b> .....	80
Spectre 21: Région des carbones anomériques et glycosiques du miel1 à 100,625 MHz.....	81
Spectre 22: Région de 40-80 ppm du spectre de carbone-13 du miel d'eucalyptus.....	81
Spectre 23: Spectre RMN de carbone-13 miel de forêt de Madagascar.....	83
Spectre 24: <b>Région des carbones anomériques du miel des forêts</b> .....	83
Spectre 25: <b>région spectrale de 80-60 ppm du miel des forêts de Madagascar</b> .....	84
Spectre 26 : Spectre RMN de carbone-13 du miel de letchis de Madagascar.....	86
Spectre 27 : Spectre RMN de carbone-13 du miel de Morondava à 100 MHz.....	88
Spectre 28 : Région 60-77 du spectre de miel Morondava.....	89
<b>Spectre 29</b> : Région du spectre $^{13}\text{C}$ -RMN entre 60-80 ppm du miel Michaud à 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ).....	92
Spectre 30 : <b>Région 80-60 ppm du spectre du miel 5</b> .....	93
Spectre 31: <b>Spectre RMN du carbone-13 du miel Elisa</b> .....	94
Spectre 32 : <b>RMN du carbone-13 du miel de bruyère</b> .....	96
Spectre 33 : <b>Spectre RMN de carbone-13 du miel de maquis</b> .....	98
<b>Spectre 34</b> : Spectre de proton de l'ester (R)-O-méthylemandélate dans le dichlorométhane- $d_2$ .....	115
<b>Spectre 35</b> : Spectre de proton de l'ester (S)-O-méthylemandélate dans le dichlorométhane- $d_2$ .....	115
Spectre 36 : RMN du carbone-13 de la résine brute de <i>P. kesiya</i> Briéville.....	118
Spectre 37: RMN du carbone-13 de la résine brute RP2 provenant de Marovitsika.....	119

Spectre 38: RMN du carbone-13 de la résine brute Pk3 dans le CDCl <sub>3</sub> .....	119
Spectre 39: spectre RMN du carbone-13 de la résine brute de <i>Pinus patula</i> .....	119
Spectre 40: Portion du spectre de RMN- <sup>13</sup> C 155-110 ppm de la fraction non volatile de la résine Pk1 .....	120
<b>Spectre 41:</b> Portion de spectre 52-29 ppm de <sup>13</sup> C-RMN de la fraction non volatile Pk1 .....	121
Spectre 42 : Région 14-35 ppm de la fraction non volatile Pk1 .....	121
<b>Spectre 43:</b> Région du spectre de 14-23 ppm de la fraction non volatile Pk2 .....	122
Spectre 44 : Région 23-33 ppm de la fraction non volatile Pk2 .....	123
Spectre 45: Portion 30-45 ppm du spectre de carbone-13 de la fraction non volatile Pk2 .....	123
<b>Spectre 46:</b> Région de 44 à 53 ppm des carbones asymétriques C4, C5 et C9 des constituants résiniques Pk2 .....	124
Spectre 47: Région 109-130 ppm des carbones oléfiniques protonés du spectre des constituants résiniques Pk2 .....	124
Spectre 48: Région 133-151 ppm des carbones oléfiniques des constituants résiniques Pk2 .....	124
Spectre 49 : Région 13-23 ppm des constituants résiniques de Pk3 .....	126
Spectre 50: région 23-33 ppm des constituants résiniques de Pk3 .....	126
Spectre 51 : Région 30-44 ppm des constituants résiniques de Pk3 .....	126
Spectre 52: région 43-53 ppm des carbones asymétriques C4, C5 et C9 des constituants résiniques de Pk3 .....	127
Spectre 53: région 110-130 ppm des carbones oléfiniques du cycle C des constituants de la fraction non volatile de la résine Pk3 .....	127
Spectre 54 : Région 133-151 ppm des carbones oléfiniques des constituants résiniques de Pk3 .....	127
Spectre 55 : région 132-152 ppm comprenant les carbones oléfiniques IV des constituants résiniques Pp .....	128
Spectre 56 : région 110-130 ppm des carbones oléfiniques du cycle C des constituants résiniques de Pp .....	129
<b>Spectre 57 :</b> région 43-53 ppm des carbones asymétriques C4, C5 et C9 des constituants résiniques de Pp .....	129
Spectre 58 : région 32-41 ppm du spectre <sup>13</sup> C des constituants résiniques de Pp .....	130
<b>Spectre 59:</b> région 23-32 ppm des constituants résiniques de Pp .....	130
<b>Spectre 60 :</b> Région 13-23 ppm des constituants résiniques de Pp .....	130
<b>Spectre 61 :</b> Spectre en entier typique des miels d'échantillon à 100 MHz .....	132
Spectre 62: <b>Spectre typique de la région des carbones anomériques et glycosidiques des miels à 100 MHz</b> .....	132

## Tableaux

Tableau 1: Comparaison des facteurs d'accroissement des signaux par effet NOE et INEPT de <sup>1</sup> H .....	13
Tableau 2: Comparaison des constantes de couplages des 18 protons de A9 .....	19
Tableau 3 : Multiplicité des carbones déterminés de A9 par DEPT dans le dichlorométhane-d <sub>2</sub> .....	20
Tableau 4: Paramètres des doublets des protons méthyléniques de 3 .....	21
Tableau 5: Diagnostic de DNOE pour A9 .....	23
Tableau 6 : Attribution complète des protons de A9 .....	24
Tableau 7 : Attributions spectrales des carbones de A9 .....	24
<b>Tableau 8:</b> Couplages hétéronucléaires observés en SINEPT et FLOCK .....	28
Tableau 9: centres asymétriques de A9 et multiplicité .....	28
Tableau 10: Récapitulation des données spectrales proton pour A9 .....	33
Tableau 11: Récapitulation des données spectrales carbone pour A9 .....	33
Tableau 12: Comparaison des paramètres RMN des protons dans la pyridine-d <sub>5</sub> et dans le CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	35
Tableau 13: Identification des doublets des protons méthyléniques sur le pyréthroidine .....	36
Tableau 14: Constantes de couplage des protons de TD15 dans CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	37
Tableau 15 : Points-clés SINEPT dans CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> pour TD15 .....	37
Tableau 16 : Identification des résonances de carbone de TD15 .....	38
Tableau 17: Couplages à longue portée proton-proton de TD15 dans CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	39
Tableau 18: Pairs-clés de NOE du pyréthroidine dans le dichlorométhane-d <sub>2</sub> .....	41
Tableau 19 : δ des protons des esters 36 (R) et 37 (S) dans CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> . (D'après Lincoln Scott) .....	41
Tableau 20 : Attributions spectrales complètes <sup>1</sup> H de TD15 .....	42
Tableau 21: Attribution <sup>13</sup> C complète de TD15 .....	42
Tableau 22: Constituants terpéniques de la fraction volatile de PK1 .....	63
Tableau 23: Constituants terpéniques de la fraction volatile de Pk2 .....	64
Tableau 24 : Identification et quantification des mono- et sesquiterpènes de la fraction volatile de Pk3 .....	65
Tableau 25: Individualisation des constituants de la fraction volatile <i>P. patula</i> .....	66
<b>Tableau 26:</b> Comparaison des éluats chromatographiques des fractions volatiles sur colonne apolaire .....	67
Tableau 27 : comparaison des teneurs pour total hydrocarboné et total oxygéné .....	68
Tableau 28 : Composés résiniques identifiés à partir du spectre .....	69
Tableau 29: Quantification des constituants de la fraction non volatile Pk1 .....	69
Tableau 30: Identification des constituants de la colophane (fraction non volatile) Pk2 .....	70
Tableau 31: Quantification des constituants de la fraction non volatile Pk2 .....	71
Tableau 32: Constituants de la fraction non volatile de la résine Pk3 par analyse directe RMN du carbone-13 .....	72

Tableau 33 : Quantification de la fraction non volatile de Pk3.....	72
Tableau 34 : Individualisation des constituants de la fraction non volatile de la résine Pp par RMN <sup>13</sup> C.....	73
Tableau 35: Répartition en masse des constituants résiniques Pp.....	73
<b>Tableau 36: Comparaison des quantifications des constituants dans les fractions non volatiles</b> .....	74
Tableau 37: Composition globale de la résine Pk1 de Briéville.....	75
Tableau 38: Composition globale de la résine Pk2.....	75
<b>Tableau 39:</b> composition globale de la résine provenant de l'échantillon Pk3.....	76
Tableau 40: Composition globale de la résine provenant de l'échantillon P. patula.....	76
<b>Tableau 41:</b> Comparaison des compositions des fractions volatiles et non volatiles des échantillons.....	77
<b>Tableau 42:</b> Comparaison des constituants dans les fractions non volatiles.....	77
<b>Tableau 43:</b> Comparaison des compositions globales des échantillons de résine.....	78
<b>Tableau 44:</b> Etude de variabilité intraspécifique de P. nigra par RMN carbone-13.....	78
Tableau 45: Etude de variabilité intraspécifique des espèces de P. Kesiya de Chine.....	79
Tableau 46: Criblage des sucres dans le miel d'eucalyptus pour identification.....	81
Tableau 47: Quantification miel d'eucalyptus par la moyenne des intensités.....	82
Tableau 48: Criblage et identification des sucres dans le miel de forêt.....	83
Tableau 49 : Analyse des intensités des pics des sucres du miel de forêt de Madagascar.....	85
Tableau 50: Classement des constituants en sucres du miel des forêts de Madagascar.....	85
Tableau 51: Criblage et identification des sucres du miel de letchis de Madagascar.....	87
Tableau 52: Validation des constituants du miel de letchis de Madagascar.....	87
Tableau 53: Classement des constituants en sucre du miel de letchis.....	87
<b>Tableau 54:</b> Criblage des sucres du miel commercial de Morondava et identification.....	89
Tableau 55: Validation des sucres du miel commercial de Morondava.....	90
Tableau 56: Classement des sucres du miel de Morondava.....	91
Tableau 57: Criblage du spectre du miel 5 et possibles constituants.....	92
Tableau 58: Validation des sucres identifiés dans le miel5.....	93
Tableau 59: Classement des sucres du miel commercial Michaud de Corse.....	93
Tableau 60: Criblage des sucres du miel Elisa.....	95
Tableau 61: Validation des sucres du miel Elisa.....	95
Tableau 62: Classement des sucres du miel de Elisa.....	95
Tableau 63: Criblage et analyse des intensités du miel de bruyère.....	97
Tableau 64 : Classement des sucres du miel de bruyère.....	97
Tableau 65 : Criblage et étude des intensités des sucres du miel de maquis.....	98
Tableau 66: Classement des sucres du miel de maquis.....	99
Tableau 67: Répartition tautomérique du D-glucose et du D-fructose mélange artificiel <sup>a</sup> par <sup>13</sup> C-RMN.....	100
<b>Tableau 68:</b> Ratios des formes tautomériques à l'équilibre du glucose et du fructose de miel.....	100
Tableau 69: Répartition expérimentale et calculée des formes tautomériques des oligosaccharides.....	101
Tableau 70: Isomères et composition des différents échantillons de miel.....	102
Tableau 71: composition par classe de composé glucidique des différents échantillons de miel.....	103
Tableau 72: total oligosaccharides dans les échantillons de miel.....	105
Tableau 73: Paramètre Maltose-maltulose-turanose dans les échantillons de miel.....	105
Tableau 74: Paramètres trisaccharides des échantillons de miel.....	106
Tableau 75: Comparaison des teneurs en oligosaccharides des miels de Brésil et d'Espagne.....	106
Tableau 76: Répartition du D-glucitol dans les échantillons de miel étudiés.....	106
Tableau 77: Valeurs de solubilité de quelques sucres purs dans de l'eau.....	107
<b>Tableau 78:</b> Comparaison des paramètres dérivés des teneurs en glucose et fructose.....	107
Tableau 79: Paramètres F/G déterminé par <sup>13</sup> C-RMN sur des miels de Corse.....	108
Tableau 80: Comparaison des valeurs F/G des miels d'origine botanique et géographique différentes.....	108
Tableau 81 : Déplacement chimique des formes tautomères du $\alpha$ -et $\beta$ -maltose selon Mazzoni et Bremer.....	131
<b>Tableau 82:</b> Comparaison des déplacements chimiques des tautomères $\alpha$ - et $\beta$ -pyrane de l'isomaltose.....	131
<b>Tableau 83:</b> Déplacements chimiques des tautomères de l'isomaltrose selon Mazzoni et Friebohn.....	131
Tableau 84: Déplacements chimiques du mélézitose selon Mazzoni et Bresmer.....	131

**Abréviation en anglais**

APT	: Attached Proton Test
BB	: Broad Band decoupling
COLOC	: Correlated Spectroscopy for Long Range Couplings
COSY	: Correlation Spectroscopy
CPD	: Composite Pulse Decoupling
DNOE	: Difference NOE
DOSY	: Diffusion Ordered Spectroscopy
DQCOSY	: Double Quantum COSY
FTICRMS	: Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectroscopy
FTIR	: Fourier Transform InfraRed
HETCOR	: Heteronuclear Chemical Shift Correlation
HMBC	: Heteronuclear Multiple Bond Coupling
HMQC	: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HOHAHA	: Homonuclear Hartmann-Hann Spectroscopy
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
HRMS	: High Resolution Mass Spectroscopy
HSQC	: heteroHeteronuclearHeteronuclear Single Quantum Coherence
INEPT	: Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfert
IUPAC	: International Union of Pure and Applied Chemistry
LC	: Voir CL
LRCOSY	: Long Range COSY
LRMS	: Low Resolution Mass spectroscopy (Spectrométrie de masse à basse résolution)
MDL	: Madagascar Digital Library
MEPS	: Microextraction in a Packed Syringe
MLEV	: Matt Levitt
MS	: Mass Spectroscopy
NIR	: Near InfraRed
NMR	: Nuclear Magnetic Resonance
NMRSHIFTDB	: NMR Shift Data Base
NOE	: Nuclear Overhausen Effect
NOEDS	: NOE Difference Spectroscopy (Voir DNOE)
NOESY	: NOE Spectroscopy
PAD	: Pulsed Amperometric Detection
SDBS	: Spectroscopic Data Base System
SFE	: Supercritic Fluid Extraction
SINEPT	: Selective INEPT
SPE	: Solid Phase Extraction
SPT	: Selective Population Transfert
TJ-DNP	: Temperature jump high frequency dynamic nuclear polarization
TOCSY	: Total Correlation Spectroscopy
TROSY	: Transverse-Relaxation-Optimised Spectroscopy

## Glossaire

### Activité antiangiogénique :

La thérapie antiangiogénique agit en perturbant l'angiogénèse tumorale, c'est-à-dire le processus par lequel les tumeurs forment de nouveaux vaisseaux sanguins. En bloquant l'accès d'une tumeur aux vaisseaux sanguins, ce traitement vise à priver les cellules cancéreuses de l'oxygène et des nutriments que leur fournit le sang, ce qui permet d'en ralentir la croissance et probablement même de les faire disparaître

### Chimie combinatoire :

[http://fr.wikipedia.org/wiki/Chimie\\_combinatoire](http://fr.wikipedia.org/wiki/Chimie_combinatoire)

La **chimie combinatoire** combine (au hasard au parfois, à ses débuts, puis de manière automatique et codifiée ensuite) des molécules ou structures apparentées pour synthétiser des matières à propriétés nouvelles.

Elle est née de la [génomique](#) et de la [protéomique](#) qui cherchent à étudier le fonctionnement du Vivant aux échelles les plus petites, notamment pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques, constituant pour cela des [cibliothèques](#). Cette forme nouvelle de [chimie](#) produit des banques de molécules potentiellement actives qu'elle propose à d'autres sciences qui peuvent les tester en espérant y trouver des propriétés intéressantes pour l'industrie, la pharmacie, etc.

### Génomique :

<http://fr.wikipedia.org/wiki/G%C3%A9nomique>

La génomique est une biotechnologie qui a pour objet l'étude des génomes, c'est-à-dire l'ensemble des gènes portés par un être vivant, en appliquant notamment des techniques de séquençage des chromosomes. Cette discipline a connu un essor très médiatisé à la fin du XXe siècle avec la compétition entre différentes équipes scientifiques pour la publication de la première carte du génome humain, annoncée conjointement le 26 juin 2000 par Bill Clinton et Tony Blair. Mais le premier véritable séquençage date de 1972 avec la lecture de la séquence ARN du gène du virus bactériophage MS2. Depuis lors, les génomes complets de nombreuses espèces vivantes ont été séquencés : le ver *Caenorhabditis elegans* en 1998, la mouche drosophile et la plante *Arabidopsis thaliana* en 2000 ou encore, le chien en 2005.

### Invasif (ve) :

Non destructif(ve). Une analyse non invasive en détruit pas les analytes qui peuvent être récupérées à fin d'autres investigations.

## **REFERENCES**

# Références

- [1]. Spelman, C.A., Non-food uses of agricultural raw materials, CAB International, Wallingford, UK [ISBN 0 85198 769 9] **1994**.
- [2]. Hardy, R.W.F., 2002. The bio-based economy. In: Janick, J., Whipkey, A. (Eds.), Trends in New Crops and New Uses. Proceedings of the Fifth New Crops Symposium, Atlanta, **2001**, ASHS Press, Alexandria, VA.
- [3]. Samuelsson, G., *Drugs of Natural Origin: a Textbook of Pharmacognosy*, 5th Swedish Pharmaceutical Press **2004**., Stockholm.
- [4]. Balunas M. J., Kinghorn A. D., Drug discovery from medicinal plants, Minireview, *Life Sciences, Volume 78, Issue 5, 22 December 2005, Pages 431-441*.
- [5]. Larsson J., Gottfries, J., Muresan S., and Backlund A., ChemGPS-NP: Tuned for Navigation in Biologically Relevant Chemical Space, *Journal of Natural Products* **2007**, 70:789-794
- [6]. Koch M. A., Schuffenhauer A., Scheck M, Wetzel S, Casaulta M, Odermatt A, Ertl P, Waldmann H: Charting biologically relevant chemical space: a structural classification of natural products (SCONP). *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, 102:17272-17277.
- [7]. Hanak, J. J. , *J. Mater. Sci.* **1970**, 5, 964–971.
- [8]. Hruby V. J., Barstow L. E., Linhardt T., New Machine for Automated Solid Phase Peptide Synthesis. *Anal. Chem.*; **1972**; 44(2); 343-350.
- [9]. Klass D.H., Biomass for Renewable Energy, Fuels and Chemicals. Fossil Fuel Reserves and Depletion, *Academic Press, San Diego*, **1998**, p. 10.
- [10]. Campbell C.J., Laherrère J.H., The End of Cheap Oil, *Sci.Am.* March **1998**, 60.
- [11]. Energy Information Administration, *International Energy Outlook*, **2003**.
- [12]. Tundo P., Anastas P., Black D. StC., Breen J., Collins T., Memoli S., Miyamoto J., Polyakoff M., and Tumas W., Synthetic Pathways and Processes in Green Chemistry. Introductory Overview, *Pure Appl. Chem.* **2000**, Vol. 72, No. 7, pp. 1207–1228.
- [13]. Site web: <http://www.sustainability.co.uk/sustainability.htm>
- [14]. Ortholand J.-Y., and Ganessan A., Natural products and combinatorial chemistry: back to the future, *Current Opinion in Chemical Biology* **2004**, 8, 271-280.
- [15]. Raharison Solo Ny Herizo. *Contribution à l'Etude Physico-chimique d'une Plante Biologiquement Active*. DEA, Université Antananarivo, **2006**.
- [16]. Lantovololona Jeanne Eliane Roger, *Contribution à l'étude chimique de l'Eurphobia orthoclada*, DEA, Université Antananarivo, **1992** .
- [17]. Razanajatovo Hobia. *Contribution à l'étude Physico-chimique des Antibiotiques : Doxycycline et Tetracycline. Contribution à l'Inventaire des Constituants d'une Plante Biologiquement Active*. Mémoire de DEA, Université Antananarivo, **2001**.
- [18]. Rakotomanana Mahaivisoa Felana. *Contribution à l'étude physico-chimique des pesticides chimiques de synthèse et à l'étude des pesticides naturelles*. DEA Université Antananarivo, **1997**.
- [19]. Grenier-Loustalot, M. F., Grenier P., Bounoure J., Grall M., Panaras R., Couplage direct chromatographique en phase liquide haute performance (HPCL) et résonance magnétique

- nucléaire du proton (RMN  $^1\text{H}$ ). Appareillage, méthodologie, exemple d'application, *Analisis*, **1990**, 18, 200-207
- [20]. Wilson I. D., Morgan E. D., Lafont R., Schocker J. P., Lindon J. C., Nicholson J. K., Xright High-Performance Liquid Chromatography on-line coupled to High field NMR and Mass Spectrometer applied to plant products: Identification of ecdysteroids from *Silene otites*, *Chromatographia*, **1999**, 49, 374-378.
- [21]. Xian-Guo He. *Review: On-line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic–diode array detection–mass spectrometric techniques. Journal of Chromatography A* **2000**, 880 203–232.
- [22]. van Asten A., The importance of GC and GC-MS in Perfume Analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, **2002**, Vol. 21, nos. 9+10, 698-708.
- [23]. Stooß K., Singer H. P., Goetz C. W., Ruff M., Mueller S. R., Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography–tandem mass spectrometry Quantification of sulfonamide antibiotics, neutral and acidic pesticides at low concentrations in surface waters, *Journal of Chromatography A* **2005**, Volume 1097, Issues 1-2, 2 , 138-147.
- [24]. Sasaki T. Z., Wilkins C. L. Gas Chromatography with Fourier Transform Infrared and Mass Spectra Detection. *J. of Chromatography A* **1999**, **842**, 341-349.
- [25]. Seifar R. M., Dijkstra R. J., Brinkman U. A. T. and Gooijer C., At-Line Coupling of Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopy and Reversed-Phase Ion-Pair Chromatography, *Analytical Communications*, **1999**, 36, 273 - 276
- [26]. Sorm F., *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **1961**, 19, 1.
- [27]. Nozoe T. and Itô S., *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **1961**, 19, 32.
- [28]. Sorm F. and Dolejš L., *Guaianolides and Germacranolides*, Hilden-Day, San Francisco, **1966**.
- [29]. Kupchan S. M., *Pure Appl. Chem.* **1970**, 21, 227. Kupchan S. M., Fessler D. C., Eakin M. A., and Giacobbe T. J., *Science* **1970**, 168, 376. Hanson R. L., Lardy H. A., and Kupchan S. M., *Science* **1970**, 168, 378.
- [32]. Rodríguez A. D., Piña C., Acosta A. L., Ramírez C., and Soto J. J., Synthesis of Analogues of *Eunicea*  $\gamma$ -Cembranolides Containing Cyclic Ethers via Saponification, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 648-658.
- [33]. Cassady, J. M.; Suffness, M. In *Anticancer Agents Based on Natural Product Models*; Cassady, J. M.; Douros, J. D., Eds.; Academic: New York, **1980**; Vol. 7, pp. 201–270
- [34]. Ogura, M.; Cordell, G. A.; Fransworth, N. R., Anticancer sesquiterpene lactones of *Michelia compressa* (magnoliaceae), *Phytochemistry* **1978**, 17, 957-961
- [35]. Mischer, L. A. In *Recent Advances in Phytochemistry*; Runeckles, V. C., Ed.; Plenum: New York, **1975**; Vol. 9, p243.
- [36]. Rodriguez E., Towers G. H. N., and Mitchell J. C., Biological activities of sesquiterpene lactones, *Phytochemistry* **1976**, 15, 1573-1580
- [37]. Hopper, M.; Kirby, G. C.; Kulkarni, M. M.; Kulkarni, S. N.; Nagasampagi, B. A.; O'Neill, M. J.; Philipson, J. D.; Rojatkar, S. R.; Warhurs, D. C. *Eur. J. Med. Chem.* **1990**, 25, 717.
- [38]. Levine J. A., Ferrendelli J. A., and Covey D. F., Alkyl-substituted thio-, thiono-, and dithio- $\gamma$ -butyrolactones: new classes of convulsant and anticonvulsant agents, *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 1996-1999.

- [39]. Yoshikawa M., Shimoda H., Uemura T., Morikawa T., Kawahara Y., and Matsuda A., Alcohol absorption inhibitors from bay leaf (*Laurus nobilis*): structure-requirements of sesquiterpènes, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2000**, Volume 8, Issue 8, 2071-2077.
- [40]. Ohfuné Y., Grieco P. A., Wang C. L. J., and Majetich G., Stereospecific total synthesis of dl-helenalin: a general route to elenanolides and ambrosanolides *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 5946-5948.
- [41]. Marshall J. A. and Ellison R. H. The stereoselective total synthesis of pseudoguaianolides: confertin, *J. Amer. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 312 – 4313.
- [42]. Semmelhack M. F., Yamashita A., Tomesch J. C., and Hirotsu J., Total synthesis of confertin via metal-promoted cyclization-lactonization, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 5565-5567.
- [43]. De Clercq P., and Vandewalle M., Total synthesis of (+-)-damsin *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 3447 – 3450.
- [44]. Ramesh, C., Harakishore K. ., U.S.N. Murty, and Biswanath Das, Analogues of Parthenin and their antibacterial activity, *ARKIVOC* **2003** (ix) 126-132.
- [45]. Chen Y.-L., Lu C.-M., Lee S.-J., Kuo D.-H., Chen I.-L., Wang T.-C. and Cherng, Synthesis, antiproliferative, and vasorelaxing evaluations of coumarin  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -butyrolactone, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, Volume 13, Issue 20, 5710-5716.
- [46]. Hoffmann, H. M. R., Rabe J., Synthesis and Biological Activity of  $\alpha$ -Methylene- $\gamma$ -butyrolactones, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 94-110
- [47]. Grieco, P. A. *Synthesis* **1975**, 67-82.
- [48]. Lu, X.; Zhu, G.; Wang, Z.; Ma, S.; Ji, J.; Zhang, Z., Enyne cyclization methodology for the synthesis of bioactive lactones, *Pure Appl. Chem.* **1997**, *69*, 553-558.
- [49]. Tanaka K., Yoda H., Isobe Y., and Kaji A., Asymmetric Synthesis of  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -butyrolactones using chiral N-monosubstituted 2-[(tributylstannyl)methyl]propenamides, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1856-1866.
- [50]. Bravo P., Resnati G., and Viani F., Synthesis of optically pure  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -lactones from (+)-R-(4-methylphenyl)-alkylsulphoxides, *Tetrahedron Letters* **1985**, Volume 26, Issue 24, 2913-2916.
- [51]. Csuk R., Schröder C., Hutter S., and Mohr K., Enantioselective Dreiding-Schmidt reactions: asymmetric synthesis and analysis of  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -butyrolactones, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, Volume 8, Issue 9, 8, 1411-1429.
- [52]. Karplus M., Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870-287
- [53]. Narayanan C. R., and Venkatasubramanian N . K., Simple Methods to Find the Stereochemistry of the Side Chain of  $\gamma$ -Lactones, *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 3156-3162.
- [54]. Samek Z. , Coll. Czech. Chem. Commun. **1978**, *43*, 3210.
- [55]. Snatke G., Riechthst. Aromen. Körperpflegem. **1969**, *19*, 98.
- [56]. Suchy M., Doleje L., Herout V., Sorm Y., Snatke G., and Himmelreich J., Collect. Czech, Chem. Commun. **1969**, *34*, 229.
- [57]. Gören N., Ulubelen A., Bozok-Johanasson C. and Tahtasakal E., Sesquiterpene lactones from *Tanacetum densum* subsp. *Amani*, *Phytochemistry* **1993**, *33*, 1157-1159.
- [58]. Hahn, E.L., Spin Echoes, *Phys. Rev.* **1950**, *80*, 580-594.
- [59]. Long H .W., Gaede H.C., Shore J., Reven L., Bowers C.R., Kritzenberger J., Pietrass T.,

- Pines A., Tang P., Reimer J.A., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8491.
- [60]. Goodson B. M., Nuclear Magnetic Resonance of Laser-Polarized Noble Gases in Molecules, Materials, and Organisms, *J. Magn. Res.* **2002**, *155*, 157-216
- [61]. Gitti R., Wild C., Tsiao C., Zimmer K., Glass T. E., and Dorn H. C., Solid/liquid intermolecular transfer of dynamic nuclear polarization. Enhanced flowing fluid proton NMR signals via immobilized spin labels, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2294 - 2296. .
- [62]. Davis A. L., Laue E. D., Keeler J., Moskau D., Lohman J. A. B., Absorption-mode two-dimensional NMR spectra recorded using pulsed field gradients, *J. Magn. Reson.* **1991**, *94*, 637-644.
- [63]. Hou D. I., Richards R. E., The Signal-to-Noise Ratio of the Nuclear Magnetic Resonance Experiment, *J. Magn. Reson.* **1976**, *24*, 71.
- [64]. Styles P., Soffe N. F., Scott C. A., Cragg D. S., White D. J., White P. C. J., A high-resolution NMR probe in which the coil and preamplifier are cooled with liquid helium, *J. Magn. Reson.* **1984**, *60*, 397-404.
- [65]. Site Varian: <http://www.varianinc.com>
- [66]. Kapur G.S., Findeisen M., Berger S., Analysis of hydrocarbon mixtures by diffusion-ordered NMR Spectroscopy, *Fuel* **2000**, *79*, 1347-1351.
- [67]. Freeman, R., and Hill, H. D. W., in *Dynamic Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Eds Jackman L. M. and Cotton F. A., pp. 131-62, Academic Press, London and New York, **1975**.
- [68]. Shoolery J.N., Recent Developments in <sup>13</sup>C- and Proton-NMR, *Journal of Natural Products* **1984**, *47*, 226-259.
- [69]. Morris G. A., and Freeman R., Enhancement of Nuclear Magnetic Resonance Signals by Polarization Transfer, *J. Amer. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 760
- [70]. Pachler K. G. R., Wessels P. L., Selective Population Inversion (SPI). A pulsed double resonance method in FT NMR spectroscopy equivalent to INDOR, *J. Magn. Reson.* **1973**, *12*, 337-339.
- [71]. Pachler K. G. R., Wessels P. L., Sensitivity gain in a progressive-saturation selective population inversion NMR experiment, *J. Magn. Reson.* **1977**, *28*, 53-61.
- [72]. Sorensen S., Hansen R. S., Jakobsen H. J., Assignments and relative signs of <sup>13</sup>C-X coupling constants in <sup>13</sup>C FT NMR from selective population transfer (SPT), *J. Magn. Reson.* **1974**, *14*, 243-245.
- [73]. Jakobsen H. J., Linde S. A., Sorensen S., Sensitivity enhancement in <sup>13</sup>C FT NMR from selective population transfer (spt) in molecules with degenerate proton transitions, *J. Magn. Reson.* **1974**, *15*, 385-388
- [74]. Pines, A., Gibby, M. G., Wuagh, J. S., Proton-enhanced NMR of dilute spins in solids, *J. Chem. Phys.* **1973**, *59*, 569
- [75]. Bertrand, R. D.; Moniz, W. B.; Garoway, A. N.; Chingas, G. C.; Carbon-13-proton cross-polarization in liquids, *J. Amer. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 5227-5229.
- [76]. Hartmann, S. R., Hahn, E. L., Nuclear Double Resonance in the Rotating Frame, *Phys. Rev.* **1962**, *128*, 2042.
- [77]. Becker E. D., Feretti J. A., and Farrar T. C., Driven Equilibrium Fourier Transform Spectroscopy. A New Method for Nuclear Magnetic Resonance Signal Enhancement *J. Amer. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 7784 - 7785.

- [78]. Brouwer D. H., Chézeau J.-M. and Fyfe C. A., Solid state NMR investigation of the structure of AlPO<sub>4</sub>-14A *Microporous and Mesoporous Materials* **2006**, Volume 88, Issues 1-3, 21, 163-169.
- [79]. Alam T.M., and Holland G.P., <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C INEPT MAS NMR correlation experiments with <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H mediated magnetization exchange to probe organization in lipid biomembranes *Journal of Magnetic Resonance* **2006**, Volume 180, Issue 2, June, 210-221.
- [80]. Philbrook A., Blake C. J., Dunlop N., Easton C. J., Keniry M. A. and Simpson J. S., Demonstration of co-lymerization in melamine-urea-formaldehyde reactions using <sup>15</sup>N NMR correlation spectroscopy *Polymer* **2005**, 46, Issue 7, 10, 2153-2156.
- [81]. Bax A., Structure determination and spectral assignment by pulsed polarization transfer via long-range <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C couplings, *J. Magn. Res.* **1984**, 57, 314-318.
- [82]. Bendall M. R., Doddrell D. M., and Pegg D. T., Editing of carbon-13 NMR spectra. 1. A pulse sequence for the generation of subspectra *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 4603 – 4605.
- [83]. Jeener J., Ampere International Summer School, Basko Polje, Yougoslavie, **1971**
- [84]. Aue W. P., Bartholdi E. and Ernst R. R., Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance, *J. Chem. Phys.* **1976**, 64, 2229-2246.
- [85]. Bax A. and Freeman R., Investigation of complex networks of spin-spin coupling by two-dimensional NMR, *J. Magn. Reson.* **1981**, 44, 542-561.
- [86]. Winants G., van Binst G., Michel A., and Zanen J., *Int. J. Peptide Protein Res.* **1985**, 26, 561.
- [87]. Sydnes L. K., Skjetne T., Application of 2D NMR spectroscopy to the complete analysis of the 1H NMR spectra of 1- and 3-nitrobenzo[e]pyrene, *Magn. Res. Chem.* **1986**, 24, 317-322.
- [88]. Sakai R., Higa T., and Kashman Y., *Chem. Lett.* 1986, 1499.
- [89]. Piantini U., Sorensen O. W., and Ernst R. R., Multiple quantum filters for elucidating NMR coupling networks, *J. Amer. Chem. Soc.* **1982**, 104, 6800 – 6801.
- [90]. Braunschweiler L. and Ernst R. R., Coherence transfer by isotropic mixing: Application to proton correlation spectroscopy, *J. Magn. Reson.* **1983**, 53, 521-528.
- [91]. Bax A. and Davis D. G., MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy, *J. Magn. Reson.* **1985**, 65, 355-360.
- [92]. Bax A. and Morris G. A., An improved method for heteronuclear chemical shift correlation by two-dimensional NMR, *J. Magn. Reson.* **1981**, 42, 501-505.
- [93]. Freeman R. and Morris G.A., Experimental chemical shift correlation maps in nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1978**, 684-686.
- [94]. Doddrell D. M., Pegg D. T. and Bendall M. R., Distortionless enhancement of NMR signals by polarization transfer, *J. Magn. Reson.* **1982**, 48, 323-327.
- [95]. Wong T. C., Rutar V., and Wang J. S., Study of proton chemical shifts and couplings with fluorine-19 in 9.alpha.-fluorocortisol. Application of a novel proton-carbon-13 chemical shift correlation technique with homonuclear decoupling, *J. Amer. Chem. Soc.* **1984**, 106, 7046 – 7051.
- [96]. Longstaffe J. G., Chen B., and Huang Y., Characterization of the amorphous phases formed during the synthesis of microporous material AlPO<sub>4</sub>-5, *Microporous and Mesoporous Materials*, in Press, Corrected Proof, Available online 27 September 2006.
- [97]. Mueller L., Sensitivity enhanced detection of weak nuclei using heteronuclear multiple quantum coherence, *J. Amer. Chem. Soc.* **1979**, 101, 4481 – 4484.

- [98]. Maudsley A. A., and Ernst R. R., Indirect detection of magnetic resonance by heteronuclear two-dimensional spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.* **1977**, *50*, 368-372.
- [99]. Hallenga K. and van Binst G., *Bull. Magn. Reson.* **1980**, *12*, 109.
- [100]. Levitt M. H., Sorensen O. W. and Ernst R. R., Multiplet-separated heteronuclear two-dimensional NMR spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.* **1983**, *94*, 540-544.
- [101]. Hallenda K. and van Binst G., *Bull. Magn. Reson.* **1980**, *2*, 343.
- [102]. Reynolds W. F., McLean S., Perpick-Dumont M., Enríquez R. G., Improved <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H shift correlation spectra for indirectly bonded carbons and hydrogens: The FLOCK sequence *Magn. Reson. Chem.* **1989**, *27*, 162-169.
- [103]. Kessler H., Griesinger C., Zarbock J., Loosli H.. Assignment of carbonyl carbons and sequence analysis in peptides by heteronuclear shift correlation via small coupling constants with broadband decoupling in t<sub>1</sub> (COLOC), *J. Magn. Reson.* **1984**, *57*, 331-336.
- [104]. Jeener J., Meier B. H., Bachmann P., Ernst R. R., Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy, *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4546-4553.
- [105]. Gören N., Jakupovic J., and Topal S., Sesquiterpene lactones with antibacterial activity from *Tanacetum argyrophyllum* var. *argyrophyllum*, *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1467-1469.
- [106]. Ficher, N. H. ; Olivier, E. J. ; Ficher, H. D. In *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, Herz, W. : Griebach, H. ; Kirby, G. W. Eds ; Sprnger-Verlag ; New York, 1979, Vol. 38, pp 58-133.
- [107]. Ficher, N. H. ; Olivier, E. J. ; Fisher, H. D. In *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, Herz, W. ; Grisebach, H. ; Kirbu, G. W. ; Eds ; Springer-Verlag ; New York, 1979, Vol. 38, pp 58-133 ; Samek, Z. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1978**, *43*, 3210.
- [108]. Porter H., Mabry T. J., Yoshioka H. and Fischer N. H., The isolation and structure determination of artemisiifolin, a new germacranolide from *Ambrosia artemisiifolia* L. (*compositae*), *Phytochemistry* **1970**, *9*, 199-204.
- [109]. Harada N., Nakanishi K., « Circular Dichroic Spectroscopy - Exiton Coupling In Organic Chemistry » University Sciences Books ; Mill Valley, CA ; 1983.
- [110]. Nakanishi, K., Berova N., In *Circular Dichroism : Principles and Applications*, Nakanishi K., Berova N., Woody R. W., Eds ; VCH Publishers : New Yorl, 1994, pp 361 – 398.
- [111]. Panek J.S., Sparks M.A., Synthesis, resolution and absolute stereochemical assignment of C1-oxygenated allylsilanes and C3-oxygenated vinylsilanes, *Tetrahedron Asymm.* **1990**, *1*, 801-816.
- [112]. Abduzzimoz B. Kh., Yunusov A. L., Abdulaev N. D. and Sidyakin G. P., *Khim. Prir. Soedin.* **1984**, 792.
- [113]. Taskhodaev B., Abduazimov B. Kh., Nazarov G. B. and Talipov S. A., *Khim. Prir. Soedin.* **1988**, 50.
- [114]. Irwin M. A., PhD Thesis UCLA, **1971**.
- [115]. Barton D. H. R., de Mayo P., and Shafiq M., Photochemical transformations. Part I. Some preliminary investigations, *J. Chem. Soc.* **1957**, 929-935.
- [116]. Barton D. H. R., Some Photochemical Rearrangements *Helv. Chim. Acta* **1959**, *42*, 2604-2616.
- [117]. Zdero C., Bohlmann F. and Müller M., Sesquiterpene lactones and other constituents from *Eriocephalus* species, *Phytochemistry* **1987**, *26*, 2763-2775.
- [118]. Sanders J. K. M. and Hunter B. K., *Modern NMR spectroscopy, a guide for Chemist*, Oxford

- University Press, **1987**, p. 198 , 308 pages.
- [119]. Bhacca N. S., Gurst J. E., and Williams D. H., Spin-Spin Coupling Between Hydrogen and Steroid Angular Methyl Protons, *J. Amer. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 302-305.
- [120]. Asher J. D. M. and. Sim, S. A Sesquiterpenoids. Part II. The stereochemistry of isophotosantonin lactone: X-ray analysis of 2-bromodihydroisophoto- $\alpha$ -santonin lactone acetate, *J. Chem. Soc.* **1965**, 1584 - 1594.
- [121]. Asher J. D. M., Sim G. A., Sesquiterpenoids. Part III. The stereochemistry of santonin: X-ray analysis of 2-bromo- $\alpha$ -santonin, *J. Chem. Soc.* **1965**, 6041-6055.
- [122]. Trost B. M., Belletire J. L., Godleski S., McDougal P. G., and Balkovec J. M., Baldwin J. J., Christy M. E., Ponticello G. S., Varga S. L., and Springer J. P., On the Use of the O-Methylmandelate Ester for Establishment of Absolute Configuration of Secondary Alcohols, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2370-2374
- [123]. Gören N., Cai P., Scott L., Tianasoa Ramamonjy M., and Snyder J. K., A New Germacranolide from *Tanacetum densum ssp sivasicum* (Compositae), *Tetrahedron* **1995**, *51*, 4626-4634
- [124]. Ulubelen A., Gören N, Jiang T.-Y., Scott L., Tianasoa Ramamonjy M., and Snyder J. K., NMR Assignments and Absolute Stereochemistry of Two Guaianolide Sesquiterpenes from *Tanacetum densum ssp sivasicum* subsp. *amani*, *Magn. Reson. Chem.* **1995**, *33*, 900-904.
- [125]. Fiebach R., Kremer L. R., *Ullmann'Encyclopédia of Industrial Chemistry*, Vol. A23, p.73-88, Resins, Natural , VCH Publishers, Inc. , Bremer, **1993**.
- [126]. Nault J. R., and R. I. Alfaro, Changes in cortical and wood terpenes in Sitka spruce in response to wounding. *Can. J. For. Res.* **2000**, *31*, 1561–1568.
- [127]. Klepzig, K.D., E.L.Kruger, E.B. Smalley, and K.F. Raffa.. Effect of biotic and Biotic Stress on Induced Accumulation of Terpenes in Red Pines Inoculated with Bark Beetle-Vectored. Fungus. *J. Chem. Ecol.* **1995**, *21*, 601–626.
- [128]. TraPp S., Croteau R. Defensive Resin Biosynthesis in Conifers. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **2001**, *52*, 689-724 ; Croteau, R., and M.A. Johnson. Biosynthesis of Terpenoid Wood Extractives. p. 379–439. In T. Higuchi (ed.) Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components. Academic Press, New York, **1985**
- [129]. Yamada, T.. Biochemistry of Gymnosperm Xylem Responses to Fungal Invasion. p. 146–164. In R.A. Blanchette and A.R. Biggs Defense mechanisms of woody plants against fungi., Verlag, New York , **1992**.
- [130]. Bruneton J., *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales*, 2<sup>ème</sup> édition, Tech. & Doc, Lavoisier, Paris, **1993**.
- [131]. Sunzel, B., Södeberg T. A., Johansson A., Hallmans G., Gref R., The Protective Effect of Zinc on Rosin and Resin acid Toxicity in Human Polymorphonuclear Leucocytes and Human Gingival Fibroblasis in Vitro, *J. of Biomedical Materials Research* **1997**, *37*, 20-28.
- [132]. Macaeva F. Z. and Malkov A. V., Use of Monoterpenes,  $\Delta$ -3-carene and 2-carene, as Synthons in the Stereoselective Synthesis of 2,2-dimethyl-1,3-disubstituted Cyclopropanes, *Tetrahedron Report N°745*, Available online 28 September **2005**.
- [133]. Lange W., Spanoudaki M., Stevanovic Janezic T., The Composition of Blakan White Pines (*Pinus peuce* Griseb.) Oleoresin, *Holzforchung* **1994**, *48*, 368-370.

- [134]. Kula J., Masarweh A., Gora J., Main Constituents of the Sesquiterpene Fraction of Polish Turpentine, *J. of Essential Oil Reseach* **1996**, 8, 453-454.
- [135]. Shtar S., Adams R. P., Analyses of the Leaf and Resin Essentiel Oils of *Pinus sibirica* (Rupr.) Mayr from Mongolia, *J. of Essential Oil Research* **1996**, 8, 549-552.
- [136]. Walter J., Les Acides Résiniques et les Hydrocarbules Diterpéniques du Pin Maritime *Pinus Pinaster* Ait. Identification, Biosynthèse et Isolement de Systèmes Enzymatiques, Thèse de Doctorat de l'Université de Bordeaux 1, **1988**.
- [137]. Imaizuma Y. *et al.*. *Mol. Pharmacology* **2002**, 62, 836
- [138]. Lange W., Stavanovic Janezic T., Spanoudaki M., Cembratrienols and Other Component of White Bark Pine (*Pinus heldreichii*) Oleoresin, *Phytochemistry* **1994**, 36, 1277-1279.
- [139]. Uçar G., Fengel D., Variation in Composition of Exctractives from Wood of *Pinus nigra* arieties, *Phytochemistry* **1995**, 38, 877-880.
- [140]. Arrabal C., Cortijo M., Acid fraction Evolution in Wood Extractives of *Pinus Pinaster* Ait, *J. American Oil Chemists' Society* **1994**, 71, 1039-1040.
- [141]. Zinkel D. F., Quantitative Separation of Ether-soluble Acidic and Neutral Materials, *J. of Wood Chemistry* **1988**, 448, 428-432.
- [142]. Foster D. O., Zinkel D. F., Qualitative and Quantitative Analysis of Diterpene Resin Acids by Glass Capillary Gas-liquid Chromatography, *J. of Chromatography* **1982**, 248, 89-98.
- [143]. Gref G., Gas Chromatography Analysis on Underivatized Resin Acids, *J. of Chromatography* **1988**, 448, 428-432.
- [144]. Richardson D. E., Bremmer J. B., O'Grady B. V., Quantitative Analysis of Total Resin Acids by High-performance Liquid Chromatography of their Coumarin Ester Derivatives, *J of Chromatography* **1992**, 595, 155-162.
- [145]. Lambert J. B., Wu Y., and Santiago-Blay J. A., Taxonomic and Chemical Relationships Revealed by Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Plant Exudates. *J. Nat. Prod.* **2005**, Vol. 68, Number 5, 635-648.
- [146]. Stefanini R., Diagnosis of Unifloral Honeys. II. Numerical Taxonomy of Honey and Statistical Diagnostic Test of its botanical Origin, *Apicoltura*, **1988**, 4, 13-26.
- [147]. Doner L. W., The Sugars of Honey – A Review , *J. Sci. Food. Agric.*, **1977**, 28, 443-456.
- [148]. Chirife J., Zamora M. C., Motto A., The correlation between water activity and % moisture in honey: Fundamental aspects and application to Argentine honeys, *Journal of Food Engineering* **2006**, 72, 287–292.
- [149]. Yanniotis S., Skaltsi S., Karaburniotti S., Effect of moisture content on the viscosity of honey at different temperatures, *Journal of Food Engineering* **2006**, 72, 372–377.
- [150]. Partridge, S. M., Aniline Hydrogen Phthalate as a Spraying Reagent for Chromatography of Sugars. *Nature* **1949**, 164, 443.
- [151]. Pourtallier J., *Bull. Apic.* **1964**, 197.
- [152]. Pourtallier J., *Bull. Apic.* **1967**, 2, 209-212 .
- [153]. Siddiqui I.R., Furgala B., *J. Apic. Res.* **1967**, 6, 139
- [154]. Siddiqui I.R., Furgala B., *J. Apic. Res.* **1968**, 7, 51
- [155]. Sanz M.L., Sanz J., Martínez-Castro I., Gas chromatographic–mass spectrometric method for the qualitative and quantitative determination of disaccharides and trisaccharides in honey, *Journal of Chromatography A* **2004**, 1059, 143–148.

- [156]. Mac Innes A.G., Ball D.H., Cooper F.P., Bishop J., Separation of carbohydrate derivatives by gas-liquid partition chromatography, *J. Chromatogr.* **1958**, *1*, 556-557.
- [157]. Binder H., Separation of monosaccharides by high-performance liquid chromatography: comparison of ultraviolet and refractive index detection, *J. Chromatogr.* **1980**, *189*, 414-420
- [158]. Porsch B., High-performance liquid chromatography of sugar mixtures containing xylose and arabinose on primary amino-bonded phases, *J. Chromatogr.* **1982**, *253*, 49-54.
- [159]. Brons E., Olieman J., Study of the high-performance liquid chromatographic separation of reducing sugars, applied to the determination of lactose in milk, *J. Chromatogr.* **1983**, *159*, 79-86.
- [160]. Cordella C., Militao J. S. L. T., Clément M.-C., Drajnudel P., Cabrol-Bass D., Detection and quantification of honey adulteration via direct incorporation of sugar syrups or bee-feeding: preliminary study using high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection, (HPAEC-PAD) and chemometrics, *Analytica Chimica Acta* **2005**, *531*, 239-248.
- [161]. Tommaso R. I. Cataldi, Cristiana Campa, Innocenzo G. Casella, and Sabino A. Bufo, Determination of Maltitol, Isomaltitol, and Lactitol by High-pH Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection, *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 157-163.
- [162]. Coxon, B. "Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Food-related Disaccharides and Trisaccharides". *Dev. Food Carbohydr.* **1980**, *2*, 351-390.
- [163]. Rathbone, E. B. *Analysis of Food Carbohydrates*; Elsevier Applied Science: London, **1985**
- [164]. Tamate, J.; Bradbury, J. H. "Determination of Sugars in Tropical Root Crops Using NMR Spectroscopy: Comparison with H.P.L.C. Method". *J. Sci. Food Agric.* **1985**, *36*, 1291-1302.
- [165]. Low N. H., Brisbane T., Bigam G., and Sporns P., Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance for the Qualitative and Quantitative Analysis of Structurally Similar Disaccharides, *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *36*, 953-957.
- [166]. Mazzoni V., Analyse de mélanges naturels par RMN du carbone-13: extraits lipidiques, miels et huiles essentielles, Thèse de Doctorat de l'Université de Corse, **1998**.
- [167]. Allerhand A., Maple S. R., Detailed Tautomeric equilibrium of aqueous solution D-glucose. Observation of Six Tautomers by Ultrahigh Resolution Carbon-13 NMR, *J. Amer. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3169-3171.
- [168]. Horton D., Walaszek Z., Tautomeric Equilibria of Some Sugars by Partially Relaxed, <sup>13</sup>C-Pulse Fourier-transform, Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, *Carbohydr. Res.* **1982**, *102*, 11-22.
- [169]. Jarrel H. C., Conway F. T., Moyana P., Smith I. C. P., Manifestation of anomeric form, ring structure and linkage in the <sup>13</sup>C-MNR spectra of oligomers and polymers containing D-fructose, maltulose; isomaltulose, sucrose, 1-kestose, nystose, inulin and grass levan, *Carbohydr. Res.* **1979**, *76*, 45-47
- [170]. Lauterbur P. C., <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance Spectra, *J. Chem. Phys.* **1957**, *26*, 217.
- [171]. Ernst, R. R., and Anderson W. A. *Rev. Sci. Instrum.* **1966**, *37*, 93.
- [172]. Lowe, J., and Norberg, R. E., Free-Induction Decays in Solids, *Phys. Rev.* **1957**, *107*, 46-.
- [173]. Levitt M. H. and Freeman R., Composite pulse decoupling, *J. Magn. Reson.* **1981**, *43*, 502-507.

- [174]. Shaka A.J., Keeler J., Frenkiel T., and Freeman R., An improved sequence for broadband decoupling: WALTZ-16, *J. Magn. Reson.* **1983**, *52*, 335-338.
- [175]. Günther H., La spectroscopie de RMN. Principes de base, Concepts et Applications de la Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire du Proton et du Carbone-13 en Chimie, Masson, Paris **1994**.
- [176]. Harris R.K., Newman R.H., Choice of pulse spacings for accurate T<sub>1</sub> and NOE measurements in NMR spectroscopy, *J. Magn. Reson.* **1976**, *23*, 449.
- [177]. Tenailleau E., Lancelin P., Robins R. J., and Akoka S., NMR Approach to the Quantification of Nonstatistical <sup>13</sup>C Distribution in Natural Products: Vanillin, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3818 – 3825..
- [178]. Mooney J. R., Analytical NMR, Field L. D., Sternhell S., Eds, Chap. 3, p.41; *Quantitative Applications of <sup>13</sup>C-NMR*, John Wiley & Sons, Chichester **1989**.
- [179]. Ng S., Analysis of Positional Distribution of Fatty Acids in Palm Oil by <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy, *Lipids* **1985**, *20*, 778-782.
- [180]. Kalinowski H. O., Berger S., Braun S., Carbon-13 NMR Spectroscopy, Chap. 2, p. 45, John Wiley & Sons, Chichester **1991**.
- [181]. Becker E. D., Ferretti J. A., Gambhir P. N., Selection of Optimum Parameters for Pulse Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance, *Analytical Chemistry* **1979**, *51*, 1413-1420.
- [182]. Sacchi R., Medina I., Aubourg S. P., <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance Analysis of Lipids extracted from the White Muscle of Atlantic Tuna, *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1247-1253.
- [183]. Wenkert E., Bookser B. C., and Arrhenius T. S., Total Syntheses of (±)-α- and (±)-β-Copaene and Formal Total syntheses of (±)-Sativene, (±)-cis-Sativenediol, and (±)-Helmint hosphoralt, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 644-654.
- [184]. Lange M. and Spanoudaki M., *Holz als Roh- und Werkstoff* **1995**, *53*, 68
- [185]. Richard H. Smith R. H. Xylem Monoterpenes of Pines: Distribution, Variation, Genetics, Function. *General Technical Report PSW-GTR 177*, July **2000**.
- [186]. Tsuneki H., Ma E.-L., Kobayashi S., Sekizaki N., Maekawa K., Sasaoka T., Wang M.-W.; and Kimura I., Antiangiogenic activity of β-eudesmol in vitro and in vivo, *European Journal of Pharmacology* **2005**, *Volume 512, Issues 2-3*, 105-115.
- [187]. Arrabal C., Cortijo M., de Simon B. F., Valleko M. C. G, Cadahia E., Differentiation among five Spanish Pinus Pinaster proveances based on its oleoresin terpenic composition. *Biochem. Syst. Ecol.* **2005**, *33*, 1007- 1016
- [188]. Lambert, J. B.; Wu, Y.; Santiago-Blay, J. A.; Taxonomic and Chemical Relationships Revealed by Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Plant Exudates. *J. Nat. Prod.* **2005**; *68*(5); 635-648
- [189]. Rezzi S., Bighelli A., Castolla V., Casanova J., Composition and chemical variability of the oleoresin of *Pinus nigra ssp. Larcio* from Corscia, *Industrial Crops and Products* **2005**, *31*, 71-79.
- [190]. [http://www.rosinnet.com/ReadArt.asp?Art\\_ID=29863&Class\\_ID=718](http://www.rosinnet.com/ReadArt.asp?Art_ID=29863&Class_ID=718).
- [191]. Hodges, J.D. and P.L. Lorio Jr. Moisture stress and composition of xylem oleoresin in loblolly pine. *For. Sci.* **1975**, *21*: 283-290.
- [192]. Turtola, S., Manninen, A.M., Rikala, R. and P. Kainulainen. Drought stress alters the

- concentration of wood terpenoids in Scots pine and Norway spruce seedlings. *Journal of Chemical Ecology*. **2003**, 29 (9): 1981-1995.
- [193]. Barnola, L.F., Hasegawa, M., and A. Cedeno. Mono- and sesquiterpene variation in *Pinus caribaea* needles and its relationship to *Atta laevigata* herbivory. *Biochem. Syst. Ecol.* **1994**, 22: 437-445.
- [194]. Santoro, A.E., Lombardero, M.J., Ayres, M.P., and J.J. Ruel. Interactions between fire and bark beetles in an old growth pine forest. *For. Ecol. and Manage.* **2001**, 144: 245-254.
- [195]. Angyal, S. J. The composition of reducing sugars in solution., *Advances in carbohydrates chemistry and biochemistry* **1984**., 42, 15-68.
- [196]. Terrab A., Gonzalez A. G., Francisco M. J., Heredia J., Characterisation of Moroccan unifloral honeys using multivariate analysis, *Eur Food Res Technol* **2003**, 218:88–95.
- [197]. Cotte J. F., Casabianca H., Chardon S., Lheritier J., Grenier-Loustalot M. F., Chromatographic Analysis of Sugars Applied to the Characterisation of Monofloral Honey, *Anal. Bioanal. Chem* **2004**, 380, 698-705.
- [198]. Anklam E., A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey, *Food Chemistry* **1998**, Vol. 63, No. 4, 549-562
- [199]. Da Costa Leite J. M. *et al.* Determination of Oligosaccharides in Brazilian Honeys of Different Botanical Origin, *Food Chemistry* **2000**, 70, 93-98.
- [200]. Sane M. L., Sanz J.; Martinez-Castro, I, Gas-chromatographic-Mass spectrometric method for the Qualitative and Quantitative Determination of Disaccharides and Trisaccharides in Honey, *Journal of Chromatography A* **2004**, 1059, 143-148.
- [201]. Lee J, Chung B. C., Simultaneous Measurement of Urinary Polyols Using gas Chromatography/mass Spectrometry, *J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **2006**, Feb 2;831(1-2):126-31.
- [202]. DIONEX *Technical Note 3*, 1998, Analysis of Carbohydrates by High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD).
- [203]. Directives pour l'analyse et l'appréciation des miels, OFSP/MSDA 2003, Suisse.,
- [204]. Horn, H.: *Die Kristallisation des Bienenhonigs*. Teile 1 bis 4; **1991**: Hefte 11, 323-326 und 12, 361-363; (1992): Hefte 1, 9-13 und 2, 44-48 (1991-2).
- [205]. White J., Composition of American honeys. *Techn. Bull.* No 1261. US Department of Agriculture (**1962**).
- [206]. Honey quality, Methods and Analysis and International Regulatory Standards: Review of the Work of the International Honey Commission, Swiss Bee *Research Centre*, **2000**.
- [207]. Doner L. W., The Sugar of Honey – A Review, *J. Sci. Food Agri.* **1977**, 28, 443-456.
- [208]. Surendra Rai JOSHI, Hermann PECHHACKER, Alfons WILLAM, Werner von der OHE, Physico-chemical characteristics of *Apis dorsata*, *A. cerana* and *A. mellifera* honey from Chitwan district, central Nepal, *Apidologie* **2000**, 31, 367–375.
- [209]. Cremen P. A., Zeng L., High-throughput analysis of natural product compound libraries by parallel LC–MS evaporative light scattering detection. *Analytical Chem* **2002**, 74:5492-5500.38.
- [210]. Corley D. G., Durley R. C., strategies for database déréplication of natural products *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 1484
- [211]. Dunkel R., Wu X., Identification of organic molecules from a structure database using proton

- and carbon NMR analysis results, *Journal of Magnetic Resonance* **2007**, *188*, 97–110.
- [212]. Exarchou V., Krucker M., van Beek T. A., Vervoort J., Gerothanassis I. P., Albert K., LC-NMR coupling technology: recent advancements and applications in natural products analysis. *Magn Reson Chem* **2005**, *43*:681-687.
- [213]. Konishi Y., Kiyota T., Draghici C., Gao J.-M., Yeboah F., Acoca S., Jarussophon S., Purisma E., Molecular formula analysis by an MS/MS/MS technique to facilitate dereplication of natural products. *Anal Chem* **2007**, *79*:1187-1197.
- [214]. Bringmann G, Lang G: Full absolute stereostructures of natural products directly from crude extracts: The HPLC–MS/ MS/NMR-CD ‘triad’. *Prog Mol Subcell Biol* **2003**, *37*:89-116.
- [215]. Wolfender J.-L., Ndjoko K., Hostettmann K., Liquid chromatography with ultraviolet absorbance–mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites *Journal of Chromatography A* **2003**, *1000*, 437–455.
- [216]. Wolfender J. L., Queiroz E. F., Hostettmann K., Phytochemistry in the microgram domain—a LC-NMR perspective. *Magn Reson Chem* **2005**, *43*:697-709.
- [217]. Hu J.F., Garo E., Yoo H. D., Cremin P.A., Zeng L., Goering M. G., O’Neil-Johnson M., Eldridge G. R., Application of capillary-scale NMR for the structure determination of phytochemicals. *Phytochem Anal* **2005**, *16*:127-13
- [218]. Zhang F. and Brüschweiler R., Robust Deconvolution of Complex Mixtures by Covariance TOCSY Spectroscopy, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2639 –2642
- [219]. Meisner N.-C., Hintersteiner M., Uhl V., Weidemann T., Schmied M., Gstach H. and Auer M., The chemical hunt for the identification of drugable targets, *Current Opinion in Chemical Biology* **2004**, *8*:424–431.
- [220]. Lockey R., Scott M., Forward Chemical Genetics : progress and obstacles on the path to a new pharmacopoeia, *Current Opinion in Chemical Biology* **2003**, *7*, 91-96.

**Titre :** Apports des Techniques RMN 1D et 2D aux Analyses Structurales. Apports des Techniques RMN du Carbone-13 à l'Analyse Quantitative des Mélanges Complexes d'Intérêts Industriel et Nutritionnel

**Résumé**

Mots-clés : *chimie durable, biomasse, mélange complexe, RMN du carbone-13, quantification,  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone, résines, terpènes, miels, sucres, D-glucitol*

Dans ce travail, nous avons illustré deux démarches analytiques opposées utilisant des méthodologies de la RMN pour l'étude des métabolites secondaires provenant des mélanges complexes d'intérêts industriel, nutritionnel et médicinal issus de la biomasse.

Dans un premier temps, nous avons appliqué la méthodologie classique de purification-identification avec un usage concerté des techniques 1D et 2D de la RMN pour l'étude structurale du germacranolide A9 et la révision structurale du guaianolide TD15 ; ces deux produits ont été isolés et purifiés à partir des variétés de l'espèce *Tanacetum densum*. L'utilisation extensive de SINEPT et DNOE ont permis particulièrement de désigner sans ambiguïté les protons diastéréotopiques et des carbones quaternaires ainsi que de déterminer les relations spatiales sur les faces  $\alpha$  et  $\beta$  des molécules. Ces résultats ont validé les règles empiriques concernant les caractéristiques structurales induites par la présence de l'unité pharmacophore  $\alpha$ -méthylène- $\gamma$ -butyrolactone, conduisant à la stéréochimie absolue (**1S, 4S, 5R, 6S, 7S, 8S**) pour A9 et (**1R, 3R, 6S, 7S, 10R**) pour TD15.

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé l'analyse des mélanges complexes sans séparation préalable par la RMN du carbone-13 assistée par ordinateur. Nous avons pu quantifier les composés *mono- di-* et sesquiterpéniques des essences de térébenthine et les constituants diterpéniques acides et neutres des colophanes issus des résines provenant des espèces locales de *P. kesiya* et de *P. patula*, rendant compte pour 51 à 60% de la masse totale en résine. De même, la composition en masse des sucres dans huit échantillons de miel, totalisant pour 60-81% de la masse totale et validée par le calcul de la répartition tautomérique a pu être déterminée. Grâce à cette méthode, le D-glucitol a été détecté puis quantifié, pour la première fois à notre connaissance, parmi des divers sucres minoritaires dans cinq de nos échantillons.

**Abstract**

Keywords : *green chemistry, biomass, complex mixture, carbon-13 NMR, quantitation,  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -butyrolactone, resins, terpenes, honey, sugars, D-glucitol*

In this work, we investigated secondary metabolites from biomass complex mixtures of industrial, nutritional and medicinal interests using two NMR-based opposite analytical approaches.

Firstly, concerted use of 1D and 2D NMR techniques within the frame of the purification-identification methodology, allowed us to carry out structural studies of the germacranolide A9 and the guaianolide TD15 structure revision which were isolated and purified from *Tanacetum densum ssp.* Particularly, extensive use of SINEPT and DNOE techniques were very helpful in assigning diastereotopic proton and quaternary carbon as well as in determining these molecules  $\alpha$  and  $\beta$  face spatial relationships. These results are in support of previous empirical rules regarding  $\alpha$ -methylene- $\beta$ -butyrolactone pharmacophore unit-induced structural characteristics leading respectively to (**1S, 4S, 5R, 6S, 7S, 8S**) and (**1R, 3R, 6S, 7S, 10R**) absolute stereochemistry for A9 and TD15.

Secondly, we used computer-assisted  $^{13}\text{C}$ -NMR direct complex mixture analysis without preliminary separation. Using this technique, turpentine *mono- di-* and sesquiterpene compounds, rosin diterpenic acids and neutral constituents from local *P. kesiya* and *P. patula* specie resins were successfully quantified, accounting for 51-60% of resin mass composition. We were able to directly quantify the sugar constituents of eight honey samples, accounting for 60-81% of honey mass composition and which was validated by the tautomeric equilibrium compilation. Thanks to this method, the D-glucitol was detected and quantified, for the first time at the best of our knowledge, among minor sugars within five of our samples.