



UNIVERSITÉ D'ORLÉANS



ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Institut de Chimie Organique et Analytique

THÈSE présentée par :
Thomas MICHEL

soutenue le : **23 Novembre 2011**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline : Chimie Analytique - Phytochimie

Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*)

THÈSE dirigée par :
Claire ELFAKIR

Professeur, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :
Jean-Hugues RENAULT
Jean-Luc WOLFENDER

Professeur, Université de Reims
Professeur, Université de Genève

JURY :

M.-G. DIJOUX-FRANCA
F. GUERITTE
J.-H. RENAULT
J.-L. WOLFENDER
P. ANDRE
C. ELFAKIR
E. DESTANDAU

Professeur, Université Claude Bernard Lyon 1
Directrice de recherche INSERM, ICSN, Gif sur Yvettes
Professeur, Université de Reims
Professeur, Université de Genève
Directeur du Département Innovations Actifs, LVMH recherche
Professeur, Université d'Orléans
Maître de Conférences, Université d'Orléans

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement ma directrice Claire Elfakir, Directrice de l'équipe Extraction, Analyse de molécules bioactives pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et pour m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail, et qui durant ces trois années m'a initié à la recherche avec exigence et générosité. Je lui suis reconnaissant pour la confiance et le soutien permanent qu'elle m'a témoigné dans ce travail ainsi que pour sa disponibilité et pour la grande autonomie qu'elle m'a accordée.

Mes remerciements vont également à Jean-Luc Wolfender, directeur du laboratoire de Phytochimie et Produits Naturels Bioactifs (Université de Genève), et à Jean-Hugues Renault de l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims (Université de Reims Champagne-Ardenne) qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteurs. Leurs travaux ont été pour moi une grande source d'inspiration et je leur suis particulièrement reconnaissant de m'accompagner dans cette dernière étape du travail.

De même, je remercie très sincèrement Françoise Guéritte Directrice de recherche à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, Marie-Geneviève Dijoux-Franca Professeur à l'Université Claude Bernard Lyon 1 et Patrice André Responsable du département innovation actifs du groupe DIOR-LVMH recherche pour avoir accepté d'être examinateurs de ce travail.

Je remercie très sincèrement Emilie Destandau qui m'a accompagné au quotidien pendant ces trois années de thèse. Je la remercie pour sa disponibilité, sa gentillesse, ses conseils particulièrement avisés mais surtout pour la grande confiance qu'elle m'a toujours accordée et pour m'avoir toujours encouragé à aller plus loin.

Je suis également très redevable à Caroline West pour son aide précieuse au niveau des traitements statistiques.

Je tiens à remercier tout particulièrement Laëtitia Fougère pour sa très (voire trop) grande disponibilité lorsqu'un appareil ne fonctionnait pas et pour ses conseils avisés en spectrométrie de masse.

Mes pensées vont également à Claire Lopez et Renaud Respaud avec qui j'ai partagé les enthousiasmes et les doutes inhérents à nos parcours de doctorants. Nombreux sont les bons moments où j'ai pu leur parler de ma chère Bretagne jusqu'à ce qui n'en peuvent plus et combien de fois nous nous sommes amusés à effrayer Laëtitia quant au fonctionnement de la spectrométrie. D'ailleurs, je crois que Renaud a trouvé le moyen de démontrer efficacement un API 300.

Un grand merci à mes collègues de l'ICOA, dans un ordre aléatoire plus ou moins organisé, cela me ressemble : Saïda, Cristina, Alessandra, Nathaly, Alix, Andréa, Florian, Benoit, Raphaël, Eric, Agnès, Philippe, Cédric, Cyril, Aleksander, Hala, Sandrine, Berengère, Reine...et tous ceux que j'aurais pu oublier, pour tous les moments passés ensemble.

Je tiens à remercier tout particulièrement Marie-Madeleine et Yann pour m'avoir aidé, voire secouru, et ce toujours avec le sourire, pour toutes les tâches administratives.

Je n'oublie pas ce que l'on nomme tels des « barbares » les organiciens (trop nombreux pour les cités ici !!!) pour leur sympathie, leur aide en RMN et avec qui j'ai participé à de nombreuses activités sportives qui me ressourçaient et me permettaient de mettre entre parenthèses mes analyses.

Je souhaite sincèrement remercier Gaëtan Le Floch du Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne (LUBEM, Université de Brest) pour son aide inestimable en microbiologie et son humour quotidien, parfois décalé mais auquel j'adhère !!! Je remercie également tous les autres membres du LUBEM pour leurs sympathies et leurs grandes

disponibilités. Je ne peux pas oublier Marie Elisabeth Lucchesi sans qui cette collaboration n'aurait pas pu avoir lieu. Un grand merci donc pour ton accueil à Brest et ta sympathie.

Je tiens à remercier le Professeur Chantal Pichon du Centre de Biophysique Moléculaire (CBM, CNRS Orléans) de m'avoir permis de réaliser les tests cellulaires au sein de son unité. Je remercie également Loïc Lebègue pour sa disponibilité et son aide dans la réalisation de ces tests.

Je voudrais également adresser mes remerciements à toute l'équipe du département innovation actifs du groupe DIOR-LVMH et plus particulièrement Laure Pasquier, Virginie Pécher, Isabelle Renimel et Sylvie Darnaud qui m'ont permis de travailler en toute confiance sur un projet annexe à ma thèse, et ainsi de découvrir le monde de la cosmétique.

Merci à mes parents et à ma grand-mère pour la liberté qui m'ont toujours accordé dans mes choix. Merci à ma belle-famille pour leur touchante inquiétude quant à l'avancée de mes travaux.

Je ne pouvais finir sans remercier très fortement mon incroyable chérie Emi, qui a su m'épauler, me pousser dans mes choix, et qui m'encourage toujours à aller plus loin, quoique cela nous coûte. Ta joie de vivre au quotidien, pour ne pas dire ton humour si particulier, m'a toujours égayé même dans les moments les plus durs. Sans toi je ne serai pas arrivé jusque là et j'espère que l'on ira encore plus loin ensemble.

Communications écrites et orales

Publications dans des journaux internationaux à comités de lectures

- (1) Evaluation of a simple and promising method for extraction of antioxidants from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries: Pressurised solvent-free microwave assisted extraction. T. Michel, E. Destandau, C. Elfakir. *Food Chemistry*, 126 (2011), 1380–1386.
- (2) Two-steps Centrifugal Partition Chromatography (CPC) fractionation of *Butea monosperma* (Lam.) biomarkers. T. Michel, E. Destandau, V. Pecher, I. Renimel, L. Pasquier, P. André, C. Elfakir. *Separation and Purification Technology*, 80 (2011), 34-37.
- (3) On-line hyphenation of Centrifugal Partition Chromatography (CPC) and High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) for the fractionation of flavonoids from *Hippophaë rhamnoides* L. berries. T. Michel, E. Destandau, C. Elfakir. *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011), 6173-6178.
- (4) Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed. T. Michel, E. Destandau, G. Le Floch, M.E. Lucchesi, C. Elfakir. *Food Chemistry*, 131 (2012), 754-760.

Communications orales

Congrès internationaux

- (1) On-line coupling of Centrifugal Partition Chromatography (CPC) to High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS). T. Michel, E. Destandau, C. Elfakir.
Young Researcher Workshop, 59th International Congress of the Society for medicinal plant and natural product research, Septembre 2011, Antalya, Turquie.
- (2) Development of an on-line Centrifugal Partition Chromatography (CPC) coupled with High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for the fractionation of flavonoids from *Hippophaë rhamnoides* berries. T. Michel, E. Destandau, C. Elfakir.
CCC 2010, VIth International symposium on CounterCurrent Chromatography
Juillet 2010, Lyon, France.

Congrès nationaux

- (3) Fractionnement bio-guidée et identification de bio-marqueurs dans un extrait de fleurs de *Butea monosperma* (Lam.). T. Michel, L. Fougere, E. Destandau, B. Maunit, C. Elfakir, V. Pecher, I. Renimel, L. Pasquier, Patrice André.
SEP11, 10^{ème} congrès francophone de l'AfSep sur les sciences et les couplages, Mars 2011, Toulouse, France
- (4) Fractionnement et activité anti-oxydante d'un extrait de baies d'argousier (*Hippophaë rhamnoides*) obtenu par extraction sans solvant assistée par micro-ondes. T. Michel, E. Destandau, C. Elfakir.
SEP09, 9^{ème} congrès francophone de l'AfSep sur les sciences et les couplages, Décembre 2009, Marseille, France

(5) Fractionnement par Chromatographie de Partage Centrifuge d'un extrait micro-ondes sans solvant de baies d'argousier. T. Michel, E. Destandau, C. Elfakir.

Journée AfSep – Club Ile de France: chromatographies multidimensionnelles et mélanges complexes , Juin 2009, Paris, France

Posters

Congrès internationaux

(1) Antibacterial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) organs. T. Michel, E. Destandau, C. Elfakir.

59th International Congress of the Society for medicinal plant and natural product research, Septembre 2011, Antalaya, Turquie.

(2) Centrifugal partition chromatography (CPC) as a tool for the separation of polyphenolic compounds from *Hippophaë rhamnoides* L. T. Michel, E. Destandau, C. Elfakir, L. Lebegue, C. Pichon.

ICP 2010, XXVth International Conference on Polyphenols, Août 2010, Montpellier, France

(3) Development of a methodology for the fractionation of antioxidant compounds from *Butea monosperma* flowers. T. Michel, E. Destandau, C. Elfakir, L. V. Pecher, L. Fanton, I. Renimel, S. Darnault.

Cosm'ing 2010, 5th European symposium on cosmetic ingredients and biotechnologies, Juin 2010, Saint Malo, France

(4) Anti-aging screening of a *Butea monosperma* extract, fractionation and analysis. T. Michel, E. Destandau, C. Elfakir, L. V. Pecher, L. Fanton, I. Renimel

Cosm'Innov 2010, Mars 2010, Orléans, France

(5) Optimisation of solvent-free microwave assisted extraction of antioxidants from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries. T. Michel, E. Destandau, C. Elfakir

Euroanalysis 2009, Septembre 2009, Innsbruck, Autriche

Congrès nationaux

(6) Avantages des couplages de la chromatographie de partage centrifuge avec la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse pour la purification de composés dans des extraits de plante. E. Destandau, T. Michel, A. Toribio, C. Elfakir, B. Maunit

28^{ème} journées Française de Spectrométrie de Masse, 10 Décembre 2009, 19-22 Septembre 2011, Avignon.

(7) Optimisation de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes d'anti-oxydants de baies d'argousier (*Hippophae rhamnoides* L.). T. Michel, E. Destandau, C. Elfakir

Journées de la section régionale Centre-Ouest de la Société Chimique Française, 10 Décembre 2009, Orléans.

(8) Résolution d'un extrait de baies d'argousier (*Hippophaë rhamnoides* L.) par le couplage bidimensionnel de la chromatographie de partage centrifuge avec la chromatographie liquide haute performance (CPC-HPLC-UV-DEDL). T. Michel, E. Destandau, C. Elfakir

SEP09, 9^{ème} congrès francophone de l'AfSep sur les sciences et les couplages, Décembre 2009, Marseille, France.

Liste des abréviations	16
Liste des figures	19
Liste des tableaux	25
INTRODUCTION GENERALE	28
<u>CHAPITRE 1</u>	33
I. Présentation de l'argousier (<i>Hippophaë rhamnoides</i> L.)	34
I.1. La famille des Elaeagnaceae	34
I.2. L'argousier, <i>Hippophaë rhamnoides</i> L.	34
I.2.1. Classification	34
I.2.2. Description botanique (morphologique)	36
II. Description phytochimique de l'argousier	38
II.1. Molécules issues du métabolisme primaire	38
II.1.1. Les glucides	38
II.1.2. Acides aminés et organiques	39
II.1.3. Les lipides	39
II.2. Molécules issues du métabolisme secondaire	40
II.2.1. Les composés phénoliques	40
II.2.1.1. Les acides phénoliques	41
II.2.1.2. Les lignanes	42
II.2.1.3. Les flavanoïdes	42
II.2.1.3.1. Les flavonols	42
II.2.1.3.2. Les flavan-3-ols	45
II.2.2. Dérivés terpéniques	46
II.2.2.1. Triterpènes	47
II.2.2.2. Phytostérols	47
II.2.2.3. Caroténoïdes	48
II.2.3. Alcaloïdes	48
II.3. Autres constituants	49
II.3.1. Les vitamines	49
II.3.2. Les composés volatils	49
II.3.3. Les éléments minéraux	49

III. Etat de l'art sur l'analyse des différents constituants de l'argousier	50
III.1. Chromatographie liquide haute performance (HPLC, High Performance Liquid Chromatography)	50
III.2. Chromatographie en phase gazeuse (GC, Gas Chromatography)	52
III.3. Autres techniques employées pour l'analyse des molécules de l'argousier	52
IV. Propriétés pharmacologiques de l'argousier	52
IV.1. Utilisation en médecine traditionnelle	53
IV.2. Propriétés pharmacologiques	54
IV.2.1. Activité antioxydante	57
IV.2.2. Activité antiproliférative	59
IV.2.3. Activité antimicrobienne	59
IV.3. Intérêts économiques et écologiques de l'argousier	60
V. Conclusion générale	61
Références bibliographiques	63
<u>CHAPITRE 2</u>	75
I. Introduction	76
II. Les méthodes d'extraction par fluide compressé	77
II.1. L'extraction par fluide pressurisé (PLE, Pressurized Liquid Extraction)	77
II.2. L'extraction par eau subcritique (SWE, Subcritical Water Extraction)	78
II.3. L'extraction par fluide supercritique (SFE, Supercritical Fluid Extraction)	78
III. L'extraction assistée par ultra-sons (UAE, Ultrasonic Assisted Extraction) et par micro-ondes (MAE, Microwave Assisted Extraction)	79
III.1. Principe de d'extraction UAE	79
III.2. Principe de l'extraction MAE	80
III.3. Appareillage de l'extraction MAE	84
III.4. Avantages et inconvénients de la MAE	85
III.5. Paramètres influençant l'extraction MAE	85
IV. Méthodes dérivées de l'extraction assistée par micro-ondes (MAE)	87
IV.1. Entraînement à la vapeur d'eau et MAE	87

IV.2. L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (SFME, Solvent-Free Microwave Extraction)	88
IV.3. Hydrodiffusion assisté par micro-ondes et gravité (MGH, Microwave Hydrodiffusion and Gravity)	88
IV.4. Apport du vide dans l'extraction MAE	89
V. Extractions « vertes » de l'argousier	90
VI. Evaluation et développement de la méthode d'extraction pressurisée sans solvant assistée par micro-ondes (PSFME, Pressurised Solvent Free Microwave Extraction)	92
VI.1. Evaluation comparée de la PSFME et de la PMAE avec solvant	92
VI.2. Principe de l'extraction PSFME	93
VI.3. Procédure d'extraction	94
VII. Optimisation de la PSFME par plan d'expériences	96
VII.1. Principe du plan d'expériences	96
VII.2. Paramètres expérimentaux du plan d'expériences (facteurs)	96
VII.3. Evaluation de la quantité extraite (réponse)	97
VII.4. Modélisation du plan d'expériences	97
VII.5. Résultat de l'optimisation	98
VIII. Etude approfondie de l'influence du nombre de cycles d'extraction	100
VIII.1. Effet du nombre de cycles sur la structure de la matière	100
VIII.2. Effet du nombre de cycles et de la température sur l'extraction	102
VIII.3. Analyse des extraits par HPLC-DAD	103
VIII.3.1. Optimisation de la méthode HPLC-DAD	103
VIII.3.2. Empreintes chromatographiques des extraits PSFME	104
IX. Evaluation de la dégradation potentielle des molécules	106
IX.1. Comparaison de la PSFME à d'autres techniques d'extraction	106
IX.2. Etude de la stabilité de l'isorhamnétine-3-O-glucoside et de l'isorhamnétine-3-O-rutinoside	108
X. Discussion sur le mécanisme d'extraction	110
XI. Conclusion	111
Références bibliographiques	113

CHAPITRE 3	119
I. Introduction	120
II. La Chromatographie à Contre Courant (CCC) et ses développements Actuels	121
II.1. Principe et fonctionnement de la CPC	121
II.2. Etat de l'art sur le couplage avec la spectrométrie de masse (MS)	123
II.3. Etat de l'art sur le couplage multidimensionnel impliquant la CCC dans la première dimension	125
III. Description du montage réalisé pour la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)	129
IV. Optimisation des conditions de séparation en première dimension – choix du système biphasique pour la CPC	130
V. Optimisation des conditions de séparation en deuxième dimension HPLC	134
V.1. Supports dédiés à la chromatographie rapide et compatibles avec un appareillage HPLC classique	135
V.1.1. Les colonnes monolithiques	135
V.1.2. Les colonnes « Fused core »	136
V.2. Choix du modificateur organique	138
V.3. Choix de la température de la colonne	139
V.4. Optimisation du débit de la phase mobile	140
V.5. Etude de la nature du solvant d'injection, du volume injecté et de la quantité injectée sur la séparation HPLC de deuxième dimension	141
V.5.1. Compatibilité des phases mobiles entre la première et la deuxième dimension	141
V.5.2. Optimisation du volume d'injection	143
V.5.3. Effet de la concentration injectée	144
VI. Réalisation du couplage multidimensionnel CPC-HPLC-UV-DEDL	145
VII. Application du couplage CPC-HPLC-UV-DEDL au fractionnement des flavonoïdes des baies d'argousier	147
VIII. Réalisation du couplage multidimensionnel CPC-HPLC-UV-MS	150
IX. Conclusion	154
Références bibliographiques	155

CHAPITRE 4	161
I. Introduction	162
II. Identification des flavonoïdes dans les extraits actifs de baies d'argousier	163
II.1. Présentation sommaire des techniques utilisées: HPLC-UV et HPLC-MS/MS	163
II.1.1. HPLC-UV	163
II.1.2. HPLC-MS	164
II.1.3. Conditions opératoires des paramètres d'ionisation	165
II.2. Point bibliographique sur la fragmentation des flavonoïdes en MS	166
II.2.1. Nomenclature et généralités	168
II.2.2. Fragmentation en mode positif des génines	168
II.2.3. Fragmentation en mode négatif des génines	170
II.2.4. Fragmentation des flavonoïdes- <i>O</i> -glycosylés	171
II.3. Identification des molécules présentes dans les fractions F1 à F8 de l'extrait PSFME	171
III. Bioactivité des flavonoïdes, de l'extrait PSFME et de ses fractions	181
III.1. Activité antioxydante	181
III.2. Détermination de l'activité antioxydante par des tests chimiques <i>in vitro</i>	182
III.2.1. Mesure du pouvoir anti-radicalaire par le test DPPH [*] (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle)	182
<i>III.2.1.1. Principe</i>	182
<i>III.2.1.2. Résultats</i>	182
III.2.2. Pouvoir réducteur (FRAP, Ferric Reducing Antioxydant Power)	183
<i>III.2.2.1. Principe</i>	183
<i>III.2.2.2. Résultats</i>	184
II.2.3. Détermination de la teneur en composés phénoliques totaux (TPC, Total Phenolic Content)	185
<i>II.2.3.1. Principe</i>	185
<i>II.2.3.2. Résultats</i>	186
III.3. Détermination de l'activité antioxydante cellulaire	187
III.3.1. Principe	187
III.3.2. Optimisation	187

III.3.3. Résultats	188
III.4. Détermination de la cytotoxicité	189
III.4.1. Principe	190
III.4.2. Résultats	191
IV. Discussion générale: Relation structure-activité	193
V. Conclusion	197
Références bibliographiques	198
<u>CHAPITRE 5</u>	203
I. Introduction	204
II. Développement de la méthodologie de criblage	205
II.1. Choix des organes	205
II.2. Procédure d'extraction	205
II.2.1. Choix de la technique d'extraction	205
II.2.2. Optimisation de l'extraction PLE	206
II.3. Choix des micro-organismes	207
II.4. Procédure d'évaluation de l'activité antimicrobienne	210
III. Etude exploratoire de l'activité antimicrobienne	211
III.1. Principe des méthodes descriptives	212
III.1.1. L'Analyse en Composante Principale (ACP)	212
III.1.2. L'Analyse Factorielle Discriminante (AFD)	212
III.1.3. La Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)	212
III.2. Interprétation des résultats obtenus par les méthodes statistiques descriptives	213
III.2.1. Distinction entre les organes	213
<i>III.2.1.1. Traitement de l'ensemble des données</i>	<i>213</i>
<i>III.2.1.2. Traitement d'un espace réduit de données</i>	<i>218</i>
III.2.2. Effet du solvant d'extraction	222
IV. Bioactivité et investigation phytochimique des feuilles, tiges, racines et Graines	224
IV.1. Fractionnement des extraits bruts par Extraction Liquide-Liquide (ELL)	224
IV.2. Activité antimicrobienne	226

IV.3. Activité antioxydante	228
IV.4. Caractérisation phytochimique par chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC, High Performance Thin Layer Chromatography)	231
IV.5. Détermination de la teneur en composés phénoliques et en tanins condensés	236
IV.5.1. Détermination de la teneur en composés phénoliques (TPC, Total Phenolic Content)	236
IV.5.2. Détermination du contenu en tannins condensés (CTC, Condensed Tanin Content)	238
IV.6. Corrélation entre les bio-activités et le criblage phytochimique	239
V. Isolement et identification de molécules de la fraction hydro-alcoolique de Racine	240
V.1. Choix des conditions de séparation en première dimension CPC	241
V.2. Choix des conditions de séparation en deuxième dimension HPLC	242
V.3. Vérification des conditions de MS	243
V.4. Séparation des molécules cibles par CPC-HPLC-UV-MS	244
V.5. Purification et identification des molécules cibles	249
VI. Conclusion	251
Références bibliographiques	253
CONCLUSION - PERSPECTIVES	257
ANNEXES	263
Glossaire	286

Liste des abréviations

ACN	Acétonitrile
AE	Acétate d'Ethyle
ANOVA	ANalysis Of Variance
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation)
APG	Groupe de phylogénie des angiospermes (Angiosperm Phylogeny Group)
Arg	Arginine
ASE	Extraction accélérée par solvant (Accelerated Solvent Extraction)
ATCC	American Type Culture Collection
BHA	Hydroxyanisole butylé (Butylated hydroxyanisole)
BHT	Hydroxytoluène butylé (Butylated hydroxytoluene)
BuOH	Butanol
CCC	Chromatographie à contre courant (Countercurrent Chromatography)
CE	Electrophorèse capillaire (Capillary Electrophoresis)
CH₂Cl₂	Dichlorométhane
CH₃COOH	Acide acétique
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CoA	Coenzyme A
CPC	Chromatographie de Partage Centrifuge (Centrifugal Partition Chromatography)
CTC	Contenu en tannins condensés (Condensed Tanin Content)
Cu	Cuivre
cyc	Cyclisation
DAD	Détecteur à barrette de diodes (Diode Array Detector)
DEDL	Détecteur Evaporatif à Diffusion de Lumière
d_f	Epaisseur de film en GC (Depth Film)
DHR 123	Dihydrorhodamine 123
DMEM	Milieu de culture modifié de Dulbecco (Dulbecco Modified Eagle Medium)
DMSO	Diméthylsulphoxide
DPPH	2,2-diphenyle-1-picrylhydrazyle
EAG	Equivalence en Acide Gallique
EB	Extrait Brut
EC	Equivalence en Catéchine
ECD	Détecteur électrochimique (Electrochemical Detection)
ERO	Espèce réactive oxygénée
ESI	Ionisation par électrospray (Electrospray Ionisation)
ET	Equivalence en Trolox
EtOH	Ethanol
ep	Epaulement (spectres UV)
FAE	Fraction Acétate d'Ethyle
Faq	Fraction aqueuse
FC	Folin Ciocalteu
FCPC	Fast Chromatographie de Partage Centrifuge
Fe	Fer
FeCl₃	Chlorure de fer
FeSO₄-7H₂O	Sulfate de fer heptahydraté
FH	Fraction Hexane
FID	Détecteur à ionisation de flamme (Flame Ionisation Detector)
FMAE	Extraction à pression atmosphérique assistée par micro-ondes (Focused Microwave Assisted Extraction)
FRAP	Pouvoir antioxydant réducteur du fer ferrique (Ferric Reducing Antioxydant Power)
Gal	Acide gallique

Liste des abréviations

GC	Chromatographie en phase gazeuse (Gas Chromatography)
Glu	Glucose
Gram +	Bactérie Gram-positive
Gram -	Bactérie Gram-négative
h	Heure
H₂O	Eau
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
Hex	Hexane
Hept	Heptane
HPLC	Chromatographie liquide haute performance (High Performance Liquid Chromatography)
HPTLC	Chromatographie sur couche mince haute performance (High Performance Thin Layer Chromatography)
HRMS	Spectrométrie de masse haute résolution (High Resolution Mass Spectrometry)
HSCCC	Chromatographie à contre courant haute vitesse (High Speed CounterCurrent Chromatography)
HTLC	Chromatographie liquide haute température (High Temperature Liquid Chromatography)
Hyp	Hypéroside
I	Injection
I3g	Isorhamnétine-3- <i>O</i> -glucoside
I3r	Isorhamnétine-3- <i>O</i> -rutinoside
i.d.	Diamètre interne (Internal Diameter)
IP	Appariement d'ion (Ion-pair)
Iso	Isorhamnétine
IR	Infrarouge
J/cm²	Joule par centimètre carré
Kae	Kaempférol
λ	Longueur d'onde
LMSA	Laboratoire de Microbiologie et de Sécurité Alimentaire
MΩ	Mega ohm
MAE	Extraction assistée par micro-ondes (Microwave Assisted Extraction)
MASD	Entrainement à la vapeur accéléré par micro-ondes (Microwave Accelerated Steam Distillation)
MeOH	Methanol
Mf	Matière fraîche
min	Minute
mg	Milligramme
MHG	Hydrodiffusion assistée par micro-ondes et gravité (Microwave Hydrodiffusion and Gravity)
mL	Millilitre
Ms	Matière sèche
MS	Spectrométrie de masse (Mass Spectrometry)
MSD	Entrainement à la vapeur assisté sous micro-ondes (Microwave Steam Distillation)
MSDf	Vapo-diffusion assistée par micro-ondes (Microwave Steam Diffusion)
MtBE	Méthyl <i>tert</i> -butyl éther
MTHD	Turbo hydro-distillation assistée par micro-ondes (Microwave Turbo Hydrodistillation)
MTT	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium)
m/z	Rapport masse/charge
μL	Microlitre
n	Nombre de réplicats
Na₂CO₃	Carbonate de sodium
Na₂SO₄	Sulfate de sodium
Na₂SO₄	Sulfate de sodium
n.c.	Non calculable
NEU	Ethyl aminoester de l'acide diphenyl borique
NH₂	Amine
NP	Phase normale (Normal Phase)

Liste des abréviations

P	Pression
ρ	Coefficient de corrélation de Pearson
p	p-value
PBS	Tampon phosphate salin (Phosphate Buffered Saline)
PEG	Polyéthylène Glycol
PLE	Extraction par fluide pressurisé (Pressurised Liquid Extraction)
PMAE	Extraction pressurisée assistée par micro-ondes (Pressurised Microwave Assisted Extraction)
PSFME	Extraction pressurisée sans solvant assistée par micro-ondes (Pressurised Solvent Free Microwave Extraction)
Phe	Phénylalanine
RDA	Retro Diels-Alder
Rf	Rapport frontal
RH 123⁺	Rhodamine 123 (cation fluorescent)
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROC	Receiver Operating Characteristics
RP	Phase inverse (Reversed Phase)
Sac	Saccharose
sec	Seconde
ser	Sérotype ou sérovar
Ser	Sérine
SFC	Chromatographie en fluide supercritique
SFE	Extraction par fluide supercritique (Supercritical Fluid Extraction)
SFME	Extraction sans solvant assisté par micro-ondes (Solvent Free Microwave Extraction)
SIM	Suivi d'ion isolé (Single Ion Monitoring)
SOD	Superoxyde dismutase
ssp	Sous-espèce
SWE	Extraction par eau subcritique (Subcritical Water Extraction)
T	Température
T_h	Taux d'humidité
tr	Temps de rétention
TIC	Courant ionique total (Total Ionic Current)
TMS	Triméthylsilyle
TPC	Contenu en phénols totaux (Total Phenolic Content)
TPTZ	Tripyridyltriazine
Trolox	Dérivé hydrosoluble de la Vitamine E (Acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique)
UAE	Extraction assistée par ultra-sons (Ultrasound Assisted Extraction)
UFC	Unité Formant des Colonies
UHPLC	Chromatographie liquide ultra haute performance (Ultra High Pressure Liquid Chromatography)
UV	Ultra-Violet
Val	Valine
VFS	Vanne de division de flux active (Variable Flow Splitter)
Vis	Visible
VMAE	Extraction sous vide assistée par micro-ondes (Vacuum Microwave Assisted Extraction)
VMHD	Hydrodistillation par micro-ondes sous vide pulsé (Vacuum Microwave Hydrodistillation)
VMHG	Hydrodiffusion assistée par micro-ondes et gravité sous vide (Vacuum Microwave Hydrodiffusion and Gravity)
VS	Vanille Sulfurique
W	Watt
XTT	2,3-bis-(2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl)
Xyl	Xylose

Liste des figures

Chapitre I:

- Figure I-1:** Distribution géographique des sous-espèces européennes de l'espèce *Hippophaë rhamnoides*. 36
- Figure I-2:** Représentation photographique de différentes parties de l'argousier, *Hippophaë rhamnoides*. 37
- Figure I-3:** Structure des acides hydrobenzoïques et hydrocinnamiques libres identifiés dans l'argousier, *Hippophaë rhamnoides*. 41
- Figure I-4:** Exemples de flavonols aglycones et de flavonols-*O*-glycosylés détectés dans différents organes de l'argousier, *Hippophaë rhamnoides*. 43
- Figure I-5:** Exemples de flavan-3-ols et proanthocyanidines identifiées dans les graines d'argousier, *Hippophaë rhamnoides*. 46
- Figure I-6:** Structure de l'acide mévalonique. 46
- Figure I-7:** Exemples de triterpènes identifiés dans l'argousier, *Hippophaë rhamnoides*. 47
- Figure I-8:** Exemples de phytostérols identifiés dans l'argousier, *Hippophaë rhamnoides*. 47
- Figure I-9:** Exemple d'un caroténoïde identifié dans l'argousier, *Hippophaë rhamnoides*. 48
- Figure I-10:** Exemples d'alcaloïdes isolés de l'argousier, *Hippophaë rhamnoides*. 48

Chapitre II:

- Figure II-1:** Schéma simplifié d'une cellule d'extraction PLE. 78
- Figure II-2:** Représentation schématique de la croissance et de l'implosion d'une bulle de cavitation. 80
- Figure II-3:** Evolution d'une bulle de cavitation à proximité d'une surface solide. 80
- Figure II-4:** Représentation du spectre électromagnétique et positionnement des micro-ondes domestiques. 81
- Figure II-5:** Représentation schématique du comportement de molécules possédant un dipôle en l'absence de champ électrique, sous l'effet d'un champ électrique continu et sous l'effet d'un champ électrique de haute fréquence. 82
- Figure II-6:** Représentation schématique de la FMAE (système ouvert) (A) et de la PMAE (système fermé) (B) sous des conditions d'irradiations micro-ondes monomode (A) et multimode (B) respectivement. 85
- Figure II-7:** Chromatogrammes d'extraits de baies d'argousier obtenus par PMAE avec de l'éthanol (EtOH), de l'eau (H₂O) et par PSFME à 300W et pendant 60 sec. 93
- Figure II-8:** Illustration schématique de la procédure d'extraction PSFME développé pendant cette étude. 95
- Figure II-9:** Diagrammes de Pareto et valeurs des facteurs et de leurs interactions de premier ordre pour les réponses du test DPPH[•], du test FRAP et de la TPC. 99
- Figure II-10:** Photographies obtenues par un microscope optique montrant la structure d'une baie avant et après plusieurs cycles (C) d'extraction (50 sec, 1000 W), et couleur des extraits obtenus après différents cycles d'extraction. 101

- Figure II-11:** Evolution du rendement d'extraction et de la température à l'intérieur du réacteur en fonction du nombre de cycle appliqué, $n = 6$. **102**
- Figure II-12:** Histogrammes illustrant l'activité antioxydante des extraits après 1, 3 et 5 cycles d'extraction (50 sec, 1000W) avec les tests DPPH^{*}, FRAP et TPC. **103**
- Figure II-13:** Chromatogrammes d'extraits de baies d'argousier obtenus par PSFME (50 sec, 1000W) après un, trois et cinq cycles d'extraction. **105**
- Figure II-14:** Histogrammes comparatif obtenus entre différentes techniques d'extraction pour le test DPPH (A), le test FRAP (B) et le test FC (C). **107**
- Figure II-15:** Chromatogrammes d'extraits de baies d'argousier obtenus par PSFME, macération, PLE à 100°C et pressage. **108**
- Figure II-16:** Pourcentage de recouvrement de l'isorhamnétine-3-*O*-rutinoside et de l'isorhamnétine-3-*O*-glucoside avant (C0) et après plusieurs cycles d'irradiation micro-ondes (C1 à C5). **109**
- Figure II-17:** Représentation schématique du mécanisme de rupture des parois cellulaires sous l'effet des micro-ondes. **110**
- Chapitre III:**
- Figure III-1:** Photographie d'une colonne de 200 mL d'un appareil FastCPC (FCPC, Kromaton, Angers) et détail d'un des disques constitutifs de la colonne. **122**
- Figure III-2:** Représentation schématique des modes ascendant et descendant en CPC. **123**
- Figure III-3:** Représentation schématique des deux approches couplant des appareils CCC entre eux: MDCCC et 2D-CCC. **125**
- Figure III-4:** Représentation schématique du couplage HSCCC-HPLC-DAD utilisant un diviseur de flux passif en forme de T et une vanne 6 voies. **126**
- Figure III-5:** Représentation schématique du système de fractionnement par CPC utilisé au laboratoire. Les flèches bleues représentent le circuit principal alors que les vertes représentent le circuit auxiliaire. **129**
- Figure III-6:** Chromatogramme du fractionnement de l'extrait PSFME de baie d'argousier obtenu par CPC-DEDL avec le système de solvant Arizona G constitué du mélange Hept/AE/MeOH/H₂O (1/4/1/4, v/v). **134**
- Figure III-7:** Photographies obtenues au microscope électronique à balayage des macropores de diamètre de 2 μm (A) et des mésopores de diamètre de 13 nm (B) d'une colonne Chromolith (Merck, Darmstadt, Allemagne). **135**
- Figure III-8:** Représentation schématique du chemin de diffusion sur une particule « fused core » Halo (A) et sur une particule ordinaire totalement poreuse (B). **137**
- Figure III-9:** Chromatogramme HPLC-UV d'un extrait de baies d'argousier obtenu par PSFME. **138**
- Figure III-10:** Chromatogrammes montrant l'effet du modificateur organique sur la séparation des flavonoïdes de l'argousier obtenus à 366 nm (A) sur la colonne « Fused core » Halo C18 (50 \times 4.6 mm ID, 2.7 μm) et (B) sur la colonne monolithique Chromolith-RP18e (100 \times 4.6 mm ID, 2 μm). **139**

Figure III-11: Chromatogrammes de l'extrait PSFME obtenus à 366 nm sur la colonne « Fused core » Halo C18 (50 × 4.6 mm ID, 2.7 μm) à 2 mL/min et sur la colonne monolithique Chromolith-RP18e (100 × 4.6 mm ID, 2 μm) à 3 mL/min. **140**

Figure III-12: Chromatogrammes d'un mélange de cinq flavonols (rutine (1) isorhamnétine-3-*O*-rutinoside (2), isorhamnétine-3-*O*-glucoside (3), quercétine (4) et isorhamnétine (5)) obtenus à 366 nm sur la colonne « Fused core » Halo C18 (50 × 4.6 mm ID, 2.7 μm) à 2 mL/min en modifiant la nature du solvant d'injection: phase aqueuse (MeOH/H₂O), phase organique (Hept/AE). **142**

Figure III-13: Chromatogrammes de l'extrait PSFME obtenus à 366 nm sur la colonne « Fused core » Halo C18 (50 × 4.6 mm ID, 2.7 μm) à 2 mL/min en variant le volume d'injection. **143**

Figure III-14: Chromatogrammes de l'extrait PSFME obtenus à 366 nm sur la colonne « Fused core » Halo C18 (50 × 4.6 mm ID, 2.7 μm) à 2 mL/min en variant la quantité injectée. **144**

Figure III-15: Représentation schématique du couplage entre la CPC et l'HPLC avec focalisation sur la vanne Valco ® en position « LOAD » et « INJECT ». **146**

Figure III-16: Chromatogrammes CPC-UV-DEDL de l'extrait de baies d'argousier PSFME obtenus par fractionnement CPC avec le système de solvant Arizona G (Hept/AE/MeOH/H₂O, 1/4/1/4). **147**

Figure III-17: Chromatogrammes obtenus avec le couplage en ligne CPC-HPLC-UV: première dimension CPC-DEDL (A) et deuxième dimension HPLC-UV à 366 nm (B). **148**

Figure III-18: Chromatogrammes UV (366 nm) et de courant ionique total (TIC, Total Ion Current) obtenues avec le couplage CPC-HPLC-UV-MS pendant la phase d'élution. **149**

Figure III-19: Chromatogrammes UV (366 nm) et de courant ionique total (TIC, Total Ion Current) obtenues avec le couplage CPC-HPLC-UV-MS pendant la phase d'extrusion. **152**

Chapitre IV:

Figure IV-1: Spectres UV-vis de la quercétine (flavonol) (a), de l'isobutrine (chalcone) (b) et de la naringine (flavanone) (c) enregistrés entre 200 et 500 nm par HPLC-DAD. **164**

Figure IV-2: Structure typique d'un flavonoïde avec la numérotation des carbones (A) et exemple de voies de fragmentation des flavonoïdes obtenues en MS/MS (B). **167**

Figure IV-3: Schéma de fragmentation obtenu pour la quercétine en mode positif après rupture RDA entre les liaisons 1/3 et 0/2. **169**

Figure IV-4: Schéma de fragmentations obtenu pour la quercétine en mode négatif après rupture RDA entre les liaisons 1/2. **170**

Figure IV-5: Chromatogrammes des fractions F1 à F8 obtenus par HPLC-DAD à 366 nm (bleu) et de la F4 à 279 nm (rouge) sur la colonne. **172**

Figure IV-6: Spectres d'ions produits (ions fils) à partir de l'ion [M-H]⁻ m/z 301 pour la quercétine (20) et à partir de l'ion [M-H]⁻ m/z 315 pour l'isorhamnétine (24). **173**

Figure IV-7: Spectre d'absorbance UV-Vis du composé 8 obtenu par HPLC-DAD. **174**

Figure IV-8: Spectre d'ions produits (ions fils) à partir de l'ion $[M-H]^-$ m/z 447 de la quercétine-7-O-rhamnoside (**19**) obtenu en mode négatif avec un triple quadripôle Quattro Ultima Micromass équipé d'une source ESI. **175**

Figure IV-9: Spectre d'ions produits (ions fils) à partir de l'ion $[M-H]^-$ m/z 707 des composés **21** et **25** obtenus en mode négatif avec un triple quadripôle Quattro Ultima Micromass équipé d'une source ESI. **176**

Figure IV-10: Spectres d'ions produits (ions fils) à partir de l'ion $[M-H]^-$ m/z 463 et 477 des composés **12** et **16** obtenus en mode négatif avec un triple quadripôle Quattro Ultima Micromass équipé d'une source ESI. **177**

Figure IV-11: Spectres d'ions produits (ions fils) à partir de $[M-H]^-$ l'ion m/z 623 de l'isorhamnétine-3-O-glucoside-7-O-rhamnoside (**13**) et de l'isorhamnétine-3-O-rutinoside (**17**) obtenus en mode négatif avec un triple quadripôle Quattro Ultima Micromass équipé d'une source ESI. **178**

Figure IV-12: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH[•] entre l'espèce radicalaire DPPH[•] et un antioxydant (AH). **182**

Figure IV-13: Test DPPH[•]: Histogrammes, exprimés en pourcentage d'inhibition (%), illustrant l'activité antioxydante du Trolox, de l'extrait PSFME (PSFME) et des fractions (F1 à F8) à la concentration de 1 mg/mL. **183**

Figure IV-14: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)-TPTZ et un antioxydant (AH). **184**

Figure IV-15: Test FRAP: Histogrammes, exprimés en valeur FRAP (μ M), illustrant l'activité antioxydante du Trolox, de l'extrait PSFME (PSFME) et des fractions (F1 à F8) à la concentration de 1 mg/mL. **185**

Figure IV-16: Histogrammes, exprimés en équivalence d'acide gallique (GAE), illustrant la teneur en composés phénoliques totaux (TPC) de l'extrait PSFME (PSFME) et des fractions (F1 à F8) à la concentration de 1 mg/mL. **186**

Figure IV-17: Structure chimique (A) et mode d'action (B) de la DHR 123 au sein d'une cellule soumise à un stress oxydatif. ERO, espèces réactives de l'oxygène. **187**

Figure IV-18: Test DHR 123: Histogrammes, exprimés en pourcentage d'inhibition (%), illustrant l'activité antioxydante du Trolox, du solvant (DMSO), de l'extrait PSFME (PSFME) et des fractions (F1 à F8) à la concentration de 1 mg/mL avec le test DHR 123. **189**

Figure IV-19: Structures et schémas réactionnels impliquant les sels de tetrazolium (MTT et XTT) dans les cellules vivantes. **190**

Figure IV-20: Histogrammes, exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire (%), illustrant la cytotoxicité, du solvant (DMSO), de l'extrait PSFME (PSFME) et des fractions (F1 à F8) obtenue à 1 mg/mL (A) et à 0.1 mg/mL (B) en utilisant le sel de tetrazolium XTT sur des fibroblastes. **192**

Chapitre V:

Figure V-1: Rendement d'extraction moyen obtenu par extraction PLE à 100 bar et 60°C de divers organes de l'argousier: baie, graine, drèche, feuille, tige, racine, et en utilisant deux solvants d'extraction: Ethanol ou Acétate d'éthyle. **207**

Figure V-2: Représentation schématique de la méthodologie employée pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits d'argousier. **210**

- Figure V-3:** Analyse en composantes principales basée sur le pourcentage d'inhibition moyen des différents organes obtenu sur différentes souches de micro-organismes. (A) graphique d'observations, (B) graphique des variables. **214**
- Figure V-4:** Représentation graphique de l'AFD réalisée entre les organes dans les différentes conditions d'extraction et de concentration. (A) graphique des barycentres, (B) graphique des variables. **216**
- Figure V-5:** Pourcentage d'inhibition moyen obtenu à partir d'extraits de baies (Roumanie 2008) et de racines (PLANFLOR 2009) d'argousier sur deux souches bactériennes *B. cereus* et *S. enterica sr enteriditis*. n = 6. **218**
- Figure V-6:** Analyse en composantes principales basée sur le pourcentage d'inhibition moyen des différents organes obtenu sur différentes souches de micro-organismes. (A) graphique d'observations, (B) graphique des variables. **219**
- Figure V-7:** Dendrogramme de la CAH réalisé à partir des pourcentages d'inhibitions moyens obtenus pour les différents organes de l'argousier à 100 µg/mL sur différentes souches bactériennes. **220**
- Figure V-8:** Pourcentage d'inhibition moyen obtenu à partir d'extraits de différents organes d'argousier à 100 µg/mL sur trois souches bactériennes *B. cereus*, *S. enterica ser enteriditis* et *X. campestris*. n = 6. **221**
- Figure V-9:** Graphique des barycentres obtenu par l'AFD réalisée entre les solvants d'extraction: 1 (Ethanol) et 2 (Acétate d'éthyle). **222**
- Figure V-10:** Graphique de l'analyse de variance à un facteur comparant les moyennes des niveaux éthanol (EtOH) et acétate d'éthyle (AE) obtenus pour les bactéries *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *S. enterica ser enteriditis* et *X. campestris*. **223**
- Figure V-11:** Schéma de fractionnement ELL adopté pour le partage en trois fractions (FH, FAE et Faq) de l'extrait brut éthanolique de feuilles, tiges, racines et graines. **225**
- Figure V-12:** Activité antioxydante des extraits bruts éthanoliques des différents organes et des fractions obtenus à 1000 µg/mL avec le test DPPH^{*} et le test FRAP. **230**
- Figure V-13:** Empreintes phytochimiques en acides aminés et en sucres des extraits bruts éthanoliques et des fractions des différents organes obtenues par HPTLC. **232**
- Figure V-14:** Empreintes phytochimiques en terpènes des extraits bruts éthanoliques et des fractions des différents organes obtenues par HPTLC. **233**
- Figure V-15:** Empreintes phytochimiques en polyphénols des extraits bruts éthanoliques et des fractions des différents organes obtenues par HPTLC. **235**
- Figure V-16:** Détermination du contenu en composés phénoliques (TPC) des extraits bruts éthanoliques des différents organes et des fractions obtenus à 1000 µg/mL. **237**
- Figure V-17:** Détermination du contenu en tannins condensés (CTC) des extraits bruts éthanoliques des différents organes et des fractions obtenus à 1000 µg/mL. **238**
- Figure V-18:** Chromatogrammes obtenus à 366 nm de la fraction FAE de feuilles d'argousier (A) et des co-injections de l'isorhamnétine-3-O-glucoside (1), de l'isorhamnétine-3-O-rutinoside (2) et de l'isorhamnétine (3) avec la fraction FAE (B). **239**
- Figure V-19:** Chromatogrammes obtenus à 279 nm (rouge) et 366 nm (bleu) de la fraction aqueuse Faq de racines d'argousier. **241**

- Figure V-20:** Chromatogramme obtenu à 260 nm de la fraction aqueuse Faq de racines d'argousier. **243**
- Figure V-21:** Chromatogramme obtenu à 260 nm de la Faq de racines d'argousier après fractionnement par CPC avec le système de solvant BuOH/H₂O (5:5). **244**
- Figure V-22:** Chromatogrammes UV (260 nm) et de courant ionique total (TIC, Total Ion Current) obtenu avec une source d'ionisation ESI en mode négatif avec le couplage CPC-HPLC-UV-MS pendant la phase d'élution. **245**
- Figure V-23:** Chromatogrammes UV (366 nm) et de courant ionique total (TIC, Total Ion Current) obtenu avec une source d'ionisation ESI en mode négatif avec le couplage CPC-HPLC-UV-MS pendant la phase d'élution. **246**
- Figure V-24:** Spectre de masse du composé **R1** obtenu en mode négatif lors du couplage CPC-HPLC-UV-MS avec un triple quadripôle Quattro Ultima Micromass équipé d'une source ESI. **247**
- Figure V-25:** Chromatogrammes d'extrait d'ions caractéristiques de la molécule **R1** possédant un rapport m/z de 215. **248**
- Figure V-26:** Spectre de masse du composé **R2** obtenu en mode négatif lors du couplage CPC-HPLC-UV-MS avec un triple quadripôle Quattro Ultima Micromass équipé d'une source ESI. **248**
- Figure V-27:** Chromatogrammes d'extrait d'ions caractéristiques de la molécule **R2** possédant un rapport m/z de 199 et 259. **249**
- Figure V-28:** Chromatogrammes obtenus à 279 nm (rouge) et 366 nm (bleu) des molécules **R1** et **R2** purifiées à partir la fraction aqueuse Faq de racines d'argousier. **250**
- Annexes:**
- Figure A-1:** Photographie du couplage CPC-HPLC-UV. 1D, Première dimension ; 2D, deuxième dimension ; VFS, Variable Flow Splitter. **271**
- Figure A-2:** Photographie du couplage CPC-HPLC-UV-MS réalisé avec une source électrospray (ESI). Split, diviseur de flux. **272**
- Figure A-3:** Photographie d'une microplaque obtenue avec le test DPPH'. **277**
- Figure A-4:** Photographie d'une microplaque obtenue avec le test FRAP. **278**
- Figure A-5** Photographie d'une microplaque obtenue avec le test TPC. **279**

Liste des tableaux

Chapitre I:

Tableau I-1: Taxonomie de l'argousier <i>Hippophaë rhamnoides</i> .	34
Tableau I-2: Liste des espèces et sous-espèces du genre <i>Hippophaë</i> .	35
Tableau I-3: Principaux flavonols- <i>O</i> -glycosylés détectés dans différents organes de l'argousier, <i>Hippophaë rhamnoides</i> .	44
Tableau I-4: Séparation des composés phénoliques de l'argousier par HPLC couplés à différents systèmes de détection.	51
Tableau I-5 : Récapitulatif des différentes utilisations en médecine traditionnelle de l'argousier selon l'organe utilisé et l'origine géographique.	54
Tableau I-6: Propriétés médicinales de l'argousier (revues non incluses)	54

Chapitre II:

Tableau II-1: Valeurs de constante diélectrique (ϵ') et du facteur de perte diélectrique (ϵ'') obtenus à 20°C pour les solvants les plus communément utilisés en MAE.	83
Tableau II-2: Références des précédents travaux utilisant les techniques d'extraction modernes pour l'extraction des molécules de l'argousier, <i>Hippophaë rhamnoides</i> .	91
Tableau II-3: Matrice expérimentale du plan d'expériences factoriel complet.	98
Tableau II-4: Conditions du gradient d'analyse HPLC.	104

Chapitre III:

Tableau III-1: Exemples de couplages récents entre des appareils de HSCCC ou de CPC avec la MS pour la séparation et l'identification en ligne de molécules d'intérêt d'origine végétale.	124
Tableau III-2: Exemples de couplage en ligne entre des appareils CCC et/ou des appareils HPLC.	127
Tableau III-3: Valeurs des K_D obtenues pour six molécules caractéristiques de l'extrait brut PSFME avec différents systèmes de solvants biphasiques.	132
Tableau III-4: Durée totale d'analyse (T) et perte de charge (P) obtenues à différentes températures et avec deux modificateurs organiques pour la colonne Halo C18 (50 × 4.6 mm ID, 2.7 μm) et la colonne Chromolith-RP18e (100 × 4.6 mm ID, 2 μm).	139
Tableau III-5: Pourcentage massique moyen (%) des différentes fractions regroupées après le fractionnement de l'extrait PSFME, n = 3.	153

Chapitre IV:

Tableau IV-1: Récapitulatif des principaux ions fragments obtenus en ESI MS/MS à partir des ions pseudo moléculaires [M-H]⁺ des composés **20** et **24** identifiés comme étant la quercétine et l'isorhamnétine. **173**

Tableau IV-2: Maximums d'absorption et ions caractéristiques des acides phénoliques et flavonols détectés dans l'extrait PSFME de baies d'argousier. **179**

Chapitre V:

Tableau V-1: Abréviation, origine et année de récolte des différents organes de l'argousier utilisés lors de ces travaux. **205**

Tableau V-2: Description et pouvoir pathogène des souches de bactéries, de levures et de champignons utilisées lors de cette étude. **209**

Tableau V-3: Matrice des corrélations entre les différentes souches de micro-organismes obtenues avec le coefficient de corrélation de Pearson. **215**

Tableau V-4: Matrice de confusion de l'AFD réalisée entre les organes. **217**

Tableau V-5: Matrice de confusion de l'AFD réalisée entre les solvants. **222**

Tableau V-6: Pourcentage massique (%) et couleur des fractions obtenues après le fractionnement ELL de l'extrait brut éthanolique. **225**

Tableau V-7: Pourcentage d'inhibition (%) de l'extrait brut éthanolique et des fractions obtenu à 100 µg/mL sur diverses souches microbiennes. **226**

Tableau V-8: Détermination du pouvoir antioxydant des différentes organes et des fractions obtenu à 1000 µg/mL avec les tests DPPH[•] et FRAP. **229**

Tableau V-9: Détermination du contenu en composés phénoliques (TPC) et du contenu en tannins condensés (CTC) des extraits bruts éthanoliques des différentes organes et des fractions obtenues à 1000 µg/mL respectivement avec la méthode TPC et CTC. **237**

Tableau V-10: Valeurs des K_D obtenues pour les deux molécules cibles (**R1** et **R2**) de la fraction active Faq de racines d'argousier avec différents systèmes de solvants biphasiques. **242**

Tableau V-11: Valeurs des rapports m/z mesurés et calculés en HRMS ainsi que la proposition des formules brutes pour **R1** et **R2**. **250**

Annexes:

Tableau A-1: Nom et provenance des réactifs employés au cours de ces travaux. **265**

Tableau A-2: Abréviation, origine et année de récolte des différents organes de l'argousier utilisés lors de ces travaux. **266**

Tableau A-3: Conditions du gradient d'analyse HPLC. **270**

INTRODUCTION GENERALE

Les végétaux supérieurs ont la capacité de synthétiser, par des voies métaboliques complexes, de nombreux composés qu'ils utilisent pour diverses fonctions adaptatives notamment en réponse aux stress biotiques et abiotiques qu'ils peuvent subir. Les plantes renferment donc une large variété de molécules chimiques (peptides, terpènes, polyphénols, alcaloïdes...) de propriétés physico-chimiques très différentes et qui présentent une large variété d'activités biologiques (antitumorale, antivirale, antimicrobienne, antioxydante cicatrisante...). Il est par ailleurs aujourd'hui reconnu que les plantes constituent une source importante de molécules bioactives.

Ces dernières années, les substances naturelles connaissent un intérêt croissant dans de nombreux domaines. En effet, avec un public de plus en plus réticent à consommer des produits contenant des molécules issus de la synthèse chimique, un certain nombre de secteurs industriels (cosmétique, pharmaceutique, agroalimentaire) se tournent de nouveau vers l'incorporation de ces molécules d'origine naturelle, aux caractéristiques chimiques et biologiques originales, dans leurs formulations. La valorisation de ces principes actifs d'origine naturelle représente donc un potentiel économique énorme.

Pour être valorisés, les composés bioactifs doivent d'abord être séparés de leur matrice végétale d'origine. L'obtention de ces molécules nécessite de nombreuses étapes souvent longues et coûteuses, telles que l'extraction, l'isolement par des essais bio-guidés et l'identification freinant encore leur développement industriel. Un des enjeux majeurs de la chimie analytique consiste donc en l'innovation technologique et le développement de nouvelles méthodologies d'extraction, de séparation rapide, de miniaturisation, de couplage... tout en s'inscrivant dans une démarche de « chimie verte » et de respect de l'environnement.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse a été de participer à ces avancées technologiques en mettant en œuvre des méthodes innovantes d'extraction, de fractionnement et d'identification de produits naturels d'origine végétale plus rapides, plus efficaces tout en réduisant les quantités de solvant, d'énergie et d'échantillon consommées. L'intégralité des développements méthodologiques effectués au cours de cette thèse a été réalisée à partir de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*, Elaeagnaceae), qui par sa richesse phytochimique (molécules hydrosolubles à liposolubles) s'avère être une plante « modèle » appropriée à la mise en œuvre de nombreuses méthodes d'analyse. De plus, il est reconnu à cette plante un potentiel nutritionnel et thérapeutique particulièrement intéressant à exploiter.

Ce travail de recherche, réalisé au sein de l'équipe Extraction, Analyse de molécules bioactives de l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), s'inscrit dans les nouvelles thématiques de l'équipe portant sur le développement de méthodologies d'extraction et d'analyse de molécules bioactives potentiellement incorporables dans des formulations cosmétiques et/ou thérapeutiques. Ce travail a donné lieu à des collaborations dont certaines avec des partenaires du pôle de compétitivité « Cosmetic Valley », en particulier le département Innovations et Actifs de LVMH recherche et le Centre de Biophysique Moléculaire (CNRS – UPR 4301), ainsi qu'avec un laboratoire de microbiologie de l'Université de Bretagne Occidentale (LUBEM – EA 3882).

Le premier chapitre de cette thèse est consacré à l'étude bibliographique de l'argousier. Celle-ci est constituée d'une description botanique de la plante et d'une présentation détaillée des diverses molécules qu'elle contient. Les différentes techniques d'analyse employées à ce jour pour leur séparation sont également résumées. Enfin, l'utilisation en médecine traditionnelle ainsi que les potentiels thérapeutiques, économiques et écologiques de l'argousier sont abordés.

Après une présentation des méthodes d'extraction actuellement utilisées pour extraire les substances naturelles, le deuxième chapitre présente les résultats obtenus au cours du développement et de l'optimisation par plan d'expériences d'une méthode d'extraction « verte » sans solvant assistée par micro-ondes. Les effets de différents paramètres pouvant influencer la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits de baies d'argousier sont ensuite discutés.

Le troisième chapitre de ce manuscrit est consacré à une nouvelle approche multidimensionnelle mettant en œuvre la chromatographie de partage centrifuge et la chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur ultra-violet et à un spectromètre de masse (CPC-HPLC-UV-MS). Cette méthodologie permet la séparation à l'échelle semi-préparative et l'identification en ligne des molécules séparées.

Le quatrième chapitre est dédié à l'identification par spectrométrie de masse des molécules majoritaires de l'extrait micro-ondes sans solvant, ainsi qu'à l'évaluation, sur des systèmes *in vitro* et *in cellulo*, de leurs propriétés antioxydante et cytotoxique. Par la suite,

l'ensemble des résultats a été discuté à la fin de ce chapitre dans le but d'établir une relation structure-activité.

Le cinquième chapitre est, quant à lui, consacré à l'étude des activités antioxydante et antibactérienne de six organes de l'argousier (baie, graine, drêche, feuille, tige et racine), ainsi qu'à leur caractérisation phytochimique par chromatographie sur couche mince haute performance. Après la mise en évidence par des outils de statistique descriptive d'organes plus actifs, la méthodologie multidimensionnelle CPC-HPLC-UV-MS a été transposée au fractionnement guidé de deux molécules majoritaires de racines d'argousier.

Enfin les conclusions essentielles sur l'ensemble de ce travail ainsi que les perspectives de sa continuité ont été dégagées.

CHAPITRE 1

**L'ARGOUSIER, PLANTE MEDICINALE A FORT
POTENTIEL ECONOMIQUE ET THERAPEUTIQUE**

I. Présentation de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides* L.)

I.1. La famille des Elaeagnaceae

La famille des Elaeagnaceae appartient à l'ordre des Rosales et se constitue de trois genres (*Elaeagnus* L., *Hippophaë* L., *Sherpherdia* Nutt.) et de 45 espèces. D'après la dernière version du groupe de phylogénie des angiospermes (APG, Angiosperm Phylogeny Group) [1], cette famille botanique est principalement présente dans l'hémisphère nord (Amérique du Nord, Europe et Asie) bien qu'elle tende à se développer dans d'autres régions du monde par l'utilisation de certaines espèces en agriculture ou comme plante ornementale. Tous les membres des Elaeagnaceae ont la particularité de développer des symbioses bactériennes au niveau de leurs racines avec un actinomycète *Frankia* [2]. Les nodules racinaires ainsi formés sont capable de fixer l'azote ce qui permet à ces plantes de coloniser des milieux pauvres.

I.2. L'argousier, *Hippophaë rhamnoides* L.

I.2.1. Classification

Tableau I-1: Taxonomie de l'argousier *Hippophaë rhamnoides*.

Règne végétale	
Embranchement	Spermatophytes
Sous- embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Rosidae (Rosides)
Ordre	Rosales
Famille	Elaeagnaceae
Genre	<i>Hippophaë</i>
Espèce	<i>Hippophaë rhamnoides</i> L.

Le genre *Hippophaë* (Elaeagnaceae), comprend sept espèces parmi lesquelles *H. rhamnoides* est la plus importante avec une subdivision en huit sous-espèces [3, 4] (Tableau I-2). Il existe aussi de nombreux cultivars puisque la plante est maintenant largement cultivée. Son aire de répartition s'étend entre 27° et 69° de latitude Nord et entre 7° de longitude Ouest et 122° de longitude Est. Cependant, parmi les sept espèces seule *H. rhamnoides* s'étend pleinement sur le plateau eurasiatique couvrant la Chine, la Mongolie, la Russie, le Kazakhstan, la Turquie, la Roumanie, la Suisse, la France, la Grande-Bretagne, la Norvège, la Suède et la Finlande. Les autres espèces se retrouvent principalement en Chine et dans les pays juxtaposant la chaîne de l'Himalaya [5].

Tableau I-2: Liste des espèces et sous-espèces du genre *Hippophaë* adaptée selon Bartish [3] et Sun [4].

Espèces	Sous-espèces
<i>Hippophaë goniocarpa</i>	
<i>Hippophaë gyantsensis</i>	
<i>Hippophaë neurocarpa</i>	ssp. <i>neurocarpa</i> ssp. <i>stellatopilosa</i>
<i>Hippophaë litangensis</i>	
<i>Hippophaë rhamnoides</i>	ssp. <i>carpatica</i> ssp. <i>fluviatilis</i> ssp. <i>mongolica</i> ssp. <i>rhamnoides</i> ssp. <i>sinensis</i> ssp. <i>turkestanica</i> ssp. <i>wolongensis</i> ssp. <i>yunnanensis</i>
<i>Hippophaë salicifolia</i>	
<i>Hippophaë tibetana</i>	

Parmi les différentes sous-espèces de *H. rhamnoides* trois sont présentes sur le continent européen [5] (Fig. I-1) :

- *H. rhamnoides* ssp. *carpatica* qui est largement présente en Roumanie et dans les Carpates
- *H. rhamnoides* ssp. *fluviatilis* qui est une variété montagnaise présente dans les Alpes et ses vallées adjacentes
- *H. rhamnoides* ssp. *rhamnoides* se développant sur les massifs dunaires le long des côtes de la mer Baltique et de la Manche

Le terme argousier, qui sera employé par la suite pour décrire la plante, correspond à la dénomination française de l'espèce *H. rhamnoides*, sans distinction des sous espèces.

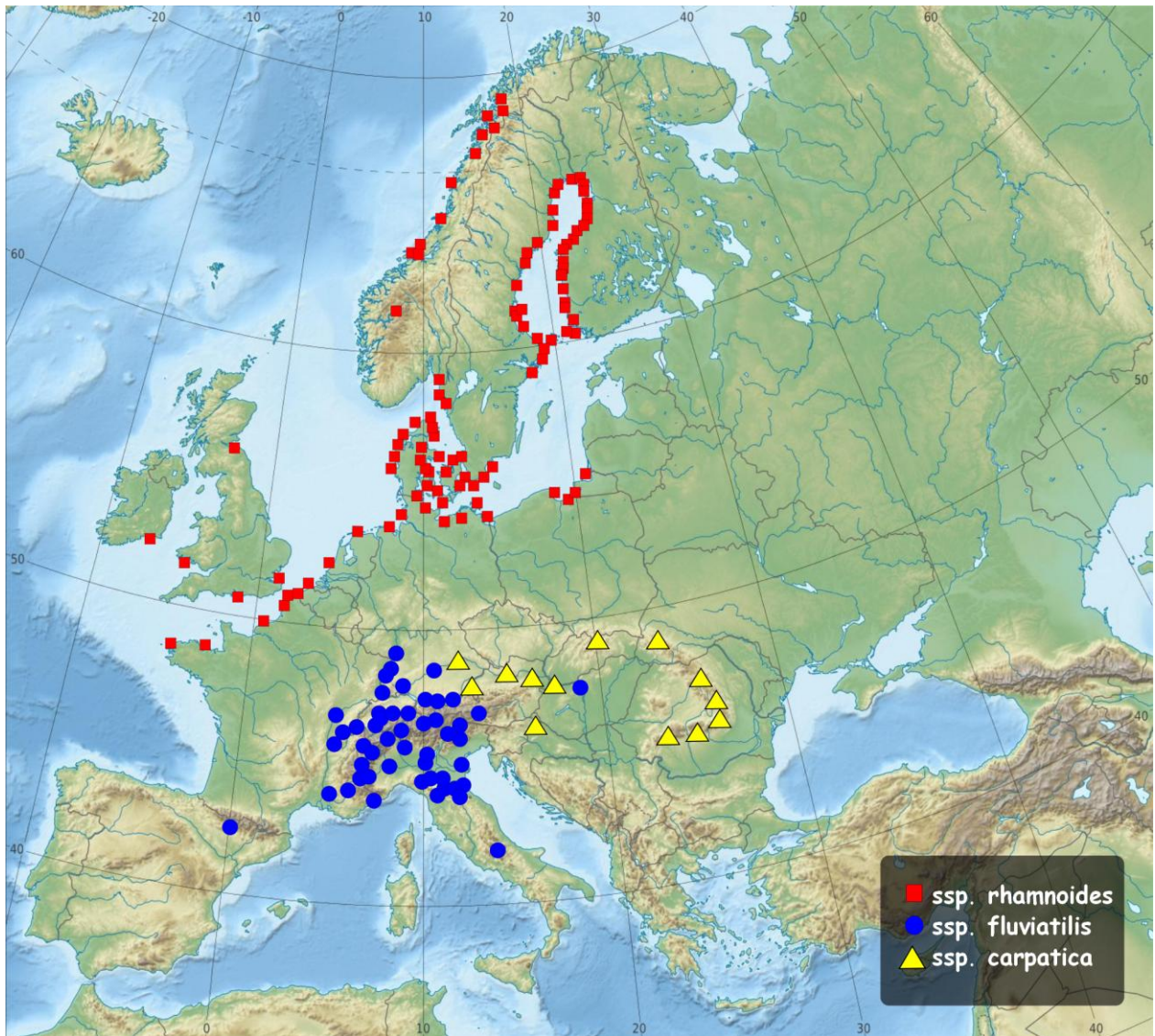


Figure I-1: Distribution géographique des sous-espèces européennes de l'espèce *Hippophaë rhamnoides*, adaptée d'après Rousi [5].

I.2.2. Description botanique (morphologique)

L'argousier est une plante épineuse, buissonnante pouvant atteindre jusqu'à 10 m de haut (Fig. I-2a). Son écorce, constituée de sillon irrégulier est de couleur brun-gris foncé ou de couleur verdâtre pour les parties jeunes. Ses feuilles caduques sont lancéolées de type simples entières, de couleur vert terne au dessus et vert glauque sur leur face inférieure. La disposition des feuilles sur le rameau est de type alternée. *H. rhamnoides* est une espèce dioïque, c'est-à-dire qui produit des fleurs mâles et femelles sur des pieds distincts, et qui effectue sa pollinisation par le vent [5, 6]. L'enveloppe florale, ou périanthe, est très réduite et se limite à un système périanthaire à deux lobes sans pétales [5, 7]. Les fleurs mâles (Fig. I-2b) sont constituées de quatre étamines et les fleurs femelles (Fig. I-2c) sont constituées d'un

unique pistil. Les fruits charnus sont des baies de forme sphérique (Fig. I-2d) engainant en masses très compactes les rameaux et qui n'apparaissent que sur les pieds femelles âgés de plus de deux ans. Les baies sont orangées mais la couleur peut varier du jaune au rouge selon les variétés. Les fruits matures restent en place tout l'hiver sur les rameaux et sont donc une nourriture appréciée de beaucoup d'animaux pendant la saison difficile.



Figure I-2: Représentation photographique de différentes parties de l'argousier, *Hippophaë rhamnoides*, plante entière (A), fleurs mâles (B), fleurs femelles (C), baies (D) [8].

Le système racinaire de l'argousier est très extensif et peut s'étendre rapidement par des rhizomes (tiges souterraines horizontales) pour former de nouveaux arbustes. Les racines sont capables de fixer l'azote atmosphérique en grande quantité grâce à une association symbiotique avec un actinomycète *Frankia*. Par ailleurs, elles sont capables de transformer la matière organique et minérale insoluble des sols en états plus solubles et donc plus absorbables par les autres plantes. L'argousier a donc un grand intérêt écologique et est d'ailleurs souvent utilisé comme espèce pionnière pour recoloniser et stabiliser des zones érodées ou des sols peu fertiles (dunes, versants montagneux, mines...). De plus, son implantation est facilitée grâce à sa capacité à survivre dans des conditions arides, humides, salines et de grand froid [9].

II. Description phytochimique de l'argousier

Dans le monde végétal, les molécules naturellement synthétisées peuvent être classifiées en deux grandes catégories. Premièrement, il y a les composés qui sont produits dans toutes les cellules et qui jouent un rôle central dans le métabolisme et la reproduction de ces cellules. Ces molécules comprennent les acides nucléiques, les acides aminés communs, les acides gras et les sucres. Ils sont connus sous le nom de métabolites primaires. Deuxièmement, il y a les molécules qui peuvent être parfois caractéristiques de certaines familles et/ou espèces végétales et qui ne sont pas indispensables à la survie de la plante. Ces molécules correspondent aux métabolites secondaires qui peuvent être classés en trois grands groupes: les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes. La plupart des métabolites primaires exercent leurs effets biologiques au sein de la cellule ou de l'organisme qui est responsable de leur production, tandis que les métabolites secondaires, bio-synthétisés en réponse à un stress biotique et/ou abiotique, ont la particularité d'avoir des effets biologiques sur d'autres organismes, d'où leur intérêt dans les domaines cosmétique, pharmaceutique et agronomique [10]. Comme mentionné ci-dessus ces molécules sont synthétisées par les plantes en réponse aux variations de leur environnement proche. Leur teneur peut donc être fortement influencée au sein de la plante avec parfois des localisations spécifiques. Différentes études ont ainsi montré que la composition chimique et nutritive de l'argousier était soumise à d'importantes variations suivant les sous-espèces, le climat, l'origine, la maturité ou encore la méthodologie employée pour obtenir des molécules d'intérêt [11-13].

II.1. Molécules issues du métabolisme primaire

II.1.1. Les glucides

Les glucides sont des molécules indispensables à la survie des organismes vivants car leurs formes les plus simples sont à la base des mécanismes énergétiques et de la biosynthèse des autres métabolites. Chez les végétaux on les retrouve sous différentes formes [14]:

- polymères énergétiques (amidon) ou structuraux (cellulose, pectines...)
- sucres simples
- hétérosides (sucre lié avec une molécule non osidique)
- précurseurs de voies de biosynthèse

Dans cette partie, seuls les oses simples et leurs dérivés seront abordés, les hétérosides seront décrits en même temps que leurs génines.

Les baies d'argousier sont une source riche en oses simples et dérivés. Une équipe Finlandaise s'est attardée à l'identification des sucres des baies ainsi qu'à leur variation en

fonction de l'origine, du climat et de la variété d'argousier [11, 15-17]. Les sucres majoritaires sont le fructose, le glucose, l'éthyl- β -D-glucose et le saccharose. L'argousier est une plante qui contient également des polyols tel que le sorbitol, le L-quebrachitol, le mannitol, l'inositol et différentes formes énantiomériques du méthyl-inositol.

Un autre dérivé majeur de sucre est l'acide ascorbique, ou vitamine C, qui dérive biosynthétiquement du D-glucose. Les baies d'argousier ont la particularité d'être très riches en vitamine C ce qui leur confère un fort intérêt nutritionnel. Sa concentration varie de 360 mg/100 g de baies pour la sous-espèce Européenne *rhamnoides*, à 2500 mg/100 g de baies pour la sous espèce Chinoise *sinensis* [18].

II.1.2. Acides aminés et organiques

Ces métabolites primaires polaires sont présents dans différentes parties de l'argousier [18, 19]. Les fruits et le jus d'argousier contiennent dix-huit acides aminés dont les plus abondants sont l'acide aspartique, la proline et la thréonine [18, 20]. Des acides organiques, qui migrent au niveau de la pulpe du fruit au cours de la maturation, sont également présents tel que l'acide malique, l'acide quinique et l'acide citrique [15, 16].

II.1.3. Les lipides

Le terme lipide est en général utilisé pour décrire des molécules à caractère hydrophobe et solubles dans des solvants organiques. Cette définition peut convenir à différentes classes moléculaires telles que les acides gras, les terpènes, les caroténoïdes ou les stérols. Dans cette partie, seuls les acides gras et leurs dérivés seront abordés, les autres classes étant issues du métabolisme secondaire seront évoquées par la suite.

Les lipides qui sont de nature hydrophobe se retrouvent principalement dans les fractions huileuses de la plante. L'argousier a la particularité de produire deux types d'huile, qui diffèrent par leur composition métabolique, l'une issue des parties charnues du fruit (pulpe et peau) et l'autre issue des graines. La quantité d'huile varie considérablement dans les parties tendres (de 1 à 35%) en fonction de la variété, de l'origine géographique et de la maturation des fruits, alors que la quantité d'huile dans les graines, moins assujettie à variation, est d'environ 10 % [21].

Pour l'huile des parties tendres, les acides gras majoritaires sont l'acide palmitoléique (16 :1 n-7), l'acide palmitique (16:0) et l'acide oléique (18:1 n-9). L'huile issue des graines est riche en acides gras insaturés, dont les deux majoritaires sont l'acide linoléique (18:2 n-6) et l'acide linoléique (18:3 n-3). Néanmoins d'autres acides gras sont présents dans les

graines, comme l'acide stéarique (18:0), l'acide oléique (18:1 n-9), l'acide palmitique (16:0) et l'acide vacénique (18:1 n-7).

Les baies d'argousier sont également riches en tocophérols et tocotriénols. Dans la pulpe et la peau, l' α -tocophérol, ou vitamine E, constitue à lui seul 90 % de la quantité totale en tocophérols et tocotriénols alors que dans la graine les isomères α et γ du tocophérol représentent chacun 30 à 50 % du total. L' α -, β - et γ -tocotriénol sont les plus présents dans les parties tendres alors que seulement le β -tocotriénol domine dans les graines [21].

Des lipides polaires ont été caractérisés dans les fruits avec la présence de phospholipides et de galactolipides représentant respectivement 61 et 39% de ceux-ci. Les phospholipides majoritaires sont le phosphatidylglycérol et le siphosphophatidylethanolamine, alors que le monogalactosyldiacylglycérol et le digalactosyldiacylglycérol constituent les galactolipides majoritaires [22].

II.2. Molécules issues du métabolisme secondaire

II.2.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques des végétaux correspondent à un vaste ensemble de molécules qui ont toutes en commun un noyau benzénique portant un ou plusieurs hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction. Ce sont des molécules issues du métabolisme secondaire et qui sont ubiquitaires du règne végétal et notamment des angiospermes. Les composés phénoliques interviennent dans différents aspects de la vie de la plante, ils sont ainsi impliqués dans la physiologie de la plante (lignification, interactions symbiotiques...), dans les mécanismes de défenses de la plante (interactions biotiques et abiotiques) ou encore dans la coloration des fleurs. Par ailleurs ils sont bénéfiques pour l'homme vis-à-vis de certaines maladies de par leur action sur le métabolisme humain et leur propriété antioxydante [23]. D'un point de vue biosynthétique, les composés phénoliques peuvent être engendrés par deux voies métaboliques : la voie du shikimate, la plus courante, qui conduit entre autre à la formation des acides phénoliques, flavonoïdes et lignanes ; et la voie des polyacétates qui est à l'origine de composés polycycliques tels que les coumarines, les xanthones et les quinones [14].

II.2.1.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes distincts que sont les acides hydroxybenzoïques (C₆-C₁) et les acides hydroxycinnamiques (C₆-C₃) (Fig. I-3). Des composés de ces deux groupes ainsi que leurs dérivés estérifiés et glycosylés ont été trouvés dans les baies et les feuilles d'argousier par Arimboor *et al.* [24]. Dans la pulpe et les graines, cinq acides hydroxybenzoïques (l'acide salicylique, l'acide *p*-hydroxybenzoïque, l'acide protocatéchique, l'acide gallique et l'acide vanillique) et quatre acides hydroxycinnamiques (l'acide cinnamique, l'acide *p*-coumarique, l'acide caféique et l'acide férulique) ont pu être détectés (Fig. I-3). Une étude antérieure mentionne également la présence d'acide ellagique dans les baies d'argousier [25]. Les feuilles quant à elles, sont moins riches en structure moléculaire avec seulement six acides phénoliques caractérisés, mais comme pour la pulpe et les baies c'est l'acide gallique qui est le plus abondant. Récemment, un dérivé glucosylé de l'acide férulique, le 1-feruloyl- β -D-glucoside, a été isolé et identifié des feuilles d'argousier [26].

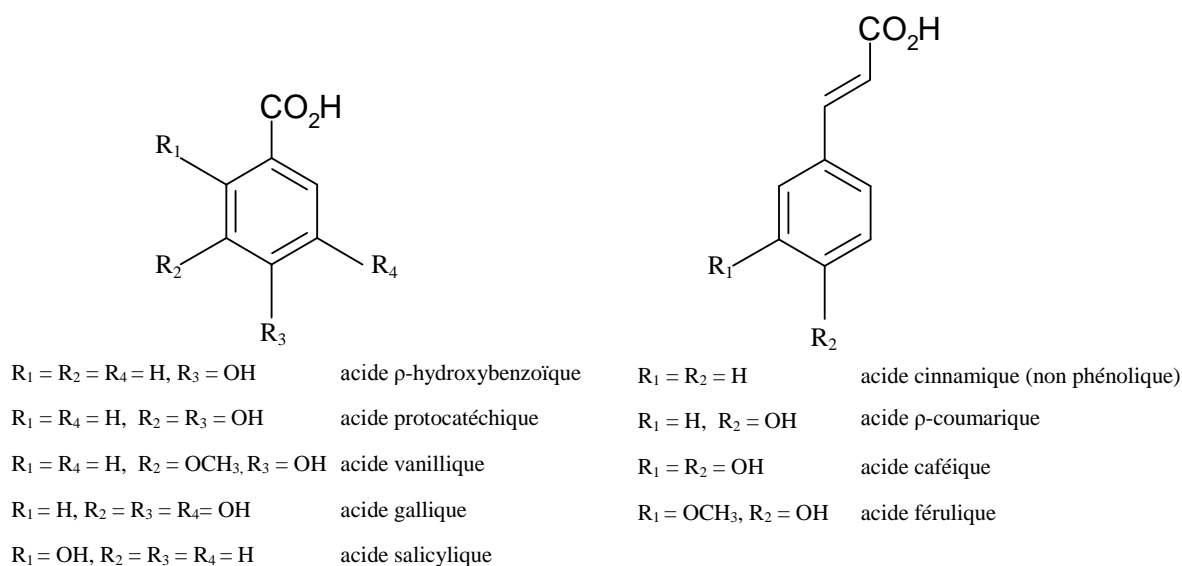


Figure I-3: Structure des acides hydrobenzoïques et hydrocinnamiques libres identifiés dans l'argousier, *Hippophaë rhamnoides*, adapté d'après Arimboor *et al.* [24].

II.2.1.2. Les lignanes

Les lignanes désignent des molécules qui résultent, le plus souvent, de l'établissement d'une liaison entre deux carbones de la chaîne latérale de deux acides hydroxycinnamiques. Ils interviennent dans les mécanismes de défense de la plante. Chez l'argousier deux lignanes ont été identifiés, le (-)-sécoisolaricirésinol et le (-)-matairésinol [27].

II.2.1.3. Les flavanoïdes

L'ensemble des flavanoïdes, qui possèdent une origine biosynthétique commune, ont un élément structural de base en C₁₅ (C₆-C₃-C₆). Selon le degré d'oxydation du noyau central, qui peut être ouvert ou fermé, les flavanoïdes peuvent être regroupés en neuf classes distinctes : chalcones, auronnes, flavones, isoflavones, flavonols, flavanones, flavane-3-ols flavane-3,4-diols et anthocyanes. Dans la plante, ils sont très souvent liés avec des sucres, on parle alors d'hétérosides constitués d'une partie phénolique aglycone ou génine associée à un sucre. La liaison glycosidique pouvant être de type C-O-C ou de type C-C. D'autres types de liaisons se retrouvent fréquemment chez les flavanoïdes comme des sulfatations ou des prénylations [14, 23]. L'argousier contient de nombreux dérivés flavonoïques qui sont principalement représentés par des dérivés de flavonols et de flavane-3-ols.

II.2.1.3.1. Les flavonols

De nombreux travaux ont pu démontrer la richesse en flavonols et surtout en flavonols glycosylés des baies et des feuilles d'argousier. Pour exemple, les travaux réalisés par Rosch *et al.* [28] ont permis de détecter trente-quatre flavonols glycosylés et/ou acylés dans le jus d'argousier. Parmi ces composés il a pu être démontré que les flavonols glycosylés majoritaires des baies étaient l'isorhamnétine-3-*O*-glucoside-7-*O*-rhamnoside, l'isorhamnétine-3-*O*-rutinoside, l'isorhamnétine-3-*O*-glucoside, l'isorhamnétine-3-*O*-sophoroside-7-*O*-rhamnoside, la quercétine-3-*O*-rutinoside, la quercétine-3-*O*-glucoside et la quercétine-3-*O*-sophoroside-7-*O*-rhamnoside [29, 30]. Les parties aglycones sont majoritairement représentées par l'isorhamnétine, la quercétine et le kaempférol, mais d'autres génines, comme la myricétine et la syringétine, ont également été trouvées (Fig. I-4) [13, 31-34]. Pour mieux apprécier cette diversité chimique, le tableau I-3 présente une liste des flavonols glycosylés caractérisés dans les différents organes de l'argousier. Cette liste est non-exhaustive car elle ne mentionne pas les molécules dont la position des sucres n'a pas pu être correctement assignée.

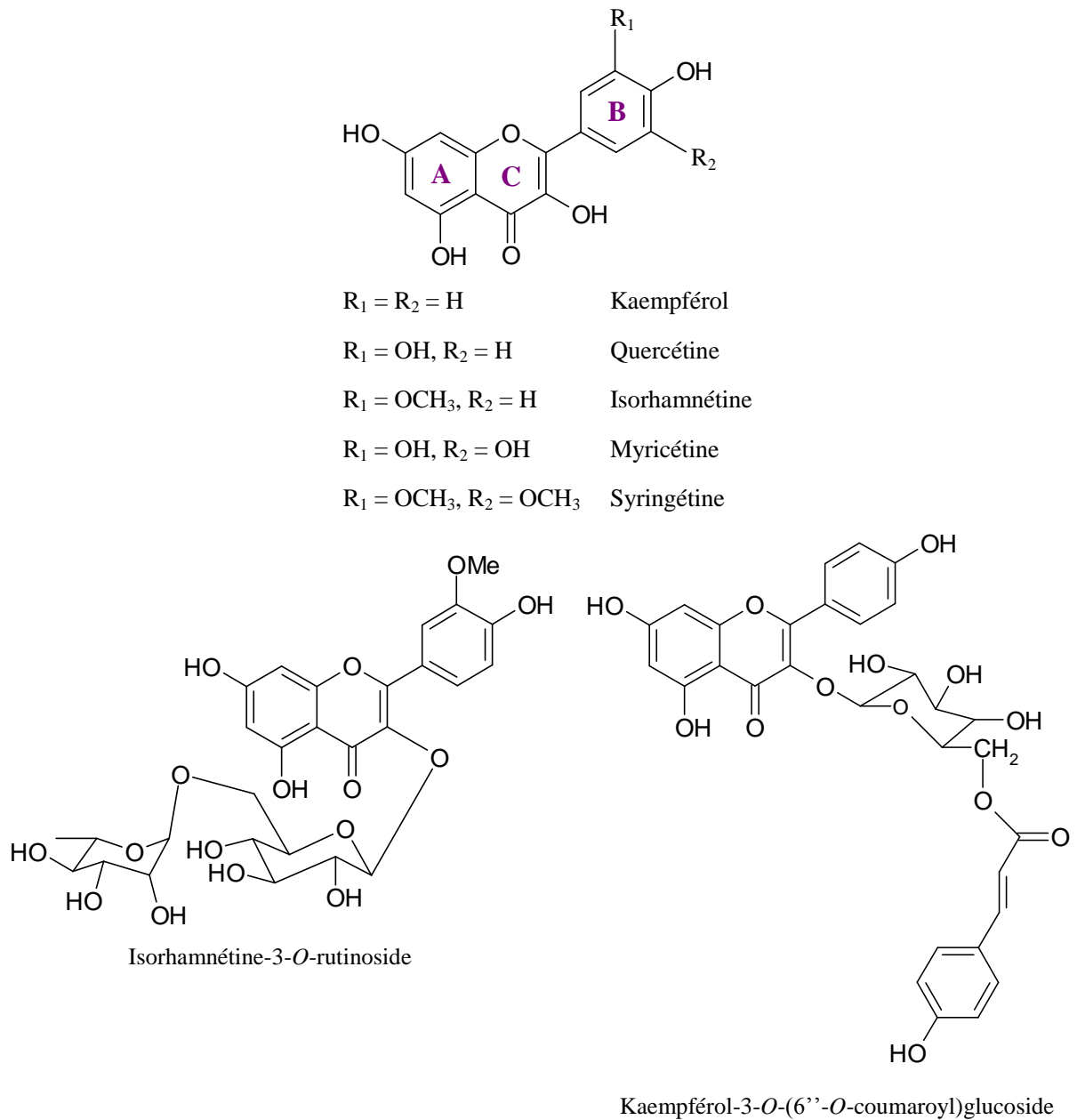


Figure I-4: Exemples de flavonols aglycones et de flavonols-O-glycosylés détectés dans différents organes de l'argousier, *Hippophaë rhamnoides*.

Tableau I-3: Principaux flavonols-*O*-glycosylés détectés dans différents organes de l'argousier, *Hippophaë rhamnoides*.

Molécule	Echantillon	Références
Isorhamnétine		
Isorhamnétine-7- <i>O</i> -rhamnoside	Jus	[28]
	Fruit	[33]
Isorhamnétine-3- <i>O</i> -glucoside	Jus	[28, 34]
	Fruit	[29, 30, 33, 35]
	Feuille	[26]
Isorhamnétine-3- <i>O</i> -galactoside	Fruit	[33, 35]
Isorhamnétine-3- <i>O</i> -rutinoside	Jus	[28, 34]
	Fruit	[29, 30, 33, 35]
	Feuille	[26]
Isorhamnétine-3- <i>O</i> -glucoside-7- <i>O</i> -rhamnoside	Jus	[28]
	Fruit	[29, 30]
Isorhamnétine-3,7- <i>O</i> -diglucoside	Jus	[28]
Isorhamnétine-3- <i>O</i> -pentoside-7- <i>O</i> -rhamnoside	Jus	[28]
Isorhamnétine-3- <i>O</i> -sophoroside-7- <i>O</i> -rhamnoside	Jus	[28]
	Fruit	[29, 30]
Isorhamnétine-3- <i>O</i> -rutinoside-7- <i>O</i> -rhamnoside	Jus	[28]
Quercétine		
Quercétine-7- <i>O</i> -rhamnoside	Fruit	[33]
Quercétine-3- <i>O</i> -glucoside	Jus	[28, 34]
	Fruit	[29, 30, 33]
	Feuille	[26]
Quercétine-3- <i>O</i> -galactoside	Fruit	[33, 36]
	Graine	[36]
	Feuille	[36, 37]
Quercétine-3- <i>O</i> -rutinoside	Jus	[28]
	Fruit	[29, 30, 33, 36]
	Feuille	[36]
Quercétine-3- <i>O</i> -glucoside-7- <i>O</i> -rhamnoside	Jus	[28]
	Feuille	[26]
Quercétine-3- <i>O</i> -sophoroside-7- <i>O</i> -rhamnoside	Jus	[28]
	Fruit	[29, 30]
Kaempférol		
Kaempférol-3- <i>O</i> -glucoside	Fruit	[35]
Kaempférol-3- <i>O</i> -rutinoside	Fruit	[35]
Kaempférol-7- <i>O</i> -rhamnoside	Fruit	[30]
Kaempférol-3- <i>O</i> -glucoside-7- <i>O</i> -rhamnoside	Jus	[28]
Kaempférol-3- <i>O</i> -sophoroside-7- <i>O</i> -rhamnoside	Jus	[28]
	Fruit	[30]
Kaempférol-3- <i>O</i> -rutinoside-7- <i>O</i> -rhamnoside	Jus	[28]
Kaempférol-3- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -coumaroyl)glucoside	Feuille	[33]
Syringétine		
Syringétine-3- <i>O</i> -glucoside	Jus	[34]

II.2.1.3.2. Les flavan-3-ols

Les flavan-3-ols sont des flavonoïdes qui se caractérisent par un cycle central C très peu substitué et l'absence de fonction cétone (Fig. I-5). Par ailleurs, les flavan-3-ols sont à l'origine des tannins condensés ou proanthocyanides, qui correspondent à des oligomères ou des polymères de flavan-3-ols dérivés de la (+)-catéchine [23]. Dans l'argousier, il a pu être mis en évidence que le jus et les résidus de fruits contiennent des monomères de (+)-catéchine, (-)-épicatéchine, (+)-gallocatéchine et (-)-épigallocatéchine (Fig. I.5) [38, 39], et que les feuilles contiennent seulement de la (+)-catéchine [32]. Toutefois, c'est dans les graines (contenues dans les résidus) et sous la forme de proanthocyanides que l'on retrouve majoritairement les flavan-3-ols [38, 40-42]. Dans le monde végétal, les polymères de flavan-3-ols peuvent être groupés en deux classes : les procyanidines constituées de sous unités (-)-épicatéchine, et les prodelphinidines constituées de sous unités (-)-épigallocatéchine (Fig. I-5). Les polymères dominants de l'argousier sont de type prodelphinidine avec des unités élémentaires (epi)gallocatéchine couplées, par des liaisons C₄-C₈, à des unités terminales gallocatéchine, ce qui est très rare dans le monde végétal dans lequel les procyanidines dominant largement [40, 41].

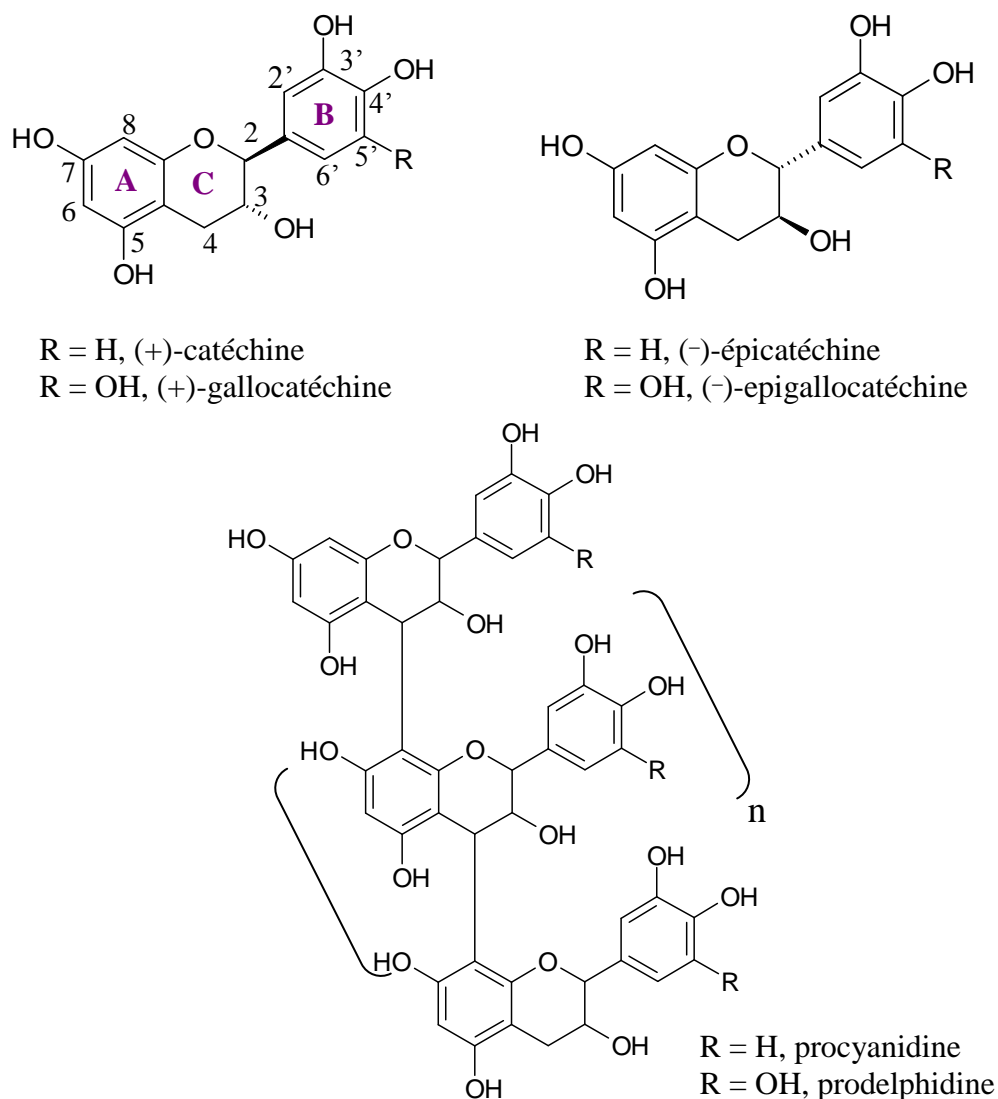


Figure I-5: Exemples de flavan-3-ols et proanthocyanidines identifiées dans les graines d'argousier, *Hippophaë rhamnoides*.

II.2.2. Dérivés terpéniques

Les terpénoïdes sont une classe importante de métabolites secondaires qui proviennent du même précurseur biosynthétique, l'acide mévalonique (Fig. I-6). Chaque classe de terpènes est issue du couplage « tête-à-queue » d'unités isopréniques. La première étape de leur biosynthèse commence toujours par condensation de deux dérivés phosphorylés de l'acide mévalonique, l'isopentényl pyrophosphate et le diméthylallyl pyrophosphate [14].

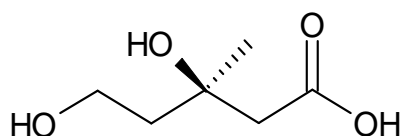


Figure I-6: Structure de l'acide mévalonique.

II.2.2.1. Triterpènes

Les triterpènes sont des composés en C₃₀ issus de la cyclisation du squalène. Ils sont très souvent hydroxylés et présentent une très forte unité structurale [14]. Dans l'argousier des triterpènes ont été identifiés dans différentes parties de la plante. Ainsi, dans les baies et les graines, l' α et β -amyrine, le lupeol, l'uvaol et l'acide ursolique ont été détectés (Fig. I-7) [43-46]. De l'acide ursolique a également été identifié dans les tiges [47], ainsi que de l'acide oléanolique, des dérivés d'acide oléanolique et d'acide maslinique [48].

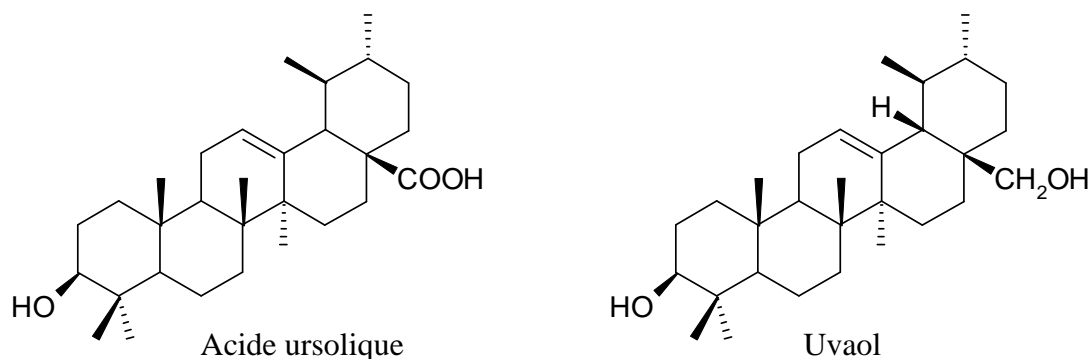


Figure I-7: Exemples de triterpènes identifiés dans l'argousier, *Hippophaë rhamnoides*.

II.2.2.2. Phytostérols

Les phytostérols, l'un des sous-groupes les plus importants des triterpènes, sont très présents dans les baies d'argousier. Ils constituent 0,02-0,04 % de l'huile des parties tendres et 0,1-0,2 % de l'huile de graines [21]. Différents travaux ont montré que le β -sistostérol était le phytostérol le plus abondant dans l'huile d'argousier. Parmi les autres phytostérols majoritaires (Fig. I-8) peuvent être cités : le campestérol, l'avenastérol, l'isofucostérol, le stigmastérol, le citrostadiénole, le cycloarténole, le 24-methylnecycloartanol et l'obtusifoliolé [21, 43, 44, 49]. La composition en phytostérols majoritaires est peu soumise à variations en fonction de l'origine et de la période de récolte, au contraire des minoritaires. Toutefois, la composition en phytostérols isolés varie considérablement en fonction de la méthode d'extraction utilisée [44].

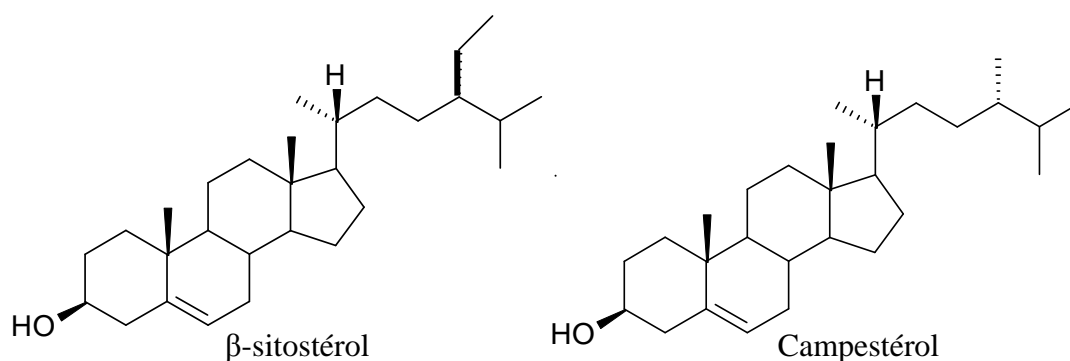


Figure I-8: Exemples de phytostérols identifiés dans l'argousier, *Hippophaë rhamnoides*.

II.2.2.3. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des terpènes en C₄₀ qui possèdent un chromophore avec au moins dix doubles liaisons. Ce sont des pigments végétaux qui donnent une couleur jaune-orangée aux organes qui les contiennent. Les caroténoïdes peuvent être séparés en deux grandes classes, les carotènes et les xanthophylles qui diffèrent respectivement par l'absence ou la présence de fonctions hydroxyles [14]. Ce sont ces molécules qui sont responsables de la couleur des baies d'argousier pouvant varier du jaune au rouge. La quantité de caroténoïdes est donc sujette à de nombreuses variations notamment en fonction des variétés, du climat et du degré de maturation des fruits [50]. Les caroténoïdes présents dans la baie, l'huile de pulpe et de graines, et dans les résidus d'argousier, s'y retrouvent sous forme de carotènes, de xanthophylles mais aussi sous forme de carotènes estérifiés [13, 21, 50, 51]. Les pigments majoritaires sont le β-carotène (Fig. I-9), la zéaxanthine et la β-cryptoxanthine, mais d'autres caroténoïdes ubiquitaires comme le lycopène, le γ-carotène ou la lutéine sont également présents.

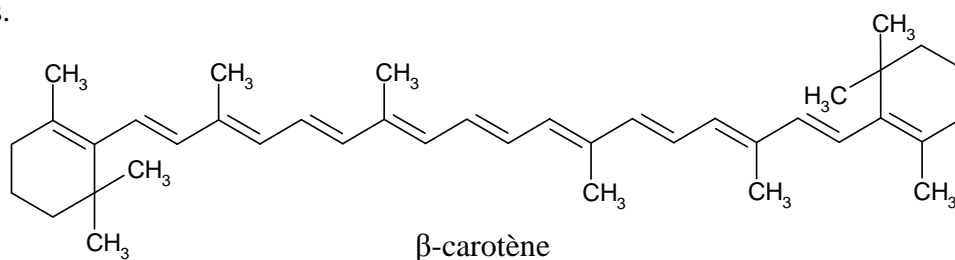


Figure I-9: Exemple d'un caroténoïde identifié dans l'argousier, *Hippophaë rhamnoides*.

II.2.3. Alcaloïdes

Certaines publications datant d'au moins une vingtaine d'années et publiées en Russe ou en Allemand portent sur l'identification d'alcaloïdes présents dans différentes parties de l'argousier. Ces travaux mentionnent que des alcaloïdes indoliques, à savoir l'harmaline, l'harmane (Fig. I-10) [52], et l'éléagnine [53] sont présents dans différentes parties de l'argousier. Plus récemment, Tolkachev *et al.* [54] ont confirmé la présence d'alcaloïdes indoliques de type β-carboline, à caractère hallucinogène, dans différentes plantes de la famille des Elaeagnaceae et notamment dans l'écorce des tiges d'argousier avec la présence de l'harmane et de ses dérivés.

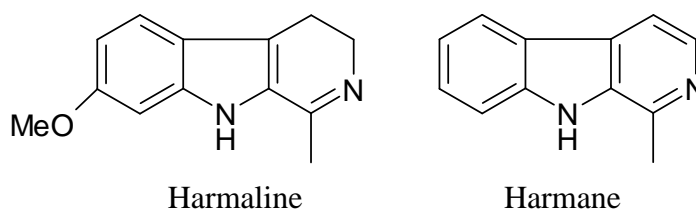


Figure I-10: Exemples d'alcaloïdes indoliques isolés de l'argousier, *Hippophaë rhamnoides*.

II.3. Autres constituants

II.3.1. Les vitamines

Gutzeit *et al.* [55] mentionnent le fait que les fruits d'argousier sont riches en vitamines telles que les vitamines B1 (thiamine), B2 (riboflavine), B3 (nicotinamide), B5 (acide pantothénique), B6 (pyridoxine), B9 (acide folique), la vitamine C (acide ascorbique), la vitamine E (tocophérol), et la vitamine K1 (phylloquinone). En raison de leur valeur nutritionnelle de nombreux travaux ont porté sur l'étude de ces vitamines, comme l'étude de la stabilité de l'acide pantothénique [56] et de la phylloquinone [55] face aux différents modes d'obtention de jus et de concentré de baies d'argousier et de leur conditionnement. La quantité de vitamines C et E des baies d'argousier est également soumise à variation en fonction de l'origine et du moment de la récolte [57].

II.3.2. Les composés volatils

La composition en composés volatils de l'huile essentielle de fruits d'argousier a été analysée par Cakir [58]. Trente composés ont pu être identifiés représentant 94,6 % de l'huile. Les composés majoritaires de cette huile sont l'éthyl dodécenoate, l'éthyl octanoate, le décanol et l'éthyl décanoate. De même Tian *et al.* [59] ont pu identifier les composés volatils des feuilles d'argousier dont les majoritaires sont le tetracosane (10–40%), l'acide hexadecanoïque (<0.1–11%), l'octadecatriénol (5–27%), le tetracosene (3–11%), et l'eicosanol (<0.1–13%).

II.3.3. Les éléments minéraux

Plusieurs éléments minéraux ont été reportés dans les baies et graines d'argousier, parmi lesquels au moins vingt-quatre sont présents dans le jus tels que l'azote, le phosphore, l'aluminium, le calcium, le fer, le bore, le manganèse... [18].

Cette étude bibliographique montre que l'argousier est une plante riche en molécules très diverses qui couvrent une large gamme de propriétés physico-chimiques. Dès lors, l'argousier présente un intérêt particulier, comme plante modèle, pour mettre en œuvre des méthodologies d'extraction, de fractionnement, d'analyse et d'identification de produits naturels d'origine végétale.

III. Etat de l'art sur l'analyse des différents constituants de l'argousier

La complexité des extraits de plantes nécessite des techniques de séparation efficaces pour identifier les diverses molécules d'intérêt. Différentes techniques d'analyse s'offrent à l'expérimentateur pour la séparation des produits naturels telles que la chromatographie liquide haute performance (HPLC, High Performance Liquid Chromatography), la chromatographie en phase gazeuse (GC, Gas Chromatography), la chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC, High Performance Thin Layer Chromatography), la chromatographie à contre courant (CCC, CounterCurrent Chromatography), la chromatographie en fluide supercritique (SFC, Supercritical Fluid Chromatography) ou l'électrophorèse capillaire (CE, capillary electrophoresis) [60]. Parmi ces techniques, les deux premières, couplées à différents systèmes de détection, sont celles qui ont été les plus employées pour l'analyse qualitative et/ou quantitative des différents constituants de l'argousier. Dans le but de déterminer quelles sont les méthodes les plus appropriées à l'analyse d'une famille moléculaire donnée, nous avons résumé les différentes méthodes de séparation déjà utilisées pour l'analyse de différents constituants de l'argousier.

III.1. Chromatographie liquide haute performance (HPLC, High Performance Liquid Chromatography)

D'une manière générale l'HPLC, qui fait intervenir une phase stationnaire solide constituée de particules fines et une phase mobile liquide, demeure la technique la plus souvent utilisée car elle présente de nombreux avantages telles que sa simplicité de mise en œuvre, sa reproductibilité, une gamme étendue de phases stationnaires commercialement disponibles permettant de moduler les interactions avec le soluté, et ses diverses possibilités de couplages avec d'autres techniques chromatographiques et/ou des systèmes de détection. Parmi les différents systèmes de détection pouvant être couplés avec l'HPLC, les systèmes de détection les plus communément utilisés sont les détections par absorption dans l'ultraviolet-visible (UV-vis), fluorescence, diffusion de lumière (DEDL), électrochimie, spectrométrie de masse (MS, Mass Spectrometry) et résonance magnétique nucléaire (RMN). Outre ces avantages, cette technique peut être utilisée selon plusieurs modes de séparation en fonction des caractéristiques physico-chimiques des analytes à séparer dont le mode dit phase normale (NP, Normal Phase) dans lequel la phase stationnaire est polaire et la phase mobile est apolaire, et le mode dit phase inverse (RP, Reversed Phase) dans lequel les polarités sont inversées, sont les deux principaux modes utilisés dans les travaux antérieurs.

L'HPLC a majoritairement été utilisée pour l'analyse des composés phénoliques de l'argousier comme le montre le tableau I-4. Il peut être remarqué que la séparation des polyphénols de l'argousier, et particulièrement celle des flavonols, a principalement été réalisée en mode RP, et que la détection a été suivie par UV-vis et/ou par MS. La détection UV-vis étant, dans ces différents exemples, réalisée par un détecteur à barrette de diodes (DAD, Diode Array Detector). L'analyse des flavan-3-ols et de leurs dérivés polymériques, les proanthocyanidines, est celle qui présente le plus de variabilité avec des séparations réalisées en mode NP ou RP, et des détections de types UV, électrochimique ou MS.

Tableau I-4: Séparation des composés phénoliques de l'argousier par HPLC couplés à différents systèmes de détection.

Technique	Molécules	Organes	Références
RP-HPLC-DAD	Acides phénoliques	Fruit, feuille	[24]
RP-HPLC-DAD	Flavonols	Fruit	[25]
	Acides phénoliques		
RP-HPLC-DAD	Flavonols	Fruit	[30]
RP-HPLC-DAD	Flavonols	Feuille	[32]
	Flavan-3-ols		
RP-HPLC-DAD	Flavonols	Fruit, graine, feuille	[36]
RP-HPLC-DAD	Flavonols	Feuille	[37]
RP-HPLC-DAD	Flavonols	Jus	[39]
RP-HPLC-DAD	Flavonols	Feuille	[61]
	Acides phénoliques		
RP-HPLC-DAD	Proanthocyanidines	Fruit	[42]
RP-UHPLC-MS			
RP-HPLC-DAD-MS	Flavonols	Fruit	[62]
RP-HPLC-DAD-MS	Proanthocyanidines	Résidu	[38]
RP-HPLC-MS	Proanthocyanidines	Residu	[40]
RP-HPLC-MS	Flavonols	Résidu	[28]
RP-HPLC-MS	Flavonols	Jus	[34]
RP-HPLC-ECD	Flavan-3-ols	Jus de fruits	[39]
	Acides phénoliques		
RP-HPLC-ECD	Proanthocyanidines	Résidu	[38]
NP-HPLC-DAD	Proanthocyanidines	Ecorce	[63]

RP-HPLC, chromatographie liquide haute performance en mode de phase inverse (Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography) ; **NP-HPLC**, chromatographie liquide haute performance en mode de phase normale (Normal Phase-High Performance Liquid Chromatography) ; **UHPLC**, chromatographie liquide ultra haute performance (Ultra High Performance Liquid Chromatography) ; **DAD**, détecteur à barrette de diodes (Diode Array Detector) ; **MS**, spectrométrie de masse (Mass Spectrometry) ; **ECD**, Détecteur électrochimique (Electrochemical Detector).

Les tocophérols et tocotriénols ont été séparés soit par NP-HPLC couplée à un détecteur UV [57] ou fluorescence [45, 64, 65], soit par RP-HPLC-UV [66]. De part leur fort caractère hydrophobe, les carotènes de l'argousier ont été majoritairement séparés par RP-HPLC-UV [13, 45, 50].

La RP-HPLC a également été employée pour la séparation de l'acide ascorbique et des différents acides organiques de l'argousier [13, 16, 57]. Par ailleurs, il est à noter que lorsque les oses et polyols nécessitent une identification plus poussée, ceux-ci ont été purifiés par NP-HPLC sur des colonnes contenant des groupements amine (NH₂) [16, 67].

III.2. Chromatographie en phase gazeuse (GC, Gas Chromatography)

La GC a été employée pour l'analyse et l'identification des composés volatils des fruits et des feuilles d'argousier [58, 59]. Outre les composés volatils, la GC est particulièrement adaptée à l'analyse de molécules de faible poids moléculaire et/ou à caractère hydrophobe facilement volatilisables, après une étape de dérivation. Ainsi cette technique couplée à un détecteur à ionisation de flamme (FID, Flame Ionisation Detector) ou à un détecteur de spectrométrie de masse a également été utilisée, après une étape d'estérification, pour la détermination du contenu en acides gras [22, 64, 68] des baies et des graines d'argousier. D'autres molécules telles que les phytostérols [44, 49, 64], les triterpènes [44] et les lignanes [27] de baies et de graines d'argousier ont été identifiées par GC-FID ou GC-MS après dérivation avec du triméthylsilyle (TMS). De même, les dérivés glucidiques (oses, polyols, acide ascorbique) ainsi que les acides organiques de l'argousier ont été préférentiellement séparés par GC après dérivation avec le TMS [11, 15-17, 67].

III.3. Autres techniques employées pour l'analyse des molécules de l'argousier

Parmi les autres techniques d'analyses une attention particulière peut être retenue envers l'HPTLC qui a été employée dans plusieurs études pour la séparation de dérivés terpéniques (acide ursolique, β -sitostérol, β -carotène), d'acides gras ainsi que des phospholipides de fruits d'argousier [22, 45, 51]. De même, la CCC couplée à un autre appareil CCC ou à un détecteur MS a été utilisée dans plusieurs études pour la séparation et la purification de composés phénoliques de baie d'argousier [34, 69, 70]. Une référence mentionne également l'utilisation de la CE pour l'analyse simultanée de l'acide ascorbique et de composés phénoliques dans les baies d'argousier [31].

Cette étude bibliographique montre que les deux techniques séparatives principalement utilisées pour analyser la composition chimique de l'argousier sont l'HPLC et

la GC, et que selon la famille moléculaire certaines techniques sont à privilégier. Dans cette thèse nous utiliserons préférentiellement l'HPLC, car les familles moléculaires étudiées sont principalement des molécules polaires et donc faiblement volatiles.

IV. Propriétés pharmacologiques de l'argousier

IV.1. Utilisation en médecine traditionnelle

L'argousier a toujours été une plante appréciée par les populations locales sur divers aspects. Dès l'antiquité, les grecs l'utilisaient comme nourriture pour alimenter leurs chevaux de course, d'où le nom botanique *Hippophaë* qui signifie cheval brillant [20]. Les différents organes de l'argousier ont été employés en médecine traditionnelle, notamment en Chine, en Mongolie, au Tibet et en Asie centrale. L'argousier est aujourd'hui listé dans la pharmacopée chinoise comme plante médicinale d'intérêt [21]. Toutefois, les baies sont les plus utilisées pour leurs hautes valeurs nutritionnelles et leurs diverses propriétés. De plus, les produits dérivés de baies d'argousier sont de plus en plus populaires dans les pays d'Europe et d'Amérique du Nord pour leur apport en vitamines et leur pouvoir antioxydant. Parmi les différents usages cités dans la littérature (Tableau I-5), l'argousier a été principalement utilisé comme anti-inflammatoire et cicatrisant, ou pour traiter les rhumes, les maladies de peau et les troubles gastro-intestinaux.

Tableau I-5 : Récapitulatif des différentes utilisations en médecine traditionnelle de l'argousier selon l'organe utilisé et l'origine géographique.

Organe	Utilisation	Pays	Références
Fruits	- Anti-inflammatoire dans le cas de troubles pulmonaires, cardiaques, gastro-intestinaux	Chine	[18-21, 71]
	- Traitement de la fièvre	Inde	
	- Traitement de la toux et des rhumes	Tibet	
	- Détoxifiant	Mongolie	
	- Favorise la digestion	Russie	
	- Cicatrisation des blessures	Ouzbékistan	
	- Traitement des ulcères gastriques	Himalaya	
	- Antitumorale	Turquie	
	- Régulateur métabolique		
	- Améliore la circulation du sang		
	- Nourriture (sirops, conservateurs, confitures, glace)		
	- Colorant		
	Huiles (fruits et graines)	- Traitement de problèmes dermatologiques et ophtalmologiques	
- Anti-inflammatoire dans le cas de troubles digestifs et d'hémorragie externe		Asie	
- Traitement des maladies de peaux (eczéma, coup de soleils...)		centrale	
- Cicatrisation des brûlures et coupures			
Feuilles	- Traitement des troubles gastro-intestinaux	Mongolie	[33]
	- Traitement de la polyarthrite rhumatoïde	Asie	
		Centrale	
Fleurs	- Adoucissant de la peau	Tadjikistan	[33]
Tiges	- Traitement de l'inflammation du colon et des diarrhées	Mongolie	[19, 20]
	- Bois de chauffage pour leur haute valeur calorifique	Inde	
	- Outils agricole (charrue, excavateur)	Himalaya	
Ecorce	- Traitement des brûlures	Inde	[72]
		Himalaya	
Arbres	- Clôture naturel pour protéger les cultures et les champs	Inde	[72]
		Himalaya	

IV.2. Propriétés pharmacologiques

En corrélation avec ces différents usages traditionnels, diverses études ont été menées afin de confirmer les différents effets de l'argousier. Le tableau I-6 liste les activités pharmacologiques qui ont été démontrées jusqu'à présent, en précisant le modèle biologique étudié et l'organe ou les molécules présentes dans l'argousier qui ont été testées. Ces études ont démontré une activité anti-inflammatoire, antitumorale, anticancéreuse, antioxydante ainsi que des effets notables dans le processus de cicatrisation ou dans le traitement des maladies cardio-vasculaires. Seules les activités antioxydantes, antiprolifératives et antimicrobiennes seront détaillées car ces effets seront abordés dans les chapitres suivants.

Tableau I-6: Propriétés médicinales de l'argousier (revues non incluses).

Propriété	Modèle biologique	Organe/molécule	Références
Anti-inflammatoire	Cellule humaine	Flavones	[73]
	Cellule endothéliale humaine	Isorhamnétine	[74]
	Macrophage murin	Feuille	[75]
	Rat	Feuille	[76]
	Cellule humaine	Fruit	[77]
Antimicrobienne	Bactéries Gram + et –	Fruit	[78, 79]
	Bactéries Gram + et –	Graine	[80]
	<i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Yersinia enterocolitica</i>	Graine	[81]
	<i>Helicobacter pylori</i>	Feuille	[82]
	Bactéries Gram + et –	Feuille	[83]
Anti-tumoral	Souris	Ecorce, pousse	[84]
	Souris	Tige	[47]
	Cellule tumorale humaine	Isorhamnétine	[85]
Anticancéreux	Cellule cancéreuse humaine (colon et sein)	Fruit	[86]
	Cellule cancéreuse humaine (colon et foie)	Fruit	[87]
	Souris	Fruit	[88]
	Cellule cancéreuse humaine (colon et cerveau)	Fruit	[89]
	Cellule cancéreuse humaine (estomac, prostate, intestin, cerveau)	Fruit	[77]
Anti-ulcérique	Rat	Huile de baies et de graines	[90]
Antioxydant . <i>In-vivo</i>	Rat	Feuille	[91, 92]
	Rat	Huile de graine	[93, 94]
<i>In vitro</i>	Gliome	Feuille	[95]
	Lymphocyte	Feuille/Fruit	[96]
	Lymphocyte	Flavone	[97]
		Huile de Graine	[98]
		Graine	[49, 80, 81]
		Feuille	[26, 83, 99]
		Fruit	[66, 100, 101]
		Jus de fruit	[39]
		Proanthocyanidine	[38, 40, 41]
		Fruit, graine, feuille, pulpe	[36]
	Isorhamnétine	[102]	

Antivirale	Macrophage humain infecté par le virus de la dengue	Feuille	[103]
Maladie cardio-vasculaire :			
. Trouble coronaire	Homme	Flavonoles	[104]
	Homme	Jus de fruits	[105]
. Agrégation des plaquettes	Homme	Huile de baies	[106]
. Hypertension	Rat	Graines	[107]
Effet dermatologique :			
. Dermatite/Eczéma	Homme	Huile de baies et de graines	[108]
. Cicatrisant	Rat	Flavones	[109]
	Rat	Huile de graines	[94]
	Rat	Feuille	[110]
Effet hypoglycémique	Rat	Graine	[111]
	Souris	Graine	[112]
	Homme	Fruit	[113]
	α -Glucosidase	Feuille	[26]
Effet adaptogénique	Rat	Feuille	[114]
Obésité	Homme	Fruit	[113]
Effet radioprotecteur	Souris	Fruit	[115]
	Thymocytes murin	Fruit	[116, 117]
Effet hépatoprotecteur	Souris	Huile de graine	[118, 119]
	Homme	Fruit	[120]
	Rat	Feuille	[121]

IV.2.1. Activité antioxydante

➤ Fruit

La littérature fournit de nombreuses informations sur l'activité antioxydante des baies d'argousier en raison de leur richesse en molécules bioactives. L'étude seule des flavonols des baies d'argousier montre que ceux-ci sont fortement corrélés à l'activité antioxydante [36, 101]. Cependant, lorsque l'ensemble des molécules, hydrophiles et lipophiles, est pris en compte, la capacité antioxydante des baies est attribuée à l'action combinée de l'acide ascorbique, des polyphénols (acides phénoliques et flavonoïdes) et des caroténoïdes [100]. Ainsi, l'augmentation de la quantité de caroténoïdes dans les fruits au cours de la maturation, entraîne une augmentation de l'activité antioxydante. L'étude de la contribution des molécules hydrophiles d'un jus de baies d'argousier, en fonction de leur structure et de leur concentration, a permis de déterminer que l'acide ascorbique et les proanthocyanidines (tanins condensés) sont les antioxydants hydrophiles majeurs du jus d'argousier, suivis par les dérivés glycosylés des flavonols [39]. L'acide ascorbique est la molécule qui contribue le plus à l'activité antioxydante de par sa forte concentration dans les fruits, toutefois les proanthocyanidines sont plus antioxydants que l'acide ascorbique, mais à cause de leur faible concentration elles ne contribuent pas énormément à la capacité antioxydante de ceux-ci. Des travaux ciblés sur les proanthocyanidines de résidus d'argousier réalisés par Rösch *et al.* [38, 40] ont confirmé que celles-ci avaient une capacité antioxydante supérieure à celle de l'acide ascorbique.

Le caractère antioxydant des baies d'argousier a été vérifié sur des lymphocytes soumis à un stress oxydatif [96]. Les extraits alcooliques de baies entraînent une inhibition de la production de radicaux libres et la restauration du statut antioxydant des cellules traitées.

➤ Graine

La description de l'activité antioxydante des graines d'argousier est ici séparée en deux parties, car des différences au niveau des molécules actives apparaissent selon que l'activité a été mesurée sur des extraits hydrophiles ou sur de l'huile de graines.

En utilisant différents modèles *in vitro*, l'équipe de Chauhan [80, 81] a pu démontrer que les graines d'argousier possédaient une forte activité antioxydante, particulièrement lorsque l'extraction était réalisée avec des solvants polaires (méthanol, eau), mais sans aucune identification des molécules d'intérêt. Un travail réalisé par Fan *et al.* [41] a montré que les fractions de graines d'argousier étaient constituées de proanthocyanidines. Les polymères

dominants étant de type prodelphinidine avec des unités élémentaires (epi)gallocatéchine et des unités terminales gallocatéchine.

L'huile de graines d'argousier possède également des propriétés antioxydantes. Ainsi, l'application d'huile de graines d'argousier sur des rats blessés par brûlure entraîne une augmentation de la quantité de glutathion SH réduit (GSH) et réduit la production d'Espèces Réactives Oxygénées (ERO) au niveau des tissus blessés [94]. Récemment, une étude réalisée *in vitro* et *in vivo* sur l'effet antioxydant de l'huile de graines [93] a mis en évidence que l'administration d'huile de graines joue un rôle important dans la réduction du stress oxydatif. Cette forte activité antioxydante serait due d'une part, à la présence de tocophérols et de caroténoïdes qui ont la capacité de diminuer l'effet des ERO et d'autre part, à l'activation des systèmes de défense antioxydants cellulaires tel que les enzymes de type catalase ou superoxyde dismutase (SOD). Par ailleurs, une étude de Yang *et al.* [98], confirme que l'huile de graines et de pulpes d'argousier possède une activité antioxydante importante sur différents modèles *in vitro*, et que ce sont les tocophérols et les caroténoïdes qui sont les antioxydants majoritaires de l'huile.

➤ Feuille

Longtemps délaissées par rapport aux baies, les feuilles d'argousier subissent un regain d'intérêt comme le justifie les études récentes portant sur l'activité antioxydante de celles-ci. Les feuilles d'argousier ont ainsi été montrées comme antioxydantes sur différents modèles *in vitro* en corrélation avec la présence de composés phénoliques tels que des dérivés flavonoïques (e.g. isorhamnétine, quercétine, isorhamnétine-3-*O*-glucoside, quercétine-3-*O*-galactoside, quercétine-3-*O*-glucoside, kaempférol, kaempférol-3-*O*- β -D-(6''-*O*-coumaryl)glycoside...) ou des dérivés d'acides phénoliques (i.e. 1-feruloyl- β -D-glucoside) [26, 36, 83, 99].

Les travaux réalisés sur des modèles vivants confirment que les feuilles ont un fort potentiel antioxydant. Par exemple, lorsque des rats sont placés en condition de stress oxydatif, la consommation de feuilles d'argousier permet de protéger les animaux face au stress en gardant un taux d'activité des défenses cellulaires (catalase, SOD, GSH) proche d'une activité normale [91, 92]. Geetha *et al.* [96] ont également montré un phénomène similaire avec des lymphocytes soumis à un stress oxydatif. Le traitement par des feuilles entraînant une inhibition de la production de radicaux libres et la restauration du statut antioxydant des cellules traitées. Ce même constat fut noté dans le traitement de gliomes sous conditions hypoxiques [95].

IV.2.2. Activité antiproliférative

L'activité antiproliférative décrite dans cette partie correspond à l'inhibition de la croissance cellulaire de cellules tumorales et/ou cancéreuses. Les fruits d'argousier ont été majoritairement étudiés pour leur potentielle activité antiproliférative. Différentes études montrent que la croissance de diverses lignées cellulaires cancéreuses de l'estomac (AGS), du foie (HepG 2 et BEL-7402), du colon (HT 29 et CaCo 2), du sein (MCF-7), et du cerveau (HeLa), a été inhibée par des extraits de baies d'argousier [77, 85-87, 89]. L'activité anticancéreuse semble toutefois varier suivant le solvant d'extraction utilisé. Ainsi Grey *et al.* [87] ont trouvé qu'un extrait de baies obtenu avec de l'acétate d'éthyle (AE) inhibe significativement la prolifération de cellules CaCo 2 en induisant un effet apoptotique, alors qu'un extrait obtenu dans une solution hydro-alcoolique a un effet plus significatif sur des cellules cancéreuses HepG 2 sans induction d'apoptose. Les auteurs ont corrélé l'activité de l'extrait AE à la présence d'acide ursolique qui possède des propriétés anticancéreuses et apoptotiques. Ces résultats corroborent ceux de Teng *et al.* [85] qui ont trouvé qu'une fraction AE de baies d'argousier inhibait la prolifération de tumeurs cancéreuses hépatiques. Alors que des extraits riches en polyphénols ont montré une activité antiproliférative intéressante sur lignées de cellules cancéreuses HeLa, CaCo 2, HT 29 et MCF-7 [86, 89]. Deux théories s'affrontent pour justifier l'effet antiprolifératif observé via les mécanismes cellulaires. Selon Padmavathi *et al.* [88], l'effet anticancéreux des fruits d'argousier serait dû à l'induction de facteurs de transcription impliqués dans l'apoptose et l'induction d'enzymes de régulation et d'enzymes liées au stress oxydatif. Alors que Boivin *et al.* [77], démontrent que l'activité antiproliférative n'est pas corrélée à la capacité antioxydante et n'induit pas de mort cellulaire, mais qu'elle semble être due à l'arrêt du cycle cellulaire via la réduction de l'expression de protéines impliquées dans le cycle cellulaire (cyclines).

Par ailleurs, deux autres travaux ont montré que les tiges et l'écorce d'argousier avaient une activité antitumorale notoire sur des souris [47, 84].

IV.2.3. Activité antimicrobienne

La littérature fait référence à six travaux portant sur l'étude du potentiel antimicrobien de différents organes de l'argousier.

Puupponen-Pimia *et al.* [78] ont étudié le potentiel de huit extraits de baies fraîches, dont l'argousier, sur des bactéries Gram-positives et Gram-négatives incluant des bactéries probiotiques et la bactérie intestinale pathogène *Salmonella*. Les extraits de baies montrent tous un effet inhibiteur sur la croissance des bactéries Gram-négatives, mais les baies

d'argousier font partie de celles qui ont le moins d'effet sur l'inhibition de ces bactéries. La même équipe [79] a également mesuré l'effet d'extraits de baies d'argousier lyophilisées. L'étude a montré que les baies avaient un effet inhibiteur faible (entre 0 et 12h) sur *S. enterica* ser. *Typhimurium* et un effet plus important (inhibe même après 24H) sur *Staphylococcus aureus*, mais pas d'effet contre *Listeria monocytogenes* et *Lactobacillus rhamnosus*.

Une étude de Negi *et al.* [80] a permis de tester différents extraits de graines obtenus par extraction au Soxhlet avec différents solvants. Il apparaît que les extraits les plus efficaces sur les bactéries testées (*Bacillus cereus*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes* et *Y. enterocolitica*) sont dans l'ordre l'extrait méthanolique, suivi par l'extrait chloroformique puis l'extrait réalisé avec l'acétone. L'extrait méthanolique possédant une Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de l'ordre de 200 à 350 mg/mL. Par ailleurs, une étude complémentaire [81] a permis de déterminer des CMI de 750 et 1000 mg/mL, pour un extrait aqueux de graines d'argousier testé sur *L. monocytogenes* et *Y. enterocolitica*.

Les feuilles d'argousier ont également été testées pour leur potentiel antimicrobien. Ainsi, un extrait éthanolique de feuilles présente une CMI de 60 µg/mL contre une bactérie pathogène responsable de violents ulcères, *Helicobacter pylori* [82]. Plus récemment, Upadhyay *et al.* [83] ont montré que des extraits aqueux et hydro-alcooliques de feuilles, en plus d'une activité antioxydante et cytoprotectrice, inhibaient la croissance de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *B. cereus* et *S. aureus*.

L'étude comparée des utilisations médicinales et des propriétés pharmacologiques de l'argousier montre que le fruit, les graines et leurs dérivés (huile, jus, résidus) sont les organes qui ont été le plus étudiés. Néanmoins, mis à part les feuilles sur lesquelles de plus en plus d'études sont réalisées, il apparaît clairement que les autres organes (tige, racine, fleur) ont été très peu considérés.

IV.3. Intérêts économiques et écologiques de l'argousier

Comme il a pu être démontré précédemment l'argousier est une plante qui présente plusieurs intérêts. D'un point de vue écologique, elle permet de lutter contre l'érosion des sols tout en améliorant la qualité de ceux-ci, et d'un point de vue économique elle est disponible commercialement pour ses propriétés nutritionnelles, cosmétiques et thérapeutiques.

Toutes les parties de la plante semblent avoir un intérêt. Cependant la majorité des produits commerciaux ont été développés à partir des fruits d'argousier. Il peut être extrait, par simple pressage, un jus qui pourra être consommé tel quel ou sous forme de sirop. Les

baies sont acides, astringentes et dégagent une odeur qui n'est pas toujours attirante. De ce fait, elles sont rarement consommées à l'état brut, mais plutôt incorporées dans des jus avec des fruits plus sucrés. Avec l'explosion du marché « bio », ces jus multivitaminés et riches en antioxydants à base d'argousier sont de plus en plus présents dans les magasins spécialisés. Les dérivés commerciaux des baies d'argousier peuvent se retrouver sous forme de boissons, liqueurs, friandises sucrées, confitures, gelées, ou incorporés dans des gels douche, shampoings ou des produits cosmétiques [18].

Les feuilles d'argousier sont également vendues sous forme de thé, et l'huile de graine, pour son intérêt thérapeutique, est commercialisée sous différentes formes. A partir des résidus, il peut être obtenu des extraits enrichis en pigments pouvant être utilisés comme colorant dans l'industrie textile et agro-alimentaire [19].

Face à ce développement économique, l'argousier est une plante qui est de plus en plus cultivée. La Chine et la Russie sont les plus grands producteurs et consommateurs de produits dérivés de l'argousier. La haute valeur nutritive de ces baies a entraîné le développement et la commercialisation de nombreux produits en Europe et en Amérique du Nord. En France, on peut citer les producteurs de la vallée de la Haute Durance (Hautes-Alpes), et notamment la société NATVIT avec laquelle nous avons travaillé et qui commercialise des produits (jus, pâtes de fruits, biscuits...) à partir d'argousier.

V. Conclusion générale

Cette étude bibliographique a permis de montrer que l'argousier était une plante riche en molécules très diverses et qui présentait de nombreuses propriétés pharmacologiques.

L'étude phytochimique a mis en évidence que l'argousier et notamment ses baies contenaient des molécules couvrant une large gamme de polarité, telles que des glucides, des acides aminés, des lipides, des composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes, lignanes), des terpènes ainsi que des alcaloïdes.

Outre sa richesse moléculaire, l'argousier est une plante qui est connue pour avoir été utilisée en médecine traditionnelle et dont les dérivés (huile, jus, résidus) de baies et de graines sont connus pour posséder des propriétés pharmacologiques. Cependant, mis à part les feuilles sur lesquelles de plus en plus d'études sont réalisées, il apparaît clairement que les autres organes (tige, racine, fleur) ont été très peu considérés.

De par la richesse de sa composition chimique l'argousier apparaît comme une plante très intéressante pour développer des méthodologies: évaluer de nouvelles méthodes

d'extraction plus rapides et plus « vertes » (Chapitre 1), réaliser le couplage en ligne de méthodes de fractionnement et d'identification (Chapitre 3 et 4), que nous présenterons dans les chapitres suivants. Nous nous intéresserons également à mieux caractériser les organes de l'argousier très peu valorisés jusqu'à présent dans l'optique de compléter les connaissances de cette plante très riche en bienfaits (Chapitre 5).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **The Angiosperm Phylogeny Group.** (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 105-121.
2. **Benson, D.R. and Silvester, W.B.** (1993) Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 57(2), 293-319.
3. **Bartish, I.V., Jeppsson, N., Nybom, H. and Swenson, U.** (2002) Phylogeny of *Hippophae* (Elaeagnaceae) inferred from parsimony analysis of chloroplast DNA and morphology. *Systematic Botany*, 27(1), 41-54.
4. **Sun, K., Chen, X., Ma, R., Li, C., Wang, Q. and Ge, S.** (2002) Molecular phylogenetics of *Hippophae* L. (Elaeagnaceae) based on the internal transcribed spacer (ITS) sequences of nrDNA. *Plant Systematics and Evolution*, 235(1), 121-134.
5. **Rousi, A.** (1971) The genus *Hippophaë* L. A taxonomic study. *Annales Botanici Fennici* 8, 177-227.
6. **Johnson, O. and More, D.** (2005) Guide Delachaux des arbres d'Europe. Delachaux et Niestlé, Paris, pp. 464.
7. **Bonnier, G. and De Layens, G.** (1986) Flore complète portative de la France, de la Suisse et de la Belgique. Belin, Paris, pp. 426.
8. **Photographie d'*Hippophaë rhamnoides*** (Consultée le 21-06-2011) <http://www.kuleuven-kortrijk.be/bioweb/?lang=en&detail=183&titel=buckthorn>.
9. **Rongsen, L.** (1992) Seabuckthorn a multipurpose plant species for fragile mountains. *ICIMOD occasional paper n°20*, Khatmandhou, Nepal, 62.
10. **Guignard, J.-L.** (2006) Biochimie végétale. Dunod, 2^{ème} éd., Paris, pp. 274.
11. **Yang, B., Zheng, J. and Kallio, H.** (2011) Influence of origin, harvesting time and weather conditions on content of inositols and methylinositols in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) berries. *Food Chemistry*, 125(2), 388-396.
12. **Ercisli, S., Orhan, E., Ozdemir, O. and Sengul, M.** (2007) The genotypic effects on the chemical composition and antioxidant activity of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries grown in Turkey. *Scientia Horticulturae*, 115(1), 27-33.
13. **Raffo, A., Paoletti, F. and Antonelli, M.** (2004) Changes in sugar, organic acid, flavonol and carotenoid composition during ripening of berries of three seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) cultivars. *European Food Research and Technology*, 219(4), 360-368.
14. **Bruneton, J.** (2008) Pharmacognosie, Phytochimie, Plante médicinales. Lavoisier Technique & Documentation, 3^{ème} éd., Paris, pp. 1120.

15. **Yang, B.** (2009) Sugars, acids, ethyl β -D-glucopyranose and a methyl inositol in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) berries. *Food Chemistry*, 112(1), 89-97.
16. **Tiitinen, K.M., Yang, B., Haraldsson, G.G., Jonsdottir, S. and Kallio, H.P.** (2006) Fast analysis of sugars, fruit acids, and vitamin C in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(7), 2508-2513.
17. **Zheng, J., Kallio, H., Linderborg, K. and Yang, B.** (2011) Sugars, sugar alcohols, fruit acids, and ascorbic acid in wild Chinese sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* ssp. *sinensis*) with special reference to influence of latitude and altitude. *Food Research International*, 44, 2018-2026.
18. **Bal, L.M., Meda, V., Naik, S.N. and Satya, S.** (2011) Sea buckthorn berries: A potential source of valuable nutrients for nutraceuticals and cosmoceuticals. *Food Research International*, 44(7), 1718-1727.
19. **Beveridge, T., Li, T.S.C., Oomah, B.D. and Smith, A.** (1999) Sea buckthorn products: Manufacture and composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9), 3480-3488.
20. **Zeb, A.** (2004) Important therapeutic uses of sea buckthorn (*Hippophae*): A review. *Journal of Biological Sciences*, 4(5), 687-693.
21. **Yang, B. and Kallio, H.** (2002) Composition and physiological effects of sea buckthorn (*Hippophaë*) lipids. *Trends in Food Science & Technology*, 13(5), 160-167.
22. **Pintea, A., Marpeau, A., Faye, M., Socaciu, C. and Gleizes, M.** (2001) Polar lipid and fatty acid distribution in carotenolipoprotein complexes extracted from sea buckthorn fruits. *Phytochemical Analysis*, 12(5), 293-298.
23. **Macheix, J.-J., Fleuriet, A. and Jay-Allemand, C.** (2005) Les composés phénoliques végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, pp. 192.
24. **Arimboor, R., Kumar, K.S. and Arumughan, C.** (2008) Simultaneous estimation of phenolic acids in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) using RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(1), 31-38.
25. **Häkkinen, S., Heinonen, M., Kärenlampi, S., Mykkänen, H., Ruuskanen, J. and Törrönen, R.** (1999) Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research International*, 32(5), 345-353.
26. **Kim, J.-S., Kwon, Y.-S., Sa, Y.-J. and Kim, M.-J.** (2011) Isolation and identification of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) phenolics with antioxidant activity and α -glucosidase inhibitory effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 138-144.
27. **Yang, B., Linko, A.-M., Adlercreutz, H. and Kallio, H.** (2006) Secoisolariciresinol and matairesinol of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries of different subspecies and harvesting times. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), 8065-8070.

28. **Rösch, D., Krumbein, A., Mügge, C. and Kroh, L.W.** (2004) Structural investigations of flavonol glycosides from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) pomace by NMR spectroscopy and HPLC-ESI-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(13), 4039-4046.
29. **Yang, B., Halttunen, T., Raimo, O., Price, K. and Kallio, H.** (2009) Flavonol glycosides in wild and cultivated berries of three major subspecies of *Hippophaë rhamnoides* and changes during harvesting period. *Food Chemistry*, 115(2), 657-664.
30. **Chen, C., Zhang, H., Xiao, W., Yong, Z.-P. and Bai, N.** (2007) High-performance liquid chromatographic fingerprint analysis for different origins of sea buckthorn berries. *Journal of Chromatography A*, 1154(1-2), 250-259.
31. **Gorbatsova, J., Lõugas, T., Vokk, R. and Kaljurand, M.** (2007) Comparison of the contents of various antioxidants of sea buckthorn berries using CE. *Electrophoresis*, 28(22), 4136-4142.
32. **Zu, Y., Li, C., Fu, Y. and Zhao, C.** (2006) Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(3), 714-719.
33. **Guliyev, V.B., Gul, M. and Yildirim, A.** (2004) *Hippophae rhamnoides* L.: Chromatographic methods to determine chemical composition, use in traditional medicine and pharmacological effects. *Journal of Chromatography B*, 812(1-2), 291-307.
34. **Gutzeit, D., Winterhalter, P. and Jerz, G.** (2007) Application of preparative high-speed counter-current chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for a fast screening and fractionation of polyphenols. *Journal of Chromatography A*, 1172(1), 40-46.
35. **Lehtonen, H.-M., Lehtinen, O., Suomela, J.-P., Viitanen, M. and Kallio, H.** (2009) Flavonol glycosides of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* ssp. *sinensis*) and lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*) are bioavailable in humans and monoglucuronidated for excretion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 620-627.
36. **Sharma, U.K., Sharma, K., Sharma, N., Sharma, A., Singh, H.P. and Sinha, A.K.** (2007) Microwave-assisted efficient extraction of different parts of *Hippophae rhamnoides* for the comparative evaluation of antioxidant activity and quantification of its phenolic constituents by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(2), 374-379.
37. **Kumar, M.S.Y., Dutta, R., Prasad, D. and Misra, K.** (2011) Subcritical water extraction of antioxidant compounds from seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves for the comparative evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry*, 127(3), 1309-1316.
38. **Rösch, D., Krumbein, A. and Kroh, L.W.** (2004) Antioxidant galliccatechins, dimeric and trimeric proanthocyanidins from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) pomace. *European Food Research and Technology*, 219(6), 605-613.

39. **Rösch, D., Bergmann, M., Knorr, D. and Kroh, L.W.** (2003) Structure-antioxidant efficiency relationships of phenolic compounds and their contribution to the antioxidant activity of sea buckthorn juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4233-4239.
40. **Rösch, D., Mügge, C., Fogliano, V. and Kroh, L.W.** (2004) Antioxidant oligomeric proanthocyanidins from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(22), 6712-6718.
41. **Fan, J., Ding, X. and Gu, W.** (2007) Radical-scavenging proanthocyanidins from sea buckthorn seed. *Food Chemistry*, 102(1), 168-177.
42. **Hosseinian, F.S., Li, W., Hydamaka, A.W., Tsopmo, A., Lowry, L., Friel, J. and Beta, T.** (2007) Proanthocyanidin profile and ORAC values of manitoba berries, chokecherries, and seabuckthorn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(17), 6970-6976.
43. **Yang, B., Karlsson, R.M., Oksman, P.H. and Kallio, H.P.** (2001) Phytosterols in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries: Identification and effects of different origins and harvesting times. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5620-5629.
44. **Li, T.S.C., Beveridge, T.H.J. and Drover, J.C.G.** (2007) Phytosterol content of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil: Extraction and identification. *Food Chemistry*, 101(4), 1633-1639.
45. **Cossuta, D., Simándi, B., Hohmann, J., Doleschall, F. and Keve, T.** (2007) Supercritical carbon dioxide extraction of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) pomace. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(13), 2472-2481.
46. **Bekker, N.P. and Glushenkova, A.I.** (2001) Components of certain species of the Elaeagnaceae family. *Chemistry of Natural Compounds*, 37(2), 97-116.
47. **Yasukawa, K., Kitanaka, S., Kawata, K. and Goto, K.** (2009) Anti-tumor promoters phenolics and triterpenoid from *Hippophae rhamnoides*. *Fitoterapia*, 80(3), 164-167.
48. **Yang, Z.-G., Li, H.-R., Wang, L.-Y., Li, Y.-H., Lu, S.-G., Wen, X.-F., Wang, J., Daikonya, A. and Kitanaka, S.** (2007) Triterpenoids from *Hippophae rhamnoides* L. and their nitric oxide production-inhibitory and DPPH radical-scavenging activities. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 55(1), 15-18.
49. **Nogala-Kalucka, M., Rudzinska, M., Zadernowski, R., Siger, A. and Krzyzostaniak, I.** (2010) Phytochemical content and antioxidant properties of seeds of unconventional oil plants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(12), 1481-1487.
50. **Andersson, S.C., Olsson, M.E., Johansson, E. and Rumpunen, K.** (2008) Carotenoids in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries during ripening and use of pheophytin a as a maturity marker. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(1), 250-258.

- 51. Pinteá, A., Varga, A., Stepnowski, P., Socaciu, C., Culea, M. and Diehl, H.A.** (2005) Chromatographic analysis of carotenol fatty acid esters in *Physalis alkekengi* and *Hippophae rhamnoides*. *Phytochemical Analysis*, 16(3), 188-195.
- 52. Pasich, B., Juszko-Jasinska, M., Palisch, M., Pilch, M. and Rompel, H.** (1984) Harmaline and Harman of *Hippophaë rhamnoides* L. from the industrial region of upper Silesia *Herba Polonica*, 30, 3-4.
- 53. Massagetov, P.S.** (1946) Alkaloids in plants of the family of Elaeagnaceae. *Zhurnal Obshchei Khimii* 16, 775-776.
- 54. Tolkachev, O., Abizov, E., Abizova, E. and Mal'tsev, S.** (2008) Phytochemical study of the bark of some plants of the Elaeagnaceae family as a natural source of β -carboline indole alkaloids. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 42(11), 630-632.
- 55. Gutzeit, D., Baleanu, G., Winterhalter, P. and Jerz, G.** (2007) Determination of processing effects and of storage stability on vitamin K1 (phylloquinone) in sea buckthorn berries (*Hippophaë rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides*) and related products. *Journal of Food Science*, 72(9), 491-497.
- 56. Gutzeit, D., Klaubert, B., Rychlik, M., Winterhalter, P. and Jerz, G.** (2007) Effects of processing and of storage on the stability of pantothenic acid in sea buckthorn products (*Hippophaë rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides*) assessed by stable isotope dilution assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 3978-3984.
- 57. Kallio, H., Yang, B. and Peippo, P.** (2002) Effects of different origins and harvesting time on vitamin C, tocopherols, and tocotrienols in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6136.
- 58. Cakir, A.** (2004) Essential oil and fatty acid composition of the fruits of *Hippophae rhamnoides* L. (sea buckthorn) and *Myrtus communis* L. from Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(9), 809-816.
- 59. Tian, C., Nan, P., Chen, J. and Zhong, Y.** (2004) Volatile composition of chinese *Hippophae rhamnoides* and its chemotaxonomic implications. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(4), 431-441.
- 60. Marston, A.** (2007) Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2786-2798.
- 61. Heinäaho, M., Pusenius, J. and Julkunen-Tiitto, R.** (2006) Effects of different organic farming methods on the concentration of phenolic compounds in sea buckthorn leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7678-7685.
- 62. Heinäaho, M., Hagerman, A.E. and Julkunen-Tiitto, R.** (2009) Effect of different organic farming methods on the phenolic composition of sea buckthorn berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1940-1947.

- 63. Xu, X., Xie, B., Pan, S., Yang, E., Wang, K., Cenkowski, S., Hydamake, A.W. and Rao, S.** (2006) A new technology for extraction and purification of proanthocyanidins derived from sea buckthorn bark. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(3), 486-492.
- 64. St. George, S.D. and Cenkowski, S.** (2007) Influence of harvest time on the quality of oil-based compounds in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L. ssp. *sinensis*) seed and fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(20), 8054-8061.
- 65. Andersson, S.C., Rumpunen, K., Johansson, E. and Olsson, M.E.** (2008) Tocopherols and tocotrienols in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6701-6706.
- 66. Kagliwal, L., Pol, A., Patil, S., Singhal, R. and Patravale, V.** (2011) Antioxidant-rich extract from dehydrated seabuckthorn berries by supercritical carbon dioxide extraction. *Food and Bioprocess Technology*, Article in press, 1-9.
- 67. Kallio, H., Lassila, M., Järvenpää, E., Haraldsson, G.G., Jonsdottir, S. and Yang, B.** (2009) Inositols and methylinositols in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) berries. *Journal of Chromatography B*, 877(14-15), 1426-1432.
- 68. Yang, B. and Kallio, H.P.** (2001) Fatty acid composition of lipids in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries of different origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1939-1947.
- 69. Jerz, G., Gutzeit, D. and Winterhalter, P.** (2010) Characterization of acylated flavonoid glycosides from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) juice concentrate by preparative HSCCC/ESI-MS-MS. In *Flavor and Health Benefits of Small Fruits*, American Chemical Society, 253-265.
- 70. Yang, F., Quan, J., Zhang, T.Y. and Ito, Y.** (1998) Multidimensional counter-current chromatographic system and its application. *Journal of Chromatography A*, 803(1-2), 298-301.
- 71. Cakilcioglu, U., Khatun, S., Turkoglu, I. and Hayta, S.** (2011) Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Maden (Elazig-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), 469-486.
- 72. Dhyani, D., Maikhuri, R.K., Misra, S. and Rao, K.S.** (2010) Endorsing the declining indigenous ethnobotanical knowledge system of seabuckthorn in Central Himalaya, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(2), 329-334.
- 73. Mishra, K.P., Chanda, S., Karan, D., Ganju, L. and Sawhney, R.C.** (2008) Effect of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) flavone on immune system: An *in-vitro* approach. *Phytotherapy Research*, 22(11), 1490-1495.
- 74. Bao, M. and Lou, Y.** (2006) Isorhamnetin prevent endothelial cell injuries from oxidized LDL via activation of p38MAPK. *European Journal of Pharmacology*, 547(1-3), 22-30.

75. **Padwad, Y., Ganju, L., Jain, M., Chanda, S., Karan, D., Kumar Banerjee, P. and Chand Sawhney, R.** (2006) Effect of leaf extract of seabuckthorn on lipopolysaccharide induced inflammatory response in murine macrophages. *International Immunopharmacology*, 6(1), 46-52.
76. **Ganju, L., Padwad, Y., Singh, R., Karan, D., Chanda, S., Chopra, M.K., Bhatnagar, P., Kashyap, R. and Sawhney, R.C.** (2005) Anti-inflammatory activity of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves. *International Immunopharmacology*, 5(12), 1675-1684.
77. **Boivin, D., Blanchette, M., Barrette, S., Moghrabi, A. and Béliveau, R.** (2007) Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF-induced activation of NFκB by edible berry juice. *Anticancer Research*, 27(2), 937-948.
78. **Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A. and Oksman-Caldentey, K.M.** (2001) Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4), 494-507.
79. **Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Hartmann-Schmidlin, S., Kähkönen, M., Heinonen, M., Määttä-Riihinen, K. and Oksman-Caldentey, K.-M.** (2005) Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 98(4), 991-1000.
80. **Negi, P.S., Chauhan, A.S., Sadia, G.A., Rohinishree, Y.S. and Ramteke, R.S.** (2005) Antioxidant and antibacterial activities of various seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, 92(1), 119-124.
81. **Chauhan, A.S., Negi, P.S. and Ramteke, R.S.** (2007) Antioxidant and antibacterial activities of aqueous extract of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) seeds. *Fitoterapia*, 78(7-8), 590-592.
82. **Li, Y., Xu, C., Zhang, Q., Liu, J.Y. and Tan, R.X.** (2005) In vitro anti-Helicobacter pylori action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 98(3), 329-333.
83. **Upadhyay, N.K., Yogendra Kumar, M.S. and Gupta, A.** (2011) Antioxidant, cytoprotective and antibacterial effects of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12), 3443-3448.
84. **Gol'dberg, E., Amosova, E., Zueva, E., Razina, T. and Krylova, S.** (2007) Antimetastatic activity of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) extracts. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 143(0), 50-54.
85. **Teng, B.-s., Lu, Y.-H., Wang, Z.-T., Tao, X.-Y. and Wei, D.-Z.** (2006) In vitro anti-tumor activity of isorhamnetin isolated from *Hippophae rhamnoides* L. against BEL-7402 cells. *Pharmacological Research*, 54(3), 186-194.
86. **Olsson, M.E., Gustavsson, K.-E., Andersson, S., Nilsson, Å. and Duan, R.-D.** (2004) Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and

correlations with antioxidant levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(24), 7264-7271.

87. Grey, C., Widén, C., Adlercreutz, P., Rumpunen, K. and Duan, R.-D. (2010) Antiproliferative effects of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) extracts on human colon and liver cancer cell lines. *Food Chemistry*, 120(4), 1004-1010.

88. Padmavathi, B., Upreti, M., Singh, V., Rao, A.R., Singh, R.P. and Rath, P.C. (2005) Chemoprevention by *Hippophae rhamnoides*: Effects on tumorigenesis, phase II and antioxidant enzymes, and IRF-1 transcription factor. *Nutrition and Cancer*, 51(1), 59 - 67.

89. McDougall, G.J., Ross, H.A., Ikeji, M. and Stewart, D. (2008) Berry extracts exert different antiproliferative effects against cervical and colon cancer cells grown in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3016-3023.

90. Xing, J., Yang, B., Dong, Y., Wang, B., Wang, J. and Kallio, H.P. (2002) Effects of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) seed and pulp oils on experimental models of gastric ulcer in rats. *Fitoterapia*, 73(7-8), 644-650.

91. Saggi, S. and Kumar, R. (2008) Effect of seabuckthorn leaf extracts on circulating energy fuels, lipid peroxidation and antioxidant parameters in rats during exposure to cold, hypoxia and restraint (C-H-R) stress and post stress recovery. *Phytomedicine*, 15(6-7), 437-446.

92. Geetha, S., Sai Ram, M., Mongia, S.S., Singh, V., Ilavazhagan, G. and Sawhney, R.C. (2003) Evaluation of antioxidant activity of leaf extract of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) on chromium(VI) induced oxidative stress in albino rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 87(2-3), 247-251.

93. Ting, H.-C., Hsu, Y.-W., Tsai, C.-F., Lu, F.-J., Chou, M.-C. and Chen, W.-K. (2011) The in vitro and in vivo antioxidant properties of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil. *Food Chemistry*, 125(2), 652-659.

94. Upadhyay, N.K., Kumar, R., Mandotra, S.K., Meena, R.N., Siddiqui, M.S., Sawhney, R.C. and Gupta, A. (2009) Safety and healing efficacy of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil on burn wounds in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1146-1153.

95. Narayanan, S., Ruma, D., Gitika, B., Sharma, S., Pauline, T., Ram, M., Ilavazhagan, G., Sawhney, R., Kumar, D. and Banerjee, P. (2005) Antioxidant activities of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) during hypoxia induced oxidative stress in glial cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 278(1), 9-14.

96. Geetha, S., Sai Ram, M., Singh, V., Ilavazhagan, G. and Sawhney, R.C. (2002) Anti-oxidant and immunomodulatory properties of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*)-an in vitro study. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(3), 373-378.

97. Geetha, S., Ram, M.S., Sharma, S.K., Ilavazhagan, G., Banerjee, P.K. and Sawhney, R.C. (2009) Cytoprotective and antioxidant activity of seabuckthorn (*Hippophae*

rhamnoides L.) flavones against tert-butyl hydroperoxide-induced cytotoxicity in lymphocytes. *Journal of Medicinal Food*, 12(1), 151-158.

98. Yang, B., Ahotupa, M., Määttä, P. and Kallio, H. (2011) Composition and antioxidative activities of supercritical CO₂-extracted oils from seeds and soft parts of northern berries. *Food Research International*, 44(7), 2009-2017.

99. Maheshwari, D.T., Yogendra Kumar, M.S., Verma, S.K., Singh, V.K. and Singh, S.N. (2011) Antioxidant and hepatoprotective activities of phenolic rich fraction of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 49(9), 2422-2428.

100. Gao, X., Ohlander, M., Jeppsson, N., Björk, L. and Trajkovski, V. (2000) Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1485-1490.

101. Püssa, T., Pällin, R., Raudsepp, P., Soidla, R. and Rei, M. (2008) Inhibition of lipid oxidation and dynamics of polyphenol content in mechanically deboned meat supplemented with sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) berry residues. *Food Chemistry*, 107(2), 714-721.

102. Pengfei, L., Tiansheng, D., Xianglin, H. and Jianguo, W. (2009) Antioxidant properties of isolated isorhamnetin from the sea buckthorn marc. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 64(2), 141-145.

103. Jain, M., Ganju, L., Katiyal, A., Padwad, Y., Mishra, K.P., Chanda, S., Karan, D., Yogendra, K.M.S. and Sawhney, R.C. (2008) Effect of *Hippophae rhamnoides* leaf extract against Dengue virus infection in human blood-derived macrophages. *Phytomedicine*, 15(10), 793-799.

104. Suomela, J.-P., Ahotupa, M., Yang, B., Vasankari, T. and Kallio, H. (2006) Absorption of flavonols derived from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) and their effect on emerging risk factors for cardiovascular disease in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7364-7369.

105. Eccleston, C., Baoru, Y., Tahvonen, R., Kallio, H., Rimbach, G.H. and Minihane, A.M. (2002) Effects of an antioxidant-rich juice (sea buckthorn) on risk factors for coronary heart disease in humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(6), 346-354.

106. Johansson, A.K., Korte, H., Yang, B., Stanley, J.C. and Kallio, H.P. (2000) Sea buckthorn berry oil inhibits platelet aggregation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(10), 491-495.

107. Pang, X., Zhao, J., Zhang, W., Zhuang, X., Wang, J., Xu, R., Xu, Z. and Qu, W. (2008) Antihypertensive effect of total flavones extracted from seed residues of *Hippophae rhamnoides* L. in sucrose-fed rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 117(2), 325-331.

108. Yang, B., Kalimo, K.O., Tahvonen, R.L., Mattila, L.M., Katajisto, J.K. and Kallio, H.P. (2000) Effect of dietary supplementation with sea buckthorn (*Hippophaë*

rhamnoides) seed and pulp oils on the fatty acid composition of skin glycerophospholipids of patients with atopic dermatitis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(6), 338-340.

109. Sandeep Kumar, S., Pankaj, C., Indracanti Prem, K., Namita, S., Farhat, A., Manju Lata, G., Upendra Kumar, S., Arun Kumar, S., Yogendra Kumar, S. and Rakesh Kumar, S. (2006) Protection from radiation-induced mitochondrial and genomic DNA damage by an extract of *Hippophae rhamnoides*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47(9), 647-656.

110. Upadhyay, N.K., Kumar, R., Siddiqui, M.S. and Gupta, A. (2009) Mechanism of wound-healing activity of *Hippophae rhamnoides* L. leaf extract in experimental burns. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1-9.

111. Zhang, W., Zhao, J., Wang, J., Pang, X., Zhuang, X., Zhu, X. and Qu, W. (2010) Hypoglycemic effect of aqueous extract of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed residues in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytotherapy Research*, 24(2), 228-232.

112. Wang, J., Zhang, W., Zhu, D., Zhu, X., Pang, X. and Qu, W. (2011) Hypolipidaemic and hypoglycaemic effects of total flavonoids from seed residues of *Hippophae rhamnoides* L. in mice fed a high-fat diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, n/a-n/a.

113. Lehtonen, H.M., Jarvinen, R., Linderborg, K., Viitanen, M., Venojarvi, M., Alanko, H. and Kallio, H. (2010) Postprandial hyperglycemia and insulin response are affected by sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* ssp. *turkestanica*) berry and its ethanol-soluble metabolites. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(12), 1465-1471.

114. Saggu, S., Divekar, H.M., Gupta, V., Sawhney, R.C., Banerjee, P.K. and Kumar, R. (2007) Adaptogenic and safety evaluation of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaf extract: A dose dependent study. *Food and Chemical Toxicology*, 45(4), 609-617.

115. Goel, H.C., Prasad, J., Singh, S., Sagar, R.K., Prem Kumar, I. and Sinha, A.K. (2002) Radioprotection by a herbal preparation of *Hippophae rhamnoides*, RH-3, against whole body lethal irradiation in mice. *Phytomedicine*, 9(1), 15-25.

116. Goel, H.C., Indraghanti, P., Samanta, N. and Rana, S.V.S. (2004) Induction of apoptosis in thymocytes by *Hippophae rhamnoides*: implications in radioprotection. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 23(2), 90.

117. Shukla, S.K., Chaudhary, P., Kumar, I.P., Samanta, N., Afrin, F., Gupta, M.L., Sharma, U.K., Sinha, A.K., Sharma, Y.K. and Sharma, R.K. (2006) Protection from radiation-induced mitochondrial and genomic DNA damage by an extract of *Hippophae rhamnoides*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47(9), 647-656.

118. Hsu, Y.-W., Tsai, C.-F., Chen, W.-K. and Lu, F.-J. (2009) Protective effects of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 47(9), 2281-2288.

- 119. Ruan, A., Min, H., Meng, Z. and Lü, Z.** (2003) Protective effects of seabuckthorn seed oil on mouse injury induced by sulfur dioxide inhalation. *Inhalation Toxicology*, 15(10), 1053-1058.
- 120. Gao, Z.-L., Gu, X.-H., Cheng, F.-T. and Jiang, F.-H.** (2003) Effect of sea buckthorn on liver fibrosis: a clinical study. *World Journal of Gastroenterology*, 9(7), 1615-1617.
- 121. Geetha, S., Jayamurthy, P., Pal, K., Pandey, S., Kumar, R. and Sawhney, R.C.** (2008) Hepatoprotective effects of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) against carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(9), 1592-1597.

CHAPITRE 2

**DEVELOPPEMENT ET OPTIMISATION D'UNE
MÉTHODE D'EXTRACTION « VERTE »,
APPLICATION AUX BAIES D'ARGOUSIER**

I. Introduction

Parmi les différentes étapes que constituent l'analyse et l'identification de molécules bioactives, l'étape d'extraction, qui a pour but la désorption des molécules d'intérêt des sites actifs de la matrice végétale, est primordiale puisqu'elle déterminera la nature et la quantité des molécules extraites et par conséquent le succès des étapes suivantes. L'extraction de produits naturels est généralement de type solide-liquide, c'est-à-dire qu'un solide, la matrice végétale, est mélangé avec un liquide, le solvant d'extraction. Des méthodes dites traditionnelles, comme la macération, le Soxhlet, l'hydrodistillation et l'extraction par percolation ou par reflux, étaient jusqu'ici utilisées et considérées comme techniques de choix pour extraire les composés naturels. Cependant, ces procédés sont généralement longs, fastidieux et nécessitent de grande quantité de solvant organique. Ces dernières années ont été marquées par le développement de méthodes d'extraction alternatives qui font intervenir des fluides compressés comme agents extracteurs [1] tel que l'extraction par fluide pressurisé (PLE, Pressurized Liquid Extraction), l'extraction par eau subcritique (SWE, Subcritical Water Extraction) et l'extraction par fluide supercritique (SFE, Supercritical Fluid Extraction), ou des techniques comme l'extraction assistée par ultra-sons (UAE, Ultrasound Assisted Extraction) et l'extraction assistée par micro-ondes (MAE, Microwave Assisted Extraction) qui utilisent respectivement l'énergie ultra-sonique [2] et micro-ondes [3] comme source de chauffage de la solution solvant-matrice. Ces techniques offrent de nombreux avantages d'un point de vue du temps d'extraction, de la consommation de solvant, du rendement d'extraction et de la reproductibilité, et ce sans altérer la qualité de l'extrait. De plus, ces techniques sont simples d'utilisations, automatiques, souvent plus sélectives, et appropriées pour des couplages en ligne avec des détecteurs ou des techniques d'analyse [4-6]. Dans certains cas (PLE, SWE et SFE), les étapes post-extractions telles que la filtration, la centrifugation, et la concentration, sont directement intégrées dans la méthodologie d'extraction.

Par ailleurs, ces dernières années, certaines inquiétudes ont été émises vis-à-vis de la nature dangereuse de certains solvants, de leur impact sur l'atmosphère, l'environnement et la santé humaine, et sur les coûts que peuvent engendrer le traitement de ces déchets toxiques. Cela a conduit à la notion de chimie « verte », laquelle a pris de plus en plus d'importance dans les laboratoires de chimie et les industries [7]. En chimie analytique, l'impact de ces solvants toxiques peut être réduit en limitant leur utilisation excessive lors des différentes étapes de préparation d'échantillon ou lors de l'étape d'analyse, ou bien en développant des méthodologies qui ne nécessitent pas de solvants organiques [8].

Dans ce contexte général, nous présentons dans ce chapitre le développement et l'optimisation d'une technique d'extraction sans solvant assistée par micro-ondes qui a été appliquée à l'extraction de polyphénols antioxydants des baies d'argousier. Le procédé repose sur l'échauffement par les micro-ondes de l'eau résiduelle contenue dans les baies, entraînant une rupture des cellules végétales et libérant ainsi les molécules dans le milieu. Cette technique d'extraction a été optimisée par plan d'expérience afin d'obtenir l'extrait le plus riche en polyphénols et montrant l'activité antioxydante la plus élevée. Ce procédé s'inscrit totalement dans le contexte actuel de développement de méthodes de traitement de l'échantillon qui soient à la fois rapides, efficaces et plus respectueuses de l'environnement.

II. Les méthodes d'extraction par fluide compressé

II.1. L'extraction par fluide pressurisé (PLE, Pressurized Liquid Extraction)

La PLE, dont une des variantes les plus connues est l'extraction par solvant accéléré (Accelerated Solvent Extraction, ASE), est une technique d'extraction solide-liquide qui a la particularité d'utiliser des solvants sous de hautes pressions et à des températures situées au dessus du point d'ébullition des solvants [9]. Cette combinaison de pression et température élevées fournit un processus d'extraction plus rapide et plus efficace. L'augmentation de la température diminue la viscosité des solvants permettant une meilleure pénétration dans la matrice solide et des interactions solvants-matrices-molécules plus faibles. De plus, les taux de diffusion deviennent plus rapides à température élevée ce qui diminue le temps d'extraction. La pression force le solvant à passer à travers les pores de la matrice et ainsi atteindre des composés jusqu'ici inaccessibles. Par ailleurs, le processus d'extraction, constitué de plusieurs cycles d'extraction, engendre l'introduction de solvant propre augmentant le gradient de concentration entre le solvant et la matrice solide, ce qui améliore le transfert de masse et augmente le taux d'extraction. L'extraction est réalisée en mode statique, c'est-à-dire que le solvant est en contact avec la matrice pendant un temps imparti (généralement 5 à 10 min) et pendant lequel a lieu la désorption et la diffusion des molécules de l'échantillon vers le solvant [9, 10]. A la fin de l'extraction, le solvant est évacué de la cellule de haut en bas par un flux d'azote. Toutefois, lors de l'extraction, la matrice est introduite dans une cellule en acier inoxydable qui contient un filtre positionné dans la partie basse de celle-ci (Fig. II-1). Ainsi, l'extrait obtenu est filtré avant d'être envoyé vers un flacon de récupération ce qui élimine l'étape de filtration [11].

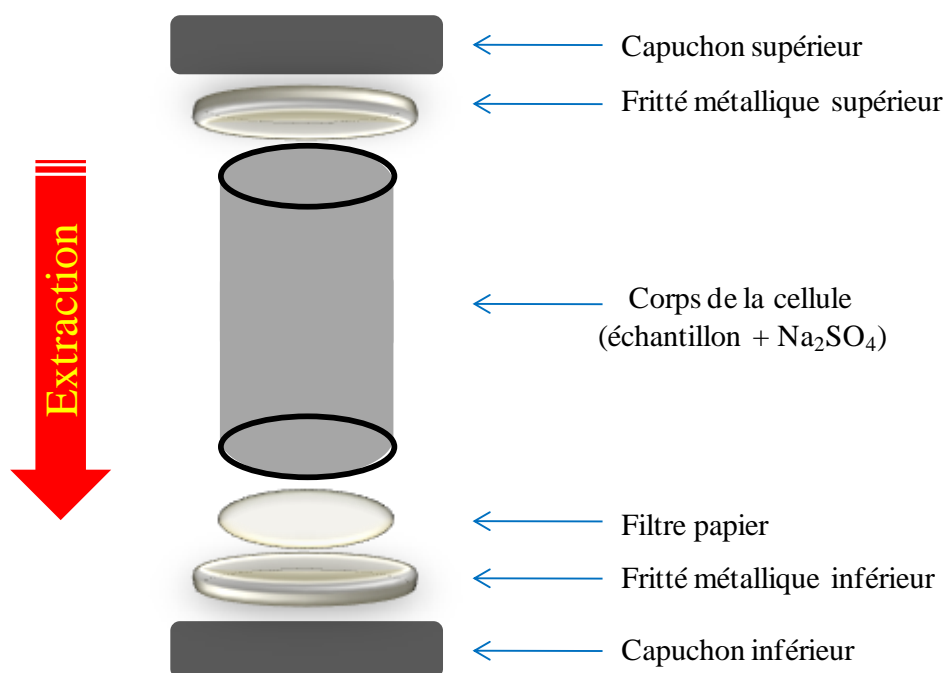


Figure II-1: Schéma simplifié d'une cellule d'extraction PLE.

II.2. L'extraction par eau subcritique (SWE, Subcritical Water Extraction)

La SWE est une variante de l'ASE dans laquelle de l'eau chaude est utilisée à des températures comprises entre 100°C (point d'ébullition de l'eau) et 374.1°C (point critique de l'eau), et c'est sous l'effet de fortes pressions que l'eau est maintenue sous sa forme liquide [12, 13]. L'eau à température ambiante est un solvant polaire qui possède une permittivité, ou constante diélectrique (ϵ'), de 75.5. Cependant, lorsque l'eau est chauffée dans une atmosphère pressurisée à des températures de l'ordre de 250-300°C, sa polarité diminue et sa constante diélectrique devient équivalente à celle du méthanol ($\epsilon' = 33$) ou de l'éthanol ($\epsilon' = 24$) [14]. Ainsi la SWE permet l'extraction de molécules moyennement polaires à non-polaires sans utiliser de solvants organiques. De plus, une augmentation de la température permet une meilleure pénétration de la matrice et une meilleure solubilisation des analytes dû à la diminution de la viscosité et des tensions de surface [14]. La SWE nécessite le même matériel que l'ASE et peut également être utilisé en mode statique ou dynamique. Néanmoins, la SWE n'est pas adaptée à l'extraction de composés thermolabiles.

II.3. L'extraction par fluide supercritique (SFE, Supercritical Fluid Extraction)

L'état supercritique d'un composé organique pur est atteint lorsque celui-ci est placé dans des conditions de pression et de température supérieures aux valeurs de ses points critiques. Au-delà de ces valeurs le fluide est dit supercritique et possède des propriétés à la

fois proche d'un gaz et d'un liquide qui vont être intéressantes pour l'extraction de molécules à partir de matière végétale. En effet, un fluide supercritique possède un coefficient de diffusion plus élevé et une viscosité plus faible qu'un liquide ce qui réduit les tensions de surface et permet un meilleur transfert de masse et donc une meilleure cinétique et efficacité d'extraction [15, 16]. De plus, l'extraction peut être hautement sélective car il est possible de moduler le pouvoir solvant du fluide supercritique en modifiant les valeurs de pression et/ou de température. La SFE est principalement utilisé avec le CO₂ supercritique, car celui-ci est peu coûteux (sous-produit de l'industrie), non-inflammable, largement présent dans l'atmosphère, facile à éliminer et nécessite des conditions critiques faciles à atteindre (T = 31.1°C, P = 73.8 bar). Ainsi les principaux avantages de la SFE sont l'obtention d'un échantillon concentré et son pouvoir solvant. Pendant le processus d'extraction, le fluide est pompé de manière continue à travers l'échantillon, et libère ainsi les composés d'intérêt qui sont récupérés sous forme concentrés après une étape de dé-pressurisation qui élimine le CO₂ sous forme gazeuse. Cependant, en plus du coût de l'appareillage, l'un des désavantages majeurs de l'extraction par CO₂ supercritique est l'hydrophobicité de ce composé qui limite l'extraction à des molécules apolaires et qui nécessite l'ajout de co-solvants comme le méthanol ou l'éthanol pour permettre l'extraction de molécules plus polaires [17, 18].

III. L'extraction assistée par ultra-sons (UAE, Ultrasonic Assisted Extraction) et par micro-ondes (MAE, Microwave Assisted Extraction)

III.1. Principe de d'extraction UAE

Les ultrasons sont des ondes vibrationnelles mécaniques de fréquence allant de 16 KHz à 1 GHz pouvant se propager dans les solides, les liquides et les gaz. Dans un milieu liquide, la propagation des ondes va générer des cycles successifs de compression (haute pression) et de raréfaction (basse pression) [16]. Cette différence de pression va générer des mouvements moléculaires au sein du milieu. Lors d'un cycle de raréfaction la distance entre molécules est augmentée et au dessus d'une certaine distance, dépendant de chaque milieu, des bulles de cavitations vont se former. Ces bulles vont croître pendant les phases de raréfaction et diminuer pendant les phases de compression (Fig. II-2). La répétition de ces cycles va conduire à l'implosion des bulles de cavitation, libérant ainsi une grande quantité d'énergie [19].

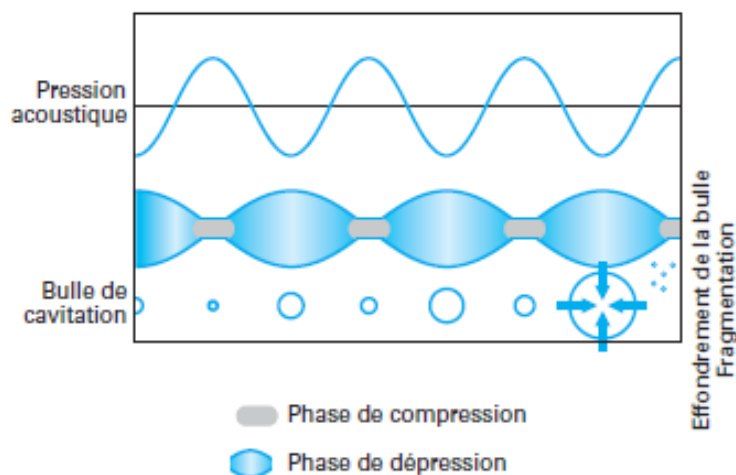


Figure II-2: Représentation schématique de la croissance et de l'implosion d'une bulle de cavitation [19].

Lorsque les bulles de cavitation sont formées à proximité d'une surface solide (Fig. II-3) elles deviennent asymétriques, et l'implosion qui en résulte produit des jets de liquide projetés à très grande vitesse vers la surface du solide, ainsi qu'une augmentation locale de la température et de la pression. Dans le cas d'une matrice végétale, ces jets de liquides vont percer les parois végétales et permettre ainsi la libération des molécules dans le milieu liquide [16].

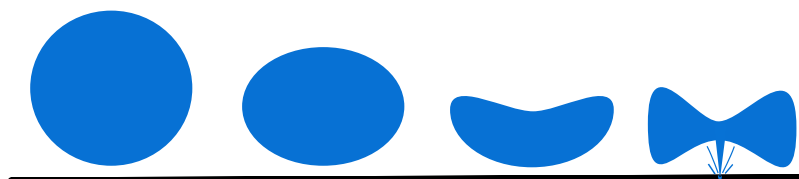


Figure II-3: Evolution d'une bulle de cavitation à proximité d'une surface solide, adapté de [19].

L'UAE est une technique peu onéreuse, utilisable avec n'importe quel type de solvant et simple à mettre en place. En effet, l'extraction peut être réalisée de manière très simple en utilisant un bain à ultra-sons - ce qui par-ailleurs permet d'effectuer plusieurs extractions simultanément - ou via une sonde ultrasonore combinée à un agitateur [2, 16]. De plus, l'effet mécanique des ultra-sons sur la matrice végétale induit une meilleure pénétration du solvant dans les cellules, ce qui améliore ainsi le transfert de masse et augmente le rendement d'extraction et la cinétique d'extraction. Cependant une dispersion non homogène de la phase solide peut contribuer à l'atténuation des ondes ultrasons, et la zone qui subit les ultrasons est alors restreinte à une zone localisée près de l'émetteur ce qui peut réduire le rendement d'extraction [16].

III.2. Principe de l'extraction MAE

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques, possédant un champ électrique et magnétique perpendiculaires l'un par rapport à l'autre, qui se propagent dans le vide avec des fréquences situées entre 300 MHz et 300 GHz. Néanmoins, dans le but d'éviter des interférences avec les radiocommunications et les radars, les micro-ondes domestiques et industrielles sont généralement utilisées à une fréquence de 2.45 GHz [15]. Les micro-ondes sont positionnées sur le spectre électromagnétique entre les infra-rouges et les radiofréquences, avec des valeurs de longueurs d'ondes comprises entre 1 m et 1 cm (Fig. II-4).

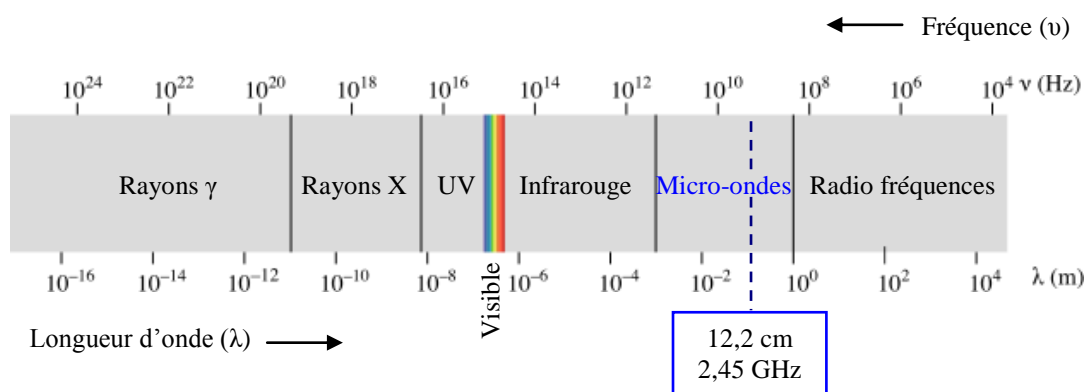


Figure II-4: Représentation du spectre électromagnétique et positionnement des micro-ondes domestiques.

Le principe de chauffage de la matière par les micro-ondes est dû à deux phénomènes qui interviennent simultanément: la conduction ionique et la rotation dipolaire [3, 10].

- La conduction ionique est due à la migration électrophorétique des ions dans un champ électromagnétique. La résistance du milieu à ces courants ioniques induit des frictions libérant de la chaleur par effet Joule.
- La rotation dipolaire correspond au phénomène d'alignement/réalignement des molécules possédant un dipôle dans un champ électrique alternatif de haute fréquence. La figure II-5 permet de mieux comprendre ce phénomène. En l'absence de champ électrique, les molécules constituées d'un dipôle diélectrique sont orientées aléatoirement. Sous l'effet d'un champ électrique continu, les molécules s'orientent dans la direction du champ électrique. Et lorsque les molécules dipolaires sont soumises à l'effet d'un champ électrique alternatif de haute fréquence, elles s'orientent dans la direction du champ, se désorientent lorsque le champ s'annule puis se réorientent dans l'autre sens du champ. Les mouvements de réalignement vont être perturbés par les liaisons qui existent entre les molécules (liaisons hydrogène, liaisons de Van der Waals) induisant des frictions entre molécules et par

conséquent une libération d'énergie thermique. Avec une fréquence de travail de 2,4 GHz, ce phénomène intervient $4,9 \cdot 10^9$ fois par seconde ce qui se traduit par un échauffement de la matière très rapide voire quasi instantané.

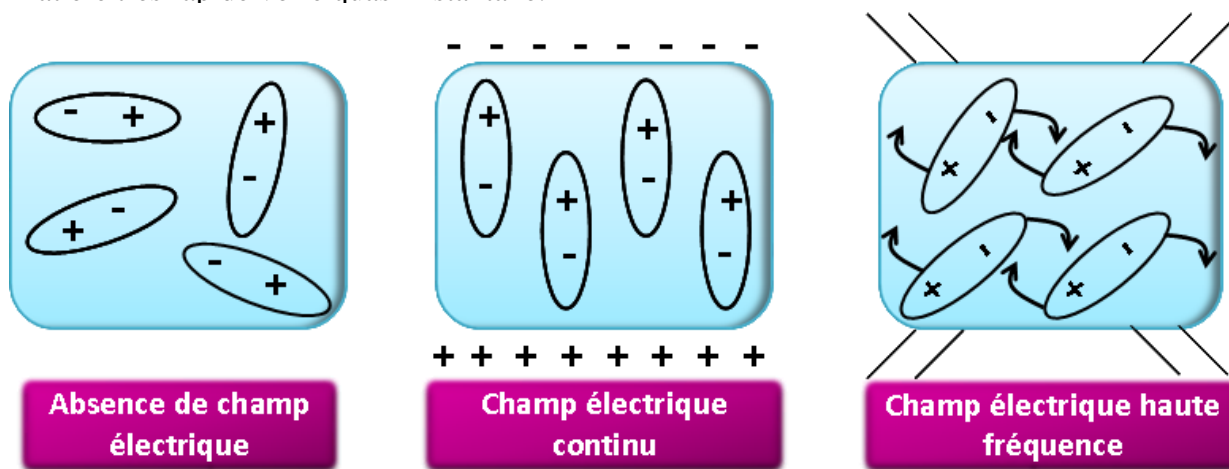


Figure II-5: Représentation schématique du comportement de molécules possédant un dipôle en l'absence de champ électrique, sous l'effet d'un champ électrique continu et sous l'effet d'un champ électrique de haute fréquence.

Cet échauffement rapide constitue l'une des spécificités du chauffage micro-onde. Du fait de l'habileté des micro-ondes à pénétrer directement au cœur des matériaux, le transfert de chaleur s'effectue de l'intérieur vers l'extérieur de celui-ci, au contraire des chauffages classiques par conduction, pour lesquels le transfert de chaleur s'effectue de l'extérieur vers l'intérieur induisant une cinétique d'extraction plus longue.

La conduction ionique et la rotation dipolaire apparaissent généralement simultanément, mais sont dépendants du type de solvant utilisé, et de la charge et de la taille des ions présents dans la matrice. L'aptitude d'un solvant à s'échauffer sous l'action d'un rayonnement micro-onde et à transmettre la chaleur aux autres molécules peut être évaluée par le facteur de dissipation ($\tan \delta$) lié au facteur de perte diélectrique ou moment dipolaire (ϵ'') et à la constante diélectrique (ϵ') par la relation : $\tan \delta = \epsilon'' / \epsilon'$. ϵ'' mesure la capacité à convertir l'énergie micro-onde en chaleur, et ϵ' correspond à la capacité des molécules à se polariser dans un champ électrique [3]. Par conséquent, les solvants d'extraction les plus communément rencontrés en MAE sont ceux qui possèdent une constante diélectrique forte. C'est le cas des solvants polaires qui possèdent un dipôle permanent et qui vont donc fortement absorber les micro-ondes, au contraire des solvants apolaires qui possèdent une constante diélectrique faible (Tableau II-1). Cependant, la sélectivité de l'extraction et la capacité du milieu à interagir avec les micro-ondes peuvent être modulées en utilisant des mélanges de solvants ou des solvants apolaires seuls. Dans certains cas, la matrice interagit

elle-même avec les micro-ondes. Les micro-ondes irradient de manière sélective les composés polaires présents dans les différents types de tissus végétaux [10].

Tableau II-1: Valeurs de constante diélectrique (ϵ') et du facteur de perte diélectrique (ϵ'') obtenues à 20°C pour les solvants les plus communément utilisés en MAE [3, 10].

Solvant	ϵ'	ϵ'' (Debye)
Hexane	1.89	<0.1
Heptane	1.92	0
Dichlorométhane	8.9	1.14
2-Propanol	19.9	1.66
Acetone	20.7	2.69
Ethanol	24.3	1.69
Méthanol	32.6	2.87
Acetonitrile	37.5	3.44
Eau	78.3	1.87

Ainsi différentes combinaisons solvant-matrice s'offrent à l'expérimentateur lors du développement d'une MAE.

- Dans le cas de matrices fraîches ou sèches, l'extraction peut avoir lieu avec:
 - un unique solvant possédant une forte constante diélectrique
 - un mélange de solvants possédant de fortes constantes diélectriques
 - un mélange contenant des solvants à faible et forte constante diélectrique

Dans ce cas le solvant d'extraction, ou le mélange de solvants, possède une forte capacité à absorber les micro-ondes et donc à s'échauffer, transférant la chaleur à la matière végétale. Le processus d'extraction est équivalent aux autres techniques à la différence que le chauffage est rapide, sans inertie et sans perte de chaleur.

- Dans le cas de matrices fraîches à forte teneur en eau (> 70 %), l'extraction peut être conduite:
 - avec un solvant transparent aux micro-ondes
 - sans solvant

Dans ce cas, c'est directement la matrice végétale qui s'échauffe grâce à l'eau qu'elle contient.

III.3. Appareillage de l'extraction MAE

Les systèmes de four micro-ondes commercialisés et adaptés aux laboratoires sont constitués de cinq éléments principaux [20]:

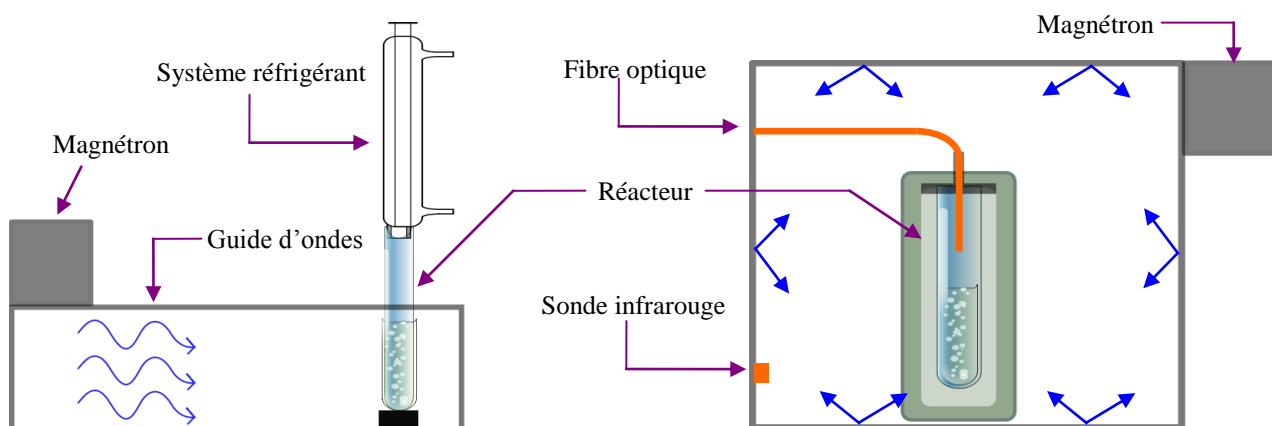
- un générateur de micro-ondes, aussi nommé magnétron, qui va générer les micro-ondes à partir d'énergie électrique;
- un guide d'ondes métallique qui va propager les micro-ondes du magnétron à l'échantillon;
- un réacteur transparent aux micro-ondes dans lequel est disposé l'échantillon;
- une cavité protectrice (ou four), dans laquelle le réacteur sera placé;
- un système de contrôle des températures.

Certains réacteurs sont également équipés de systèmes de sécurité pour éviter les surpressions. Par exemple, les réacteurs des appareils Milestone, utilisés pendant cette étude, sont pourvus d'un dispositif élastique pouvant s'ouvrir et se fermer lors d'une surpression [3].

L'application de l'irradiation micro-onde sur l'échantillon peut être réalisée soit avec un applicateur d'onde monomode ou avec un applicateur à cavité multi-modes (Fig. II-6). L'applicateur d'onde monomode ne permet qu'un seul mode de propagation de l'onde, qui est orienté par le guide d'ondes. Ainsi la radiation micro-onde est restreinte à une certaine zone dans laquelle se situe l'échantillon.

Les applicateurs à cavité multi-modes permettent la dispersion de manière aléatoire des ondes à l'intérieur d'une cavité. L'échantillon, placé à l'intérieur de la cavité, est agité ou mis en mouvement de manière à ce que tout le contenu soit irradié de manière homogène [15, 20, 21].

D'autre part, l'extraction dans le réacteur peut être menée de deux façons différentes: soit à pression atmosphérique, soit sous atmosphère pressurisée. Le premier, connu sous le nom d'extraction focalisée assistée par micro-ondes (FMAE, Focused MAE), utilise des réacteurs ouverts surmontés d'un système de condensation des vapeurs [10, 15]. Le deuxième type d'extraction utilise des réacteurs fermés, et de surcroît sous pression, ce qui permet de travailler à des températures supérieures au point d'ébullition des solvants utilisés. Ce système est appelé extraction sous pression assistée par micro-ondes (PMAE, Pressurized MAE) [10, 15].



(A) Propagation monomode (système ouvert) (B) Propagation multimodes (système fermé)

Figure II-6: Représentation schématique de la FMAE (système ouvert) (A) et de la PMAE (système fermé) (B) sous des conditions d'irradiations micro-ondes respectivement monomode (A) et multimode (B). Adapté de [20].

III.4. Avantages et inconvénients de la MAE

Par rapport aux techniques d'extraction classiques, les principaux avantages de la MAE sont sa rapidité, la réduction du volume de solvant utilisé, tout en ayant un rendement d'extraction amélioré. De plus, la MAE est simple d'utilisation et peu onéreuse. Néanmoins, c'est une technique d'extraction qui nécessite une étape de filtration et/ou de centrifugation pour éliminer les particules solides après extraction. Par ailleurs, de faibles rendements d'extraction peuvent être obtenus lorsque des solvants apolaires ou volatils sont utilisés [3, 16]. Des différences flagrantes peuvent être constatées lorsque la FMAE et la PMAE sont comparées. Ainsi, la PMAE a pour avantage, par rapport à la FMAE, de réduire la quantité de solvant utilisée, de réaliser simultanément plusieurs extractions d'échantillons différents, et d'utiliser des températures supérieures au point d'ébullition des solvants, aboutissant de surcroît à une diminution du temps d'extraction. La PMAE augmente cependant les risques de surpressions et nécessite une étape de refroidissement avant de prélever l'extrait. [20].

III.5. Paramètres influençant l'extraction MAE

Lorsque la MAE est employée, cinq paramètres majeurs peuvent avoir une influence essentielle sur le rendement d'extraction et la qualité de l'extrait : la nature du solvant, le temps et la température d'extraction, la puissance d'irradiation et la nature de la matrice [20, 22].

➤ **Nature et volume du solvant**

Le choix du solvant d'extraction en MAE est fondamental pour obtenir un processus d'extraction optimal. Comme pour les autres techniques d'extraction ce choix est déterminé par la solubilité des molécules d'intérêt et par les interactions solvant-matrice. Cependant, en MAE le choix du solvant est surtout relié à sa capacité à absorber les micro-ondes comme il a été expliqué dans la section III.1.

Le volume de solvant doit être suffisant pour que la matrice reste immergée pendant la totalité de l'extraction. Les ratios optimums liquide:solide, le plus souvent trouvés dans la littérature scientifique, sont généralement situés entre 10:1 et 50:1 (mL:mg)

➤ **Temps d'extraction**

Le temps d'extraction est l'un des avantages de la MAE car il est généralement court: quelques secondes à plusieurs minutes. De plus, il a pu être démontré que des temps plus longs d'extraction n'amélioreraient pas forcément le rendement d'extraction et qu'ils induisaient des risques de dégradation de molécules thermolabiles plus élevés.

➤ **Température d'extraction**

La température est l'un des paramètres les plus importants car il contribue à améliorer les rendements d'extraction. Une augmentation de la température induit une diminution de la viscosité des solvants et par conséquent une meilleure diffusion de celui-ci dans les parties internes de la matrice. Le rendement est ainsi meilleur à des températures élevées car la désorption des molécules d'intérêt est augmentée. Il convient de souligner que dans les systèmes fermés des températures supérieures au point d'ébullition des solvants peuvent être utilisées améliorant ainsi le rendement d'extraction.

➤ **Puissance d'irradiation**

La puissance d'irradiation est choisie en fonction de la température et du temps d'extraction que l'on veut appliquer. Elle est généralement minimisée pour éviter d'atteindre des températures d'extraction trop élevées et à l'inverse, augmentée pour diminuer le temps d'extraction.

➤ **Nature de la matrice**

La teneur en eau de la matrice a une grande importance dans le processus d'extraction, car les molécules d'eau, qui ont une forte capacité à absorber les micro-ondes, jouent un rôle important dans le processus d'échauffement. En conséquence, l'obtention de résultats reproductibles exige le contrôle préalable de la teneur en eau de la matrice à extraire.

IV. Méthodes dérivées de l'extraction assistée par micro-ondes (MAE)

Dans l'optique de réduire le coût énergétique, la consommation de solvant et les déchets aqueux ou organiques, de nombreuses variantes de la MAE, essentiellement adaptées à l'extraction d'huile essentielle, ont émergé ces dernières années.

IV.1. Entraînement à la vapeur d'eau et MAE

Lors d'un processus classique d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau (ou hydrodistillation) les molécules volatiles du matériel végétal sont vaporisées par un flux de vapeurs créé par un générateur extérieur, puis le mélange vapeur/huiles essentielles est condensé sur les parois d'un réfrigérant, avant que l'huile essentielle ne soit séparée de l'eau florale dans un essencier. La littérature différencie quatre types de méthodes combinant entraînement à la vapeur d'eau et irradiation micro-ondes :

- la turbo hydro-distillation assistée par micro-ondes (MTHD, Microwave Turbo Hydrodistillation), dans laquelle le matériel végétal, placé au sein d'un réacteur micro-ondes, est immergé dans un bain d'eau agité vigoureusement et continuellement [23];
- l'entraînement à la vapeur accéléré sous micro-ondes (MASD, Microwave accelerated steam distillation) où les vapeurs d'eau sont directement produites par échauffement par les micro-ondes à partir d'un réservoir d'eau placé sous le réacteur micro-ondes contenant le matériel végétal [24];
- l'entraînement à la vapeur assisté sous micro-ondes (MSD, Microwave Steam Distillation) où seul le matériel végétal est soumis à l'irradiation micro-ondes. le flux ascendant de vapeur étant fourni par un générateur placé à l'extérieur du four [25];
- La vapo-diffusion assistée par micro-ondes (MSDf, Microwave Steam Diffusion) qui est similaire à la MSD à la différence que le flux de vapeur est descendant [26].

La combinaison entre entraînement à la vapeur d'eau et micro-ondes conduit à une méthode simple à mettre en place qui accélère le processus d'extraction sans altérer la qualité chimique des huiles essentielles. Les variantes les plus récentes MSD et MSDf sont encore plus efficaces car seul le matériel végétal subit l'irradiation micro-ondes, conduisant à un chauffage local et sélectif facilitant la destruction des glandes et trichomes contenant les huiles essentielles. La vapeur agit comme gaz conducteur qui va entraîner les molécules vers le réfrigérant. La cinétique d'extraction est ainsi cinq fois plus rapide que dans le processus classique d'entraînement à la vapeur pour un même rendement d'extraction et une même

composition chimique. Ces procédés ont été adaptés à l'extraction d'huiles essentielles de poivrier rose, de lavande ou d'orange [23-28].

IV.2. L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (SFME, Solvent-Free Microwave Extraction)

La SFME développée par Lucchesi *et al.* [29, 30] est une technique « verte », simple et rapide qui permet d'extraire les huiles essentielles sans solvant et sans eau à pression atmosphérique. Cette technique combine l'effet de l'énergie micro-ondes et de l'hydrodistillation. L'échauffement de l'eau constitutive du matériel végétal frais induit une rupture des glandes riches en huiles essentielles, qui sont ensuite entraînées par la vapeur d'eau produite vers un système de réfrigération situé au-dessus du four micro-onde. Les huiles essentielles sont par la suite récupérées dans un essencier. Pour améliorer la cinétique d'extraction le matériel sec peut être légèrement humidifié avant extraction. D'un point de vue comparatif, la SFME (30 min) est plus rapide que l'hydrodistillation (4.5 h), pour la même quantité d'huile essentielle extraite. Néanmoins l'huile essentielle obtenue par SFME diffère de celle obtenue par hydrodistillation avec plus de composés oxygénés et moins de monoterpènes.

Une autre approche, utilisée pour l'extraction des matrices sèches, consiste à remplacer l'eau par des solides tels que de la poudre de graphite ou de la poudre de carbone actif. Ces matériaux possèdent d'excellentes propriétés d'absorption des micro-ondes. La chaleur ainsi produite est transférée par conduction à la plante, permettant l'extraction d'huile essentielle à partir d'un matériel végétal sec [31, 32].

IV.3. Hydrodiffusion assisté par micro-ondes et gravité (MHG, Microwave Hydrodiffusion and Gravity)

La MHG consiste en une MAE à pression atmosphérique qui fait intervenir en plus deux phénomènes physiques que sont l'hydrodiffusion et la gravité. La matière végétale est soumise à une extraction MAE classique sans ajouter ni eau ni solvant organique. Les molécules sont extraites et transférées de l'intérieur vers l'extérieur de la matrice végétale via l'effet de l'irradiation micro-ondes, c'est le phénomène d'hydrodiffusion. L'extrait liquide, contenant les molécules, s'écoule ensuite du four micro-onde vers un système de refroidissement par simple gravité. Ce procédé premièrement développé pour l'extraction d'huiles essentielles [33, 34], a ensuite été adapté pour l'extraction de flavonoïdes de

l'oignon [35] et de co-produits de l'argousier [36], ainsi que pour l'extraction de jus de fruits [37].

IV.4. Apport du vide dans l'extraction MAE

Certains auteurs ont réalisé des extractions MAE sous vide. Ainsi Wang *et al.* [38] ont démontré qu'un système classique de MAE sous vide (VMAE, Vacuum MAE) induisait les mêmes phénomènes d'extraction c'est-à-dire une augmentation de la température suivie de la rupture des parois cellulaires, induisant le transfert des molécules vers le solvant. Cependant, l'utilisation du vide a pour principal avantage d'utiliser des températures inférieures à la MAE pour un même rendement d'extraction, ce qui est intéressant dans le cas d'extraction de molécules thermosensibles. Ces mêmes résultats ont été observés dans le cas du développement de la MHG sous vide (VMHG, Vacuum MHG) [39].

L'hydrodistillation par micro-ondes sous vide pulsé (VMHD, Vacuum Microwave Hydrodistillation), mis au point par Archimex [40], est basée sur l'utilisation conjointe des micro-ondes et d'un vide pulsé. Il consiste à extraire les huiles essentielles d'une matrice végétale sans solvant organique, avec ou sans ajout d'eau selon que le matériel est sec ou humide. Sous l'effet conjugué du chauffage sélectif des micro-ondes, et de la réduction de la pression dans l'enceinte d'extraction, l'eau de constitution entre brutalement en ébullition, libérant les molécules dans le milieu extérieur. Le contenu cellulaire est donc plus facilement transféré vers l'extérieur du tissu biologique, et l'huile essentielle est entraînée par la vapeur d'eau propre au produit traité.

Dans cette partie nous avons répertorié les évolutions les plus récentes des méthodes d'extraction, ainsi que les méthodes dérivées de la MAE. Dans la partie suivante, nous passons à la description de celles qui ont été employées dans le cadre de l'extraction des molécules de l'argousier, plante que nous avons sélectionnée comme modèle, et qui sera utilisée pour nos différents développements méthodologiques.

V. Extractions « vertes » de l'argousier

Le tableau II-2 résume les différentes techniques d'extraction qui ont été employées pour l'extraction de molécules d'intérêt dans les différents organes de l'argousier. La SFE, qui présente une forte sélectivité envers les composés hydrophobes, est la technique la plus utilisée notamment pour l'extraction des molécules contenues dans l'huile de graines ou de fruits [41-47]. En revanche la PLE n'a jamais été utilisée avec l'argousier. L'UAE a été utilisée pour l'extraction de flavonoïdes à partir de différentes parties de l'argousier, notamment à partir des feuilles [48, 49]. L'utilisation combinée de l'UAE et de la SFE a permis d'améliorer le processus d'extraction supercritique et par conséquent d'augmenter le rendement d'extraction d'huile à partir de graines [50]. L'efficacité de la SWE a également été testée récemment pour l'extraction des flavonoïdes antioxydants provenant des feuilles d'argousier [51]. Les auteurs, qui comparent la SWE au Soxhlet et à la macération, démontrent que la SWE est une technique alternative de choix car elle permet d'obtenir des extraits plus antioxydants, plus riches en composés phénoliques et plus cytoprotecteurs, dans un temps et avec une consommation de solvant réduits par rapport aux techniques traditionnelles.

Seuls deux travaux, dont un très récent, mentionne l'extraction de composés phénoliques par MAE. Le premier correspond à un travail réalisé par Sharma *et al.* [48] dans lequel différentes procédures d'extraction, dont le Soxhlet, la macération, la MAE et l'UAE, ont été comparés à partir de différentes parties de d'argousier. Ils démontrent, entre autre, que la MAE est la meilleure approche car l'utilisation des micro-ondes entraîne une meilleure extraction des polyphénols et une activité antioxydante plus élevée que les autres techniques, et cela en un minimum de temps et une consommation de solvant réduite. Le deuxième correspond à un travail de 2011 réalisé par Périno-Issartier *et al.* [52], dans lequel les auteurs utilisent le système MGH pour extraire des molécules antioxydantes de co-produits de jus d'argousier. Dans ce cas l'extraction développée est sans solvant et les micro-ondes vont directement agir sur l'eau présente dans l'échantillon.

Tableau II-2: Références des précédents travaux utilisant les techniques d'extraction modernes pour l'extraction des molécules de l'argousier, *Hippophaë rhamnoides*.

Techniques	Organes	Molécules	Références
SFE	Résidu	Caroténoïdes Sitostérols Acide ursolique Tocophérols	[41]
SFE	Graine	Phytostérol	[42]
SFE	Fruit	Polyphénols	[43]
SFE	Graine	Huiles Caroténoïdes α -Tocophérol	[44]
SFE	Graine	Acides gras saturés et insaturés	[45]
SFE	Fruit	Carotène Tocophérol Acide gras	[46]
SFE	Résidu (pulpe et graine)	β -Sitostérol	[47]
UAE	Feuille, fruit, pulpe, graine	Isorhamnétine Myricétine Kaempférol Quercétine Quercétine-3- <i>O</i> -galactoside Rutine	[48]
UAE	Feuille	Isorhamnetine Kaempférol Quercétine Rutine Catéchine	[49]
SFE-UAE	Graine	Huiles	[50]
SWE	Feuille	Isorhamnétine Kaempférol Quercétine-3- <i>O</i> -galactoside	[51]
FMAE	Feuille, fruit, pulpe, graine	Isorhamnétine Myricétine Kaempférol Quercétine Quercétine-3- <i>O</i> -galactoside Rutine	[48]
SFME-MHG	Résidu	Isorhamnétine Isorhamnétine-3- <i>O</i> -glucoside Isorhamnétine-3- <i>O</i> -rutinoside Quercétine-3- <i>O</i> -glucoside	[52]

SFE, extraction par fluide supercritique (Supercritical Fluid Extraction) ; **UAE**, extraction assistée par ultra-sons (Ultrasound Assisted Extraction) ; **SWE**, extraction par eau subcritique (Subcritical Water Extraction) ; **FMAE**, extraction à pression atmosphérique assisté par micro-ondes (Focused Microwave Assisted Extraction) ; **SFME**, extraction sans solvant assisté par micro-ondes (Solvent Free Microwave Extraction) ; **MGH**, hydrodiffusion assistée par micro-ondes et gravité (Microwave Hydrodiffusion and Gravity).

En conclusion de cette partie bibliographique il apparait que cinq techniques d'extraction « vertes » sont préférentiellement utilisées pour l'extraction de substances naturelles en réduisant le temps d'extraction et la quantité de solvant utilisé. A l'exception de la PLE, ces méthodologies « vertes » ont toutes été utilisées pour l'extraction de composés hydrophiles et lipophiles dans diverses parties de l'argousier. Parmi celles-ci la MAE, qui a pour principal avantage une augmentation rapide de la température dès l'application des micro-ondes, réduit considérablement le temps d'extraction et le volume de solvant nécessaire, et apparait de ce fait une technique très séduisante. De plus, comme nous l'avons cité de nombreux développements ont été réalisés autour de cette technique, notamment dans le but d'éliminer totalement l'ajout de solvant d'extraction. Néanmoins, les processus MAE élaborés ont tous été réalisés jusqu'à présent à pression atmosphérique et/ou sous vide. Il nous a donc semblé intéressant de compléter ces développements en évaluant l'extraction MAE sans solvant réalisée sous atmosphère pressurisée.

VI. Evaluation et développement de la méthode d'extraction pressurisée sans solvant assistée par micro-ondes (PSFME, Pressurised Solvent Free Microwave Extraction)

VI.I. Evaluation comparée de la PSFME et de la PMAE avec solvant

A partir des données bibliographiques et du contexte actuel, notre travail s'est orienté vers le développement d'une technique d'extraction « verte » permettant l'extraction de composés polyphénoliques des baies d'argousier. On s'est donc intéressé dans un premier temps à comparer la méthode PSFME à la PMAE réalisée avec des solvants polaires, eau (H₂O) et éthanol (EtOH) dans le but d'évaluer la composition en composés les plus polaires de l'argousier dont font partie les polyphénols.

Pour ce faire les extractions ont été réalisées à partir de 4 g de baies d'argousier après un cycle d'extraction à 300 W et pendant 60 sec, et dans le cas des extractions PMAE 4 ml de solvant (H₂O ou EtOH) ont été ajoutés dans le réacteur (Annexe 3). Après avoir été prélevés et filtrés, les extraits PMAE et PSFME ont été dissous dans 5 mL de méthanol (MeOH). Afin de comparer la composition chimique des différents extraits obtenus, nous avons analysé par chromatographie liquide haute performance couplé à un détecteur à barrette de diode (HPLC-DAD, High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector) les extraits PMAE-EtOH et PMAE-H₂O, ainsi que l'extrait sans solvant PSFME à une longueur d'onde de 366 nm caractéristique des flavonoïdes (Annexe 4 + partie VIII.3.1.). L'analyse

chromatographique de ces trois extraits dissous dans le même volume de solvant (5 mL) (Fig. II-7) montre que la sélectivité d'extraction est identique quelque soit le solvant utilisé. De plus, la quantité extrait est similaire entre la PMAE-EtOH et la PSFME alors que l'extraction PMAE-H₂O conduit à une abondance relative de pics légèrement supérieure. D'après ces résultats préliminaires, il apparaît plus judicieux d'optimiser la procédure sans solvant PSFME car elle présente l'avantage d'être plus écologique et plus économique par rapport aux extractions EtOH et H₂O, tout en extrayant les mêmes molécules en quantité similaire.

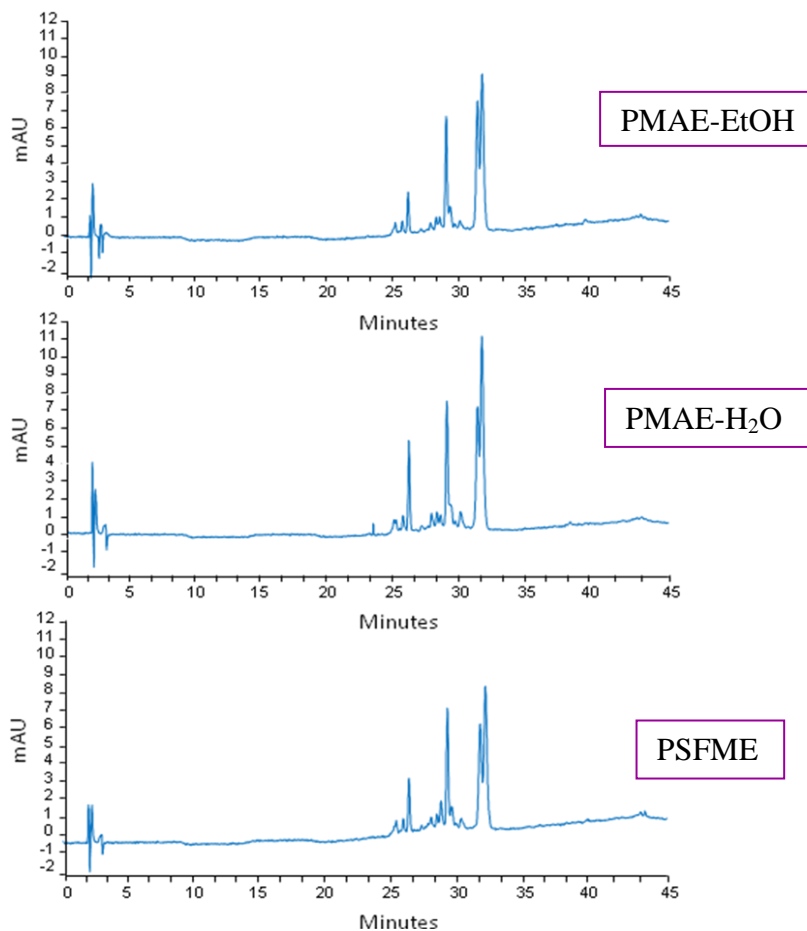


Figure II-7: Chromatogrammes d'extraits de baies d'argousier obtenus par PMAE avec de l'éthanol (EtOH), de l'eau (H₂O) et par PSFME à 300W et pendant 60 sec. Colonne Alltima C18 (150 × 4.6mm ID, 5 μm) ; gradient constitué d'H₂O ultra-pure et de MeOH tous les deux acidifiés à 1% CH₃COOH ; débit de 1 mL/min ; injection de 20 μl ; λ = 366 nm ; T = 25°C.

VI.2. Principe de l'extraction PSFME

La PSFME consiste en une extraction sous pression sans aucun ajout de solvant. Le matériel végétal est placé directement dans le réacteur sans prétraitement préalable puis est soumis à l'irradiation micro-ondes. Le principe de la PSFME repose donc sur la propriété de l'eau constitutive des baies à absorber les micro-ondes. Comme l'eau interne devient la source de chauffage de la matrice il est nécessaire de travailler avec du matériel végétal frais ou

congelé avec une humidité suffisante. Les diverses méthodologies MAE sans solvant développées jusqu'à présent ne mentionnent pas de taux d'humidité minimal pour réaliser l'extraction. Cependant toutes les procédures ont été réalisées avec des matériaux végétaux contenant entre 70 et 95 % d'humidité [29, 33, 35]. Dans les baies d'argousier, la littérature mentionne des taux d'humidité allant de 20 à 87% [53] suivant l'origine des baies. Pour éviter de fortes variabilités dans les résultats, il a été nécessaire de s'assurer du taux d'humidité des baies d'argousier utilisé. Pour déterminer la teneur en eau des baies, celles-ci ont été lyophilisées sur une période de 10 jours (Annexe 10). Le taux d'humidité (T_h) a été obtenu en calculant le rapport entre la masse sèche (M_s) et la masse fraîche (M_f) de baies d'argousier selon l'équation suivante: $T_h = 1 - M_s/M_f * 100$. Le taux moyen a été estimé à 72% ce qui est suffisant pour développer une procédure d'extraction sans solvant.

VI.3. Procédure d'extraction

La procédure d'extraction sans solvant a été réalisée dans un four micro-onde MycroSynth (Milestone, Sorisole, Italie) en utilisant le module MonoPREP, adapté à des températures et des pressions élevées, dans lequel est introduit le réacteur en verre d'une capacité de 50 mL. Le logiciel easyCONTROL permet de piloter et de contrôler les différents paramètres que sont le temps d'irradiation, la puissance micro-ondes et la température. Cette dernière peut être enregistrée à l'intérieur et à l'extérieur du réacteur grâce à une fibre optique ATC-FO introduite directement dans le récipient et à une sonde infrarouge placée sur les parois du four.

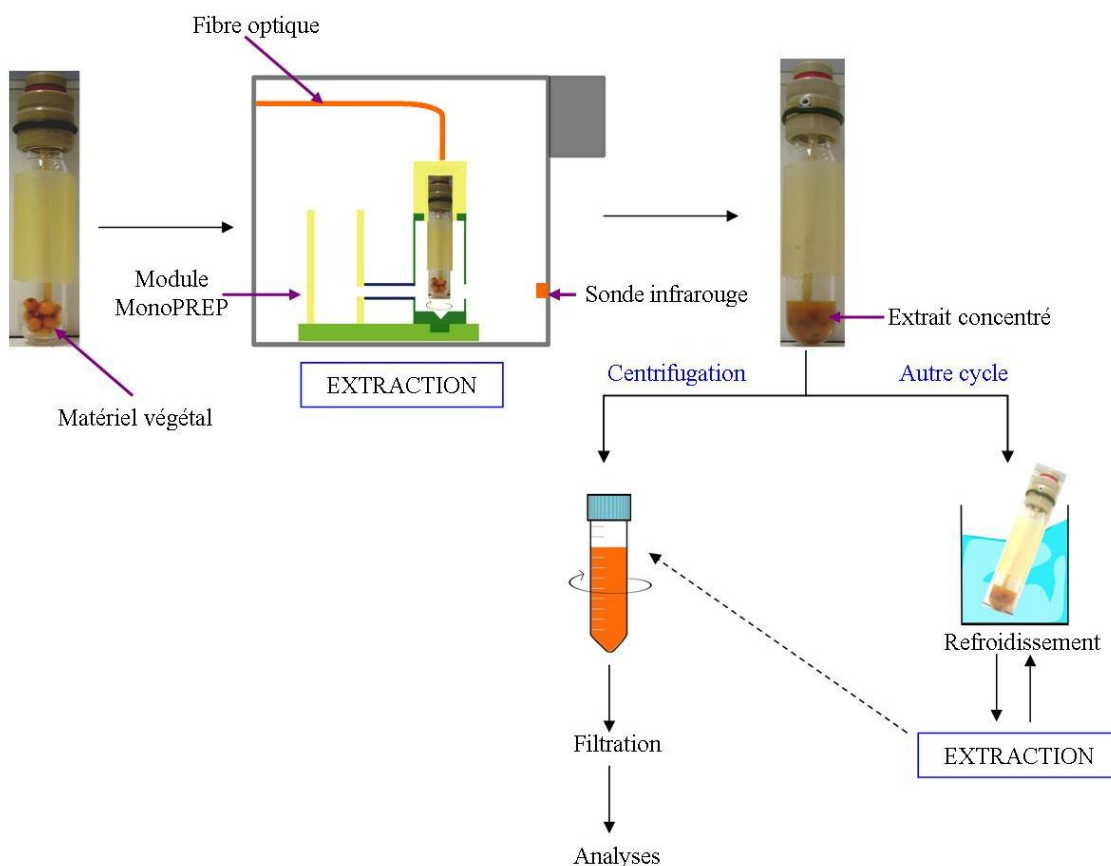


Figure II-8: Illustration schématique de la procédure d'extraction PSFME développée pendant cette étude.

A partir des tests préliminaires il a pu être déterminé un protocole expérimental dont les différentes étapes, décrites dans la figure II-8, comprennent:

- l'introduction des baies dans le réacteur fermé
- l'irradiation micro-onde à une puissance et un temps donnés
- le prélèvement et le transfert de l'extrait dans un tube à centrifuger
- la centrifugation à 5000 rpm pendant 4 min avec une centrifugeuse Jouan BR4i multifonction (Thermo, Illkirch, France)
- la filtration sur un filtre hydrophile Millipore Millex-HV (0,45 µm, Billerica, États-Unis)

Dans le cas de plusieurs cycles d'extraction, le réacteur est refroidi dans un bain de glace jusqu'à ce que la température soit revenue à son niveau initial (20 à 25°C). Les différents paramètres optimisés pendant cette étude ont été le temps d'extraction (10 à 50 sec), la puissance d'irradiation (200 à 1000 W) et le nombre de cycles (1 à 5). Pour l'analyse et les tests antioxydants, les extraits obtenus à partir de 4 g de matière végétale, ont ensuite été dilués dans un volume final de 5 ml de méthanol (MeOH).

VII. Optimisation de la PSFME par plan d'expériences

Nous avons adopté une optimisation par plan d'expériences pour développer la technique d'extraction sans solvant. Des expériences préliminaires ont été effectuées pour déterminer les paramètres influant et délimiter le domaine d'étude du plan d'expériences.

VII.1. Principe du plan d'expériences

La technique des plans d'expériences, basée sur l'élaboration d'une série de tests expérimentaux, consiste à faire varier simultanément les niveaux de un à plusieurs facteurs à chaque essai. Par rapport à une optimisation classique qui peut conduire à un nombre considérable d'expériences, cette méthodologie va permettre de diminuer le nombre d'expériences à réaliser, tout en augmentant le nombre de renseignements obtenus sans altérer la qualité des résultats. Outre l'influence de chaque facteur, il est possible d'obtenir des informations sur les interactions entre facteurs étudiés, et sur les paramètres optimaux par rapport à une réponse qui est une grandeur caractéristique de l'étude réalisé [54].

VII.2. Paramètres expérimentaux du plan d'expériences (facteurs)

Comme il a été mentionné précédemment (partie III.4.), différents facteurs peuvent influencer sur la qualité d'une extraction MAE. Dans notre étude, les paramètres expérimentaux qui seront pris en compte dans l'optimisation sont le temps d'extraction, la puissance d'irradiation micro-ondes ainsi que le nombre de cycles d'extraction. Il a été décidé de couvrir toute la gamme de puissance disponible sur l'appareil micro-ondes dont nous disposons (200-1000W). Le nombre de cycles d'extraction a été limité à cinq cycles au maximum afin d'obtenir un temps d'extraction total n'excédant pas 30 min. Pour rappel, un cycle d'extraction nécessite une étape de refroidissement de 5 min dans la glace. La durée d'irradiation a été choisie en fonction de la température et de la pression à l'intérieur du réacteur. Un temps d'irradiation supérieur à 50 sec a induit des surpressions à l'intérieur du réacteur, conduisant à l'ouverture de la membrane de sécurité de ce dernier et par conséquent à une perte de matière. Afin de prévenir toute surpression, le temps d'irradiation a été limité à 50 sec. La masse de matière végétale à extraire a été fixée à 4 g pour trois raisons: pour être compatible avec le volume du réacteur, pour assurer une bonne homogénéité des échantillons à extraire, et pour obtenir un volume d'extrait suffisant pour son analyse et la réalisation ultérieure de tests d'activité biologique.

VII.3. Evaluation de la quantité extraite (réponse)

Pour optimiser une technique d'extraction la réponse conventionnelle est le rendement d'extraction qui estime la masse de molécules extraites par rapport au matériel de départ. Toutefois dans notre étude, l'extraction à de faibles valeurs de temps et de puissance d'irradiation a mené à de très faibles quantités extraites ce qui rend l'estimation du rendement d'extraction, et ce de manière répétable, difficile. Par ailleurs, l'objectif de notre étude est de développer une méthode d'extraction verte qui permette d'obtenir un extrait le plus riche possible en composés phénoliques, or dans de nombreuses études, concernant ou non l'argousier, l'activité antioxydante a été fortement corrélée à la présence de composés phénoliques [55, 56]. Il nous a donc paru pertinent de caractériser la qualité de chaque extrait, non plus par le rendement d'extraction, mais par une évaluation de son activité antioxydante liée directement à la teneur en composés phénoliques présents. La capacité antioxydante de chaque extrait a été obtenue par deux tests chimiques : la méthode utilisant le radical 2,2-diphenyle-1-picrylhydrazyle (DPPH^{*}) et la méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power). En complément, une estimation du contenu en composés phénoliques totaux (TPC, Total Phenolic Content) via le test colorimétrique Folin-Ciocalteu (FC) a également été réalisée (Annexe 6 + Chapitre 4 partie III.2). Chaque extrait sera ainsi caractérisé par trois réponses différentes.

VII.4. Modélisation du plan d'expériences

Afin d'étudier l'influence des facteurs sur les réponses choisies, nous nous sommes orientés vers la réalisation d'un plan d'expériences factoriel complet à deux niveaux. Toutes les combinaisons des différents niveaux de facteurs sont réalisées au cours de l'expérience. Les trois facteurs choisis ont été étudiés entre un niveau inférieur (-1) et un niveau supérieur (+1): le temps d'irradiations micro-ondes ($10 < T < 50$ sec), la puissance micro-ondes ($200 < P < 1000$ W) et le nombre de cycle d'extraction ($1 < C < 5$). La matrice expérimentale du plan d'expériences est donnée dans le tableau II-3. L'effet des facteurs et de leurs interactions de premier ordre (TP, TC, CP) ont été modélisés par l'équation suivante:

$$Y = \beta_0 + \beta_T \times X_T + \beta_P \times X_P + \beta_C \times X_C + \beta_{TP} \times (X_T \times X_P) + \beta_{TC} \times (X_T \times X_C) + \beta_{CP} \times (X_C \times X_P)$$

- Y est la réponse
- β_0 est la valeur de la réponse au centre du domaine d'étude, noté 0
- β_i est l'effet du facteur i
- β_{ij} est l'effet de l'interaction entre les facteurs i et j
- X_i est le niveau attribué au facteur i

Les expériences ont été réalisées dans un ordre aléatoire afin de minimiser des contraintes extérieures inconnues, et le point central à été répété quatre fois afin d'évaluer la répétabilité de la méthode et de vérifier l'absence de biais.

Tableau II-3: Matrice expérimentale du plan d'expériences factoriel complet à deux niveaux pour les trois facteurs étudiés : temps d'extraction, puissance d'irradiation micro-ondes, et nombre de cycles. Les niveaux -1, 0 et +1 représentent respectivement le niveau inférieur, le centre, et le niveau supérieur du domaine d'étude.

Ordre expérimental	Niveau	Temps d'extraction (sec)	Puissance d'irradiation (W)	Nombres de cycles
8	-1	10	200	1
7		50	200	1
6		10	1000	1
2		50	1000	1
11		10	200	5
10		50	200	5
4		10	1000	5
12	+1	50	1000	5
5	0	30	600	3
3	0	30	600	3
9	0	30	600	3
1	0	30	600	3

VII.5. Résultat de l'optimisation

Les résultats du plan d'expériences factoriel complet à deux niveaux sont représentés sous forme de diagrammes de Pareto (Fig. II-9), qui classent les effets contribuant à chacune des réponses par ordre décroissant d'importance. Les barres verticales pointillées représentent la valeur minimale à partir de laquelle les effets sont considérés comme étant statistiquement significatif à un niveau de confiance de 95 %. L'analyse de ces diagrammes montre que les trois facteurs étudiés ont tous un effet significatif sur l'activité antioxydante et sur la quantité de polyphénols extraits. Les facteurs les plus influant sont par ordre décroissant le temps d'irradiation (T), la puissance d'irradiation (P) et le nombre de cycles (C). Il convient de noter que, quelque soit la réponse étudiée, l'interaction des facteurs TP a toujours une influence sur les réponses étudiées. Par ailleurs elle est significativement plus influente que C dans le cas de la réponse obtenue via le test d'évaluation du contenu en composés phénoliques totaux (TPC) (Fig. II-9).

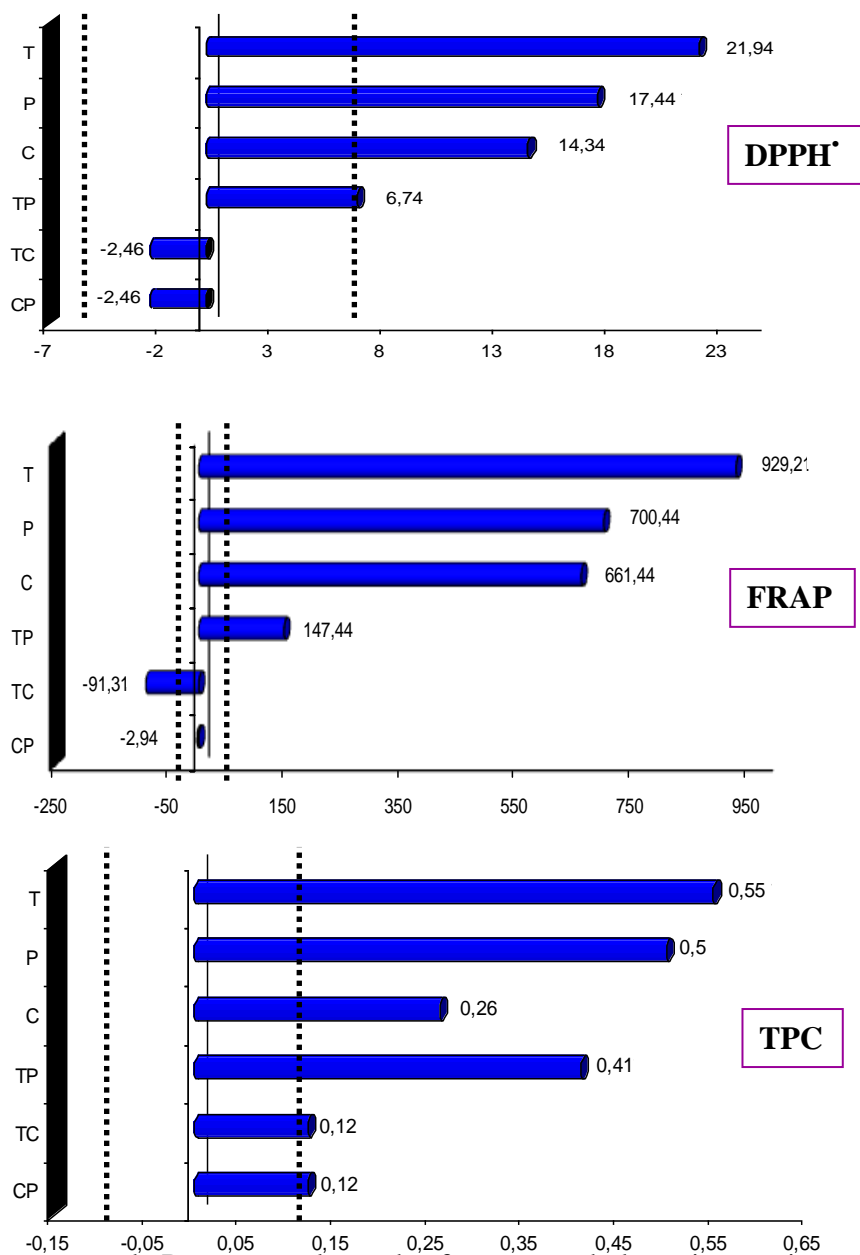


Figure II-9: Diagrammes de Pareto et valeurs des facteurs et de leurs interactions de premier ordre pour les réponses du test DPPH[•], du test FRAP et de la TPC. La ligne verticale indique le niveau de confiance de 95 % à partir duquel les résultats sont considérés comme significatifs. **T**, temps d'extraction; **P**, puissance d'irradiation; **C**, nombre de cycles; **TP**, interaction entre temps et puissance; **TC**, interaction entre temps et nombre de cycles; **CP**, interaction entre nombre de cycle et puissance.

Ainsi, il a été démontré que plus T, P et C augmentent, plus la capacité antioxydante des extraits augmente et plus ils contiennent de composés phénoliques. Pour la suite de l'étude les **conditions optimales d'extraction** ont donc été fixées à **50 sec d'extraction avec une puissance d'irradiation micro-ondes de 1000 W et 5 cycles d'extraction**. En complément de cette étude et pour vérifier le pertinence de notre choix des tests pour

l'évaluation de la quantité extraite de composés, le coefficient de Pearson (ρ) a été déterminé entre chaque réponse. Une corrélation fortement significative a été établie entre les réponses des deux tests antioxydants DPPH^{*} et FRAP ($\rho = 0.908$, $p = 0.001$ à 5%). Cependant une réponse plus faible a été estimée d'une part entre DPPH^{*} et TPC ($\rho = 0.760$, $p = 0.017$ à 5%) et d'autre part entre FRAP et TPC ($\rho = 0.723$, $p = 0.028$ à 5%), ce qui indique que l'activité antioxydante n'est pas seulement due aux composés phénoliques des baies d'argousier. Cette activité pourrait être liée à la présence supplémentaire d'acide ascorbique et/ou de caroténoïdes qui sont des molécules connues pour leur activité antioxydante et qui ont déjà été identifiées dans les baies d'argousier [55, 57].

VIII. Etude approfondie de l'influence du nombre de cycles d'extraction

Dans notre procédure, le nombre de cycles détermine le temps total d'extraction car l'étape de refroidissement est plus longue que l'irradiation micro-ondes et constitue une limite dans un processus d'extraction qui se veut rapide. Bien qu'il soit le facteur le moins influant sur l'extraction et sans interactions significatives avec les autres facteurs, il a un effet significatif sur l'activité antioxydante et la quantité de composés phénoliques extraits. Ceci nous a mené à nous questionner sur la nécessité d'effectuer cinq cycles d'extraction pour obtenir une activité antioxydante importante sachant qu'une réduction du nombre de cycles induirait une diminution du temps d'extraction. C'est pourquoi nous avons réalisé, après optimisation de la PSFME, une étude détaillée sur l'effet du nombre de cycles sur le processus d'extraction. Pour cela, nous avons réalisé cinq extraits différents dans les conditions optimales (50 sec, 1000 W) mais en appliquant de un à cinq cycles, noté C1 à C5.

VIII.1. Effet du nombre de cycles sur la structure de la matière

La figure II-10 montre le changement de structure que subit une baie d'argousier après plusieurs cycles d'extraction successifs. Les deux premiers cycles (C1 et C3) vont entraîner la perte d'intégrité de la baie et par la même occasion amorcer le transfert des molécules de l'intérieur vers l'extérieur de la baie. L'action répétée de l'irradiation micro-ondes (C3 à C5) va ensuite attaquer directement le cœur de la matrice, ainsi on peut voir la graine qui à la fin des cinq cycles est complètement dissocié de la baie. A la fin de l'extraction on obtient un matériel qui est déshydraté suggérant que toute l'eau constitutive de la baie a été utilisée par le processus d'extraction.

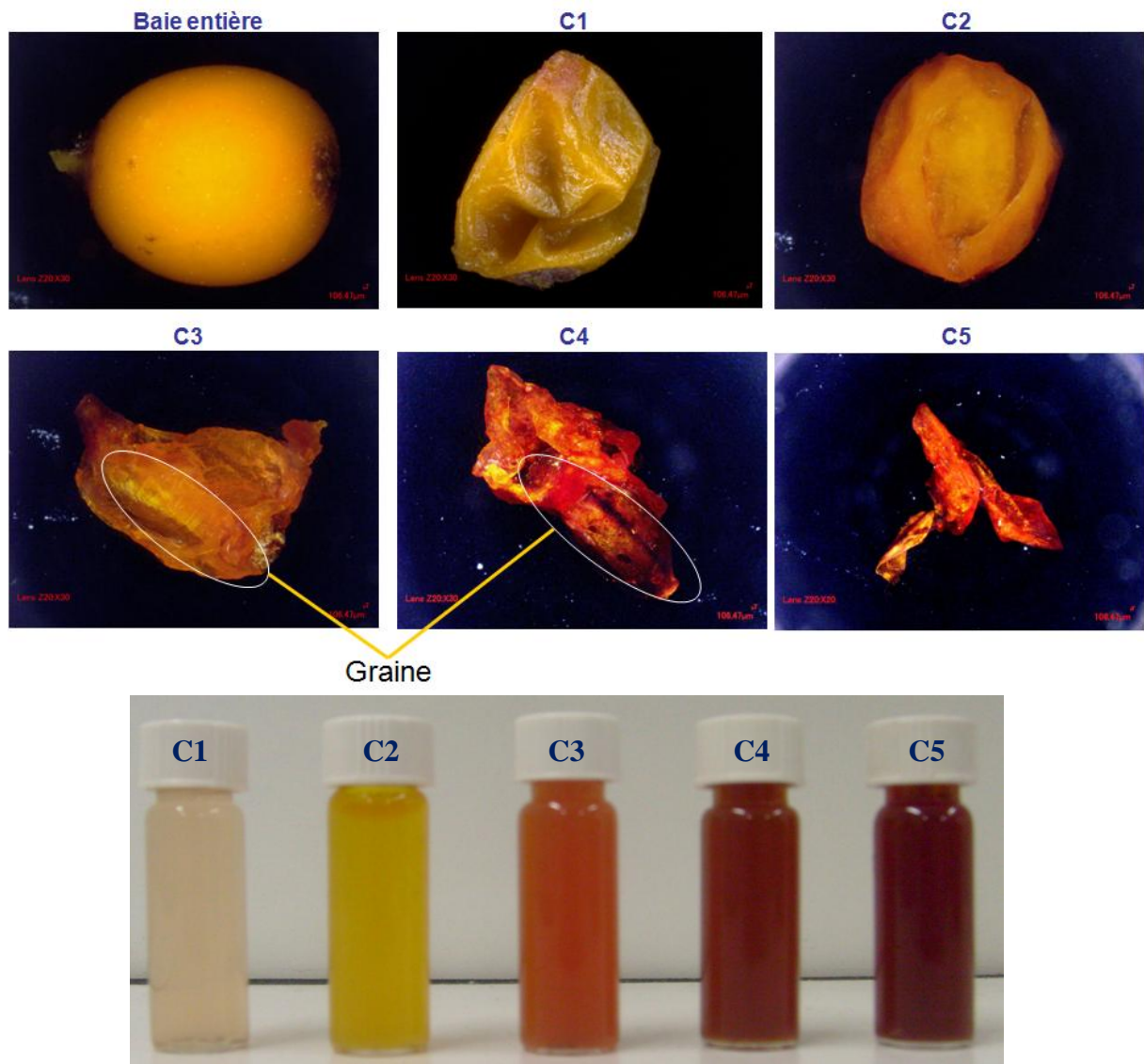


Figure II-10: Photographies obtenues par un microscope optique montrant la structure d'une baie avant et après plusieurs cycles (C) d'extraction (50 sec, 1000 W), et couleur des extraits obtenus après différents cycles d'extraction.

Les trois premiers cycles (C1 à C3) conduisent à des extraits, dont la couleur évolue fortement, du jaune de plus en plus foncé à l'orange. Les deux derniers cycles (C4 et C5) conduisent à des extraits dont la couleur rouge s'intensifie. L'évolution de la couleur de l'extrait suggère que les premiers cycles permettent d'extraire principalement les molécules hydrosolubles qui se trouvent dans la pulpe, alors que les cycles suivants permettent d'atteindre les sites actifs présents au cœur de la baie.

VIII.2. Effet du nombre de cycles et de la température sur l'extraction

La figure II-11 illustre l'évolution de la température moyenne finale à l'intérieur du réacteur et l'évolution du rendement d'extraction à la fin de chaque cycle d'extraction. Dans ce cas, le rendement d'extraction, déterminé par le rapport entre la quantité de matière obtenue après extraction et la quantité de matière utilisée au départ, a pu être évalué car suffisamment de matière extraite était disponible. Il peut être observé que l'évolution du rendement d'extraction est parallèlement corrélée à l'évolution de la température. De plus, nous pouvons distinguer deux phases: la première (C1 à C3) où la répétition de cycles induit une augmentation de la température de 100 à 190°C et une augmentation du rendement de 4 à 9 % ; et la deuxième phase (C3 à C5) pendant laquelle la température et le rendement d'extraction n'évoluent plus.

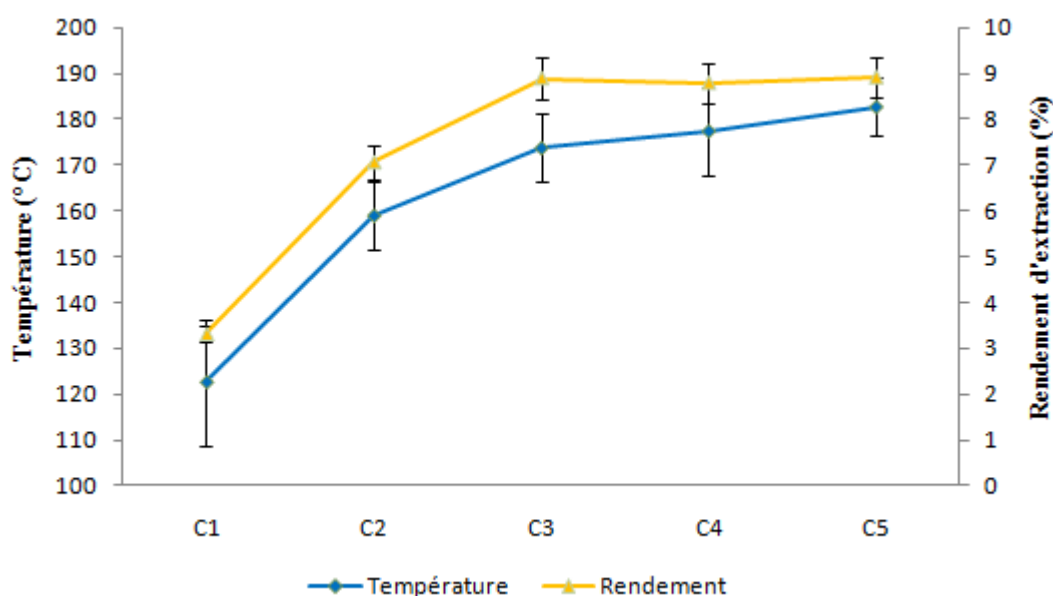


Figure II-11: Evolution du rendement d'extraction et de la température à l'intérieur du réacteur en fonction du nombre de cycle appliqué, $n = 6$.

Les résultats d'activité antioxydante (Fig. II-12) montrent que l'activité augmente significativement entre C1 et C3, mais très peu entre C3 et C5, ce qui corrèle parfaitement avec l'évolution de la température et du rendement. Cependant, la quantité en composés phénoliques augmente considérablement lorsque plusieurs cycles sont appliqués, ainsi C5 contient une TPC qui est significativement plus élevée que C1 et C3. Ainsi il semble que l'application de 5 cycles d'extraction augmente la quantité de composés phénoliques extraits mais n'a pas d'effet sur l'activité antioxydante. Afin d'avoir une image plus précise des composés extraits des analyses par HPLC-DAD ont donc été réalisées.

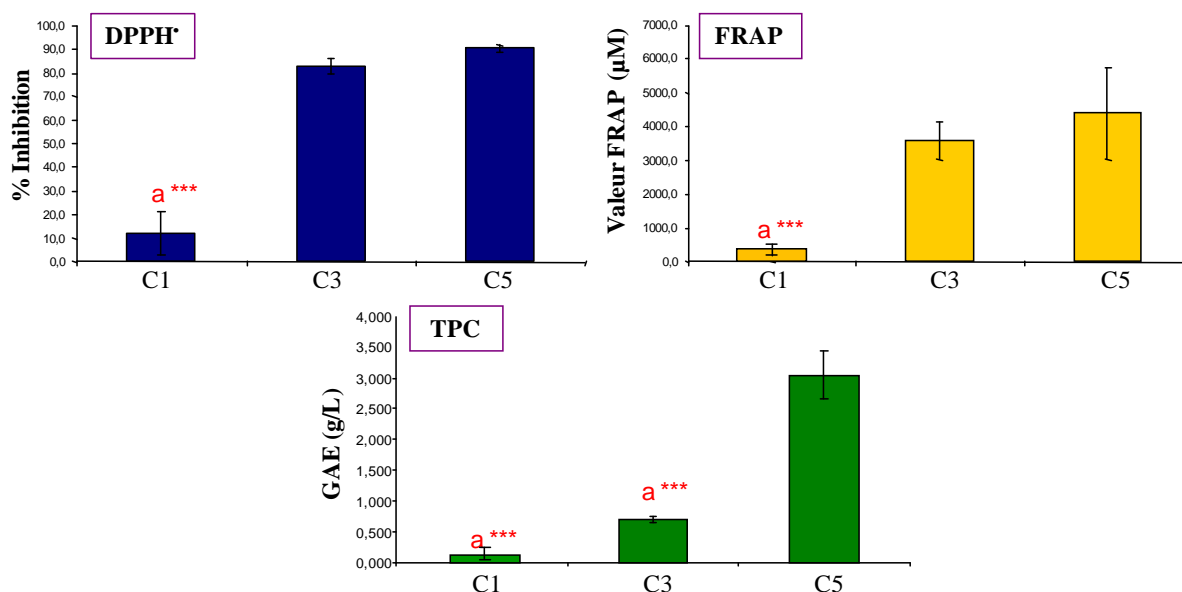


Figure II-12: Histogrammes illustrant l'activité antioxydante des extraits après 1, 3 et 5 cycles d'extraction (50 sec, 1000W) avec les tests DPPH^{*}, FRAP et TPC. **a** statistiquement significatif par rapport à C5 à un niveau de confiance de 99.9 % *******, n = 3.

VIII.3. Analyse des extraits par HPLC-DAD

VIII.3.1. Optimisation de la méthode HPLC-DAD

Comme il a été mentionné dans le chapitre 1 (partie III.1.) les composés phénoliques de l'argousier ont principalement été séparés par HPLC-DAD. Les phases stationnaires habituellement employées pour la séparation de composés phénoliques sont les colonnes de silice greffées avec des chaînes C₁₈ [58]. La séparation peut être réalisée en mode isocratique ou en mode gradient d'élution, toutefois la vaste gamme de polarité de ces molécules nécessitent souvent de travailler en gradient d'élution pour éviter les co-élutions et pour éluer l'ensemble des composés. Les systèmes de solvant sont alors composés d'eau (H₂O) et d'un modificateur organique le méthanol (MeOH) ou l'acétonitrile (ACN). La phase mobile est souvent acidifiée à un pH situé entre 2 et 4, afin d'éviter l'ionisation des nombreux groupes hydroxyles des composés phénoliques pendant l'analyse, ce qui améliore en même temps la résolution et la reproductibilité [59, 60].

En se basant sur ces généralités, la méthode chromatographique a été optimisée à partir d'un extrait brut de baies d'argousier avec pour objectif de visualiser un maximum des molécules extraites aux longueurs d'ondes caractéristiques des composés phénoliques: 254, 279 et 366 nm. La méthode développée est un gradient constitué d'H₂O ultra-pure et de MeOH tous les deux acidifiés à 1% d'acide acétique (CH₃COOH) dont les proportions sont résumés dans le tableau II-4. La séparation a été réalisée à 1 mL/min et à 25°C sur une

colonne C18 Alltima (150 × 4.6mm ID, 5 µm, Alltech, Deerfield, Etats-Unis), en injectant 20 µL d'extrait.

Tableau II-4: Conditions du gradient d'analyse HPLC.

Temps (min)	% Solvant A (H ₂ O 1% CH ₃ COOH)	% Solvant B (MeOH 1% CH ₃ COOH)
0	95	5
5	95	5
10	80	20
15	80	20
25	50	50
30	50	50
40	20	80
45	20	80
46	95	5
55	95	5

VIII.3.2. Empreintes chromatographiques des extraits PSFME

Les extraits obtenus après 1, 3 et 5 cycles ont été analysés par HPLC-DAD à 279 et 366 nm (Fig. II-13). De C1 à C3 les empreintes chromatographiques sont très semblables. Seule l'intensité relative des pics augmentent ce qui est en accord avec l'augmentation du rendement d'extraction entre C1 et C3 observé précédemment. De C3 à C5 l'intensité des pics augmentent peu, tout comme le rendement, mais de nouveaux composés apparaissent entre C3 et C5 ce qui est en accord avec l'augmentation de la TPC observé ci-dessus. Bien que nous reviendrons de façon plus détaillée dans le chapitre 4 sur l'identification par HPLC-MS/MS de ces nouveaux composés, il peut être mentionné ici que les molécules spécifiques qui sont détectées à 366 nm après 5 cycles d'extraction, sont la quercétine (tr = 35.5), l'isorhamnétine-7-*O*-rhamnoside (tr = 38.4) et l'isorhamnétine (tr = 40.3), flavonoïdes beaucoup moins polaires que ceux extraits entre dès l'application de 1 ou 3 cycles d'extractions (C1 à C3).

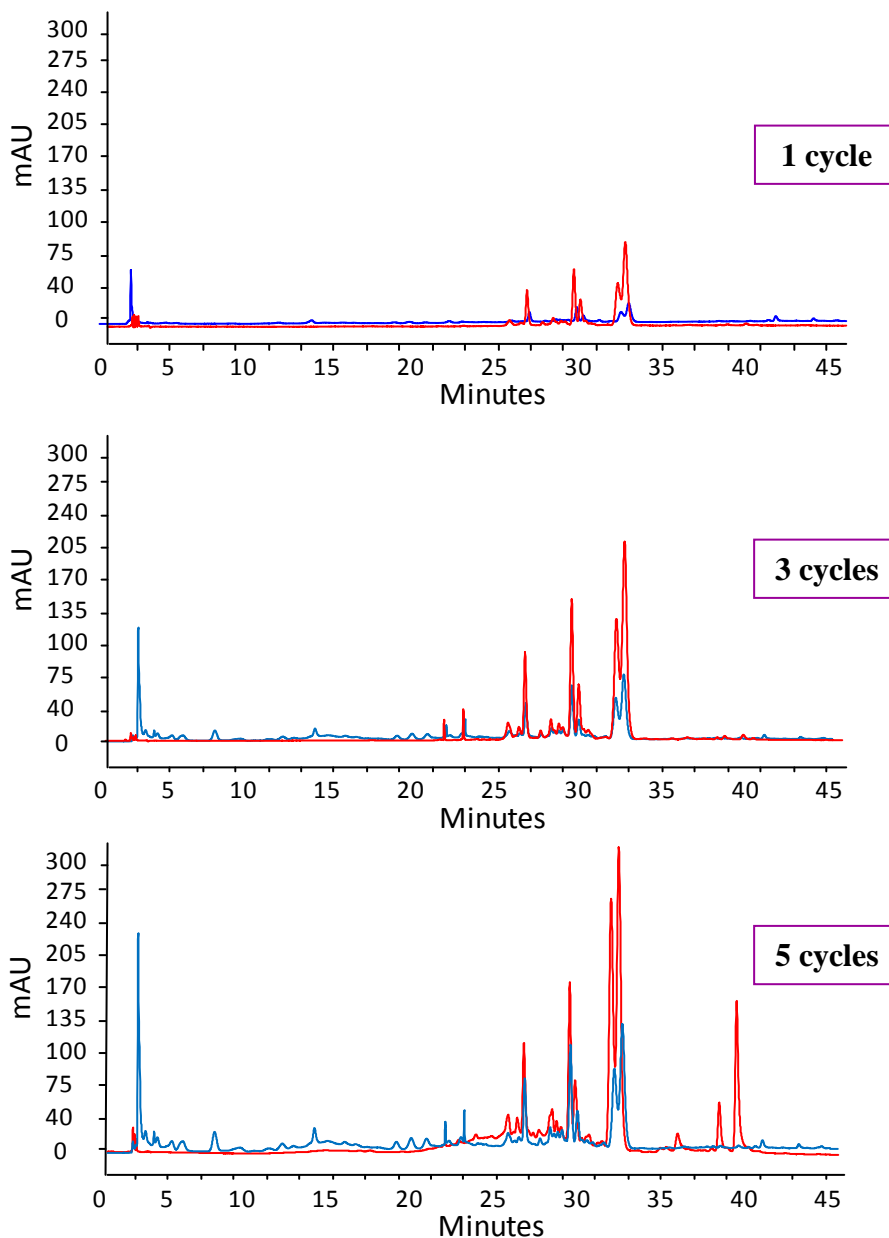


Figure II-13: Chromatogrammes d'extraits de baies d'argousier obtenus par PSFME (50 sec, 1000W) après un, trois et cinq cycles d'extraction. Colonne Alltima C18 (150 × 4.6mm ID, 5 µm); gradient constitué d'H₂O ultra-pure et de MeOH tous les deux acidifiés à 1% CH₃COOH; débit de 1 mL/min; injection de 20 µl; λ = 279 (bleu) et 366 nm (rouge); T = 25°C.

En réponse à notre questionnement, la réalisation de cinq cycles d'extraction n'induit donc pas de différence significative en terme d'activité antioxydante par rapport à trois cycles, mais les cinq cycles sont nécessaire pour extraire toute l'eau constitutive des baies et un maximum de composés phénoliques. Le processus optimisé avec cinq cycles d'extraction conduit à des températures d'extraction finales de $183 \pm 6^\circ\text{C}$ à l'intérieur du réacteur. De ce fait, il nous a paru nécessaire de s'interroger si l'apparition des nouvelles molécules observée

entre le troisième et le après cinquième cycles d'extraction, ne serait pas due à la dégradation des molécules thermolabiles.

IX. Evaluation de la dégradation potentielle des molécules

IX.1. Comparaison de la PSFME à d'autres techniques d'extraction

Dans le but d'évaluer l'influence du chauffage à haute température et l'influence de l'irradiation micro-ondes sur la dégradation des molécules, la PSFME a été comparée à la PLE utilisée à 40, 60 et 100°C, et à des techniques d'extraction douces, macération et pressage, qui ne font pas intervenir de chauffage éliminant de facto le risque de dégradation thermique (Annexe 3). La figure II-14 compare l'activité antioxydante et la composition phénolique totale, obtenue pour un même rapport: quantité de matière végétale extraite par rapport au volume de solvant concentration d'extrait, entre les différentes techniques d'extraction mentionnées ci-dessus. La procédure PSFME est significativement la plus active, lorsque seul le test du DPPH est pris en compte ($p < 0.0001$), et la plus riche en composés phénoliques ($p < 0.05$) par rapport aux autres techniques. Cependant aucune différence significative, n'a été remarquée entre la PSFME, le pressage et la macération lorsque l'activité antioxydante a été évaluée par le test FRAP. Il peut être également remarqué que la PSFME, le pressage et la macération ont toujours une réponse plus élevée que la PLE. Cela peut être expliqué par le fait que ces trois techniques induisent une perte d'intégrité des baies libérant ainsi dans le milieu les molécules bioactives de façon plus importante. A contrario, les baies étaient encore intactes dans la cellule d'extraction à la fin de la procédure PLE.

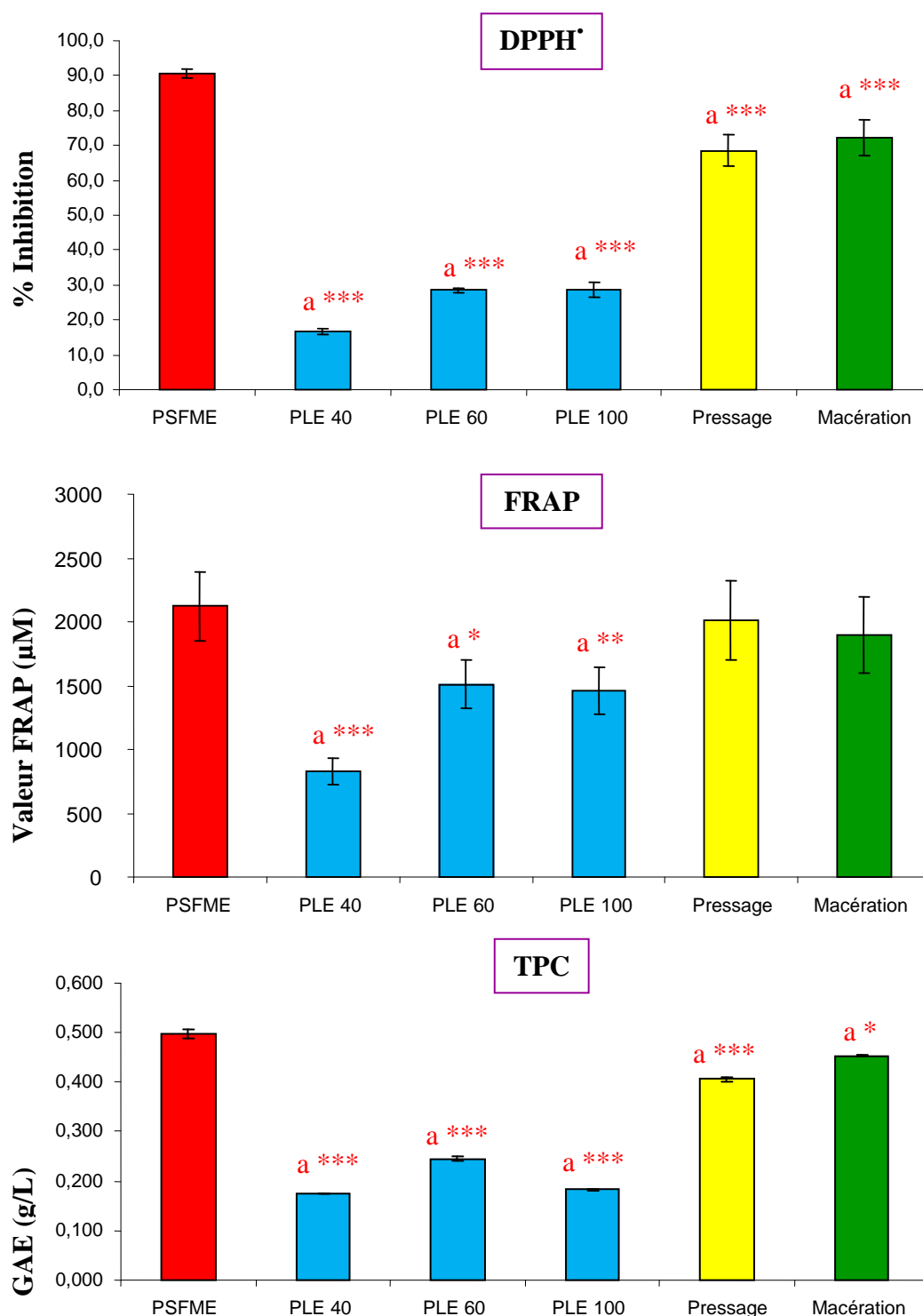


Figure II-14: Histogrammes comparatifs obtenus entre différentes techniques d'extraction pour le test DPPH (A), le test FRAP (B) et le test FC (C). **a** statistiquement significatif par rapport à la PSFME à différents niveaux de confiance 99,9 % ***, 99 % ** et 95 % *, n = 3.

Par ailleurs les chromatogrammes correspondants aux extraits obtenus avec ces différentes techniques (Fig. II-15) illustrent bien un meilleur rendement d'extraction lorsque

les baies perdent leur intégrité. L'abondance relative des pics chromatographiques est plus importante pour la PSFME suivi du pressage et de la macération, techniques qui entraînent toutes une perte d'intégrité de la baie, alors que la PLE, non destructive, présente une abondance relative beaucoup plus faible. En comparant les profils chromatographiques il peut être remarqué que ceux-ci sont similaires entre 25 et 35 min, et que l'utilisation d'une source de chauffage (PSFME et PLE à 100°C) induit l'extraction de composé plus hydrophobes tel que la quercétine et l'isorhamnétine.

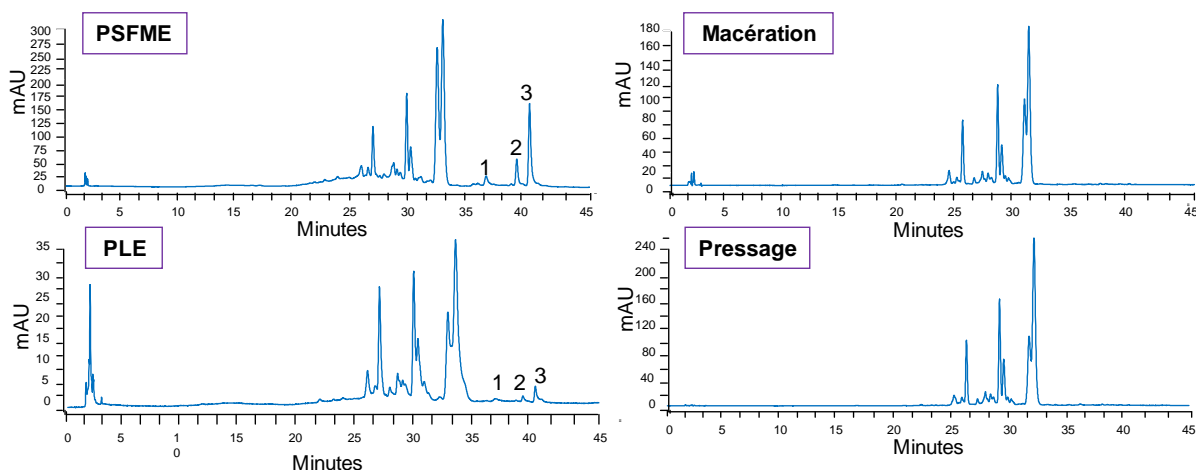


Figure II-15: Chromatogrammes d'extraits de baies d'argousier obtenus par **PSFME**, **macération**, **PLE** à 100°C et **pressage**. Colonne Alltima C18 (150 × 4.6mm ID, 5 μm) ; gradient constitué d'H₂O ultra-pure et de MeOH tous les deux acidifiés à 1% CH₃COOH ; débit de 1 mL/min ; injection de 20 μL ; λ = 366 nm ; T = 25°C. 1: Quercétine, 2: Isorhamnétine-7-*O*-rhamnoside, 3: Isorhamnétine.

L'extraction de ces molécules peut être due à deux phénomènes, soit à une meilleure solubilisation de ces molécules faiblement hydrophiles, soit à une thermo-dégradation de molécules glycosylées en aglycones.

IX.2. Etude de la stabilité de l'isorhamnétine-3-*O*-glucoside et de l'isorhamnétine-3-*O*-rutinoside

Afin de vérifier la stabilité des molécules glycosylées nous avons mimé le processus d'extraction en soumettant à 5 cycles d'extraction deux molécules glycosylées présentes dans les baies d'argousier, l'isorhamnétine-3-*O*-glucoside et l'isorhamnétine-3-*O*-rutinoside [61]. Ces deux molécules ont été dissoutes dans un mélange H₂O:MeOH (90:10) à une concentration de 0.2 mg/mL, puis soumises à cinq cycles d'irradiation micro-ondes successifs (50 sec, 1000W) avec une étape de refroidissement entre chaque cycle. Après chaque cycle, un aliquot de la solution irradiée a été prélevé et injecté en HPLC en modifiant légèrement les conditions précédemment décrite (partie VIII.3.1.) Ainsi, le gradient a été modifié de façon à éluer ces deux molécules plus rapidement, puisqu'elles sont éluées en fin de

chromatogramme d'extrait de baies d'argousier. Le pourcentage de recouvrement de chaque molécule a ensuite été calculé en prenant en compte les aires des pics avant et après irradiation micro-onde.

La figure II-16 montre que l'application répétée de plusieurs cycles d'extraction à 1000 W et pendant 50 sec a seulement une influence minimale sur le recouvrement des deux molécules étudiées. Ainsi dès l'application du premier cycle, il y a une diminution de 5% de la quantité d'isorhamnétine-3-*O*-rutinoside qui n'évolue plus par la suite. De même, la quantité d'isorhamnétine-3-*O*-glucoside n'est presque pas affectée par la répétition de 5 cycles d'extraction. De plus les empreintes chromatographiques obtenues après chaque cycle ne montrent pas d'hydrolyse des molécules glycosylés en leur aglycone. Ces résultats laissent à penser qu'il n'y a pas de dégradation significative des flavonols glycosylés dans nos conditions d'extraction PSFME.

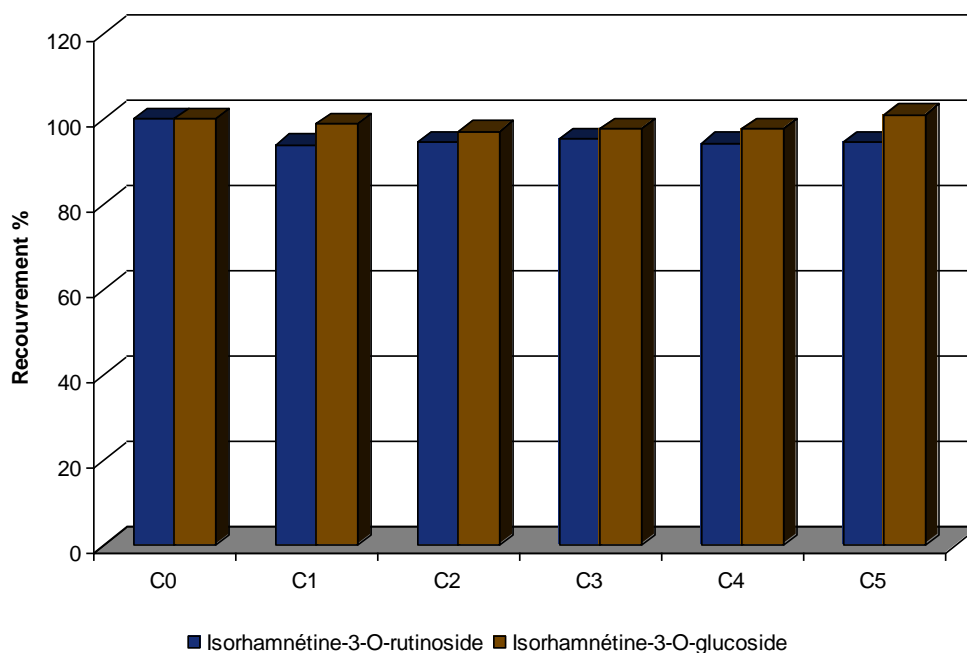


Figure II-16: Pourcentage de recouvrement de l'isorhamnétine-3-*O*-rutinoside et de l'isorhamnétine-3-*O*-glucoside avant (C0) et après plusieurs cycles d'irradiation micro-ondes (C1 à C5).

Nos résultats rejoignent ceux de Biesaga [62] qui a étudié l'influence de la MAE sur la stabilité de différentes classes de flavonoïdes et qui a démontré que les molécules les plus stables sous l'effet de l'irradiation micro-ondes sont les flavonols glycosylés, tels que la rutine ou l'hésperédine, qui subissent peu de dégradation. Au contraire, les molécules les moins stables sont les flavonols aglycones, tels que la myricétine, la quercétine, le kaempferol et la rhamnétine, classés par ordre croissant de stabilité. Cette étude a également établi que le

risque de dégradation diminuait lorsque peu de groupements hydroxyles étaient présents sur la partie aglycone du flavonoïde. Toutefois, cette étude, comme la notre, n'a pas pris en compte le pH auquel les extractions ont été réalisées, alors que celui-ci peut avoir une influence sur la dégradation des flavonoïdes glycosylés par hydrolyse acide.

Ainsi, il semble qu'il n'y a pas de dégradation significative des flavonoïdes glycosylés par la température, et que l'extraction de molécules plus hydrophobes après cinq cycles d'extraction serait bien due à l'action combinée de la température, de la pression et des micro-ondes, ce qui expliquerait l'augmentation significative de la TPC après cinq cycles. Ces molécules, caractéristiques de l'extrait PSFME, ont été par la suite utilisées comme marqueur phytochimique du processus d'extraction.

X. Discussion sur le mécanisme d'extraction

L'ensemble des observations suggère la mise en place de deux mécanismes lors d'une extraction PSFME:

- la destruction des cellules végétales via l'échauffement micro-ondes
- l'extraction au cœur de la matrice via l'effet combiné de la température, de la pression et des micro-ondes

Le premier phénomène est caractéristique de l'extraction SFME lorsque la matrice végétale utilisée est riche en eau [20, 27, 30]. Plus précisément, ce mécanisme est lié à l'échauffement rapide dès l'application des micro-ondes de l'eau constitutive via le phénomène de rotation dipolaire. Cette augmentation brutale de la température à l'intérieur des cellules végétales provoque par conséquent une augmentation de la pression à l'intérieur des cellules. Sous l'effet de la pression, les parois et membranes cellulaires se désintègrent libérant ainsi le contenu cellulaire vers l'extérieur du tissu biologique (Fig. II-17).

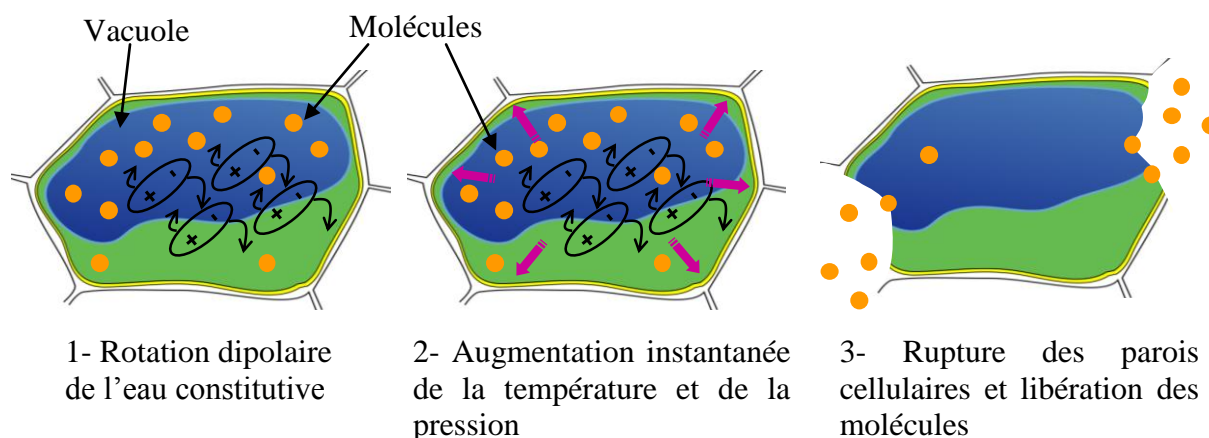


Figure II-17: Représentation schématique du mécanisme de rupture des parois cellulaires sous l'effet des micro-ondes.

Le deuxième phénomène est quant à lui spécifique de la PSFME, et fait intervenir l'effet combiné de la température, de la pression et des micro-ondes. Au début de ce chapitre, l'extraction par eau subcritique (SWE) a été décrite comme une technique « verte » qui utilisait l'eau comme solvant d'extraction dans une atmosphère pressurisée à des températures de l'ordre de 250-300°C, ce qui induisait une diminution de sa polarité et la capacité à extraire des molécules faiblement polaires [14]. L'ensemble des résultats obtenus avec la PSFME suggère la mise en place d'un mécanisme d'extraction similaire à la SWE, notamment lors des derniers cycles d'extraction. A partir du troisième cycle, l'eau libérée par la première phase d'extraction est directement en contact avec la matrice végétale. Le chauffage rapide, entre 180 et 200°C, de l'eau sous atmosphère pressurisée induit une diminution de sa viscosité et ainsi une meilleure pénétration de celle-ci au cœur de la matrice. Ces conditions lui confèrent des propriétés physico-chimiques de solvant tel que le méthanol ou l'éthanol permettant la désorption et la diffusion des molécules moins polaires, telles que la quercétine et l'isorhamnétine, du cœur de la matrice vers le milieu extérieur. L'utilisation combinée d'une atmosphère pressurisée, d'une température élevée et de l'action destructive des micro-ondes permet ainsi d'augmenter la quantité de composés phénoliques extraite.

La PSFME s'avère être une méthode simple, rapide et ne nécessitant pas de solvant pour l'extraction de molécules bioactives à partir de matériel végétal frais. A la fin de l'extraction un jus concentré en molécules d'intérêt est récupéré et peut être facilement analysable après une étape de filtration. Ce dernier point constitue l'étape limitante de ce procédé car elle demande l'utilisation d'une centrifugeuse et de consommables induisant du temps de manipulation supplémentaire. Par ailleurs, pour mieux comprendre les phénomènes induits au sein du réacteur il serait nécessaire de pouvoir contrôler la pression au sein de celui-ci.

XI. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons pu démontrer que la méthode PSFME mise en œuvre est une méthode prometteuse pour l'extraction des polyphénols à partir de fruits frais sans ajout de solvant. L'originalité de la méthode est basée sur l'utilisation combinée de la pression, de la température et des micro-ondes augmentant la vitesse de diffusion des solutés vers l'extérieur du matériel végétal riche en eau. C'est une technique simple et rapide qui s'inscrit dans une démarche de chimie « verte », évitant l'utilisation et le retraitement de solvants organiques toxiques pour l'environnement et la santé humaine.

Une partie des travaux rapportés dans ce chapitre a fait l'objet d'une publication parue en 2011 dans *Food Chemistry*.

Food Chemistry 126 (2011) 1380–1386



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

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



Analytical Methods

Evaluation of a simple and promising method for extraction of antioxidants from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries: Pressurised solvent-free microwave assisted extraction

Thomas Michel, Emilie Destandau*, Claire Elfakir

Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans-CNRS UMR 6005, BP 67059, 45067 Orléans Cedex 2, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 July 2009

Received in revised form 8 September 2010

Accepted 12 September 2010

Available online 2 December 2010

Keywords:

Hippophaë rhamnoides

Pressurised solvent-free microwave assisted extraction

Green extraction

Factorial design

Antioxidant

Phenolic compounds

ABSTRACT

The pressurised solvent-free microwave assisted extraction (PSFME) technique has been developed and optimised for extraction of antioxidants from *Hippophaë rhamnoides* L. berries using a two-level full factorial design. The effects of factors (extraction time, irradiation power, number of cycles) and their first order interactions were evaluated from antioxidant activity of extracts using the 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) free radical scavenging method, the ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay, and the estimation of total phenolic content using the Folin–Ciocalteu method. The best extraction conditions were obtained, in a laboratory scale extractor of 50 mL filled with 4 g fresh berries, using a 1000 W microwave power applied during 50 s and repeated five cycles. PSFME was then compared to other common extraction techniques such as pressing, maceration and pressurised liquid extraction. It is appeared that PSFME leads to the most active and richest extract in phenolic content including molecules such as quercetin and isorhamnetin not extracted with other techniques. Furthermore PSFME respect green chemistry, it is rapid, cheap and does not need sample preparation and/or evaporation step.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Hippophaë rhamnoides L. (sea buckthorn) is a deciduous and thorny bush which is belonged to Elaeagnaceae family and naturally present in Asia and Europe (Rousi, 1971). Chemical compounds including vitamins, phenolic compounds, lipids, tocopherols, carotenoids and phytosterols were found in *H. rhamnoides* (Beveridge, Li, Oomah, & Smith, 1999; Gutzeit, Klaubert, Rychlik, Winterhalter, & Jerz, 2007; Rosch, Krumbein, Mugge, & Kroh, 2004; Yang & Kallio, 2002; Yang, Karlsson, Oksman, & Kallio, 2001). The orange berries of *H. rhamnoides* are known to be used in traditional medicine especially in Chinese, Mongolian and Tibetan pharmacopoeia and to have various pharmacological effects like antimicrobial, dermatological or antioxidant effects (Guliyev, Gul, & Yildirim, 2004; Zeb, 2004). Various studies of fruit extracts have confirmed a good antioxidant activity and established that antioxidant properties are especially due to phenolic compounds, vitamins and carotenoids (Gao, Ohlander, Jeppsson, Bjork, & Trajkovski, 2000; Rosch, Bergmann, Knorr, & Kroh, 2003). All these effects and the high vitamin C content (Gutzeit, Baleanu, Winterhalter, & Jerz, 2008) make *H. rhamnoides* as a plant with considerable medicinal and nutritional values which is more and more incorporated in food and medicine developments (Beveridge

et al., 1999). Conventional extraction techniques employed to extract bioactive compounds from *H. rhamnoides* berries are soxhlet and maceration which use high amount of toxic solvent such as methanol. In order to introduce bioactive plant extract in pharmaceutical and cosmetic formulations, industries are looking for green and efficient extraction processes free of toxic solvent. Methodology using biodegradable and no toxic solvent such as water and ethanol can be developed. In last decade, few alternative sample extraction techniques including pressurised liquid extractions (PLE), supercritical fluid extraction (SFE), ultrasound assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE), have emerged as energy saving technologies (Armenta, Garrigues, & de la Guardia, 2008; Tobiszewski, Mechlinska, Zygmunt, & Namiesnik, 2009). PLE and SFE are based on the use of compressed fluids as extracting agents (Mendiola, Herrero, Cifuentes, & Ibañez, 2007), whereas UAE and MAE used respectively ultrasonic (Vinatoru, 2001) and microwave energy (Sparr Eskilsson & Björklund, 2000) as the source of heating of the solvent-matrix solution. For green extraction, the use of supercritical carbon dioxide is very attractive because it allows complete removal of the extracting solvent since residual carbon dioxide is easily evaporated into the atmosphere. Nevertheless, SFE is more appropriated for extraction of apolar or weakly polar compounds than for polar compounds. MAE is increasingly employed in extraction of natural products because it is a cheap and rapid technique, and the extraction time and solvent consumption are strongly decreased (Kaufmann & Christen,

* Corresponding author. Tel.: +33 238417074; fax: +33 238417281.

E-mail address: emilie.destandau@univ-orleans.fr (E. Destandau).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Mendiola, J.A., Herrero, M., Cifuentes, A. and Ibañez, E.** (2007) Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. *Journal of Chromatography A*, 1152(1-2), 234-246.
2. **Vinatoru, M., Toma, M., Radu, O., Filip, P.I., Lazurca, D. and Mason, T.J.** (1997) The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrasonics Sonochemistry*, 4(2), 135-139.
3. **Sparr Eskilsson, C. and Björklund, E.** (2000) Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227-250.
4. **Papagiannopoulos, M., Zimmermann, B., Mellenthin, A., Krappe, M., Maio, G. and Galensa, R.** (2002) Online coupling of pressurized liquid extraction, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for automated analysis of proanthocyanidins in malt. *Journal of Chromatography A*, 958(1-2), 9-16.
5. **Rostagno, M.A., D'Arrigo, M. and Martínez, J.A.** (2010) Combinatory and hyphenated sample preparation for the determination of bioactive compounds in foods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(6), 553-561.
6. **Zhang, Y., Liu, C., Yu, M., Zhang, Z., Qi, Y., Wang, J., Wu, G., Li, S., Yu, J. and Hu, Y.** (2011) Application of accelerated solvent extraction coupled with high-performance counter-current chromatography to extraction and online isolation of chemical constituents from *Hypericum perforatum* L. *Journal of Chromatography A*, 1218(20), 2827-2834.
7. **Anastas, P.T.** (1999) Green Chemistry and the role of analytical methodology development. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 29(3), 167 - 175.
8. **Armenta, S., Garrigues, S. and de la Guardia, M.** (2008) Green analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(6), 497-511.
9. **Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L., Avdalovic, N. and Pohl, C.** (1996) Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68(6), 1033-1039.
10. **Kaufmann, B. and Christen, P.** (2002) Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis*, 13(2), 105-113.
11. **Romanik, G., Gilgenast, E., Przyjazny, A. and Kaminski, M.** (2007) Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2), 253-261.
12. **Ong, E.S., Cheong, J.S.H. and Goh, D.** (2006) Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2), 92-102.

13. **Kronholm, J., Hartonen, K. and Riekkola, M.-L.** (2007) Analytical extractions with water at elevated temperatures and pressures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(5), 396-412.
14. **Teo, C.C., Tan, S.N., Yong, J.W.H., Hew, C.S. and Ong, E.S.** (2010) Pressurized Hot Water Extraction (PHWE). *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2484-2494.
15. **Camel, V.** (2001) Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst*, 126(7), 1182-1193.
16. **Wang, L. and Weller, C.L.** (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312.
17. **Herrero, M., Mendiola, J.A., Cifuentes, A. and Ibáñez, E.** (2010) Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2495-2511.
18. **Luque de Castro, M.D. and Jiménez-Carmona, M.M.** (2000) Where is supercritical fluid extraction going? *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 19(4), 223-228.
19. **Pétrier, C., Gondrexon, N. and Boldo, P.** (2008) Ultrasons et sonochimie. *Techniques de l'ingénieur*, AF6310, 1-14.
20. **Mandal, V., Mohan, Y. and Hemalatha, S.** (2007) Microwave assisted extraction – an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1), 7-18.
21. **Letellier, M. and Budzinski, H.** (1999) Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis*, 27(3), 259-270.
22. **Camel, V.** (2000) Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 19(4), 229-248.
23. **Périno-Issartier, S., Abert-Vian, M., Petitcolas, E. and Chemat, F.** (2010) Microwave turbo hydrodistillation for rapid extraction of the essential oil from *Schinus terebinthifolius Raddi* Berries. *Chromatographia*, 72(3), 347-350.
24. **Chemat, F., Lucchesi, M.E., Smadja, J., Favretto, L., Colnaghi, G. and Visinoni, F.** (2006) Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. *Analytica Chimica Acta*, 555(1), 157-160.
25. **Sahraoui, N., Vian, M.A., Bornard, I., Boutekedjiret, C. and Chemat, F.** (2008) Improved microwave steam distillation apparatus for isolation of essential oils: Comparison with conventional steam distillation. *Journal of Chromatography A*, 1210(2), 229-233.
26. **Farhat, A., Ginies, C., Romdhane, M. and Chemat, F.** (2009) Eco-friendly and cleaner process for isolation of essential oil using microwave energy: Experimental and theoretical study. *Journal of Chromatography A*, 1216(26), 5077-5085.

27. **Farhat, A., Fabiano-Tixier, A.-S., Maataoui, M.E., Maingonnat, J.-F., Romdhane, M. and Chemat, F.** (2011) Microwave steam diffusion for extraction of essential oil from orange peel: Kinetic data, extract's global yield and mechanism. *Food Chemistry*, 125(1), 255-261.
28. **Sahraoui, N., Vian, M.A., El Maataoui, M., Boutekedjiret, C. and Chemat, F.** (2011) Valorization of citrus by-products using Microwave Steam Distillation (MSD). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(2), 163-170.
29. **Lucchesi, M.E., Chemat, F. and Smadja, J.** (2004) Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A*, 1043(2), 323-327.
30. **Lucchesi, M.E., Chemat, F. and Smadja, J.** (2004) An original solvent free microwave extraction of essential oils from spices. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(2), 134-138.
31. **Wang, Z., Ding, L., Li, T., Zhou, X., Wang, L., Zhang, H., Liu, L., Li, Y., Liu, Z., Wang, H., Zeng, H. and He, H.** (2006) Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cyminum* L. and *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. *Journal of Chromatography A*, 1102(1-2), 11-17.
32. **Wang, Z.M., Wang, L., Li, T.C., Zhou, X., Ding, L., Yu, Y., Yu, A.M. and Zhang, H.Q.** (2006) Rapid analysis of the essential oils from dried *Illicium verum* Hook. f. and *Zingiber officinale* Rosc. by improved solvent-free microwave extraction with three types of microwave-absorption medium. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386(6), 1863-1868.
33. **Abert Vian, M., Fernandez, X., Visinoni, F. and Chemat, F.** (2008) Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. *Journal of Chromatography A*, 1190(1-2), 14-17.
34. **Bousbia, N., Abert Vian, M., Ferhat, M.A., Meklati, B.Y. and Chemat, F.** (2009) A new process for extraction of essential oil from *Citrus* peels: Microwave hydrodiffusion and gravity. *Journal of Food Engineering*, 90(3), 409-413.
35. **Zill-e-Huma, Abert Vian, M., Maingonnat, J.F. and Chemat, F.** (2009) Clean recovery of antioxidant flavonoids from onions: Optimising solvent free microwave extraction method. *Journal of Chromatography A*, 1216(45), 7700-7707.
36. **Périno-Issartier, S., Zill e, H., Abert-Vian, M. and Chemat, F.** Solvent free microwave-assisted extraction of antioxidants from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) food by-products. *Food and Bioprocess Technology*, 1-9.
37. **Cendres, A., Chemat, F., Maingonnat, J.-F. and Renard, C.M.G.C.** (2011) An innovative process for extraction of fruit juice using microwave heating. *LWT - Food Science and Technology*, 44(4), 1035-1041.
38. **Wang, J.-X., Xiao, X.-H. and Li, G.-K.** (2008) Study of vacuum microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds and pigment from Chinese herbs. *Journal of Chromatography A*, 1198-1199, 45-53.

- 39. Zill-e-Huma, Abert-Vian, M., Elmaataoui, M. and Chemat, F.** (2011) A novel idea in food extraction field: Study of vacuum microwave hydrodiffusion technique for by-products extraction. *Journal of Food Engineering*, 105(2), 351-360.
- 40. Mengal, P. and Mompon, B.** (1994) Method and plant for solvent-free microwave extraction of natural products. WO/94/26853(WO/94/26853).
- 41. Cossuta, D., Simándi, B., Hohmann, J., Doleschall, F. and Keve, T.** (2007) Supercritical carbon dioxide extraction of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) pomace. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(13), 2472-2481.
- 42. Li, T.S.C., Beveridge, T.H.J. and Drover, J.C.G.** (2007) Phytosterol content of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil: Extraction and identification. *Food Chemistry*, 101(4), 1633-1639.
- 43. Vaher, M. and Koel, M.** (2003) Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 990(1-2), 225-230.
- 44. Xu, X., Gao, Y., Liu, G., Wang, Q. and Zhao, J.** (2008) Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of sea buckthorn (*Hippophaë thamnoides* L.) oil using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 41(7), 1223-1231.
- 45. Yin, J.-Z., Wang, A.-Q., Wei, W., Liu, Y. and Shi, W.-H.** (2005) Analysis of the operation conditions for supercritical fluid extraction of seed oil. *Separation and Purification Technology*, 43(2), 163-167.
- 46. Kagliwal, L., Pol, A., Patil, S., Singhal, R. and Patravale, V.** (2011) Antioxidant-rich extract from dehydrated seabuckthorn berries by supercritical carbon dioxide extraction. *Food and Bioprocess Technology*, Article in press, 1-9.
- 47. Sajfrtova, M., Liekova, I., Wimmerova, M., Sovova, H. and Wimmer, Z.** (2010) β -Sitosterol: Supercritical carbon dioxide extraction from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seeds. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1842-1850.
- 48. Sharma, U.K., Sharma, K., Sharma, N., Sharma, A., Singh, H.P. and Sinha, A.K.** (2008) Microwave-assisted efficient extraction of different parts of *Hippophae rhamnoides* for the comparative evaluation of antioxidant activity and quantification of its phenolic constituents by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(2), 374-379.
- 49. Zu, Y., Li, C., Fu, Y. and Zhao, C.** (2006) Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(3), 714-719.
- 50. Yin, J.-Z., Zhou, D., Bi, M.-S., Jia, L.-Y. and Wang, A.-Q.** (2009) Solubility of *Hippophaë rhamnoides* L. seed oil in SC CO₂ and SCFE process enhancement by ultrasound. *Chemical Engineering Communications*, 196(11), 1322 - 1331.

51. **Kumar, M.S.Y., Dutta, R., Prasad, D. and Misra, K.** (2011) Subcritical water extraction of antioxidant compounds from seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves for the comparative evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry*, 127(3), 1309-1316.
52. **Périno-Issartier, S., Zill e, H., Abert-Vian, M. and Chemat, F.** (2011) Solvent free microwave-assisted extraction of antioxidants from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) food by-products. *Food and Bioprocess Technology*, 1-9.
53. **Bal, L.M., Meda, V., Naik, S.N. and Satya, S.** (2011) Sea buckthorn berries: A potential source of valuable nutrients for nutraceuticals and cosmoceuticals. *Food Research International*, 44(7), 1718-1727.
54. **Goupy, J. and Creighton, L.** (2006) Introduction aux plans d'expériences. Dunod, 3^{ème} éd., Paris, pp. 320.
55. **Gao, X., Ohlander, M., Jeppsson, N., Bjork, L. and Trajkovski, V.** (2000) Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1485-1490.
56. **Ruberto, G., Renda, A., Daquino, C., Amico, V., Spatafora, C., Tringali, C. and Tommasi, N.D.** (2007) Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chemistry*, 100(1), 203-210.
57. **Rösch, D., Bergmann, M., Knorr, D. and Kroh, L.W.** (2003) Structure–antioxidant efficiency relationships of phenolic compounds and their contribution to the antioxidant activity of sea buckthorn juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4233-4239.
58. **Robards, K. and Antolovich, M.** (1997) Analytical chemistry of fruit bioflavonoids A review. *Analyst*, 122(2), 11R-34R.
59. **De Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Gooijer, C. and Brinkman, U.A.T.** (2006) Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2), 31-63.
60. **Stalikas, C.D.** (2007) Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30(18), 3268-3295.
61. **Chen, C., Zhang, H., Xiao, W., Yong, Z.-P. and Bai, N.** (2007) High-performance liquid chromatographic fingerprint analysis for different origins of sea buckthorn berries. *Journal of Chromatography A*, 1154(1-2), 250-259.
62. **Biesaga, M.** (2011) Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1218(18), 2505-2512.

CHAPITRE 3

**DEVELOPEMENT DU COUPLAGE EN LIGNE CPC-
HPLC-UV-MS**

I. Introduction

Le processus général de caractérisation de nouvelles molécules bioactives à partir de matrices complexes, telles que les plantes, fait intervenir différentes étapes, dont les trois principales sont l'extraction, le fractionnement et l'identification des composés d'intérêt, toutes guidées par des analyses phytochimiques et des tests biologiques [1]. Le fractionnement, qui a pour but de simplifier un extrait brut en séparant les molécules en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, est l'une des étapes clés de ce processus car elle va permettre de réduire la complexité du matériel de départ et donc faciliter, à posteriori, l'identification des molécules actives. Quelque soit la méthodologie utilisée, il est nécessaire d'analyser les fractions collectées sur des systèmes chromatographiques (HPLC, HPTLC) couplés à des systèmes de détection (UV, MS, RMN) afin de regrouper les fractions similaires ou le cas échéant de déterminer la pureté et la nature des composés isolés. Cependant, cette étape de vérification fait intervenir des étapes supplémentaires (évaporation du solvant, concentration, dissolution dans solvant approprié, transfert...) souvent longues et fastidieuses. Ainsi, le développement de méthodologies rapides qui permettent l'analyse et l'identification simultanées des molécules séparées par fractionnement est actuellement l'un des défis majeurs actuels en phytochimie.

La Chromatographie à Contre Courant (CCC) est une technique de chromatographie préparative moderne qui a largement été employée pour le fractionnement et la purification de produits naturels d'origine végétale [2-5]. Les deux principales variantes: la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) et la High-Speed CCC (HSCCC) se différencient respectivement par un système d'équilibre de phases hydrostatique et hydrodynamique [6, 7]. Ces dernières années différentes stratégies multidimensionnelles permettant la séparation et l'identification rapide de molécules bioactives, ont été développées en utilisant la CPC ou l'HSCCC comme technique de fractionnement directement couplée à une technique d'identification ou à une autre technique de séparation (CCC ou HPLC). Parmi les deux variantes de la CCC, la CPC est celle sur laquelle le moins d'avancées ont été réalisées. Ainsi, seulement quelques travaux mentionnent le couplage entre la CPC et des méthodes spectroscopiques: le couplage à la spectrométrie de masse (CPC-MS) réalisé dans notre laboratoire [8, 9], et le couplage à la résonance magnétique nucléaire (CPC-RMN) [10] qui permettent d'obtenir immédiatement des informations structurales sur les molécules séparées. Ces couplages sont efficaces lorsque la séparation par CPC est performante et que l'extrait n'est pas trop complexe. Toutefois, si les molécules ne sont pas suffisamment séparées par la CPC il faut ajouter une autre

dimension de séparation. Dans le cas de l'argousier, l'extrait de baie obtenu est très riche en molécules, ainsi le fractionnement par CPC en une seule dimension ne suffit pas à séparer l'ensemble des molécules. Nous avons donc développé le couplage en ligne entre la CPC et l'HPLC-MS, dont aucune équipe de recherche ne s'était attachée jusqu'à présent. Celle-ci permet, simultanément la séparation par CPC d'extraits complexes en première dimension ainsi que l'analyse et l'identification des molécules séparées par HPLC-MS en seconde dimension. Nous verrons dans ce chapitre, en premier lieu, les résolutions des contraintes associées au couplage entre une méthode préparative, la CPC, et une méthode analytique, l'HPLC, puis la procédure sera appliquée au suivi du fractionnement des flavonoïdes des baies d'argousier.

II. La Chromatographie à Contre Courant (CCC) et ses développements actuels

Comme mentionné dans l'introduction, il existe deux appareils modernes de CCC: la CPC développée par Nunogaki [11] et l'HSCCC issue du travail d'Ito [12]. Les travaux présentés dans ce chapitre ont été réalisés avec un appareil de type CPC, par conséquent seuls le principe et le fonctionnement de la CPC seront décrits dans la suite de cette partie. En revanche, les différents couplages multidimensionnels développés ces dernières années autour de la CCC seront quant à eux, décrits en prenant en compte les appareillages de CPC et HSCCC.

II.1. Principe et fonctionnement de la CPC

La CPC est une technique de chromatographie liquide-liquide préparative qui utilise un système de solvant biphasique et pas de phase stationnaire solide [7, 13]. De ce fait, la séparation des molécules est basée sur leur différence de partage entre les deux phases liquides non miscibles. D'une manière simplifiée, une colonne CPC est constituée d'un empilement de disques en acier inoxydable dans lesquels sont gravées des cellules de partage reliées entre-elles par des capillaires (Fig. III-1).



Figure III-1: Photographie d'une colonne de 200 mL d'un appareil FastCPC (FCPC, Kromaton, Angers) et détail d'un des disques constitutifs de la colonne [14].

Quand la colonne est mise en rotation le champ de force centrifuge maintient la phase stationnaire liquide au sein de la colonne. La phase dite mobile, quant à elle, est pompée au travers de la phase stationnaire liquide. Des systèmes de solvants biphasiques variés peuvent être appliqués lorsque l'on travaille sur des échantillons naturels. En effet, des systèmes couvrant toute la gamme de polarité et constitués de deux à cinq solvants sont aujourd'hui largement utilisés pour le fractionnement d'extraits végétaux. Il peut être cité, le mélange de cinq solvants Hexane/Acétate d'Ethyle/Butanol/Méthanol/Eau (Hex/AE/BuOH/MeOH/H₂O) développé par Oka *et al.* [15], le système HEMWat constitué du mélange Hex/AE/MeOH/H₂O [15], le système Arizona, introduit par Margraff, et constitué du mélange Heptane/AE/MeOH/H₂O (Hept/AE/MeOH/H₂O) [16, 17], ou encore un système utilisant un mélange de méthyl *tert*-butyl ether/BuOH/acétonitrile/H₂O (MtBE/BuOH/ACN/H₂O) [6]. De plus lorsque les molécules d'intérêt sont des molécules ionisables (acides ou bases), il peut être ajouté des ions ou des molécules échangeuses d'ions dans chacune des deux phases du système biphasique [13, 18]. Ces systèmes génèrent donc deux phases, une légère et une dense, qui selon l'application recherchée, peuvent être utilisées comme phase stationnaire ou mobile.

En effet, l'utilisation d'appareil CPC permet d'inverser facilement le sens de pompage de la phase mobile via une vanne 4 voies située avant la colonne. Lorsque la phase stationnaire est la plus dense, la phase mobile est alors pompée en mode ascendant à contre sens du champ de force centrifuge. Au contraire, lorsque la phase stationnaire est la plus légère la phase mobile est introduite dans le sens du champ de force centrifuge, on parle alors de mode descendant (Fig. III-2).

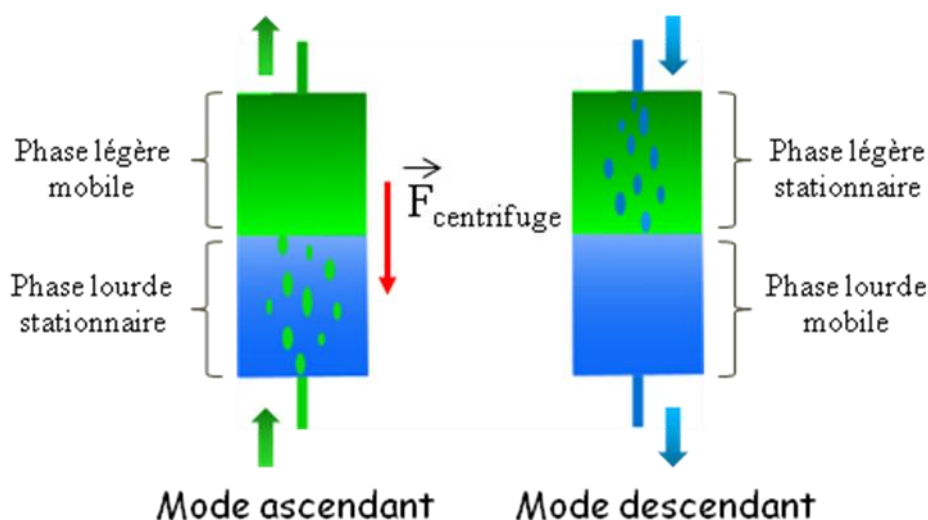


Figure III-2: Représentation schématique des modes ascendant et descendant en CPC, adapté d'après Toribio [14].

Grâce à l'utilisation d'une phase stationnaire liquide, la CPC présente plusieurs avantages qui sont appréciables lorsque l'on travaille sur des produits naturels:

- Pas d'adsorption irréversible
- Peu ou pas de dégradation des molécules
- Aucune perte d'échantillon
- Technique versatile (plusieurs modes de développement)
- Forte capacité de charge

Néanmoins, elle a pour principal défaut d'avoir une plus faible efficacité (nombre de plateau théorique) que l'HPLC préparative, et nécessite une bonne étanchéité du système pour éviter les fuites de solvants et d'échantillon lorsque la colonne est en rotation.

II.2. Etat de l'art sur le couplage avec la spectrométrie de masse (MS)

La CCC est une technique préparative généralement utilisée pour fractionner ou purifier des molécules d'origine végétale. Elle est souvent associée à une détection en ligne de type UV ou à diffusion de lumière (DEDL, Détecteur Évaporatif à Diffusion de Lumière), mais ceux-ci, sont deux modes de détection ne donnant pas ou peu d'information structurale sur les molécules séparées. En revanche, la maîtrise du couplage en ligne de la CCC et de la MS permet d'obtenir d'avantage d'informations structurales sur les molécules séparées et d'évaluer leur pureté. Le premier couplage entre un appareil CCC et la MS a eu lieu dès les années 1990 avec une source d'ionisation thermospray [19]. Depuis l'avènement des sources d'ionisation à pression atmosphérique, les couplages sont préférentiellement réalisés soit avec une source d'ionisation électrospray (Electrospray Ionisation, ESI), soit avec une source

d'ionisation chimique à pression atmosphérique (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation, APCI). Le tableau III-1 récapitule les principales publications se rapportant au couplage CCC-MS appliqué aux substances naturelles d'origine végétale. Il s'avère que ce type de couplage a également été employé pour la séparation de pesticides ou d'autres polluants organiques, mais ces applications n'ont pas été prises en compte dans le tableau III-1. D'après la littérature, peu de travaux employant la CPC ont été réalisés, d'où l'intérêt de continuer à valoriser cette technique en la couplant en ligne à des systèmes de séparation et de détection.

Tableau III-1: Exemples de couplages récents entre des appareils de HSCCC ou de CPC avec la MS pour la séparation et l'identification en ligne de molécules d'intérêt d'origine végétale.

Couplage	Source	Molécule	Organe	Matrice végétale	Références
IP-HSCCC/MS ⁿ	ESI	Betacyanine	Bractée	<i>Bougainvillea glabra</i> (Nyctaginaceae)	[20]
CPC/MS	ESI	Stilbénol	Racine	<i>Vitis riparia</i> × <i>Vitis berlandieri</i> (Vitaceae)	[21]
CPC/MS	ESI	Flavonol	Peau du fruit	<i>Malus sp</i> (Rosaceae)	[9]
CPC/MS	ESI	Xanthone	Péricarpe	<i>Garcinia mangostana</i> (Clusiaceae)	[8]
HSCCC/MS ⁿ	ESI	Coumarine	Racine	<i>Peucedanum praeruptorum</i> (Apiaceae)	[22]
HSCCC/MS ⁿ	ESI	Polyphenol	Fruit	<i>Hippophaë rhamnoides</i> (Elaeagnaceae)	[23]
HSCCC/MS ⁿ	ESI	Flavonoïde	Jus	<i>Hippophaë rhamnoides</i> (Elaeagnaceae)	[24]
HSCCC/MS	ESI et APCI	Flavonoïde	Graine	<i>Oroxylum indicum</i> (Bignoniaceae)	[25]
CCC/MS	Thermo spray	Lignane	Graine	<i>Schisandra rubiflora</i> (Schisandraceae)	[19]

MS, spectrométrie de masse (Mass Spectrometry) ; **ESI**, ionisation électrospray (Electrospray Ionisation) ; **APCI**, ionisation chimique à pression atmosphérique (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) ; **HSCCC**, chromatographie à contre courant haute vitesse (High Speed CounterCurrent Chromatography) ; **CPC**, chromatographie de partage centrifuge (Centrifugal Partition Chromatography) ; **IP**, appariement d'ion (Ion-pair).

II.3. Etat de l'art sur le couplage multidimensionnel impliquant la CCC dans la première dimension

Les séparations multidimensionnelles, qui permettent d'améliorer le pouvoir résolutif d'une simple chromatographie, sont devenues depuis quelques années une solution de choix pour résoudre des matrices complexes d'origine naturelle [26]. Le principe de la chromatographie multidimensionnelle est basé sur la combinaison de deux ou plusieurs techniques chromatographiques mettant en jeu différents mécanismes de rétention (phase normale, phase inverse, échange d'ions, exclusion, affinité) et pouvant être couplés à différents systèmes de détection [27, 28].

Parmi les différents couplages multidimensionnels résumés dans le tableau III-2, il peut être distingué deux approches:

- couplage en ligne entre appareils CCC
- couplage en ligne entre CCC et HPLC

La première approche qui consiste à connecter deux appareils CCC a été développée par Yang *et al.* [29] sous le nom de Multidimensional CCC (MDCCC). Cette technique multidimensionnelle, consiste au couplage de deux appareils CCC couplés au moyen d'une vanne 6 voies qui permet d'introduire l'effluent de la première colonne directement dans la deuxième colonne de façon discontinue (Fig. III.3). Outre la MDCCC, la dénomination two-dimensional CCC (2D-CCC) peut être également retrouvée dans la littérature. Dans ce cas, le couplage met en jeu deux colonnes de capacité volumique différente et trois vannes 3 voies pour envoyer l'effluent de la première dimension vers la deuxième dimension [30, 31] (Fig. III.3).

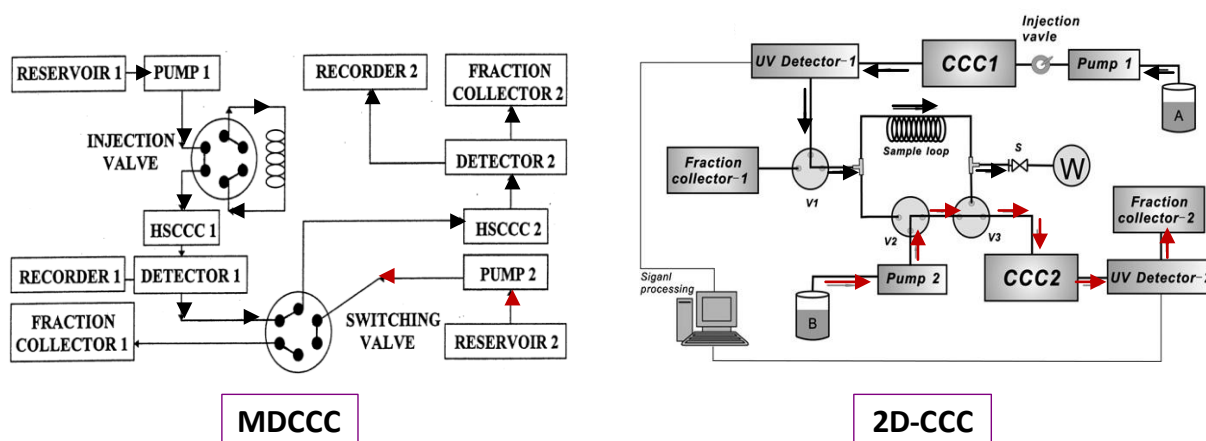


Figure III-3: Représentation schématique des deux approches couplant des appareils CCC entre eux: **MDCCC** [29] et **2D-CCC** [31]. La MDCCC utilise une vanne de couplage 6 voies (switching valve) et la 2D-CCC utilise un système de trois vannes 3 voies (représentées par la lettre v sur le schéma correspondant).

Ces deux variantes sont efficaces pour améliorer la résolution des pics chromatographiques lorsqu'ils sont co-élus dans la première colonne. Cependant, cette méthodologie est limitée en termes d'identification des molécules séparées et/ou purifiées et des étapes supplémentaires d'identification par HPLC/MS ou RMN sont généralement nécessaires après l'étape de fractionnement.

La deuxième approche consiste au couplage entre un appareil CCC et une HPLC. Ainsi, le système HSCCC-HPLC-DAD premièrement introduit par Zhou *et al.* [32] permet de déterminer en ligne la pureté relative de chaque fraction collectée et réduit donc le temps de « post-manipulation » intervenant après un fractionnement CCC. Le couplage est réalisé en utilisant un diviseur de flux passif (split) et une vanne 6 voies. A la sortie de la HSCCC, l'effluent est séparé en deux parties : une partie est collectée et l'autre est envoyée vers l'HPLC-DAD via la vanne 6 voies (Fig. III-4)

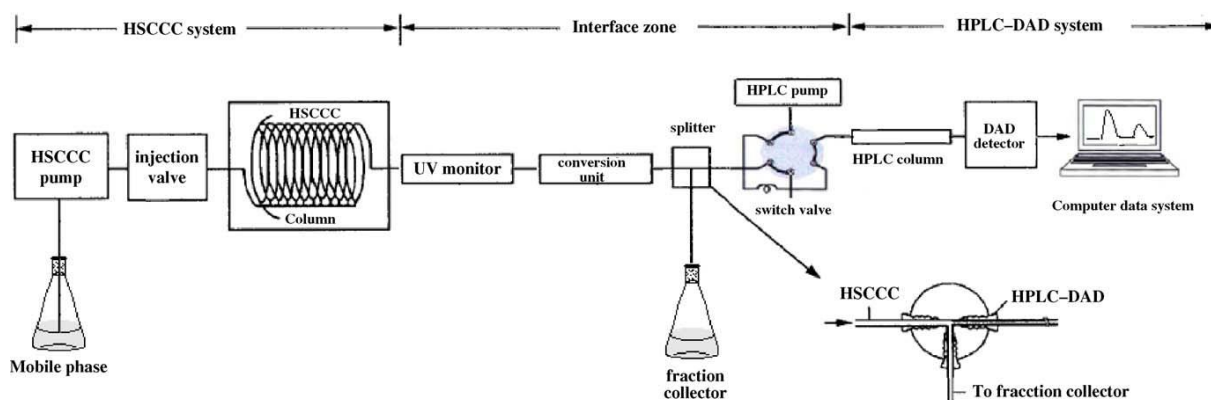


Figure III-4: Représentation schématique du couplage HSCCC-HPLC-DAD utilisant un diviseur de flux passif en forme de T et une vanne 6 voies [32].

Récemment, une autre variante, connue sous le nom de CCC-LC, a été développée [33, 34]. Elle consiste en l'utilisation combinée d'une HSCCC avec une LC utilisant une colonne analytique de résine ionique macroporeuse, et couplée via une vanne 6 voies. Cette approche est particulièrement intéressante lorsque le système de solvants CCC employé est constitué de sel. Le couplage CCC-LC permet dans ce cas de dessaler l'effluent CCC et de récupérer le produit pur après passage sur la colonne de résine macroporeuse.

Bien que quelques développements multidimensionnels aient été effectués en utilisant la HSCCC, aucun travail à ce jour n'avait été réalisé en utilisant la CPC, et qui plus est, en couplant un appareil de CPC avec une HPLC-MS. Le but de notre travail a donc été de développer le couplage CPC-HPLC-UV-MS qui permet simultanément de suivre le fractionnement et d'obtenir des informations structurales sur les molécules séparées.

Tableau III-2: Exemples de couplage en ligne entre des appareils CCC et/ou des appareils HPLC.

Couplage	1 ^{ère} dimension	2 ^{ème} dimension	Molécule	Organe	Matrice végétale	Références
MDCCC	Hex:AE:MeOH:H ₂ O (1:1:1:1)	MtBE:ACN:H ₂ O (2:2:3)	Anthraquinone	Pétiole	<i>Rheum officinale</i> (Polygonaceae)	[35]
MDCCC	Hex:CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O (3:22:17:8)	CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (4:3:2)	Tripdiolide	Extrait	<i>Tripterygium wilfordii</i> (Celastraceae)	[36]
MDCCC	Hex:AE:MeOH:H ₂ O (1:1:1:1)	Hex:AE:MeOH:H ₂ O (5:5:4.5:5.5)	Coumarine	Racine	<i>Angelica dahurica</i> (Apiaceae)	[37]
MDCCC	CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (4:3:2)	CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (4:3:2)	Flavonol	Extrait	<i>Ginkgo biloba</i> (Ginkgoaceae) <i>Hippophaë rhamnoides</i> (Elaeagnaceae)	[29]
2D-CCC	Hex:AE:MeOH:H ₂ O (1:5:1:5)	Hex:AE:MeOH:H ₂ O (3:5:3:5)	Diterpène	Extrait	<i>Rabdosia rubescens</i> (Lamiaceae)	[30]
2D-CCC	Hex:AE:MeOH:H ₂ O (5:5:7:3)	Hex:AE:MeOH:H ₂ O (5:5:6.5:3.5)	Flavonoïde	Extrait	<i>Artocarpus altilis</i> (Moraceae)	[31]
CCC×LC	AE: 8 % NaCl-H ₂ O (1:1) ou BuOH: 8 % NaCl-H ₂ O (1:1)	Résine macroporeuse HP-20 (200 mm×10 mm i.d.) ; Dessalage avec H ₂ O ; désorption H ₂ O:EtOH (5:95)	Arctiine	Fruit	<i>Arctium lappa</i> (Asteraceae)	[33]
CCC×LC	PrOH: 20 % NaCl-H ₂ O (1:1)	Résine macroporeuse HP-20 (400 mm×10 mm i.d.) ; Dessalage avec H ₂ O ; désorption H ₂ O:EtOH (5:95)	Flavonoïde	Extrait	<i>Medicago sativa</i> (Fabaceae)	[34]
HSCCC- HPLC-DAD	Hex:AE:MeOH:H ₂ O (6:5: 6:5)	Symmetry C ₁₈ (3.9 mm × 150 mm i.d., 5 µm) ; Phase mobile ACN: 1 % CH ₃ COOH (51:49)	Flavone	Extrait	<i>Taraxacum mongolicum</i> (Asteraceae)	[38]

HSCCC- HPLC-DAD	BuOH:H ₂ O (1:1)	C ₁₈ (4.6 mm × 200 mm i.d., 5 μm) ; Phase mobile MeOH:H ₂ O:CH ₃ COOH (34:66:1)	Xanthone	Extrait	<i>Anemarrhena asphodeloides</i> (Asparagaceae)	[39]
HSCCC- HPLC-DAD	EA:EtOH:H ₂ O (5:1:5)	Lichrospher C ₁₈ (6.0 mm×150mm i.d., 5 μm) ; Phase mobile ACN:H ₂ O:CH ₃ COOH (25:75:4)	Hyperoside	Extrait	<i>Hypericum perforatum</i> (Hypericaceae)	[32]

MDCCC, chromatographie à contre courant multidimensionnel ; **2D-CCC**, chromatographie à contre courant bidimensionnel ; **LC**, chromatographie liquide ; **HPLC**, chromatographie liquide haute performance ; **DAD**, détecteur à barrette de diode ; **HSCCC**, chromatographie à contre courant haute vitesse. H₂O, eau ; CH₃COOH, acide acétique ; CHCl₃, chloroforme ; CH₂Cl₂, dichlorométhane ; NaCl, chlorure de sodium ; ACN, acétonitrile ; AE, acétate d'éthyle ; BuOH, butanol ; EtOH, éthanol ; MeOH, méthanol ; Hex, hexane ; PrOH, isopropanol.

III. Description du montage réalisé pour la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)

Le système utilisé lors du développement des méthodes CPC est constitué d'éléments communs à d'autres types de chromatographie liquide préparative c'est-à-dire une pompe, un système d'injection, l'appareil CPC contenant une colonne de volume défini, des tubes de collecte, un système de détection et d'acquisition. La différence dans notre cas est l'utilisation d'un split actif en sortie de CPC permettant de prélever un volume constant de l'effluent CPC à des intervalles de temps très court et de le transférer grâce à une pompe auxiliaire vers le système de détection (Fig. III-5).

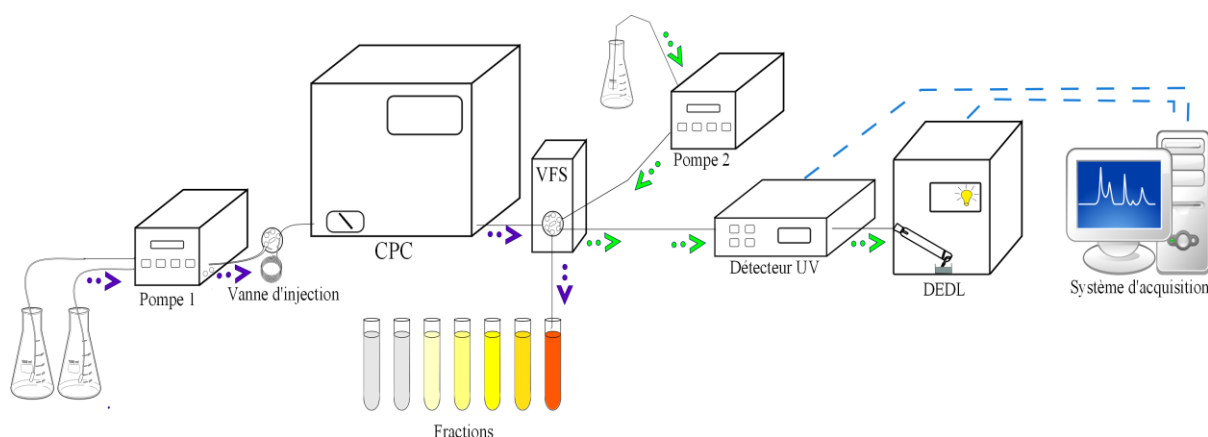


Figure III-5: Représentation schématique du système de fractionnement par CPC utilisé au laboratoire. Les flèches bleues représentent le circuit principal alors que les vertes représentent le circuit auxiliaire.

L'appareil utilisé au cours de cette thèse est un appareil semi-préparatif Fast CPC (FCPC) fourni par Kromaton (Angers, France) équipé d'une colonne de 200 mL. La colonne est constituée de vingt disques en acier inoxydable dans lesquels sont gravés 1320 cellules de partage d'une capacité de 0.1 mL chacune, et reliées entre elles par des capillaires [14].

Les différentes phases liquides ont été introduites dans la colonne CPC via une pompe isocratique préparative à double piston LC-8A de Shimadzu (Champs sur Marne, France) qui fournit sur toute la gamme de débit (de 1 à 150 ml/min) un flux d'éluant à faibles pulsations, stable et reproductible [40], ce qui est particulièrement adaptée aux techniques chromatographiques nécessitant un équilibre stable entre deux phases liquides telle que la CPC.

Le système d'injection utilisé est une vanne d'injection Upchurch basse pression à 6 voies sur laquelle a été montée une boucle d'injection de 10 mL. Le fractionnement a été réalisé à partir d'une quantité d'environ 1.5 g d'extrait concentré de baies d'argousier obtenu

par combinaison de trois extraits PSFME et solubilisé dans 8 mL du mélange biphasique choisi.

La détection en ligne a été réalisée à l'aide de deux détecteurs, un détecteur Merck L-4000 UV (Val de Fontenay, France), et un DEDL SEDEX 45 fourni par SEDERE (Alfortville, France). Ce dernier étant destructif il est nécessaire de diviser l'effluent en sortie de CPC afin de collecter les fractions en parallèle de la détection. Pour cela un split en mode actif a été introduit en utilisant une vanne de division de flux commercialisée par SEDERE (Alfortville, France) sous le nom de SEDEX Variable Flow Splitter (VFS) [41]. Dans nos différents travaux, la VFS a été programmée de telle sorte que 300 nL du flux sortant de la CPC (flux principal) soient transférés, toutes les 0.9 sec, vers le système de détection alimenté par un flux auxiliaire constitué de MeOH:H₂O (1:1) délivré à 0.3 mL/min par une pompe isocratique Shimadzu LC-10 AS (Champs sur Marne, France). La majeure partie du flux principal est ensuite collecté manuellement dans des tubes collecteurs ayant une capacité volumique de 10 mL.

Dans la procédure hors-ligne, chaque tube a ensuite été analysé par HPLC-DAD en utilisant la méthode générique décrite précédemment (Chapitre 2) dans le but de regrouper les fractions selon leur similarité en termes de profils chromatographiques. Les fractions ainsi constituées ont ensuite été évaporées à 40°C en utilisant un évaporateur rotatif (Buchi Labortechnik AG, Suisse) jusqu'à obtenir une fraction sèche. Tous les extraits et fractions ont été conservés à 2°C au réfrigérateur avant analyse et/ou utilisation pour des tests d'activité.

IV. Optimisation des conditions de séparation en première dimension – choix du système biphasique pour la CPC

La première étape lors du développement d'une méthodologie de séparation CPC est la sélection d'un système de solvants biphasiques qui doit fournir des valeurs de coefficients de distribution (K_D) appropriées à la séparation des molécules cibles, tout en fournissant un pourcentage de rétention de phase stationnaire et un temps d'analyse acceptables. Le K_D , qui définit le partage d'une molécule entre deux phases liquides, a été calculé selon la procédure

décrite par Ito [6] : $K_D = \frac{C_{sup}}{C_{inf}}$

où C_{sup} correspond à la concentration de l'analyte dans la phase supérieure et C_{inf} correspond à la concentration de l'analyte dans la phase inférieure.

De plus, le K_D est relié au volume de rétention selon l'équation suivante: $V_r = V_s + K_D \times V_M$ où V_r est le volume de rétention de l'analyte, V_s le volume de phase stationnaire dans la colonne et V_M le volume de phase mobile dans la colonne.

D'après cette relation, un composé possédant un K_D proche de 1 sera élué de la colonne au bout d'un volume de colonne. En revanche, des composés possédant des $K_D < 1$ (forte affinité avec la phase inférieure) ou des $K_D > 1$ (forte affinité pour la phase supérieure) seront respectivement élués avant et après un volume de colonne. En CPC, il est donc préférable que les valeurs de K_D soient comprises entre 0.5 et 1 afin que les molécules soient séparées en un volume de colonne sans consommation excessive de solvants. Cependant, un K_D inférieur à 2 peut être accepté car permettant toujours une séparation en un temps raisonnable. Les K_D des composés d'un échantillon doivent bien évidemment être différents pour pouvoir les séparer. Il y a donc nécessité de calculer les coefficients de partage des composés d'intérêts dans le système de solvants choisi afin de savoir si la séparation par CPC est réalisable.

Pour ce faire, nous avons testé différents systèmes (Tableau III-3) dont la majorité appartient à la gamme Arizona [16] et deux autres systèmes ayant précédemment été décrits pour la séparation de flavonoïdes [4]., et l'idéal est d'obtenir des valeurs différentes pour chaque composé cible pour qu'ils soient séparés. Dans notre étude nous avons calculé le K_D de six molécules caractéristiques de notre extrait et qui se répartissent sur une gamme de propriété physico-chimique large. D'après le tableau III-3, les deux systèmes les plus appropriés au fractionnement des flavonoïdes de l'argousier sont le système Arizona G et le système Chloroforme:MeOH:H₂O (CHCl₃:MeOH:H₂O). Néanmoins, ce dernier présente plusieurs inconvénients tels qu'un ratio de phases inégal et des émulsions longues à se séparer, pouvant mener à des pertes de phase stationnaire importantes pendant la séparation. De plus, l'utilisation du CHCl₃ est nocive pour la santé humaine et l'environnement. Pour ces raisons, le fractionnement de l'extrait brut obtenu via la procédure PSFME a été réalisé en utilisant le système de solvant biphasique G de la gamme ARIZONA constitué de quatre solvants Hept/AE/MeOH/H₂O (1:4:1:4, v/v).

Tableau III-3: Valeurs des K_D obtenues pour six molécules caractéristiques de l'extrait brut PSFME avec différents systèmes de solvants biphasiques.

Système de solvant	Pics	K_D
Arizona C (1:9:1:9)	1	0.3
	2	0.7
	3	1.0
	4	0.7
	5	n.c.
	6	n.c.
Arizona F (1:5:1:5)	1	0.3
	2	0.6
	3	0.7
	4	0.5
	5	1.6
	6	14.8
Arizona G (1:4:1:4)	1	2.1
	2	1.8
	3	1.6
	4	3.8
	5	0.7
	6	0.7
Arizona H (1:3:1:3)	1	0.4
	2	0.6
	3	0.8
	4	0.6
	5	5.0
	6	56.0
Arizona K (1:2:1:2)	1	0.2
	2	0.3
	3	0.3
	4	0.1
	5	0.2
	6	3.6
AE:EtOH:H ₂ O (4.5:1:4.5)	1	0.8
	2	1.1
	3	1.2
	4	0.9
	5	9.2
	6	52.1
CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (7:13:8)	1	1
	2	0.6
	3	0.1
	4	2.5
	5	0.4
	6	0.3

1, tr = 5.1 min ; **2**, tr = 5.4 min ; **3**, tr = 7.5 min ; **4**, tr = 30.5 min ; **5**, tr = 37.3 min ; **6**, tr = 38.4 min. Solvant du système Arizona Hept/AE/MeOH/H₂O (v/v). n.c. non calculable.

Les conditions opératoires ont été optimisées de telle sorte que le meilleur compromis entre rétention de la phase stationnaire, temps de séparation et perte de charge soit obtenu. La séparation a été réalisée à 1200 rpm et avec un débit de phase mobile de 2 mL/min. La phase aqueuse (phase inférieure dense) a été choisie comme phase stationnaire et par conséquent a été introduite en premier lieu dans la colonne. La phase organique (phase supérieure légère), employée comme phase mobile, a été introduite en mode ascendant dans un deuxième temps dans la colonne en respectant les conditions opératoires choisies. Dans nos conditions, l'équilibre entre les deux phases est caractérisé par une perte de charge de 38 bar et un pourcentage de rétention de phase stationnaire de 67.5%.

Comme mentionné dans la section I.1., le sens de pompage de la phase mobile peut être inversé à tout moment de l'expérience grâce à une vanne de commutation. Cette particularité de la CPC permet de travailler avec différents modes de développements dont les plus connus sont le mode d'élution-extrusion [42, 43] et le mode dual [44]. Le mode d'élution-extrusion consiste, après une période d'élution classique, à pousser avec de la phase stationnaire fraîche la phase mobile puis la phase stationnaire initiales hors de la colonne, et ce sans intervertir le sens d'introduction de la phase mobile. Cette méthode permet d'éliminer les deux phases liquides initialement présentes dans la colonne et de collecter l'ensemble des molécules de l'échantillon, tout en diminuant le volume de solvant normalement nécessaire à l'élution des molécules ayant une forte affinité pour la phase stationnaire [42, 43]. De même, le mode dual permet de réduire la consommation de solvants, mais son principe diffère par rapport au mode élution-extrusion. En effet après une période d'élution classique, la vanne de commutation est inversée ainsi que la nature de la phase mobile [44]. En pratique, la phase liquide initialement utilisée comme phase stationnaire devient la phase mobile, la phase mobile devenant stationnaire, ce qui permet d'éluer en sens inverse tous les composés d'intérêt dans un temps réduit. Ainsi, en élution-extrusion la séparation s'arrête à la fin de l'étape d'élution, alors que dans le mode dual la séparation des molécules continue jusqu'à leur sortie de la colonne.

Pour notre étude, le fractionnement CPC a été effectué selon le mode élution-extrusion car il est plus rapide que le mode dual et conserve la séparation déjà amorcée pendant l'élution. L'élution a été réalisée pendant 100 min en mode ascendant, puis l'extrusion a ensuite été réalisée en remplaçant le contenu de la colonne par de la phase aqueuse fraîche, toujours en mode ascendant, ce qui a pour conséquence de pousser la phase stationnaire et donc les molécules ayant une forte affinité pour celle-ci, vers la sortie de la colonne, tout en conservant la séparation déjà amorcée pendant l'élution.

La figure III-6 illustre la séparation de l'extrait brut PSFME de baies d'argousier obtenue par CPC-DEDL et dans les conditions décrites précédemment. Le chromatogramme montre deux pics majoritaires, le premier a été obtenu pendant la phase d'éluion alors que l'autre a été obtenu pendant la phase d'extrusion. Afin de mieux séparer les différents constituants des baies d'argousier il pourrait être décidé de changer de système biphasique, mais la grande différence de polarité des deux grands groupes de molécules rend difficile le choix d'un système approprié à leurs séparations en une seule étape. Ceci met en évidence que la CPC n'est pas assez résolutive pour séparer l'intégralité des flavonoïdes des baies d'argousier d'où l'intérêt d'une deuxième dimension séparative.

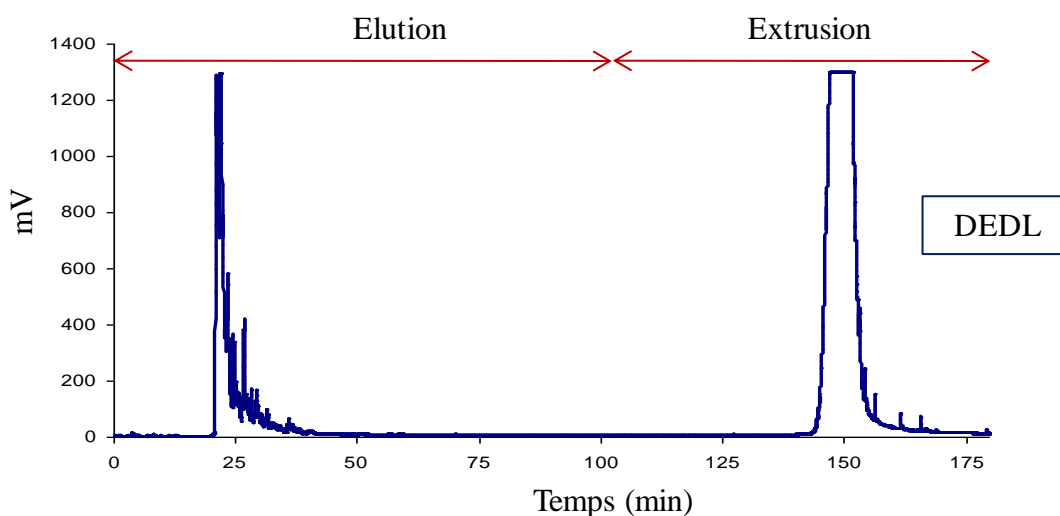


Figure III-6: Chromatogramme du fractionnement de l'extrait PSFME de baie d'argousier obtenu par CPC-DEDL avec le système de solvant Arizona G constitué du mélange Hept/AE/MeOH/H₂O (1/4/1/4, v/v). Vitesse de rotation de 1200 rpm, débit 2 mL/min.

V. Optimisation des conditions de séparation en deuxième dimension HPLC

Lorsqu'une séparation multidimensionnelle est adoptée deux stratégies peuvent être employées, le mode « coupe à cœur » du pic (heart-cutting), dans lequel seulement une fraction ou une partie de la première dimension est envoyée en deuxième dimension [27], et le mode total compréhensif, dans lequel l'intégralité des fractions de première dimension est envoyée et analysée en deuxième dimension [26, 28]. Une des premières contraintes à résoudre lorsqu'un système multidimensionnel de type compréhensif est construit est le temps d'analyse de la seconde dimension. En effet, si le système utilise un équipement qui transfère les fractions de la première vers la seconde dimension, la séparation en seconde dimension doit être achevée rapidement afin d'analyser chaque fraction de la première dimension sans qu'il y ait de risque de chevauchement entre l'analyse de la fraction n et de la fraction n+1 [27, 28].

Par conséquent, l'optimisation de la deuxième dimension HPLC a été une étape cruciale de ce travail. Le temps total d'analyse, rééquilibrage du système HPLC compris, doit être le plus court possible tout en conservant une résolution chromatographique satisfaisante, afin d'augmenter le nombre de séquence d'analyse possible des fractions en sortie CPC.

Ces dernières années, différentes stratégies ont été développées en chromatographie liquide pour augmenter le débit d'analyse, tout en maintenant des performances similaires aux méthodes classiques. Parmi ces approches, il peut être cité la chromatographie liquide haute température (High Temperature Liquid Chromatography, HTLC), l'utilisation d'équipement résistant à des pertes de charges élevées (UHPLC, Ultra High Pressure Liquid Chromatography), l'emploi de supports monolithiques ou de colonnes constituées de particules fines (sub 2 μm) ou superficiellement poreuses [45]. Néanmoins, seules deux solutions s'offrent à l'expérimentateur lorsque l'analyse rapide est réalisée avec des équipements HPLC conventionnels: l'utilisation de colonnes monolithiques ou de colonnes à particules de silice partiellement poreuses.

V.1. Supports dédiés à la chromatographie rapide et compatibles avec un appareillage HPLC classique

V.1.1. Les colonnes monolithiques

Les colonnes monolithiques sont des colonnes non particulaires, constituées d'un bloc continu d'un matériel poreux dont les pores sont interconnectés entre eux par des canaux [46]. Il existe deux grands types de colonnes monolithiques, celles à base de polymère organique et celles à base de silice.

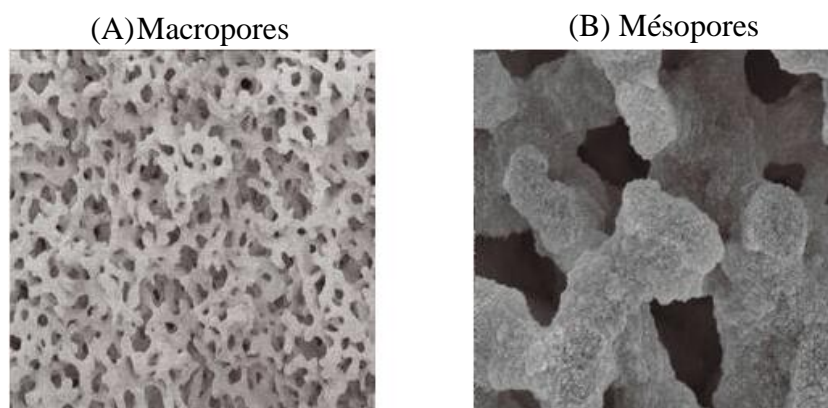


Figure III-7: Photographies obtenues au microscope électronique à balayage des macropores de diamètre de 2 μm (A) et des mésopores de diamètre de 13 nm (B) d'une colonne Chromolith (Merck, Darmstadt, Allemagne) [47].

La structure monolithique est souvent caractérisée par un double réseau poreux constitué de macropores (de l'ordre du μm) induisant une faible résistance à l'écoulement et les mésopores (2 à 50 nm) offrant une vaste surface d'adsorption des analytes sur la phase stationnaire [48]. La figure III-7 présente un exemple de structure bimodale des pores d'une colonne Chromolith (Merck, Darmstadt, Allemagne), utilisée lors de cette thèse, et qui est caractérisée par des macropores de 2 μm de diamètre et des mésopores avec un diamètre moyen d'environ 13 nm [47]. Les pores sont interconnectés entre eux dans les canaux par lesquels la phase mobile peut s'écouler. Le nombre, la distribution de la taille des pores et le rapport macropores/mésopores définit la perméabilité de la colonne, et donc la pression à laquelle la phase mobile peut être pompée en tête de colonne [46]. Cet ensemble structural poreux et fortement perméable favorise les transferts de masse rapides entre les solutés, la phase stationnaire et la phase mobile.

L'utilisation des monolithes en chromatographie liquide offre de nombreux avantages par rapport à des colonnes particulières tels que:

- l'utilisation de débit de phase mobile élevé
- la diminution de la perte de charge en tête de colonne
- la réduction du temps d'analyse et du temps d'équilibrage
- l'amélioration de l'efficacité

Ainsi, de par la faible perte de charge engendrée et une résolution non détériorée, les colonnes monolithiques peuvent être utilisées à des débits élevés sur des systèmes HPLC classiques et sont donc très bien adaptées aux analyses rapides et à la réalisation d'un couplage multidimensionnel.

V.1.2. Les colonnes « Fused core »

Les colonnes de type « Fused-core » sont des colonnes particulières constituées de particules de silice superficiellement poreuses de 2,7 μm de diamètre (Fig. III-8). Elles présentent la particularité de posséder un noyau dur solide non poreux de 1,7 μm de diamètre et un enrobage extérieur poreux de 0,5 μm de diamètre [49]. Les premiers développements remontent aux années 1990 [50], mais ce n'est que récemment, que cette technologie a été commercialisée, notamment par Advanced Materials Technology (Wilmington, Delaware, USA) avec les colonnes Halo .

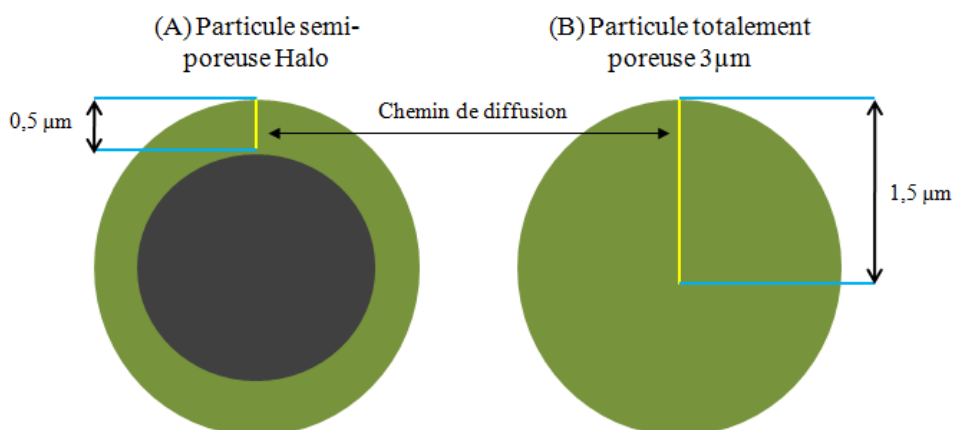


Figure III-8: Représentation schématique du chemin de diffusion sur une particule « fused core » Halo (A) et sur une particule ordinaire totalement poreuse d'un diamètre de 3 µm (B), adaptée de [51].

Grâce à un chemin de diffusion plus court par rapport à une particule totalement poreuse, l'utilisation de particules « Fused-core » diminue la diffusion axiale des solutés et minimise par conséquent l'élargissement des pics. De plus, l'utilisation de ce type de support induit une vitesse d'analyse et un temps d'équilibrage très rapide car le chemin de diffusion des molécules dans la phase stationnaire est réduit [45]. Tout comme les colonnes monolithiques, les colonnes « Fused-core » sont compatibles avec des systèmes HPLC conventionnels, et leurs performances permettent de les utiliser dans le cas de développement de séparation rapide. Contrairement aux colonnes monolithiques, l'utilisation de ce type de colonnes est limitée par une forte perte de charge nécessitant de travailler à de faible débit ou avec des colonnes courtes (50 mm) lorsque des systèmes HPLC conventionnels sont employés. Dans notre cas nous avons choisi de travailler avec une colonne de 50 mm afin de diminuer le temps d'analyse.

Le potentiel des deux colonnes adaptées aux analyses rapides a donc été évalué et comparé, et les résultats ont été discutés dans la partie suivante. Dans ce but, différents paramètres (nature du modificateur organique, débit et température d'analyse) pouvant influencer la séparation des molécules d'intérêt ont été optimisés.

V.2. Choix du modificateur organique

La figure III-9 montre un chromatogramme type des flavonoïdes de baie d'argousier lorsqu'ils sont séparés avec une colonne conventionnelle Alltima C18 (150 × 4.6mm ID, 5 μm) . Il peut être observé que les flavonoïdes couvrent une large gamme de polarité, et que 45 min sont nécessaires pour séparer l'ensemble de ces molécules.

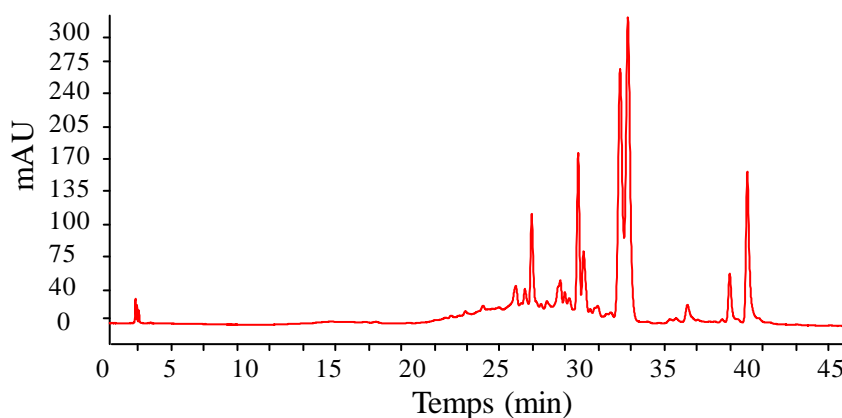


Figure III-9: Chromatogramme HPLC-UV d'un extrait de baies d'argousier obtenu par PSFME. Colonne Alltima C18 (150 × 4.6mm ID, 5 μm) ; gradient constitué d'H₂O ultra-pure et de MeOH tous les deux acidifiés avec 1% CH₃COOH ; débit de 1 mL/min ; injection de 20 μL ; λ = 366 nm ; T = 25°C.

Dans le but d'obtenir une séparation satisfaisante et plus rapide des flavonoïdes couvrant une large gamme de polarité, la deuxième dimension HPLC a été effectuée en gradient d'éluion linéaire. De ce fait, la phase mobile HPLC a été testée avec deux solvants organiques: le méthanol (MeOH) et l'acétonitrile (ACN). La Figure III-10 illustre les chromatogrammes obtenus sur les deux supports testés avec les deux solvants organiques et dans les mêmes conditions de gradient. Il peut être observé sur les deux phases stationnaires une diminution de la durée totale d'analyse sans perte de résolution majeure lorsque l'acétonitrile est employé.

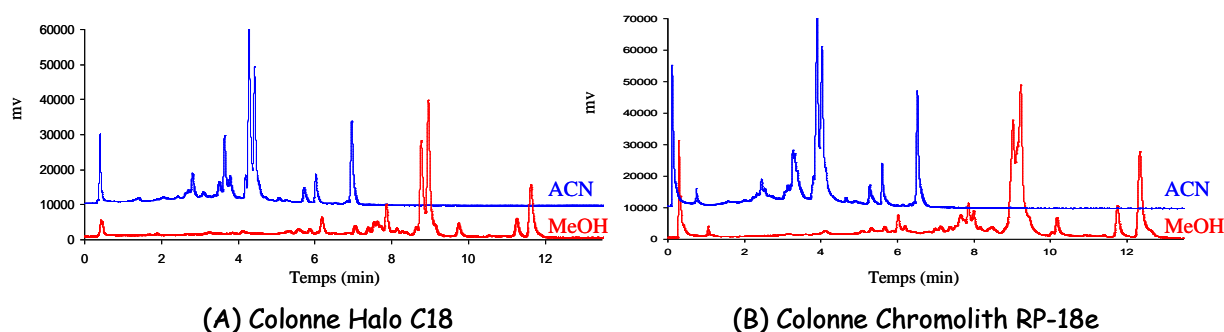


Figure III-10: Chromatogrammes montrant l'effet du modificateur organique sur la séparation des flavonoïdes de l'argousier obtenus à 366 nm (A) sur la colonne « Fused core » Halo C18 (50 × 4.6 mm ID, 2.7 μm) et (B) sur la colonne monolithique Chromolith-RP18e (100 × 4.6 mm ID, 2 μm). Gradient linéaire constitué d'H₂O ultra-pure et d'un modificateur organique (MeOH ou ACN) tous les deux acidifiés avec 1% CH₃COOH ; débit de 2 mL/min ; injection de 20 μL ; λ = 366 nm ; T = 35°C.

De plus, l'acétonitrile induit une perte de charge inférieure et une durée d'analyse plus courte par rapport aux valeurs observées avec le méthanol (Tableau III-4) en raison de sa meilleure force d'élution et de sa plus faible viscosité. Ainsi, l'acétonitrile a été sélectionné pour poursuivre le développement du couplage.

V.3. Choix de la température de la colonne

L'effet de la température a été exploré entre 30 et 45°C pour ne pas dépasser les conditions de température recommandées par les fabricants de colonnes chromatographiques. Les résultats obtenus avec les deux colonnes montrent qu'une augmentation de la température de la colonne diminue à la fois la durée d'analyse et la perte de charge (Tableau III-4). Cela est dû à la diminution de la viscosité de l'éluant à température élevée ce qui permet une diminution de la perte de charge. Pour la suite de l'étude la température de la colonne a été fixée à 40°C.

Tableau III-4: Durée totale d'analyse (T) et perte de charge (P) obtenues à différentes températures et avec deux modificateurs organiques pour la colonne Halo C18 (50 × 4.6 mm ID, 2.7 μm) et la colonne Chromolith-RP18e (100 × 4.6 mm ID, 2 μm) utilisées à 2 mL/min.

	Colonne Halo C18 (50 × 4.6 mm ID, 2.7 μm)				Colonne Chromolith-RP18e (100 × 4.6 mm ID, 2 μm)			
	MeOH		ACN		MeOH		ACN	
Température	T (min)	ΔP (bar)	T (min)	ΔP (bar)	T (min)	ΔP (bar)	T (min)	ΔP (bar)
30°C	13,0	245	6,8	230	14,1	78	8,2	73
35°C	12,3	239	6,7	217	13,7	75	8,1	71
40°C	11,9	234	6,6	213	13,3	74	8,0	69
45°C	11,6	224	6,6	212	13,1	73	8,0	69

V.4. Optimisation du débit de la phase mobile

L'effet du débit de l'éluant a été étudié entre 1 et 2 mL/min pour la colonne Halo et entre 1 et 3 mL/min pour la colonne Chromolith. Les conditions optimales ont été respectivement trouvées pour un débit de 2 et 3 mL/min pour la colonne Halo et la colonne Chromolith. Il peut être observé qu'avec un débit inférieur (2 mL/min), l'analyse réalisée sur la colonne Halo a une durée plus courte avec une efficacité similaire par rapport à la colonne Chromolith (3 mL/min) (Fig. III-11). L'utilisation d'un débit de phase mobile inférieur à un double avantage: une consommation de solvant moindre et une augmentation de la sensibilité grâce à une plus faible dilution de l'échantillon dans la phase mobile.

Par ailleurs, lors d'un gradient d'élution, un autre paramètre à prendre en considération est le temps de rééquilibrage entre deux analyses successives. Celui-ci a été déterminé comme suffisant pour obtenir des analyses répétables avec un temps de 30 s et 60 s respectivement pour la colonne Halo et la colonne Chromolith. Dans les conditions chromatographiques optimisées, le temps total d'analyse (rééquilibrage compris) est plus court avec la colonne Halo (7,3 min) qu'avec la colonne Chromolith (8,2 min). Cette différence peut s'expliquer par le chemin de diffusion réduit de la colonne Halo à base de silice superficiellement poreuse mais aussi par la longueur des colonnes choisies, 50 mm pour la Halo et 100 mm pour la Chromolith (100 mm).

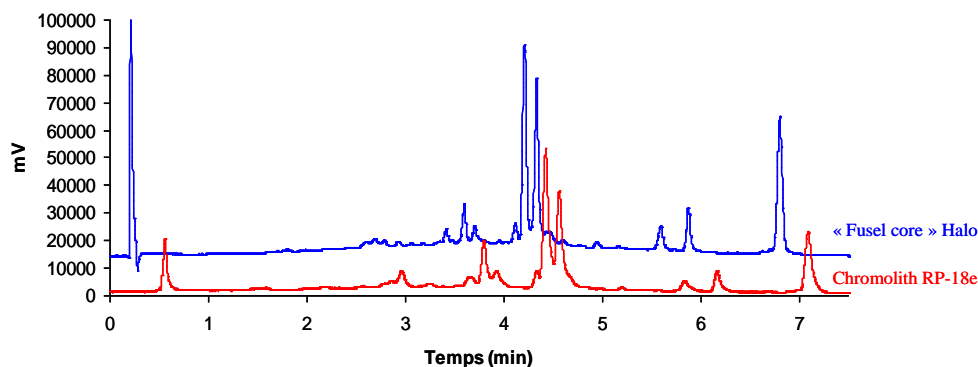


Figure III-11: Chromatogrammes de l'extrait PSFME obtenus à 366 nm sur la colonne « Fused core » Halo C18 (50 × 4.6 mm ID, 2.7 μm) à 2 mL/min et sur la colonne monolithique Chromolith-RP18e (100 × 4.6 mm ID, 2 μm) à 3 mL/min. Gradient linéaire constitué d'H₂O ultra-pure et d'ACN tous les deux acidifiés avec 1% CH₃COOH ; injection de 20 μL ; λ = 366 nm ; T = 40°C.

De par ces avantages (analyse plus rapide, meilleure sensibilité et consommation réduite de solvant) la colonne "Fused core" Halo a été choisie pour réaliser le couplage entre la CPC et l'HPLC pour le fractionnement des flavonoïdes des baies d'argousier.

V.5. Etude de la nature du solvant d'injection, du volume injecté et de la quantité injectée sur la séparation HPLC de deuxième dimension

Dans une procédure de chromatographie liquide multidimensionnelle, le solvant d'injection de la deuxième dimension correspond à la composition de la phase mobile de la première dimension au moment du transfert de la première vers la deuxième dimension.

Comme mentionné dans la partie IV de ce chapitre, le mode élution-extrusion a été privilégié pour la séparation CPC. Par conséquent, le fractionnement CPC en première dimension engendre durant la séparation deux compositions différentes d'effluent: une associée à son fonctionnement en mode élution et l'autre associée au mode extrusion. Ainsi, le solvant d'injection de la deuxième dimension HPLC sera modifié selon l'état d'avancement du fractionnement. En utilisant le système Arizona G (Hept/AE/MeOH/H₂O, 1/4/1/4) en mode ascendant, l'élution induit un solvant d'injection apolaire majoritairement constitué d'heptane et d'acétate d'éthyle (Hept/AE), alors que l'extrusion induit un solvant d'injection polaire majoritairement constituée de méthanol et d'eau (MeOH/H₂O). Dès lors, sachant que la nature de la phase mobile de première dimension peut varier d'un mélange Hept/AE à un mélange MeOH/H₂O, et que la phase mobile HPLC de deuxième dimension est un gradient linéaire utilisant un mélange d'H₂O et d'ACN dont les proportions en début du gradient sont respectivement de 95:5 (v/v), il a été nécessaire de vérifier la faisabilité du couplage en étudiant différents paramètres tels que l'effet du solvant d'injection, du volume injecté et de la quantité injectée sur la séparation HPLC de deuxième dimension.

V.5.1. Compatibilité des phases mobiles entre la première et la deuxième dimension

L'injection de la phase organique supérieure (Hept/AE) de la CPC dans la phase mobile HPLC de deuxième dimension de nature hydrophile (H₂O:ACN 95:5 en débit de gradient) peut entraîner la formation d'émulsions ou de mélanges bi-phasiques au sein même de la colonne HPLC pouvant ainsi dégrader la séparation chromatographique. Par ailleurs, un mélange de phases mobiles de viscosité différente peut provoquer une instabilité des bandes chromatographiques (déformation et dédoublement des pics) appelée digitation visqueuse [52].

Afin d'étudier l'effet du solvant d'injection sur la séparation HPLC de seconde dimension, un mélange de cinq flavonols aglycones et glycosylés (rutine (**1**) isorhamnétine-3-*O*-rutoside (**2**), isorhamnétine-3-*O*-glucoside (**3**), quercétine (**4**) et isorhamnétine (**5**)) connus pour être présents dans les baies d'argousier, comme rapporté dans le chapitre 1

(partie II.2.1.3.1.), ont été injectés dans le système HPLC optimisé. La figure III-12 illustre les résultats obtenus sur la colonne « Fused core » Halo après injection du mélange des cinq standards (20 μL) soit dilué dans la phase aqueuse inférieure (MeOH/H₂O) soit dilué dans la phase organique supérieure (Hept/AE). Lorsque le mélange de standards a été injecté dans la phase aqueuse inférieure, aucune déformation des pics chromatographiques n'a été observée ce qui se traduit par une séparation correcte. A contrario, l'injection d'une solution diluée dans la phase organique induit une déformation des pics chromatographiques correspondant aux flavonols glycosylés (**1**, **2** et **3**), avec l'apparition de digitation visqueuse. Cependant, ce phénomène n'est pas observé pour les molécules hydrophobes aglycones (**4** et **5**) pour lesquelles l'effet du solvant d'injection organique se limite à un élargissement des bandes chromatographiques.

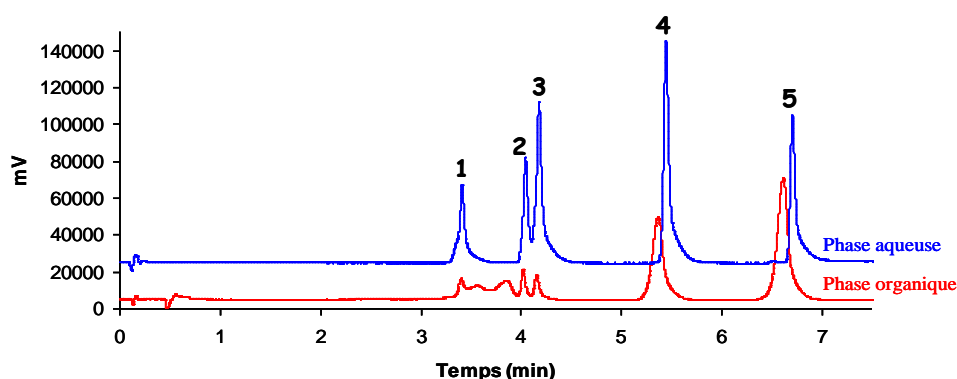


Figure III-12: Chromatogrammes d'un mélange de cinq flavonols (rutine (**1**) isorhamnétine-3-*O*-rutinoside (**2**), isorhamnétine-3-*O*-glucoside (**3**), quercétine (**4**) et isorhamnétine (**5**)) obtenus à 366 nm sur la colonne « Fused core » Halo C18 (50 \times 4.6 mm ID, 2.7 μm) à 2 mL/min en modifiant la nature du solvant d'injection: phase aqueuse (MeOH/H₂O), phase organique (Hept/AE). Gradient linéaire constitué d'H₂O ultra-pure et d'ACN tous les deux acidifiés avec 1% CH₃COOH ; débit de 2 mL/min ; injection de 20 μL ; λ = 366 nm ; T = 40°C.

Ces résultats montrent qu'il est possible de séparer correctement par HPLC des flavonoïdes aglycones (**4** et **5**) préalablement dilué dans un solvant d'injection organique et hydrophobe (Hept/AE), dans des conditions de gradient hydrophile (H₂O:ACN). Ainsi, le couplage entre la CPC et l'HPLC est réalisable dans nos conditions, car les propriétés physico-chimiques des flavonols aglycones (**4** et **5**) font qu'ils seront élués pendant la phase CPC d'éluion (phase mobile Hept/AE) alors que les flavonols glycosylés (**1**, **2** et **3**) plus polaires seront élués pendant la phase CPC d'extrusion (phase mobile MeOH/H₂O). L'effet du solvant d'injection sera ainsi minimisé pour la deuxième dimension.

La CPC et l'HPLC sont des techniques différentes à bien des égards et notamment sur la capacité de charge de la colonne: la CPC est une technique préparative compatible avec une quantité injectée de l'ordre du g, alors que l'HPLC est une technique analytique compatible avec une quantité injectée de l'ordre du μg . Dans ces conditions, les solutés en sortie de CPC peuvent être en concentration trop importante et entraîner une surcharge préjudiciable du système HPLC lors de leur injection. Il est donc important, en vue du couplage, d'étudier l'effet de quantités croissantes de solutés injectés dans le système HPLC.

La quantité injectée est dépendante de la concentration et du volume injectés. Dans les deux sous-parties suivantes nous allons nous attacher à étudier l'effet sur la séparation HPLC de seconde dimension du volume à concentration constante et l'effet de la concentration à un volume constant afin de définir les meilleures conditions de charge.

V.5.2. Optimisation du volume d'injection

Dans le but de déterminer le volume maximal transférable de la première vers la deuxième dimension, différents volumes d'injection ont été testés (20, 50, 70 et 100 μL) à une concentration constante de 10 mg/mL. L'injection d'un volume de 20 μL de l'extrait brut dissous dans une solution MeOH:H₂O (1:1) n'induit pas de déformation chromatographique, mais dès 50 μL il peut être observé une résolution inférieure, des élargissements de pics et un temps d'analyse augmenté (Fig. III-13). En conséquence, l'injection dans la deuxième dimension d'un volume de 20 μL a été définie comme le volume approprié pour réaliser le couplage CPC-HPLC.

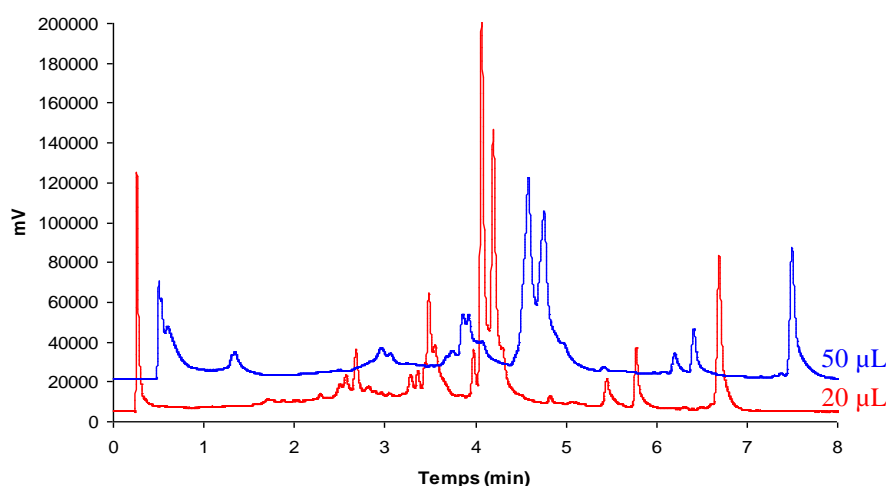


Figure III-13: Chromatogrammes de l'extrait PSFME obtenus à 366 nm sur la colonne « Fused core » Halo C18 (50 × 4.6 mm ID, 2.7 μm) à 2 mL/min en variant le volume d'injection. Température 40°C. Gradient linéaire constitué d'H₂O ultra-pure et d'ACN tous les deux acidifiés avec 1% CH₃COOH ; débit de 2 mL/min ; injection de 20 μL ; $\lambda = 366 \text{ nm}$; T = 40°C.

V.5.3. Effet de la concentration injectée

La quantité maximale qui peut être transférée entre les deux systèmes chromatographiques a été évaluée ensuite en injectant l'extrait PSFME à différentes concentrations dans la deuxième dimension HPLC (1, 5, 10, 50 et 100 mg/mL). La figure III-14 montre que des injections d'une quantité croissante de l'extrait brut à volume constant (20 μ L) n'affectent pas la séparation chromatographique.

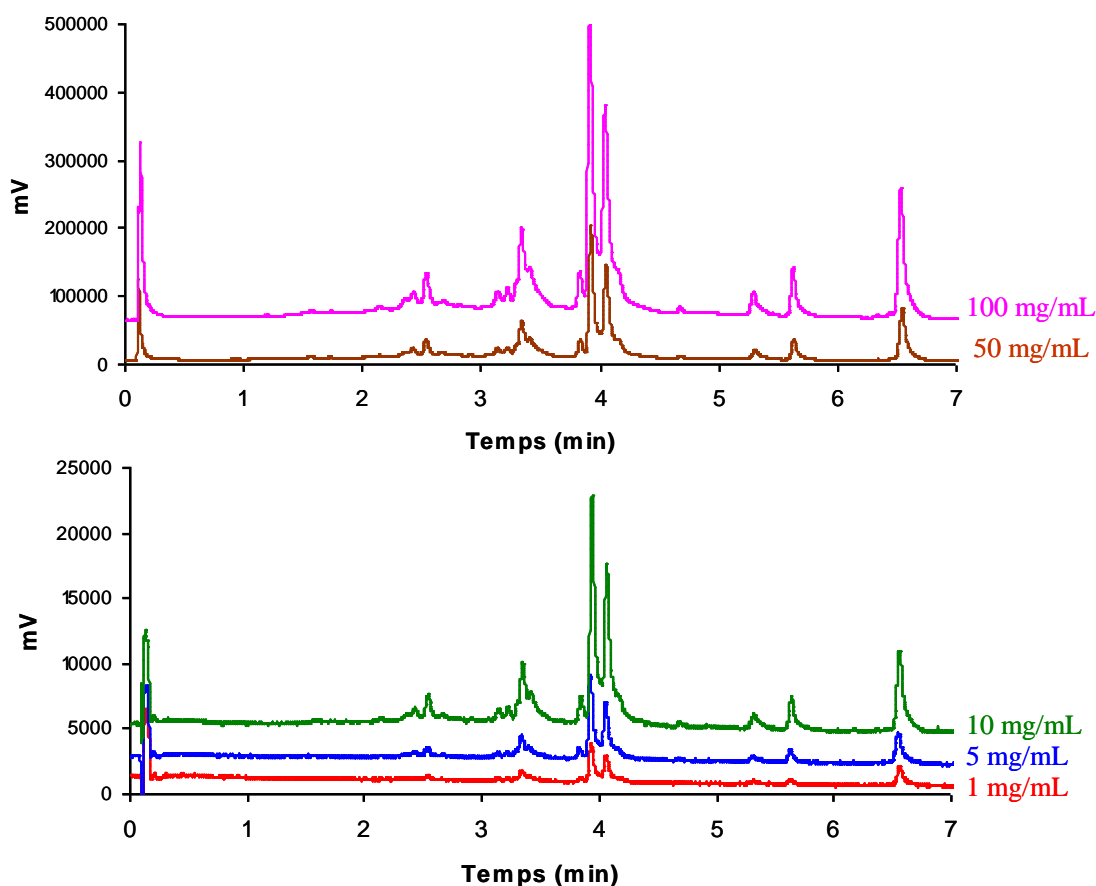


Figure III-14: Chromatogrammes de l'extrait PSFME obtenus à 366 nm sur la colonne « Fused core » Halo C18 (50 \times 4.6 mm ID, 2.7 μ m) à 2 mL/min en variant la quantité injectée. Gradient linéaire constitué d'H₂O ultra-pure et d'ACN tous les deux acidifiés avec 1% CH₃COOH ; débit de 2 mL/min ; injection de 20 μ L ; λ = 366 nm ; T = 40°C.

En résumé et au vu de ces résultats, le volume d'injection apparaît comme le facteur limitant alors que l'injection de mélanges concentrés peut être réalisée sans risque de déformation chromatographique notable. Les phénomènes décrits tels que la digitation visqueuse ou l'élargissement de pics, ont donc été limités par l'injection de petit volume (20 μ L) d'effluent CPC vers la deuxième dimension HPLC, et ce, quelle que soit la quantité injectée. De plus, il a pu être démontré que l'injection de solution concentrée, comme il est fréquent en sortie de CPC, dans la deuxième dimension HPLC était possible sans effet néfaste sur la séparation. Il reste cependant que la nature différente du solvant d'injection et de la

phase mobile HPLC peut mener à la déformation de pic dans la deuxième dimension. Afin de minimiser ou d'éviter ce phénomène, l'injection des molécules les plus polaires (flavonols glycosylés) sera réalisée en phase aqueuse durant l'extrusion.

VI. Réalisation du couplage multidimensionnel CPC-HPLC-UV-DEDL

La CPC et l'HPLC sont deux techniques qui présentent des différences au niveau de leurs conditions d'utilisation. La CPC est une chromatographie préparative qui fonctionne à des valeurs de pression inférieures à 55 bar et à des débits de phase mobile pouvant être supérieurs à 10 mL/min. En revanche, l'HPLC est une méthode analytique adaptée à des hautes pressions (400 bar) et à des débits de l'ordre de 0,5 à 3 mL/min. Dans nos conditions optimales, la pression à l'équilibre de la CPC est de 38 bar et celle de l'HPLC est de 184 bar avec un même débit de phase mobile (2 mL/min). Il est facile d'imaginer que la construction, dans ces conditions, d'un système multidimensionnel peut conduire à des problèmes de surpression, de fuites et/ou d'étanchéité. Les précédents travaux de couplage en ligne, tels que la MDCCC [29], la 2D-CCC [30, 31] ou la CCC-HPLC [32, 39], ont été réalisés soit avec une vanne 6 voies ou une combinaison de vannes 3 voies. En se basant sur ces travaux et avec le matériel disponible au laboratoire, le couplage en ligne entre la CPC et l'HPLC a donc été réalisé en utilisant une vanne Valco® six voies (Valco Instruments, Houston, USA), permettant la permutation entre la première dimension CPC et la deuxième dimension HPLC et une séparation physique entre ces deux systèmes chromatographiques (Fig. III-15).

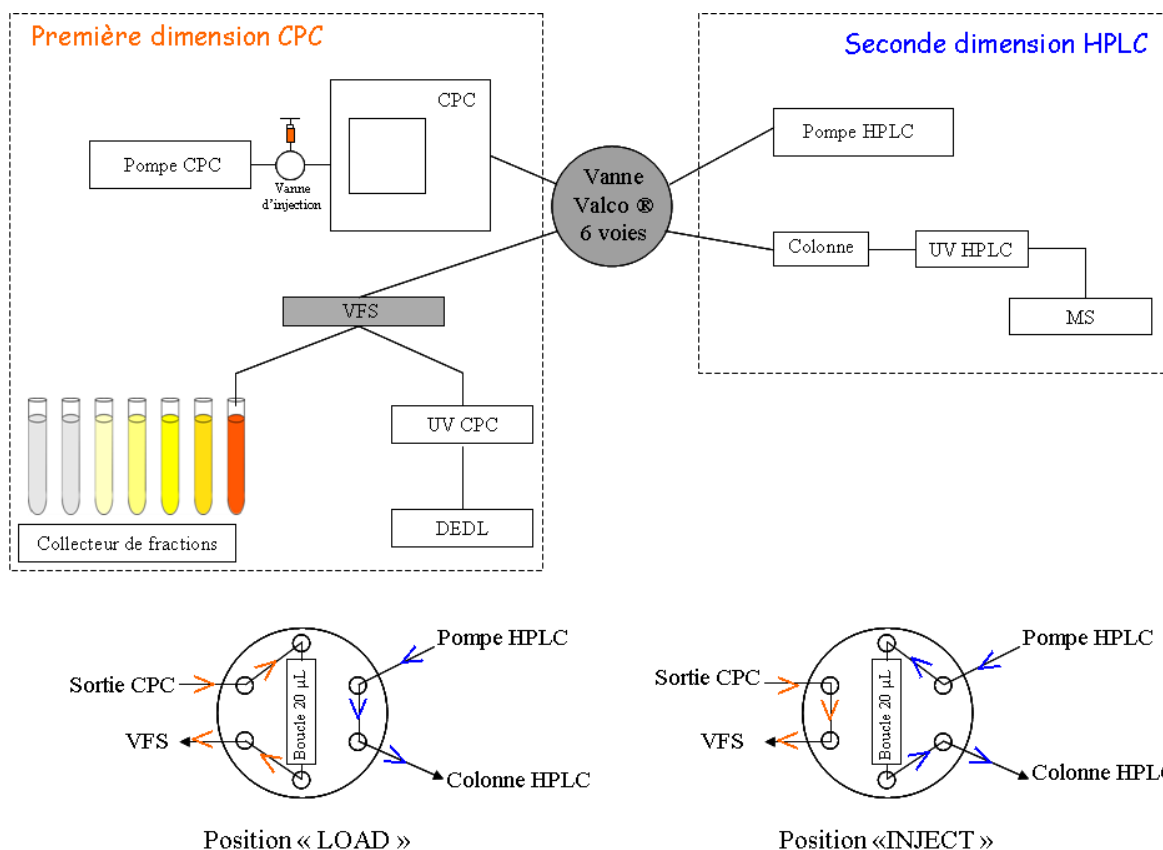


Figure III-15: Représentation schématique du couplage entre la CPC et l’HPLC avec focalisation sur la vanne Valco® en position « LOAD » et « INJECT ».

Lorsque la vanne Valco® est en position de charge « LOAD » l’effluent en sortie de la CPC passe par la boucle d’injection puis par la vanne de division VFS qui permet de prélever et diriger 300 nL du flux vers un système de détection (UV, DEDL), l’autre partie du flux étant collectée. En position « INJECT », l’effluent CPC présent à cet instant dans la boucle d’injection est injecté dans la deuxième dimension HPLC, puis soumis soit à une simple détection (UV) soit à une double détection (UV-MS) permettant une analyse instantanée du fractionnement et le cas échéant l’obtention d’informations structurales sur les molécules séparées. Le reste de l’effluent CPC étant toujours collecté.

VII. Application du couplage CPC-HPLC-UV-DEDL au fractionnement des flavonoïdes des baies d'argousier

La séparation multidimensionnelle a été effectuée à partir de l'extrait brut de baies d'argousier obtenu avec la méthode d'extraction PSFME présentée dans le chapitre 2. Les chromatogrammes de première dimension CPC obtenus par une double détection UV-DEDL montrent uniquement deux pics majoritaires (Fig. III-16).

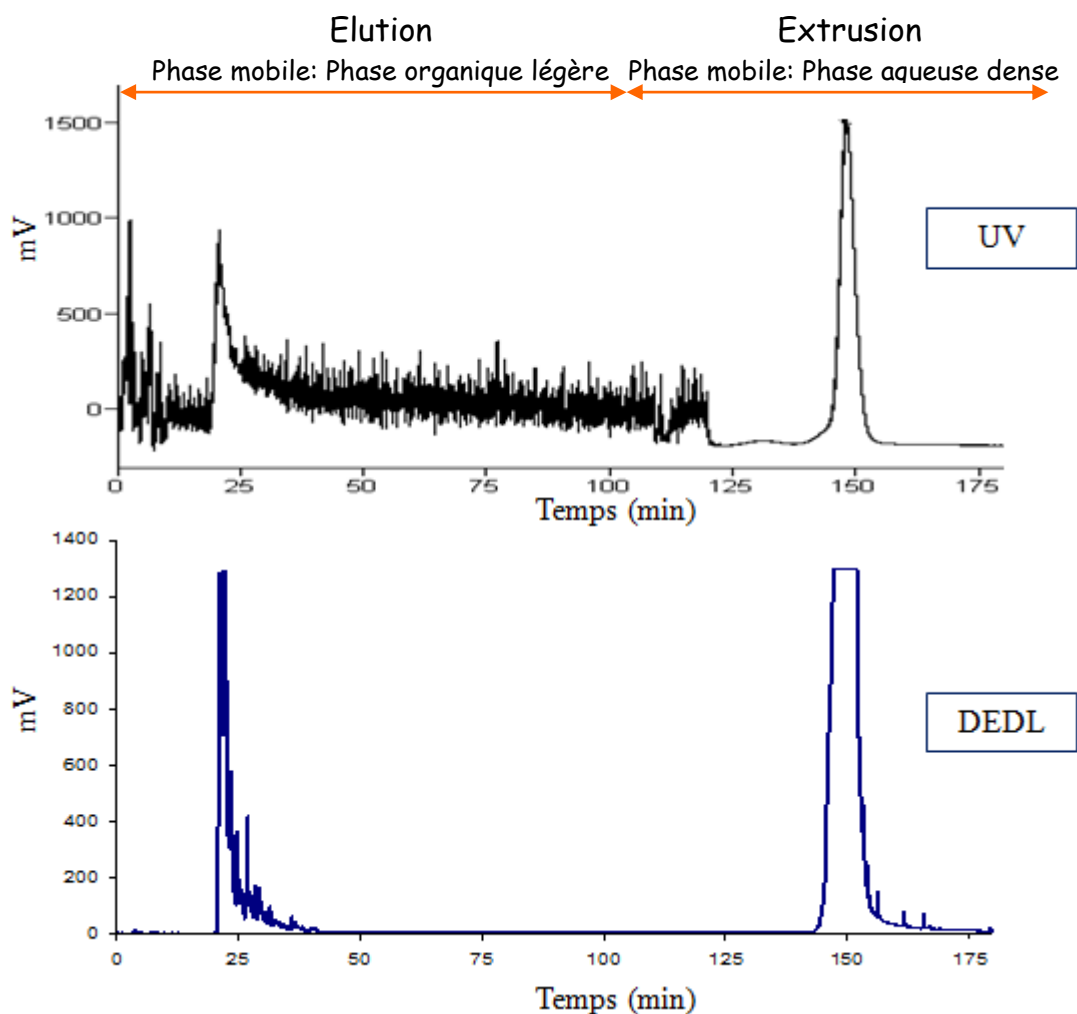


Figure III-16: Chromatogrammes CPC-UV-DEDL de l'extrait de baies d'argousier PSFME obtenus par fractionnement CPC avec le système de solvant Arizona G (Hept/AE/MeOH/H₂O, 1/4/1/4), phase organique mobile et phase stationnaire aqueuse, extrusion à 100 min. Injection de 1,5 g de l'extrait PSFME. $\lambda = 290$ nm.

Même si l'utilisation du DEDL en complément du détecteur UV permet de gagner en sensibilité pour les premiers composés élués dans la phase mobile légère (Hept/AE), car la réponse du DEDL est moins affectée que celle de l'UV par le relargage de phase stationnaire avec la phase mobile (bleeding), la collecte des fractions suivie uniquement par cette double

détection conduirait au regroupement de deux fractions seulement: une entre 25 et 40 min, et l'autre entre 140 et 160 min. Cependant pour vérifier la séparation obtenue par CPC et assurer un regroupement convenable des tubes de collecte en fraction contenant les mêmes composés, il est nécessaire d'analyser à posteriori les différents tubes collectés. L'utilisation d'un couplage en ligne CPC-HPLC-UV, permettant d'obtenir une empreinte chromatographique quasi instantanée des tubes collectés, permet de réaliser plusieurs étapes (fractionnement, analyses des différentes collectes) en une seule et facilite de ce fait le regroupement des fractions.

Pendant les 180 min du fractionnement CPC de première dimension, 24 analyses HPLC du flux CPC ont pu être réalisées, ce qui revient à une injection vers la seconde dimension HPLC toutes les 7,5 min. Les principales injections HPLC-UV (I_3 - I_6) de deuxième dimension (Fig. III-17), effectuées lors de l'éluion du premier pic CPC, présentent des profils différents et ont permis de le séparer en plusieurs fractions, alors que celles obtenues pour le pic d'extrusion (I_{20} et I_{21}) montrent des profils similaires permettant de regrouper ces molécules dans une même fraction. Par ailleurs, un autre avantage de ce couplage multidimensionnel, est un gain de sensibilité. En effet, l'analyse des empreintes I_6 , I_{16-17} et I_{18-19} , réalisée à des temps où aucune réponse du système de détection UV-DEDL de première dimension n'est visible, a permis de détecter des molécules faiblement concentrées et de les regrouper dans des fractions similaires.

Les chromatogrammes HPLC-UV de deuxième dimension (Fig. III-17) indiquent que les phénomènes chromatographiques, tels que la digitation visqueuse ou des élargissements de pics n'ont pas mené à des co-élutions rédhibitoires pendant le couplage en ligne.

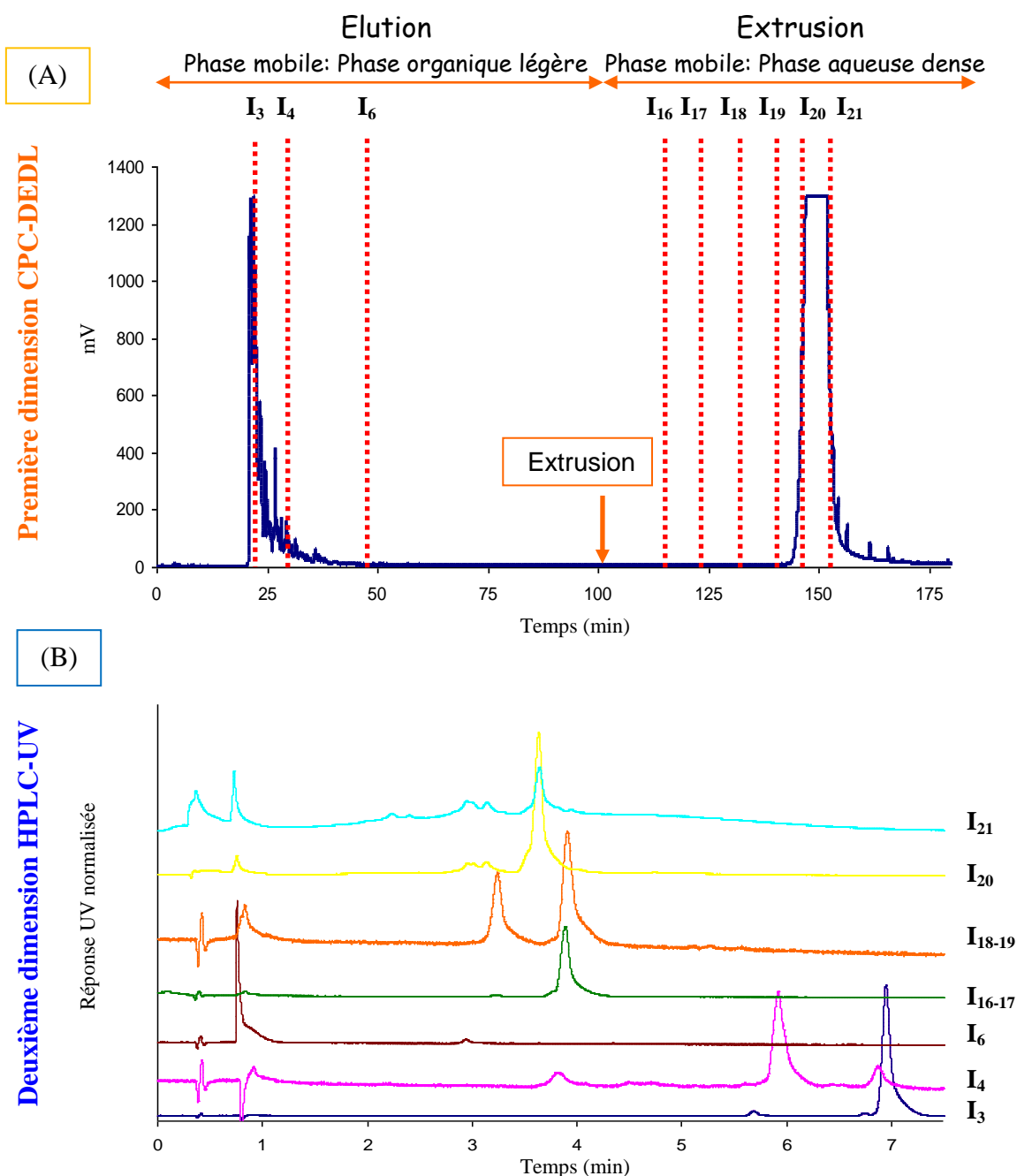


Figure III-17: Chromatogrammes obtenus avec le couplage en ligne CPC-HPLC-UV: première dimension CPC-DEDL (A) et deuxième dimension HPLC-UV à 366 nm (B). Les analyses HPLC ont été réalisées sur une « Fused core » HALO C18 (50×4.6 mm ID, 2.7 μm) à 2 mL.min⁻¹. Phase mobile H₂O/ACN acidifiée avec 1% CH₃COOH. Gradient linéaire de 5% à 45% ACN. Température 40°C, injection 20 μL. I_x représente les injections de l'effluent CPC vers la deuxième dimension réalisées avec la vanne Valco®.

Néanmoins, le couplage, tel qu'il est décrit dans cette partie, n'apporte que peu d'informations structurales sur les molécules fractionnées ou purifiées, nécessitant l'utilisation hors ligne et donc après fractionnement, d'étapes supplémentaires d'identification comme l'HPLC-MS. De ce fait, la spectrométrie de masse a été introduite au couplage afin de s'affranchir de ces étapes supplémentaires.

VIII. Réalisation du couplage multidimensionnel CPC-HPLC-UV-MS

Le couplage CPC-HPLC-UV-MS a été réalisé dans les mêmes conditions que précédemment, à la différence que la deuxième dimension a été soumise à une double détection UV-MS avec une source ESI en mode négatif. L'optimisation des conditions de MS ainsi que le détail des fragmentations des flavonoïdes seront décrits dans le chapitre suivant. Si nous prenons comme exemple les molécules majoritaires fractionnées pendant l'élution (Fig. III-18), nous pouvons identifier dans I₃ la quercétine (tr = 5,3) et l'isorhamnétine (tr = 6,5) qui présentent respectivement un ion moléculaire [M-H]⁻ à un m/z de 300 et 315, et dans I₄ l'isorhamnétine-7-O-rhamnoside à un m/z de 461.

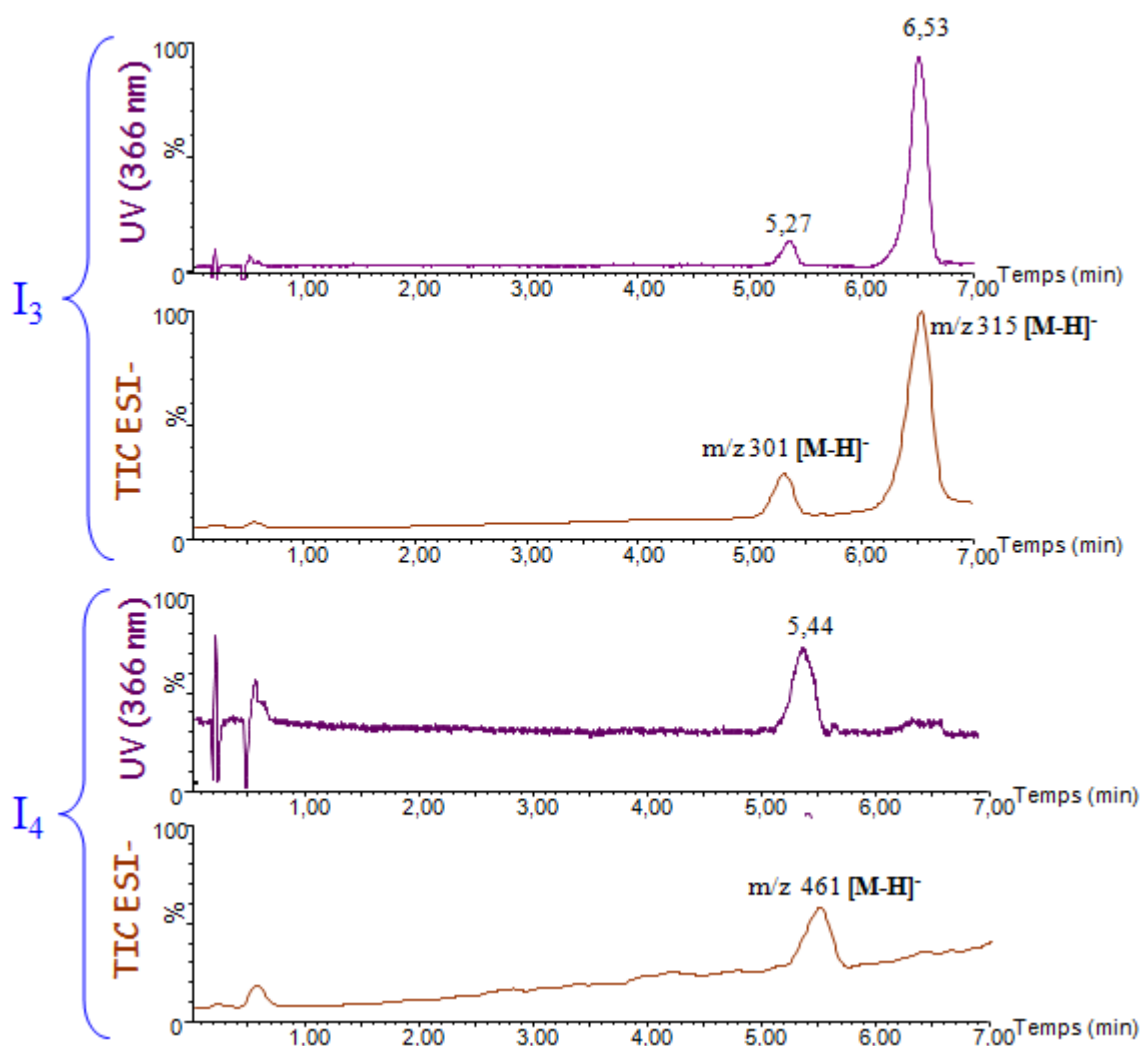


Figure III-18: Chromatogrammes UV (366 nm) et de courant ionique total (TIC, Total Ion Current) obtenus avec le couplage CPC-HPLC-UV-MS pendant la phase d'élution et en utilisant une source d'ionisation ESI en mode négatif. I₃ et I₄ correspondant aux injections 3 et 4 effectuées lors du transfert de la CPC vers l'HPLC.

Pendant l'extrusion (Fig. III-19), l'analyse de I_{16} permet d'identifier l'isorhamnétine-3-*O*-glucoside (tr = 4,13 ; $[M-H]^-$ m/z = 477), I_{18} permet d'identifier la quercétine-3-*O*-glucoside (tr = 3,5 ; $[M-H]^-$ m/z = 463) et à nouveau l'isorhamnétine-3-*O*-glucoside (tr = 4,13 ; $[M-H]^-$ m/z = 477), I_{20} permet d'identifier l'isorhamnétine-3-*O*-rutinoside (tr = 4,03 ; $[M-H]^-$ m/z = 623). De plus, la fragmentation en source permet de confirmer l'identification de molécules cibles. Par exemple pour l'isorhamnétine, il peut être visualisé l'ion fragment à un m/z de 300 $[M-H-CH_3]^-$, et pour l'isorhamnétine-7-*O*-rhamnoside et l'isorhamnétine-3-*O*-rutinoside l'ion fragment à un m/z de 315 correspondant respectivement à $[M-H-146]^-$ et $[M-H-308]^-$ ou (Y_0) est également détectable.

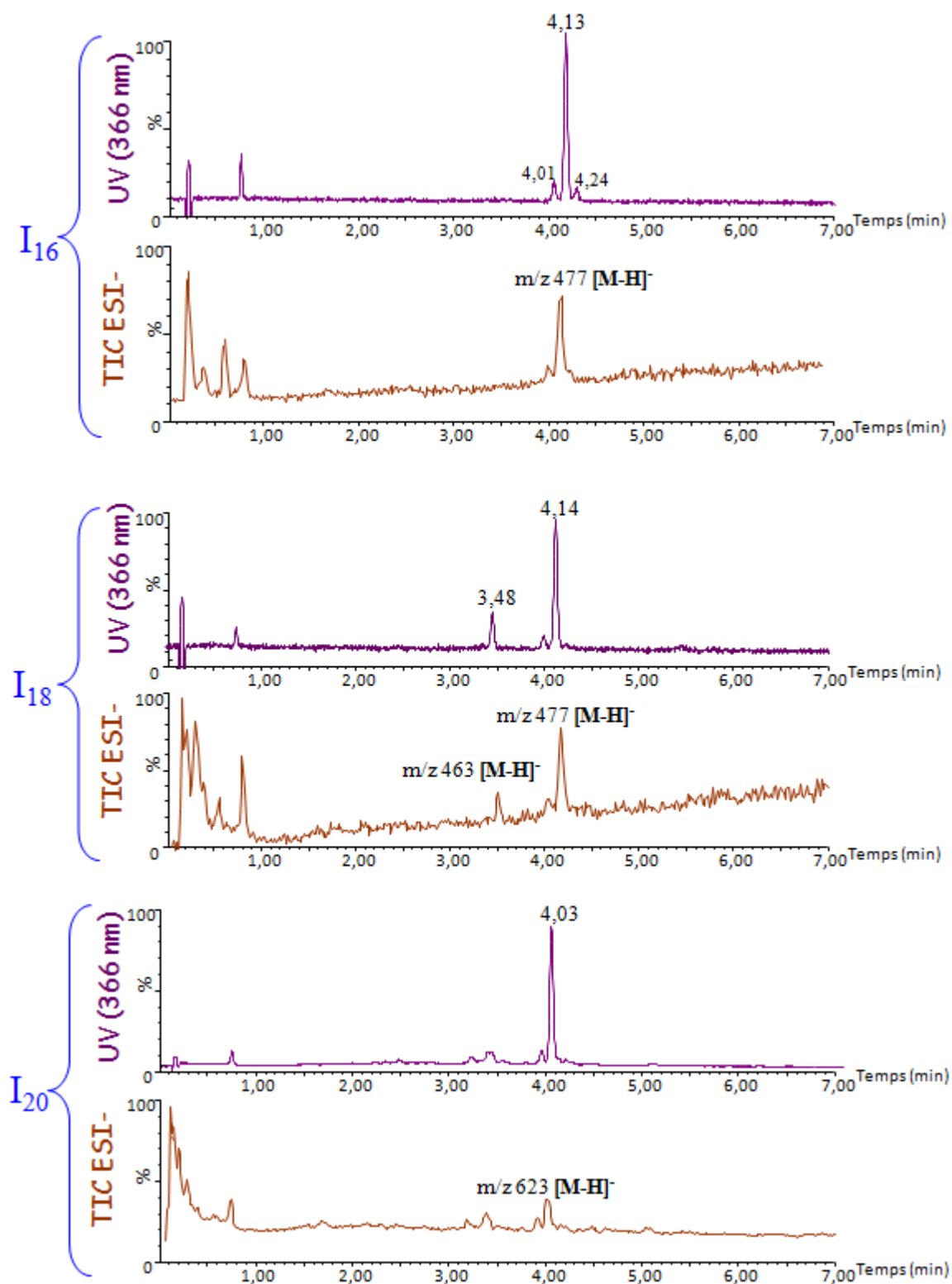


Figure III-19: Chromatogrammes UV (366 nm) et de courant ionique total (TIC, Total Ion Current) obtenues avec le couplage CPC-HPLC-UV-MS pendant la phase d'extrusion et en utilisant une source d'ionisation ESI en mode négatif. I₁₆, I₁₈ et I₂₀ correspondant aux injections 16, 18 et 20 effectuées lors du transfert de la CPC vers l'HPLC.

Le processus de fractionnement CPC-HPLC-UV-MS présenté dans ce chapitre a permis de séparer l'extrait brut PSFME de baies d'argousier en huit fractions (F) selon la similarité de leur profil phytochimique. Les fractions F1 et F8 sont les plus importantes en termes de quantité de matière (Tableau III-5). Par ailleurs, les données obtenues avec la MS permettent d'identifier majoritairement des flavonols aglycones et glycosylés.

Tableau III-5: Pourcentage massique moyen (%) des différentes fractions regroupées après le fractionnement de l'extrait PSFME, n = 3.

Fractions	Pourcentage massique (%)	Molécules majoritaires
F1	17,8 ± 1,6	Quercétine Isorhamnétine
F2	0,3 ± 0,2	Quercétine Isorhamnétine-7-O-rhamnoside Isorhamnétine
F3	0,3 ± 0,1	Isorhamnétine-7-O-rhamnoside
F4	0,8 ± 0,4	
F5	0,2 ± 0,1	
F6	1,2 ± 1,1	Quercétine-3-O-glucoside Isorhamnétine-3-O-glucoside
F7	1,0 ± 0,3	Isorhamnétine-3-O-glucoside
F8	81,6 ± 4,0	Isorhamnétine-3-O-rutinoside

Ainsi, les fractions F1 et F2 contiennent préférentiellement les molécules aglycones moins polaires, tandis que les fractions intermédiaires F3-F7 contiennent des dérivés monoglycosylés de quercétine et d'isorhamnétine enfin la fraction 8 contient les molécules diglycosylées les plus polaires.

Le couplage CPC-LC-MS permet d'obtenir rapidement et sans traitement préalable une première séparation à l'échelle semi-préparative et une caractérisation préliminaire de l'extrait de baies d'argousier à partir de seulement 1,5g d'extrait. Cela représente un gain de temps et de matière végétale comparé aux études mettant en œuvre, le fractionnement d'extrait de plantes sur des colonnes de silice ou de gel Sephadex qui nécessitent de travailler avec une quantité importante de matériel végétal pour identifier les molécules minoritaires. Par exemple, les travaux de Rösch [53], sur lesquels nous nous sommes d'ailleurs appuyés, ont permis de caractériser 34 dérivés flavonoïques à partir de 500 g de résidus de baies d'argousier après fractionnement sur colonne de gel Sephadex. Cette étude est l'une des

seules où l'identification simultanée de plusieurs flavonoïdes est mentionnée, car les autres travaux se limitent généralement à l'identification de quelques molécules [54-56].

Par ailleurs, l'absence de support solide de la CPC permet d'éviter l'adsorption irréversible et donc la perte de molécules. Ainsi la méthodologie développée est particulièrement adaptée à la séparation et l'identification en ligne des molécules bioactives provenant de matrices complexes d'origine naturelle.

IX. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons pu démontrer le développement et la mise en œuvre du couplage en ligne CPC-HPLC-UV-MS qui permet de suivre le fractionnement directement en sortie de CPC, et de plus, permet d'obtenir des informations structurales avec l'identification par MS des molécules fractionnées. Cette méthodologie peut donc, être considérée comme une nouvelle approche pour la séparation et l'identification rapide de produits naturels. Le couplage CPC-HPLC-UV-MS simplifie le regroupement des fractions, et réduit le temps de manipulation post-séparation en combinant analyse et identification des fractions en une seule et même étape. De plus, elle offre la possibilité d'obtenir des informations structurales sur les molécules d'intérêt directement après l'étape de fractionnement, ce qui est très utile dans le cas de dérégulation d'extrait végétal, procédure permettant d'identifier des molécules connues sans les isoler, ou dans le cas d'identification de nouvelles molécules bioactives. Par ailleurs, la CPC étant une technique versatile cette méthodologie peut être appliquée avec les différents modes de développement de la CPC et avec n'importe quel extrait de plantes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Hostettmann, K. and Wolfender, J.-L.** (2004) Applications of liquid chromatography/UV/MS and liquid chromatography/NMR for the on-line identification of plant metabolites. In *Bioactive compounds in natural sources*, Taylor and Francis, Londres, pp. 31-68.
2. **Foucault, A.P. and Chevlot, L.** (1998) Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. *Journal of Chromatography A*, 808(1-2), 3-22.
3. **Ingkaninan, K., Hazekamp, A., Hoek, A.C., Balconi, S. and Verpoorte, R.** (2000) Application of centrifugal partition chromatography in a general separation and dereplication procedure for plant extracts. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 23(14), 2195-2208.
4. **Marston, A. and Hostettmann, K.** (2006) Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2), 181-194.
5. **Yoon, K.D., Chin, Y.-W. and Kim, J.** (2010) Centrifugal partition chromatography: Application to natural products in 1994-2009. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 33(9), 1208 - 1254.
6. **Ito, Y.** (2005) Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1065(2), 145-168.
7. **Marchal, L., Legrand, J. and Foucault, A.** (2003) Centrifugal partition chromatography: A survey of its history, and our recent advances in the field. *Chemical Record*, 3(3), 133-143.
8. **Destandau, E., Toribio, A., Lafosse, M., Pecher, V., Lamy, C. and André, P.** (2009) Centrifugal partition chromatography directly interfaced with mass spectrometry for the fast screening and fractionation of major xanthenes in *Garcinia mangostana*. *Journal of Chromatography A*, 1216(9), 1390-1394.
9. **Toribio, A., Destandau, E., Elfakir, C. and Lafosse, M.** (2009) Hyphenation of centrifugal partition chromatography with electrospray ionization mass spectrometry using an active flow-splitter device for characterization of flavonol glycosides. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 23(12), 1863-1870.
10. **Spraul, M., Braumann, U., Renault, J.-H., Thépenier, P. and Nuzillard, J.-M.** (1997) Nuclear magnetic resonance monitoring of centrifugal partition chromatography in pH-zone-refining mode. *Journal of Chromatography A*, 766(1-2), 255-260.
11. **Murayama, W., Kobayashi, T., Kosuge, Y., Yano, H., Nunogaki, Y. and Nunogaki, K.** (1982) A new centrifugal counter-current chromatograph and its application. *Journal of Chromatography A*, 239, 643-649.

12. **Ito, Y., Sandlin, J. and Bowers, W.G.** (1982) High-speed preparative counter-current chromatography with a coil planet centrifuge. *Journal of Chromatography A*, 244(2), 247-258.
13. **Maciuk, A., Renault, J.-H., Margraff, R., Trébuchet, P., Zèches-Hanrot, M. and Nuzillard, J.-M.** (2004) Anion-exchange displacement centrifugal partition chromatography. *Analytical Chemistry*, 76(21), 6179-6186.
14. **Toribio, A.** (2007) Développement de nouvelles approches méthodologiques en Chromatographie de Partage Centrifuge en vue de la purification de molécules d'intérêt. Doctorat - Reims: Université de Reims Champagne-Ardenne.
15. **Oka, F., Oka, H. and Ito, Y.** (1991) Systematic search for suitable two-phase solvent systems for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 538(1), 99-108.
16. **Berthod, A., Hassoun, M. and Ruiz-Angel, M.** (2005) Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 383(2), 327-340.
17. **Foucault, A.P.** (1994) Solvent systems in centrifugal partition chromatography. In *Centrifugal Partition Chromatography (chromatographic science series, vol. 68)*, Marcel Dekker, New York, pp. 71-98.
18. **Toribio, A., Nuzillard, J.-M. and Renault, J.-H.** (2007) Strong ion-exchange centrifugal partition chromatography as an efficient method for the large-scale purification of glucosinolates. *Journal of Chromatography A*, 1170(1-2), 44-51.
19. **Lee, Y.W., Voyksner, R.D., Pack, T.W., Cook, C.E., Fang, Q.C. and Ito, Y.** (1990) Application of countercurrent chromatography/thermospray mass spectrometry for the identification of bioactive lignans from plant natural products. *Analytical Chemistry*, 62(3), 244-248.
20. **Jerz, G., Wybraniec, S., Gebers, N. and Winterhalter, P.** (2010) Target-guided separation of *Bougainvillea glabra* betacyanins by direct coupling of preparative ion-pair high-speed countercurrent chromatography and electrospray ionization mass-spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(27), 4544-4554.
21. **Bisson, J., Poupard, P., Pawlus, A.D., Pons, A., Darriet, P., Mérillon, J.-M. and Waffo-Téguo, P.** (2011) Development of hybrid elution systems for efficient purification of stilbenoids using centrifugal partition chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(36), 6079-6084.
22. **Hou, Z., Xu, D., Yao, S., Luo, J. and Kong, L.** (2009) An application of high-speed counter-current chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry for separation and online identification of coumarins from *Peucedanum praeruptorum* Dunn. *Journal of Chromatography B*, 877(24), 2571-2578.

23. **Gutzeit, D., Winterhalter, P. and Jerz, G.** (2007) Application of preparative high-speed counter-current chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for a fast screening and fractionation of polyphenols. *Journal of Chromatography A*, 1172(1), 40-46.
24. **Jerz, G., Gutzeit, D. and Winterhalter, P.** (2010) Characterization of acylated flavonoid glycosides from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) juice concentrate by preparative HSCCC/ESI-MS-MS. In *Flavor and Health Benefits of Small Fruits*, American Chemical Society, 253-265.
25. **Chen, L.J., Song, H., Du, Q.Z., Li, J.R. and Ito, Y.** (2005) Analysis of flavonoids in the extracts from the seeds of *Oroxylum indicum* using high speed countercurrent chromatography/mass spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 28(10), 1549-1555.
26. **Dugo, P., Cacciola, F., Kumm, T., Dugo, G. and Mondello, L.** (2008) Comprehensive multidimensional liquid chromatography: Theory and applications. *Journal of Chromatography A*, 1184(1-2), 353-368.
27. **Evans, C. and Jorgenson, J.** (2004) Multidimensional LC-LC and LC-CE for high-resolution separations of biological molecules. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(8), 1952-1961.
28. **Guiochon, G., Marchetti, N., Mriziq, K. and Shalliker, R.A.** (2008) Implementations of two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1189(1-2), 109-168.
29. **Yang, F., Quan, J., Zhang, T.Y. and Ito, Y.** (1998) Multidimensional counter-current chromatographic system and its application. *Journal of Chromatography A*, 803(1-2), 298-301.
30. **Lu, Y., Sun, C., Liu, R. and Pan, Y.** (2007) Effective two-dimensional counter-current chromatographic method for simultaneous isolation and purification of oridonin and ponacidin from the crude extract of *Rabdosia rubescens*. *Journal of Chromatography A*, 1146(1), 125-130.
31. **Lu, Y., Sun, C., Wang, Y. and Pan, Y.** (2007) Two-dimensional counter-current chromatography for the preparative separation of prenylflavonoids from *Artocarpus altilis*. *Journal of Chromatography A*, 1151(1-2), 31-36.
32. **Zhou, T., Chen, B., Fan, G., Chai, Y. and Wu, Y.** (2006) Application of high-speed counter-current chromatography coupled with high-performance liquid chromatography-diode array detection for the preparative isolation and purification of hyperoside from *Hypericum perforatum* with online purity monitoring. *Journal of Chromatography A*, 1116(1-2), 97-101.
33. **Guo, M., Liang, J. and Wu, S.** (2010) On-line coupling of counter-current chromatography and macroporous resin chromatography for continuous isolation of arctiin from the fruit of *Arctium lappa* L. *Journal of Chromatography A*, 1217(33), 5398-5406.
34. **Liang, J., Yang, Z., Cao, X., Wu, B. and Wu, S.** (2011) Preparative isolation of novel antioxidant flavonoids of alfalfa by stop-and-go counter-current chromatography and

following on-line liquid chromatography desalination. *Journal of Chromatography A*, 1218(36), 6191-6199.

35. Hu, R., Dai, X., Xu, X., Sun, C. and Pan, Y. (2011) Two-dimensional counter-current chromatography: 1st Traditional counter-current chromatography, 2nd acid-base elution counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(36), 6085-6091.

36. Wei, J., Zhang, T. and Ito, Y. (2005) Preparative separation of tripdiolide from chinese traditional herb by multidimensional CCC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28(12), 1903 - 1911.

37. Wei, Y. and Ito, Y. (2006) Preparative isolation of imperatorin, oxypeucedanin and isoimperatorin from traditional Chinese herb "bai zhi" *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm) Benth. et Hook using multidimensional high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1115(1-2), 112-117.

38. Shi, S., Zhou, H., Zhang, Y., Zhao, Y., Huang, K. and Liu, S. (2009) A high-speed counter-current chromatography-HPLC-DAD method for preparative isolation and purification of two polymethoxylated flavones from *Taraxacum mongolicum*. *Journal of Chromatographic Science*, 47, 349-353.

39. Zhou, T., Zhu, Z., Wang, C., Fan, G., Peng, J., Chai, Y. and Wu, Y. (2007) On-line purity monitoring in high-speed counter-current chromatography: Application of HSCCC-HPLC-DAD for the preparation of 5-HMF, neomangiferin and mangiferin from *Anemarrhena asphodeloides* Bunge. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44(1), 96-100.

40. Chromatographie Shimadzu France (Consulté le 16 Juin 2011) http://www.shimadzu-france.com/doc/Plaquette_Shimadzu_2008.pdf.

41. Himbert, F., Dreux, M., Pennanec, R., Chaimbault, P., Elfakir, C. and Lafosse, M. (2003) Le split en mode actif: Une approche innovante du couplage de la chromatographie liquide en phase normale à la spectrométrie de masse. *Spectra analyse*, 32(235), 29-31.

42. Berthod, A., Hassoun, M. and Harris, G. (2005) Using the Liquid Nature of the Stationary Phase: The Elution-Extrusion Method. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 28(12), 1851 - 1866.

43. Berthod, A., Ruiz-Angel, M.J. and Carda-Broch, S. (2003) Elution-extrusion countercurrent chromatography. Use of the liquid nature of the stationary phase to extend the hydrophobicity window. *Analytical Chemistry*, 75(21), 5886-5894.

44. Agnely, M. and Thiébaud, D. (1997) Dual-mode high-speed counter-current chromatography: retention, resolution and examples. *Journal of Chromatography A*, 790(1-2), 17-30.

45. Guillaume, D., Ruta, J., Rudaz, S. and Veuthey, J.-L. (2010) New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: A critical comparison of existing approaches. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(3), 1069-1082.

46. **Guiochon, G.** (2007) Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1168(1-2), 101-168.
47. **Colonne Chromolith, VWR** (Consultée le 21-06-2011) http://fr.vwr.com/app/catalog/Catalog?parent_class_id=4&parent_class_cd=116008.
48. **Unger, K.K., Skudas, R. and Schulte, M.M.** (2008) Particle packed columns and monolithic columns in high-performance liquid chromatography-comparison and critical appraisal. *Journal of Chromatography A*, 1184(1-2), 393-415.
49. **Cunliffe, J.M. and Maloney, T.D.** (2007) Fused-core particle technology as an alternative to sub-2- μm particles to achieve high separation efficiency with low backpressure. *Journal of Separation Science*, 30(18), 3104-3109.
50. **Kirkland, J.J.** (1992) Superficially porous silica microspheres for the fast high-performance liquid chromatography of macromolecules. *Analytical Chemistry*, 64(11), 1239-1245.
51. **Colonne Halo, Advanced Materials Technology** (Consultée le 21-06-2011) <http://www.advanced-materials-tech.com/halo.html>.
52. **Mayfield, K.J., Shalliker, R.A., Catchpole, H.J., Sweeney, A.P., Wong, V. and Guiochon, G.** (2005) Viscous fingering induced flow instability in multidimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1080(2), 124-131.
53. **Rösch, D., Krumbein, A., Mugge, C. and Kroh, L.W.** (2004) Structural investigations of flavonol glycosides from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) pomace by NMR spectroscopy and HPLC-ESI-MSⁿ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(13), 4039-4046.
54. **Chen, C., Zhang, H., Xiao, W., Yong, Z.-P. and Bai, N.** (2007) High-performance liquid chromatographic fingerprint analysis for different origins of sea buckthorn berries. *Journal of Chromatography A*, 1154(1-2), 250-259.
55. **Yang, B., Halttunen, T., Raimo, O., Price, K. and Kallio, H.** (2009) Flavonol glycosides in wild and cultivated berries of three major subspecies of *Hippophaë rhamnoides* and changes during harvesting period. *Food Chemistry*, 115(2), 657-664.
56. **Zu, Y., Li, C., Fu, Y. and Zhao, C.** (2006) Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(3), 714-719.

CHAPITRE 4

**RELATION STRUCTURE-ACTIVITE ENTRE LES
MOLECULES PHENOLIQUES ET L'ACTIVITE
ANTIOXYDANTE DES FRACTIONS DE
L'EXTRAIT PSFME DE BAIES D'ARGOUSIER**

I. Introduction

Les flavonoïdes, dont plus de 8000 formes différentes ont été identifiées à ce jour, sont des molécules ubiquitaires qui se retrouvent dans la plupart des végétaux et notamment dans ceux consommés par l'homme [1, 2]. Ainsi, la consommation de flavonoïdes peut varier de 50 à 800 mg/jour suivant la quantité consommée de fruits, de légumes, et de boissons telles que le thé ou le vin rouge [3]. Les solutions ou médicaments préparés à base de plantes médicinales et utilisés en phytothérapie sont également une autre source importante à considérer.

La consommation de fruits et de légumes, qui par ailleurs est encouragée par les autorités sanitaires, a été depuis quelques années corrélée à un effet protecteur contre le cancer, les maladies cardio-vasculaires et également contre les maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson [3-7]. Ces effets positifs sur la santé humaine sont en partie dus à la présence, dans les végétaux consommés, de molécules bioactives et notamment les flavonoïdes qui sont connus pour avoir une forte activité antioxydante, en inhibant d'une part les enzymes productrices de radicaux libres et d'autre part en piégeant les radicaux formés [3, 6, 7]. Une des premières étapes du développement des maladies neurodégénératives, qui apparaissent souvent avec l'âge, est due à une diminution des défenses antioxydantes et à une augmentation mitochondriale de la production d'espèces radicalaires [8]. Ainsi l'apport d'antioxydants naturels par la nourriture ne peut être que bénéfique pour la santé humaine. De nombreuses études ont démontré une corrélation positive entre une forte consommation en flavonoïdes et la diminution du risque de maladies cardiovasculaires et neurodégénératives. Par exemple, le désormais connu « paradoxe français », montre que malgré une consommation en graisse saturée élevée, le taux de maladies coronaires est particulièrement bas dans le sud de la France, et que cette réduction du risque de maladies cardiovasculaires serait liée à une consommation régulière et modérée de vin rouge riche en flavonoïdes [9-11].

Les baies d'argousier sont des fruits de plus en plus consommés pour leur teneur en vitamines et composés phénoliques, qui lui confèrent par ailleurs un potentiel antioxydant intéressant [12, 13]. Après avoir développé d'une part une méthode originale pour obtenir un extrait antioxydant et riche en composés phénoliques (Chapitre 2), et d'autre part identifié certains marqueurs phytochimiques de l'extrait tels que la quercétine, l'isorhamnétine et certains de leurs dérivés glycosylés (Chapitre 3), notre démarche a été de caractériser de manière plus approfondie l'activité antioxydante en lien avec la structure chimique des molécules présentes dans notre extrait. Dans un premier temps nous avons identifié par

couplage HPLC-MS/MS, les molécules présentes dans notre extrait actif pour mettre en évidence les molécules responsables de l'activité. Dans un deuxième temps nous avons évalué *in vitro* l'activité antioxydante de l'extrait PSFME et de ses fractions obtenues par le couplage CPC-HPLC au moyen de tests chimiques et cellulaires. Par ailleurs, la cytotoxicité de ces mêmes échantillons a été évaluée en mesurant la viabilité cellulaire des cellules utilisées. L'ensemble des résultats a ensuite été discuté à la fin de ce chapitre.

II. Identification des flavonoïdes dans les extraits actifs de baies d'argousier

Dans le but d'identifier les molécules présentes dans l'extrait de baies d'argousier nous avons combiné l'HPLC à deux systèmes de détection: UV-vis et MS, car non seulement ce sont deux modes de détection souvent rencontrés pour l'analyse des composés phénoliques mais surtout ils fournissent des informations structurales sur les analytes étudiés.

II.1. Présentation sommaire des techniques utilisées: HPLC-UV et HPLC-MS/MS

II.1.1. HPLC-UV

La détection UV-vis est le mode de détection couplé à la chromatographie liquide qui est de loin le plus utilisé aujourd'hui pour l'analyse des produits naturels possédant un ou plusieurs chromophores. Les détecteurs UV-vis les plus communément utilisés sont des détecteurs à barrette de diodes (DAD, Diode Array Detector), qui permettent de suivre une analyse à plusieurs longueurs d'ondes simultanément, et d'enregistrer les spectres d'absorption de chaque composé élué par la phase mobile [14]. De plus, il s'avère que cette méthode de détection est rapide, reproductible, sensible et non destructive. Les composés phénoliques possédant tous un chromophore, leur analyse en ligne par HPLC-DAD permet donc d'obtenir des informations structurales et ainsi de réaliser un premier criblage des extraits bruts et/ou fractions [15, 16]. Comme l'ont décrit Marbry *et al.* [17] les flavonoïdes ont un spectre d'absorption spécifique. Ils présentent deux bandes caractéristiques dans l'UV-Vis, une bande I (noyau B) qui absorbe entre 310 et 520 nm et une bande II (noyau A) qui absorbe entre 240 et 300 nm. Suivant le nombre de doubles liaisons conjuguées sur la structure des flavonoïdes, ces bandes seront plus ou moins intenses. Il est ainsi facile de faire la différence entre des molécules aglycone à cycle C ouvert (chalcone et aurone) qui ont une bande II très réduite, et les autres flavonoïdes à cycle C fermé qui possèdent une bande II beaucoup plus intense (Fig. IV-1). A contrario, les isoflavones et flavanones possèdent une bande I qui est généralement réduite à un épaulement.

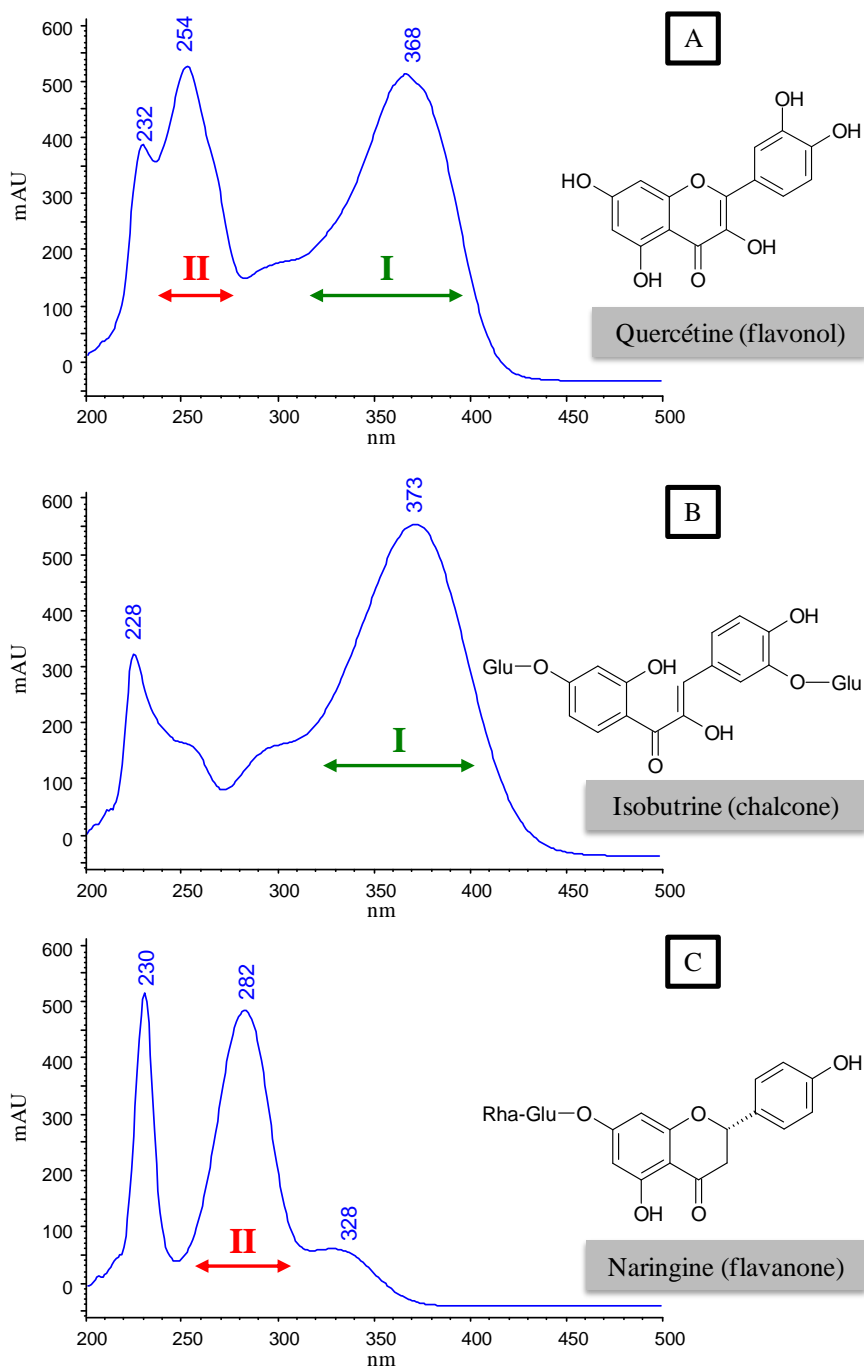


Figure IV-1: Spectres UV-vis de la quercétine (flavonol) (A), de l'isobutrine (chalcone) (B) et de la naringine (flavanone) (C) enregistrés entre 200 et 500 nm par HPLC-DAD. Colonne Alltima C18 (150 × 4.6mm ID, 5 μm) ; gradient constitué d'H₂O ultra-pure et de MeOH tous les deux acidifiés avec 1% CH₃COOH ; débit de 1 mL/min ; injection de 20 μL ; T = 25°C.

II.1.2. HPLC-MS

La spectrométrie de masse est une technique de caractérisation chimique qui consiste à mesurer les rapports masse/charge (m/z) des atomes ou des molécules présents dans un

échantillon donné [18] dans le but de les identifier et de déterminer leur structure chimique. De façon simplifiée un spectromètre de masse se décompose en:

- une source d'ionisation dans laquelle les molécules sont ionisées à partir d'un échantillon vaporisé
- un ou plusieurs analyseurs qui consistent à séparer les ions formés en fonction de leur rapport m/z
- un détecteur qui mesure un courant électrique proportionnel à la quantité d'ions reçus aux différentes valeurs de m/z
- un système de traitement de données qui transforme le courant électrique en un signal chromatographique

Depuis l'essor des procédés d'ionisation à pression atmosphérique, deux types de sources d'ionisation sont majoritairement utilisés pour l'analyse des composés phénoliques par HPLC-MS [19, 20]: l'ionisation par électrospray (ESI, Electrospray Ionisation) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI, Atmospheric Pressure Chemical Ionisation).

L'ESI repose sur l'introduction d'une solution aqueuse de l'échantillon à analyser dans un capillaire porté à un potentiel élevé (positif ou négatif). Le champ électrique étant obtenu par application d'une différence de potentiel de 3 à 6 kV entre le capillaire et une contre-électrode séparés de 0,3 à 2 cm (largeur de champ électrique). Sous l'action combinée d'un gaz de nébulisation chauffé, qui évapore le solvant, et du champ électrique, des charges vont s'accumuler à la surface de l'effluent conduisant à la rupture de celui-ci et à la formation d'un spray de gouttelettes fortement chargées ou « cône de Taylor ». Les microgouttes ainsi formées vont progressivement diminuer par perte de molécules de solvant, puis éclater sous l'effet d'une densité de charge trop importante, et au final libérer des ions moléculaires protonés ou déprotonés. L'interface entre la source ESI et l'analyseur est constituée d'une série de lentilles au sein desquelles des ions parents peuvent être obtenus [21].

En APCI, l'effluent est également introduit sous forme liquide dans la source d'ionisation dans laquelle il est converti en un aérosol à l'aide d'un flux d'azote chauffé. Les gouttelettes d'effluent sont ensuite poussées par le flux gazeux vers une chambre de désolvatation où la phase mobile est vaporisée. Le mélange de microgouttelettes de gaz et de molécules est ensuite ionisé par décharge Corona via une aiguille portée à un fort potentiel. Dans ce type d'ionisation, la phase mobile vaporisée joue le rôle de gaz ionisant, induisant

des ions réactifs qui, par transfert de charge (protons ou électrons), vont ioniser les molécules d'intérêt [21].

Ces deux sources d'ionisation sont particulièrement adaptées à l'identification des composés phénoliques. Néanmoins, dans la littérature l'ionisation des flavonoïdes, molécules présentes dans notre extrait, est principalement réalisée avec une source ESI [19, 22-24]. De ce fait, dans notre étude nous avons privilégié une source d'ionisation ESI.

Bien que l'utilisation d'un simple analyseur soit suffisante pour obtenir des données structurales sur les molécules étudiées, il est souvent nécessaire d'utiliser des spectromètres de masse en mode tandem (MS/MS) pour obtenir plus d'informations structurales. Pour ce faire, les ions sélectionnés dans le premier analyseur sont envoyés vers une chambre de collision (CID, Collision Induced Dissociation), dans laquelle un gaz rare va entrer en collision avec l'ion parent et induire des ions fragments fils. Ces ions fils seront par la suite séparés par un deuxième analyseur, conduisant à un spectre donnant des informations structurales supplémentaires.

II.1.3. Conditions opératoires des paramètres d'ionisation

Les analyses présentées dans ce chapitre ont été réalisées en couplant un appareil HPLC HP 1100 (Agilent, Waldron, Allemagne) avec un triple quadripôle Quattro Ultima Micromass équipé d'une source électrospray Z-spray de géométrie orthogonale (Waters, Saint Quentin, France). Les données enregistrées d'un rapport m/z de 100 à 1000 u ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel MassLynx 4.1. L'optimisation des paramètres de source, en mode d'ionisation négatif et positif, a été réalisée à partir de quatre molécules de polarité et de structures différentes, connues des baies d'argousier : l'acide gallique, la quercétine, la quercétine-3-*O*-glucoside et la catéchine [25, 26]. Les valeurs des paramètres pour obtenir un rapport signal/bruit optimal, en mode négatif ou mode positif, sont les suivantes:

- une tension de capillaire de ± 4.5 kV
- une tension de cône de ± 35 V,
- une température de désolvatation de 96°C
- une température de source de 400°C
- un débit de gaz de cône de 80 L/h
- un débit de gaz de de-solvatation de 55 L/h

Le gaz appliqué en sortie du capillaire pour évaporer la phase mobile est du di-azote. Les expériences de MS/MS ont été réalisées avec de l'argon comme gaz de collision et avec une énergie de collision standard de ± 25 eV.

II.2. Point bibliographique sur la fragmentation des flavonoïdes en MS

Comme mentionné dans le chapitre 1 (partie II.2.1.3.), les flavonoïdes sont présents chez les végétaux sous deux formes majoritaires: les composés aglycones (génine) et les composés glycosylés. Dans cette synthèse bibliographique, la fragmentation des génines et des composés glycosylés sera donc différenciée et présentée dans des parties différentes.

II.2.1. Nomenclature et généralités

Le système de nomenclature utilisé pour décrire les fragments de flavonoïdes obtenus par MS est celui qui a été proposé par Ma *et al.* [27] et qui est aujourd'hui largement répandu. Pour les génines, les mécanismes de fragmentation les plus courants impliquent la coupure entre deux liaisons carbone (C-C) du cycle C. Les ions fragments ainsi produits sont notés $^{i,j}A^{\pm}$ et $^{i,j}B^{\pm}$, où A et B représentent les cycles A et B restés intacts, et *i* et *j* se réfèrent, quant à eux, aux liaisons du noyau C qui ont été rompues (Fig. IV-2).

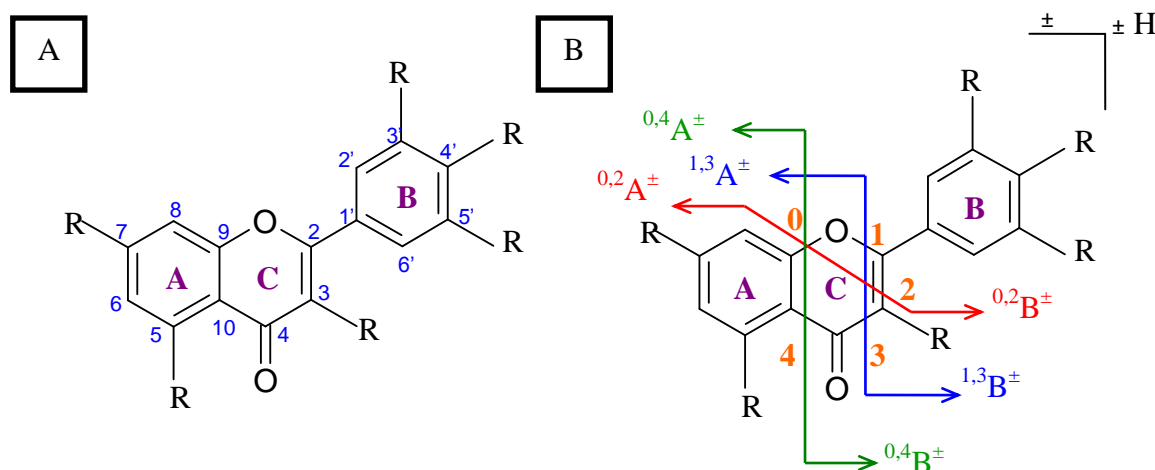


Figure IV-2: Structure typique d'un flavonoïde avec la numérotation des carbones (A) et exemples de voies de fragmentation des flavonoïdes obtenues en MS/MS (B). R, correspond aux principales substitutions des flavonoïdes. Sur la structure de droite 0, 1, 2, 3 et 4 représentent les numéros de liaisons du cycle C qui subissent une rupture lors de la fragmentation.

La fragmentation des flavonoïdes est explicable par des mécanismes rétro-Diels-Alder (RDA). Les réactions de RDA apparaissent sur des cycles à 6 carbones contenant au moins une double liaison. Une RDA du cycle C entraîne préférentiellement une coupure entre les liaisons 1 et 3 (coupure bleu figure IV-2b) et forme ainsi deux ions fragments, généralement majoritaires, notés $^{1,3}A^{\pm}$ et $^{1,3}B^{\pm}$. D'autres ruptures de liaisons peuvent intervenir selon le mode d'ionisation et la classe de molécules étudiées [15, 27].

Dans le cas de pertes neutres, tels que H₂O ou CO, les ions produits sont désignés par la combinaison de la nomenclature $^{i,j}A^{\pm}$ (ou $^{i,j}B^{\pm}$) et de la perte neutre, par exemple [$^{1,3}A - H_2O$]⁻.

Pour les flavonoïdes glycosylés, la nomenclature utilisée sera celle décrite par Domon et Costello [28] dans laquelle la génine est décrite avec un Y₀ alors que Y_n correspond à la génine liée à n monosaccharides. Les fragments glycosides correspondants sont notés respectivement B_n avec n le nombre de monosaccharides de la partie osidique.

L'étude spécifique de la génine nécessite de faire dans un premier temps une fragmentation MS/MS de l'ion moléculaire (fragmentation par dissociation induite par collision ou CID), puis de sélectionner l'ion correspondant à la génine, soit Y₀⁺ ou Y₀⁻, et de lui faire subir une fragmentation par CID (MS³). Cependant, tous les appareils n'ont pas la possibilité de réaliser de la MS³. L'utilisation de certains spectromètres induit une fragmentation en source. En conséquence, l'ion fragment Y₀ (Y₀⁺ ou Y₀⁻) est alors disponible dans la source pour subir une fragmentation par collision de type MS² ce qui est « équivalent » à une MS³.

II.2.2. Fragmentation en mode positif des génines

En mode positif, les voies de fragmentation qui sont majoritairement observées résultent d'un clivage des liaisons 1/3, 0/2, 0/3, 0/4 ou 1/4 (Fig. IV-3) [19, 24, 27]. Le schéma de fragmentation obtenu est dépendant du nombre de substitutions et de la classe de flavonoïdes étudiée, ainsi la présence d'un hydroxyle en position 3, comme pour les flavonols, induit plus de possibilités de fragmentation par rapport à des molécules ne portant pas de groupe hydroxyle dans cette position [19]. Parmi les différents fragments, l'ion $^{1,3}A^+$ se retrouve dans toutes les classes de flavonoïdes et est généralement le plus abondant. Par ailleurs, en raison d'hydroxylations biosynthétiques en position 5 et 7 sur le noyau A, l'ion résultant $^{1,3}A^+$ est souvent informatif sur la classe de flavonoïdes étudiée. Il correspond à un rapport m/z de 153 pour les flavones et flavonols, et de 139 dans le cas des flavanes et flavanols qui ne possèdent pas de cétone en position 4 [19, 27, 29]. Plus spécifiquement il a été démontré [27] que les fragmentations RDA des flavonols généraient majoritairement des coupures 1/3 et 0/2, et que l'ion $^{1,3}B^+$ était remplacé par l'ion [$^{1,3}B-2H$]⁺ (Fig. IV-3). De plus, l'ion $^{0,2}A^+$, propre aux flavonols, peut être utilisé pour confirmer la présence de cette structure moléculaire [15]. Moins fréquent le clivage 1/4 produit l'ion [$^{1,4}A-2H$]⁺ comprenant le noyau A et un atome d'oxygène [24, 29].

Les spectres obtenus en mode positif arborent également des ions produits par la perte de petites molécules comme H₂O, CO, 2H₂O, C₂H₂O, H₂O + CO, 2CO et H₂O + 2CO qui correspondent à des pertes respectives de 18, 28, 36, 42, 46, 56, et 74 u. Il est à noter que les ions fragments de types $^{i,j}A^+$ ou $^{i,j}B^+$ sont communément sujets à des pertes de neutres [15, 27]. Cependant, lorsqu'un groupe méthoxy est présent sur la molécule, la perte du CH₃ induit un ion $[M+H-CH_3]^+$ qui est le cas échéant fortement visible sur le spectre.

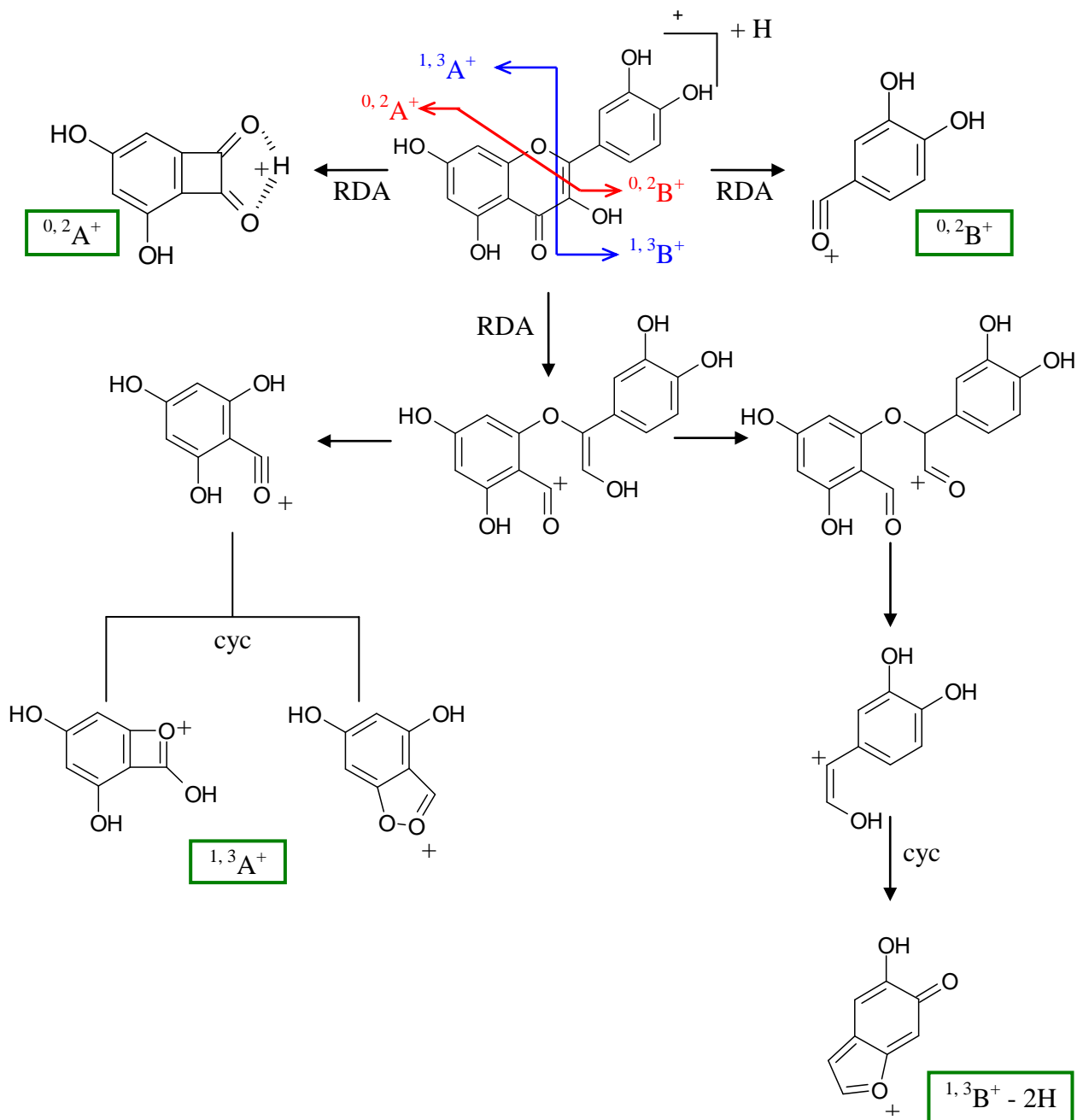


Figure IV-3: Schéma de fragmentations obtenu pour la quercétine en mode positif après rupture RDA entre les liaisons 1/3 et 0/2. Adapté de Ma *et al.* [27] et Justino *et al.* [24]. cyc :cyclisation.

II.2.3. Fragmentation en mode négatif des génines

Le mode négatif est plus communément utilisé pour l'identification structurale par HPLC-MS des flavonoïdes car il est plus sélectif et plus sensible [19, 22]. En mode négatif, la voie principale de fragmentation reste la coupure de la liaison 1/3 du noyau C. Les ions fragments obtenus $^{1,3}A^-$, $^{1,3}B^-$ et $[^{1,3}A-CO_2]^-$ sont généralement les ions majoritaires. Cependant d'autres voies de fragmentation, 1/2, 1/4 et 0/4, peuvent être observées. Il a été remarqué que la rétrocyclisation liée à la coupure 1/2 et qui induit les ions $[^{1,2}A-H]^-$, $[^{1,2}B-H]^-$ $[^{1,2}A-CO]^-$, $[^{1,2}A-CO-CO_2]^-$ est spécifique aux molécules substituées par deux hydroxyles sur le noyau B (Fig. IV-4). Ces ions étant très peu observables lorsque le noyau B est non substitué [15, 22].

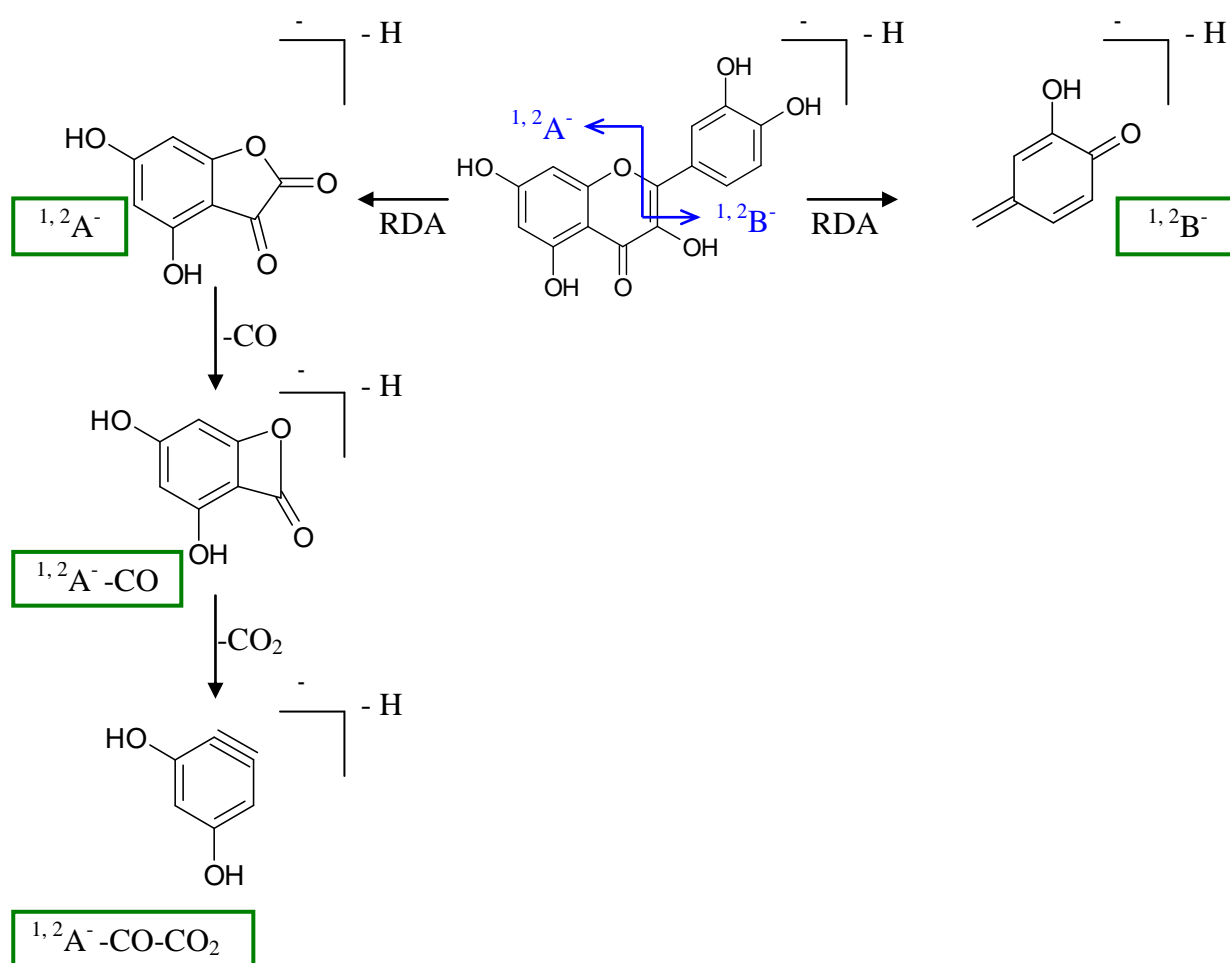


Figure IV-4: Schéma de fragmentations obtenu pour la quercétine en mode négatif après rupture RDA entre les liaisons 1/2. Adapté de Ma *et al.* [27] et Justino *et al.* [24]. cyc: cyclisation.

Tout comme avec le mode positif, les ions moléculaires peuvent être sujets à des pertes de neutres en mode négatif, dont les plus fréquentes sont la perte de CO (28 u), CO₂ (34 u), C₂H₂O (42 u), 2CO (56 u) ou la perte successive de CO et CO₂ (72 u), spécifique au mode

négatif. Les composés méthylés sont caractérisés par la perte de 15 u correspondant à la perte du CH₃ et qui généralement forme l'ion le plus abondant du spectre [M-H-CH₃]⁻. Dans certains cas, la perte directe du noyau B peut être observée, sans phénomène de rétrocyclisation [15, 19, 22].

II.2.4. Fragmentation des flavonoïdes-*O*-glycosylés

Selon leurs structures, les flavonoïdes-*O*-glycosylés peuvent subir à la fois un clivage hétérolytique et homolytique permettant de déterminer la nature du sucre et sa position sur la génine [23]. Le clivage hétérolytique produit une coupure de la liaison osidique avec réarrangement des protons. L'ion fragment Y₀[±] correspondant à la génine est alors formé et l'élimination du sucre produit des pertes caractéristiques qui permettent de déterminer facilement la nature de celui-ci. Par exemple les pertes de 162, 146, 132 et 308 u sont respectivement spécifiques de l'élimination d'un hexose, d'un déoxyhexose, d'un pentose et d'un disaccharide [19]. Le clivage homolytique de liaisons *O*-glycosidiques produit l'ion radicalaire de la génine [Y₀ - H][±]. Hvattum et Ekeberg [23] ont étudiés en mode négatif l'abondance de cet ion radicalaire pour différents types de flavonoïdes-*O*-glycosylés. Pour les flavonols, ils ont démontré que la proportion relative de [Y₀ - H]⁻ augmentait avec le nombre de groupements hydroxyles sur le noyau B, et que la nature et la position des sucres sur la génine avait une influence sur la formation de cet ion radicalaire. Une glycosylation en position 7 conduit à une proportion plus importante de [Y₀ - H]⁻ par rapport à une glycosylation en position 3.

II.3. Identification des molécules présentes dans les fractions F1 à F8 de l'extrait PSFME

Toutes les fractions ont été analysées par HPLC-UV-MS/MS dans le but d'identifier la majorité des molécules phénoliques. Toutes les molécules détectées ont été caractérisées par étude de leur fragmentation obtenue par ESI-MS/MS en mode négatif et positif, en comparant les données obtenues avec la littérature [15, 22, 30] et le cas échéant par l'injection de standards dans les mêmes conditions chromatographiques.

La figure IV-5 montre les chromatogrammes des fractions obtenus à 279 et 366 nm par HPLC-DAD avec assignation des pics majoritaires. L'analyse détaillée des fractions en HPLC-MS/MS avec une ionisation en mode négatif, mode le plus sensible et le plus informatif, a permis de caractériser des acides phénoliques, des flavonols aglycones et des flavonols ayant différents degrés de glycosylation.

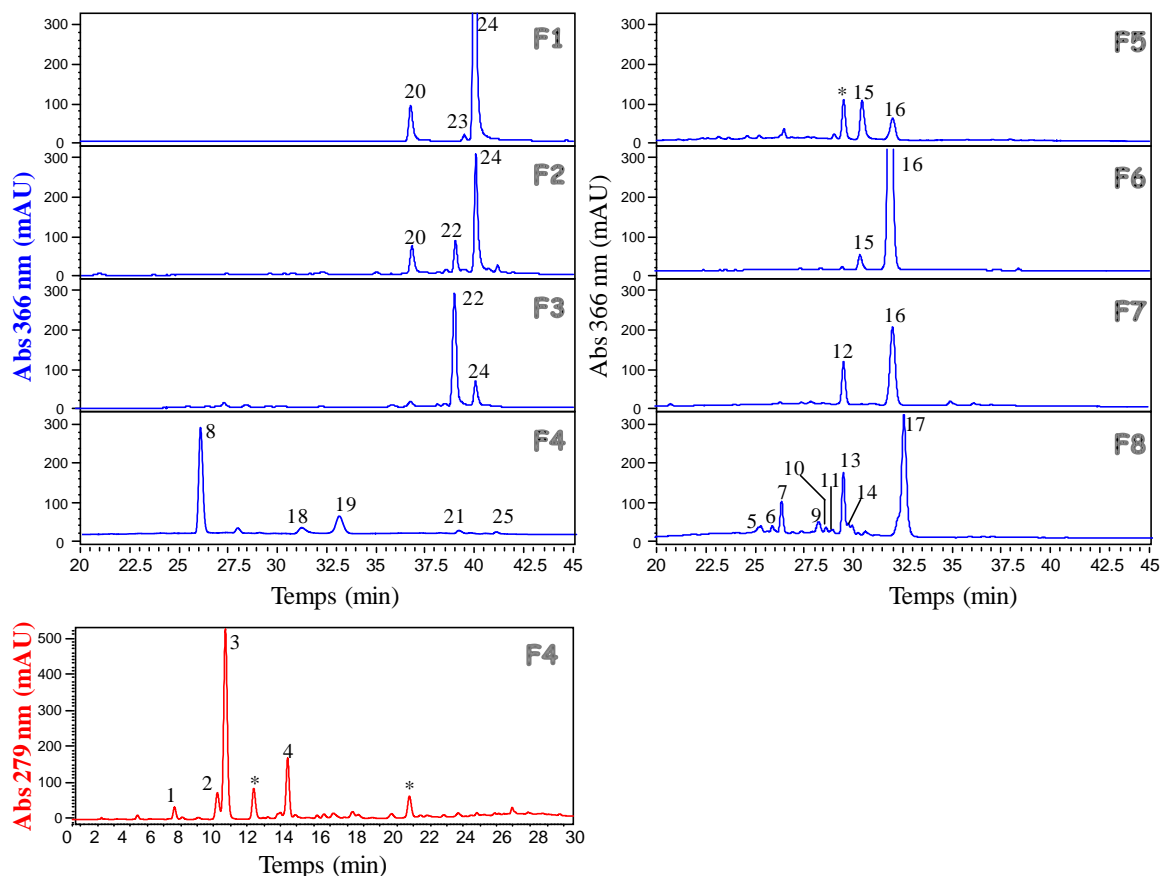


Figure IV-5: Chromatogrammes des fractions F1 à F8 obtenus par HPLC-DAD à 366 nm (bleu) et de la F4 à 279 nm (rouge) sur la colonne. * non identifié. Alltima C18 (150 × 4.6 mm ID, 5 µm) à 25°C, 1 mL/min, injection 20 µL.

➤ Fractions F1, F2 et F3

Dans F1, les composés **20** et **24**, présentant respectivement un rapport m/z de 301 et 315 en mode négatif $[M-H]^-$ et des ions fragments caractéristiques de flavonols, ont été identifiés comme étant la quercétine (**20**) et l'isorhamnétine (**24**) (Tableau IV-1 et Fig. IV-6). Les schémas de fragmentation observés corroborent ceux réalisés lors de précédents travaux [15, 22]. Un autre flavonol aglycone, le kaempférol (**23**), a également été caractérisé dans F1 à partir de son ion $[M-H]^-$ de rapport m/z de 285.

Tableau IV-1: Récapitulatif des principaux ions fragments obtenus en ESI MS/MS à partir des ions pseudo moléculaires [M-H]⁻ des composés **20** et **24** identifiés comme étant la quercétine et l'isorhamnétine.

	Quercétine (20)	Isorhamnétine (24)
	m/z	m/z
[M-H] ⁻	301	315
[M-H-CH ₃] ⁻	-	300
[M-H-CO] ⁻	273	-
[M-H-CO ₂] ⁻	-	271
[M-H-H ₂ O-CO] ⁻	255	-
[M-H-cycle B] ⁻	193	-
^{1,2} A ⁻	179	-
^{1,3} B ⁻	-	164
^{1,3} A ⁻	151	151
^{1,2} B ⁻	121	-
^{0,4} A ⁻	107	107

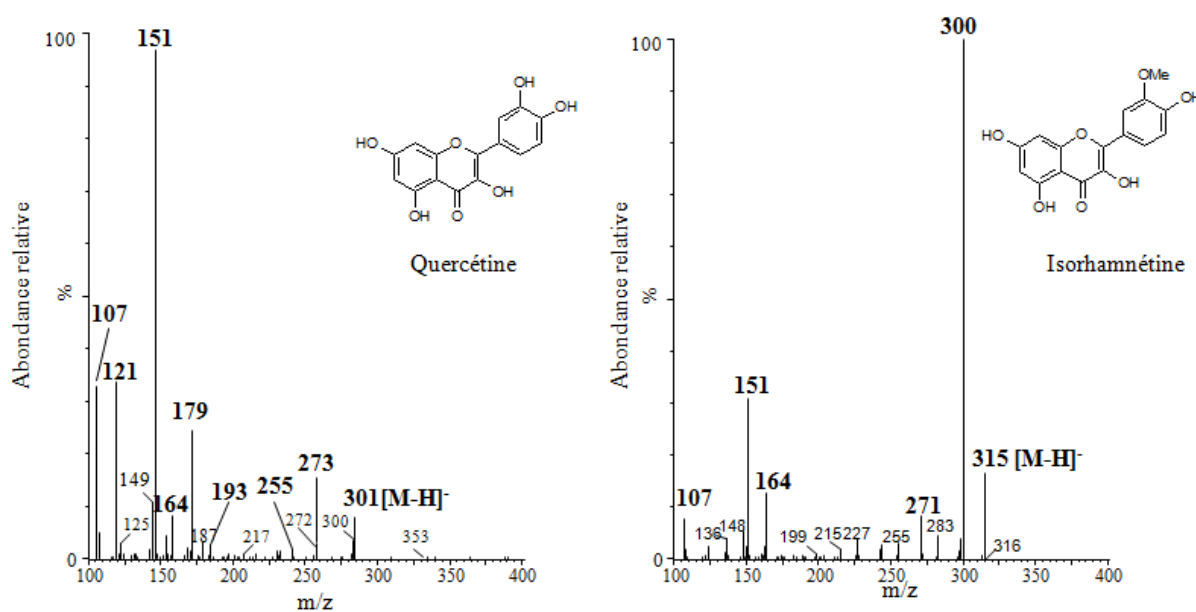


Figure IV-6: Spectres d'ions produits (ions fils) à partir de l'ion [M-H]⁻ m/z 301 pour la quercétine (**20**) et à partir de l'ion [M-H]⁻ m/z 315 pour l'isorhamnétine (**24**). Spectres obtenus en mode négatif avec un triple quadripôle Quattro Ultima Micromass équipé d'une source ESI. L'énergie de collision est de -25eV.

La quercétine et l'isorhamnétine sont les deux principaux flavonols de l'argousier. Ainsi, la connaissance de leur schéma de fragmentation respectif (Tableau IV-1) permettra d'identifier plus facilement leurs dérivés glycosylés. Par exemple, dans les fractions F2-F3, il a pu être identifié, en comparant avec la littérature [30], l'isorhamnétine-7-O-rhamnoside (**22**), autre flavonol caractéristique de l'extrait PSFME, avec un rapport m/z à 461 pour l'ion $[M-H]^-$, un ion fils $[M-H-146]^-$ ou (Y_0^-) de m/z à 315 et l'ion m/z à 151 ($^{1,3}A^-$) produit de la fragmentation de la génine de type isorhamnétine.

➤ Fraction F4

F4 est une fraction dans laquelle ont pu être détectées plusieurs structures originales mais qui n'ont pas été toutes confirmées. Si on se focalise sur le chromatogramme HPLC-UV présenté à 366 nm (Fig. IV-5), le pic majoritaire élué à 25,9 min (**8**) est caractérisé par un spectre UV avec un maximum d'absorbance à 373 nm (Fig. IV-7) caractéristique d'une chalcone ou d'une aurone [31]. La molécule semble avoir une masse de 222, comme l'atteste la présence respective des ions avec un rapport m/z 221 $[M-H]^-$ et m/z 223 $[M+H]^+$ en mode négatif et positif. De plus, une perte d'eau m/z à 205 $[M+H-H_2O]^+$ est visible en ESI+. Cependant, l'apport de la RMN est ici indispensable pour déterminer la structure de cette molécule qui n'a jamais été décrite dans les baies d'argousier.

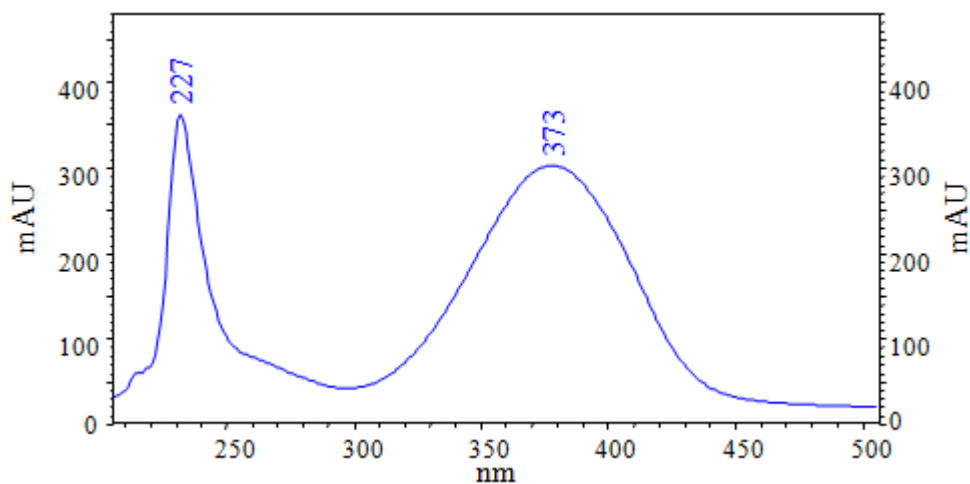


Figure IV-7: Spectre d'absorbance UV-Vis du composé **8** obtenu par HPLC-DAD

Les deux composés **18** et **19** sont deux molécules isobares avec un rapport m/z égal à 447 $[M-H]^-$ se différenciant par leurs fragments respectifs Y_0^- m/z de 315 $[M-H-132]^-$ (**18**) et m/z de 301 $[M-H-146]^-$ (**19**). Le composé **18** semble être de l'isorhamnétine monoglycosylée. La perte de 132 u indique la présence d'un pentose et la forte proportion de l'ion radicalaire

m/z à 314 $[Y_0-H]^-$ laisse penser à une glycosylation en position 3 de la génine. En revanche, la perte de 146 u caractéristique d'un désoxyhexose, tel que le rhamnose, et la présence de fragments caractéristiques de la quercétine $^{1,3}A^-$ et Y_0^- indique que le composé **19** est une quercétine rhamnoside (Fig. IV-8). De plus, la faible abondance de l'ion radicalaire m/z à 300 $[Y_0-H]^-$ suggère une glycosylation au niveau de la position 7 de la quercétine, ce qui correspondrait à la quercétine-7-*O*-rhamnoside, déjà identifiée dans les baies d'argousier [30].

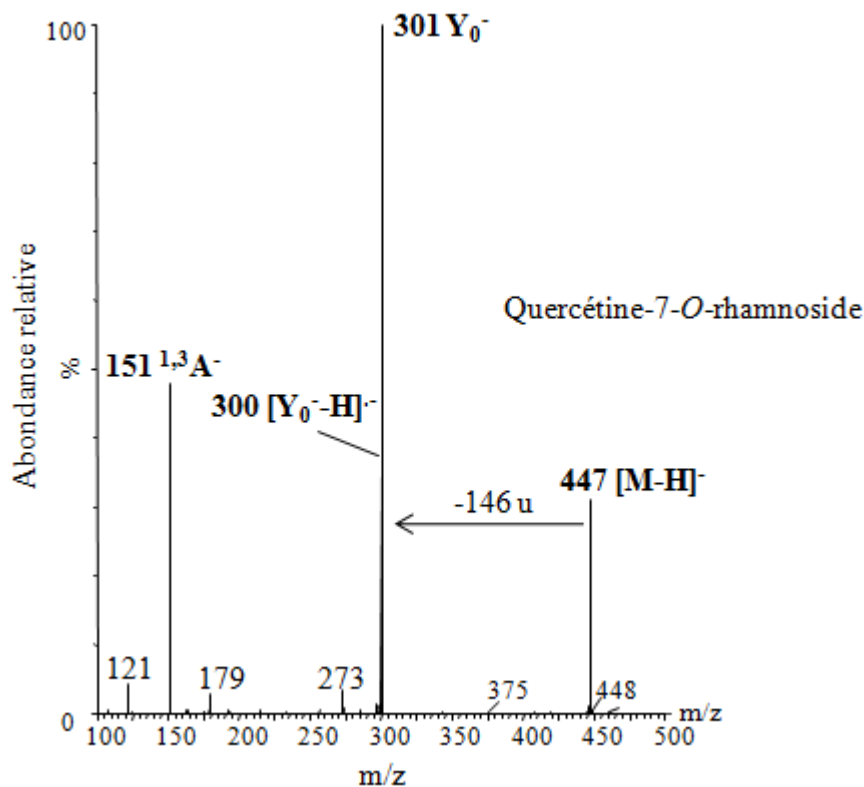


Figure IV-8: Spectre d'ions produits (ions fils) à partir de l'ion $[M-H]^-$ m/z 447 de la quercétine-7-*O*-rhamnoside (**19**) obtenu en mode négatif avec un triple quadripôle Quattro Ultima Micromass équipé d'une source ESI. L'énergie de collision est de -25eV.

Enfin également deux isomères dérivés de l'isorhamnétine, les composés **21** et **25**, possédant un ion $[M-H]^-$ de rapport m/z à 707 ont été détectés. Ils présentent le même schéma de fragmentation (Fig. IV-9) c'est-à-dire un rapport m/z à 545 $[M-H-162]^-$ correspondant à la perte d'un hexose, un rapport m/z à 477 $[M-H-162-68]^-$ et un rapport m/z à 315 (Y_0^-) qui nous indique que la génine est l'isorhamnétine. La différence entre les ions fragments m/z 477 et 315 correspond également à une perte 162 u indiquant la présence d'un deuxième hexose lié à la génine sur une position différente du premier. Néanmoins, leur identification complète nécessite la RMN afin d'identifier la position et la nature des sucres et la partie non osidique de 68 u.

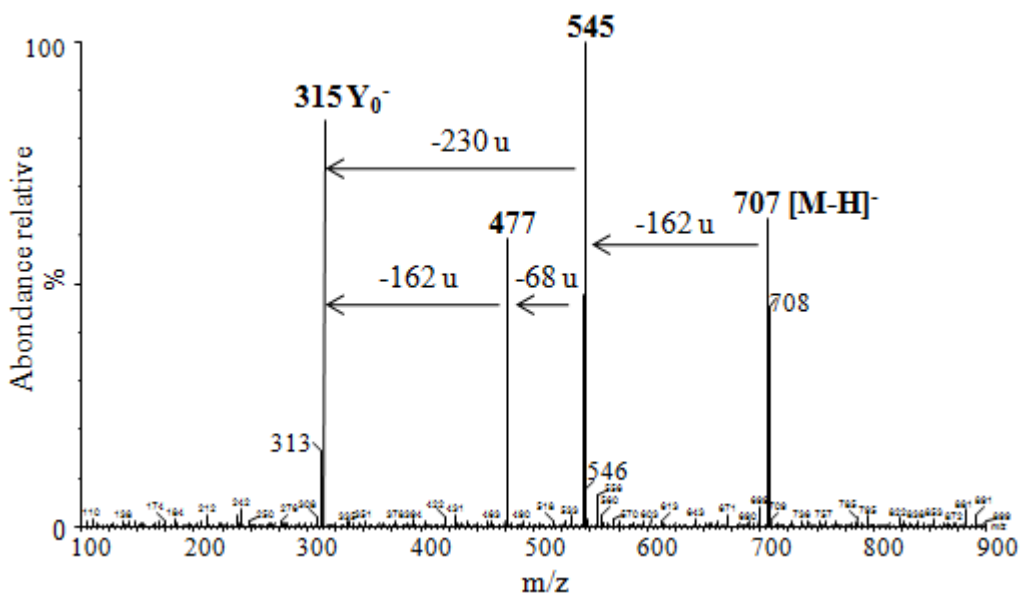


Figure IV-9: Spectre d'ions produits (ions fils) à partir de l'ion $[M-H]^-$ m/z 707 des composés **21** et **25** obtenu en mode négatif avec un triple quadripôle Quattro Ultima Micromass équipé d'une source ESI. L'énergie de collision est de -25eV .

Des acides phénoliques ont également été identifiés dans la fraction F4 tels que l'acide gallique (**1**) avec un rapport m/z de 169 pour l'ion parent $[M-H]^-$ et l'acide protocatéchique (**4**) avec un rapport m/z de 153 pour l'ion parent $[M-H]^-$. Ces deux ions parents perdent facilement leur fonction acide pour donner respectivement des ions fils $[M-H-COOH]^-$ m/z 125 et m/z 109.

➤ Fractions F5, F6 et F7

Les fractions 5 à 7 sont constituées principalement de dérivés monoglucosylés de la quercétine et de l'isorhamnétine tel que la quercétine-3-*O*-glucoside (**12**) et l'isorhamnétine-3-*O*-glucoside (**16**). La structure de ces deux molécules a été confirmée en injectant les standards correspondant et en analysant leurs spectres de masse obtenus après fragmentation de leurs ions pseudos moléculaires $[M-H]^-$ respectifs m/z à 463 et m/z à 477 (Fig. IV-10). Les deux montrent une perte de 162 u informative de la présence d'un hexose (ici le glucose). De plus, la forte abondance de l'ion Y_0^- , m/z à 300 et m/z à 314, confirme que la liaison osidique a bien lieu au niveau de la position 3 de la génine.

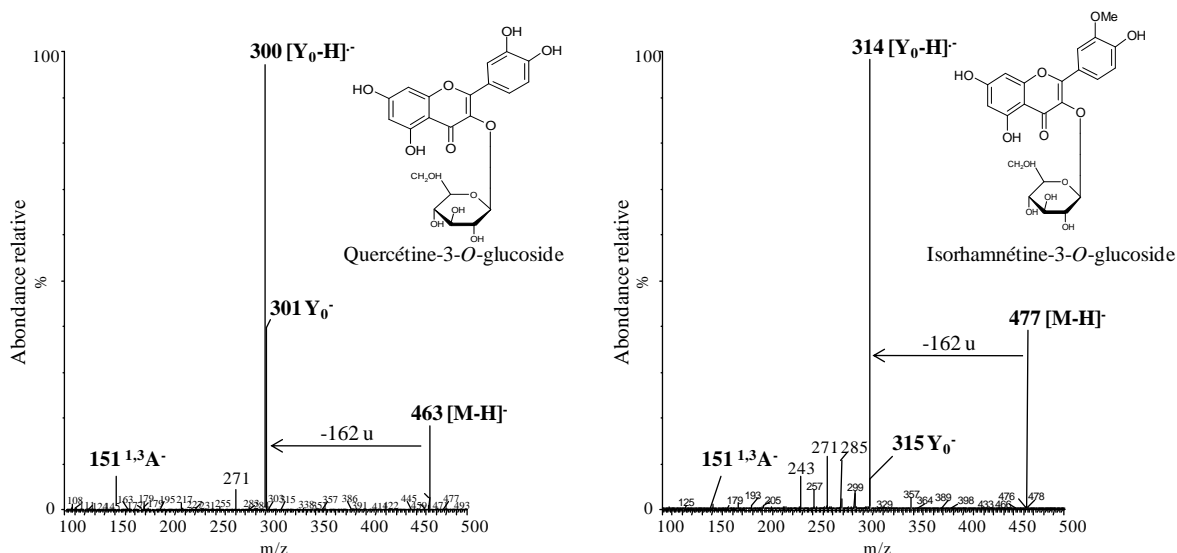


Figure IV-10: Spectres d'ions produits (ions fils) à partir de l'ion $[M-H]^-$ m/z 463 et 477 des composés **12** et **16** obtenus en mode négatif avec un triple quadripôle Quattro Ultima Micromass équipé d'une source ESI. L'énergie de collision est de -25eV .

➤ Fraction F8

La fraction F8 est une fraction qui est principalement constituée de flavonols di- à triglycosylés et parfois acylés. La majorité de ces molécules a été identifiée en comparant les rapports m/z des fragments obtenus aux valeurs obtenues par Rösch *et al.* [30]. Pour exemple, la quercétine diméthyl éther 3-hydroxyferuoyl-glucosylglucoside-7-*O*-rhamnoside (**9**) qui possède un rapport m/z de 991 $[M-H]^-$ et des ions fragments m/z à 845 $[M-H-146]^-$ et 653 $[M-H-146-192]^-$ suggèrent l'acylation d'un ose (m/z 146) à un acide férulique (m/z 192). Cependant, nous nous sommes également appuyés sur le comportement particulier des dérivés diglycosylés isomères lorsqu'ils sont soumis à une fragmentation (Fig. IV-11). En effet, il a été observé que lorsque les deux sucres étaient liés sur deux positions différentes de la génine, comme c'est le cas pour l'isorhamnétine-3-*O*-glucoside-7-*O*-rhamnoside (**13**) m/z de 623 $[M-H]^-$, la fragmentation de l'ion parent produit, en plus de l'ion Y_0^- , deux ions fils m/z à 477 $[M-H-146]^-$, et m/z 461 $[M-H-162]^-$ qui correspondent respectivement à la perte du rhamnose (position 7) et du glucose (position 3). Alors que dans le cas d'un flavonol diglycosylé sur la même position, la fragmentation induit un seul ion fils correspondant à la perte simultanée des deux oses. Ainsi, pour l'isorhamnétine-3-*O*-rutinoside (**17**) m/z de 623 $[M-H]^-$, l'ion produit possède un rapport m/z de 315 $[M-H-308]^-$ équivalent à la perte du rutinoside.

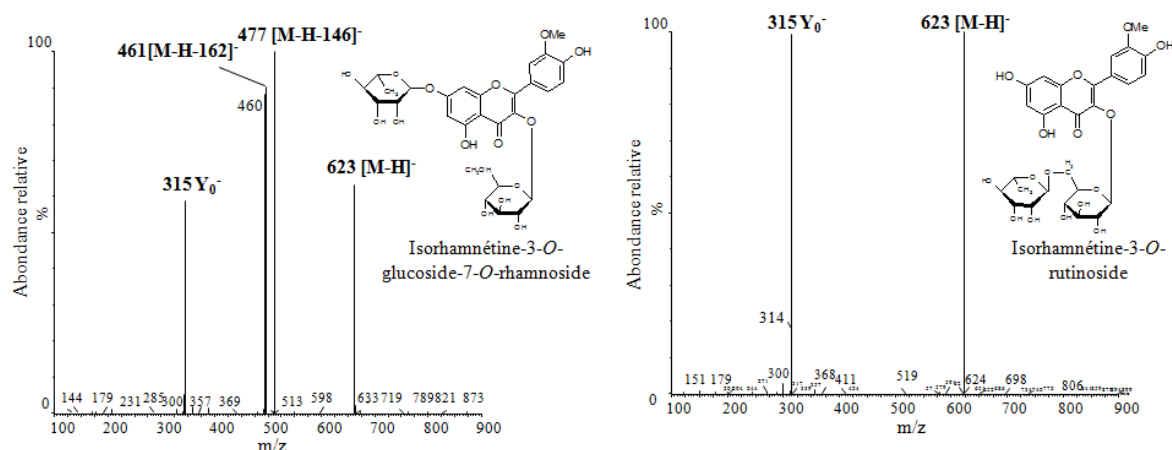


Figure IV-11: Spectres d'ions produits (ions fils) à partir de [M-H]⁻ l'ion m/z 623 de l'isorhamnétine-3-*O*-glucoside-7-*O*-rhamnoside (**13**) et de l'isorhamnétine-3-*O*-rutinoside (**17**) obtenus en mode négatif avec un triple quadripôle Quattro Ultima Micromass équipé d'une source ESI. L'énergie de collision est de -25eV.

Le tableau IV-2 résume les données spectrales obtenues par UV et par MS/MS à partir desquelles ont pu être identifiées 3 acides phénoliques et 20 dérivés de flavonols dans l'extrait PSFME de baies d'argousier. De plus, deux autres molécules (**3** et **8**) de la fraction F4 sont en cours d'identification par RMN. Après analyse des spectres de masse correspondants aux pics majoritaires, il a pu être déterminé que la fraction F1 est uniquement constituée de flavonols aglycones, que dans les fractions F2 à F7 sont présents des flavonols aglycones et monoglycosylés, alors que la fraction F8 est constituée de structures plus complexes (flavonols acylés et/ou di, triglycosylés). Par ailleurs, parmi les molécules identifiées on retrouve des flavonols majoritaires des baies d'argousier [32, 33] ainsi que des dérivés minoritaires qui sont peu décrits dans la littérature [30]. Ainsi ces résultats obtenus avec les baies d'argousier confirment que la méthodologie employée combinant extraction PSFME et fractionnement guidé par CPC-HPLC permet d'extraire et analyser les produits naturels d'une matrice végétale complexe.

Tableau IV-2: Maximums d'absorption et ions caractéristiques des acides phénoliques et flavonols détectés dans l'extrait PSFME de baies d'argousier.

Assignation	Tr (min)	Fraction	λ max (nm)	Mode Négatif		Mode positif		Proposition de Structure
				[M-H] ⁻	MS-MS (m/z)	[M+H] ⁺	MS-MS (m/z)	
1	6.5	4-5	270	169	125, 107	171	127, 109	Acide gallique
2	10.4	4-5-6	254	153	125, 107, 80	155	127, 109, 81, 53	Acide 3,4 dihydroxybenzoïque
3	11.2	4		285	175, 199			En cours d'identification
4	14.4	4-5	258, 293	153	109	155	111, 137	Acide protocatéchique
5	24.3	8	254, 270(ep), 349	771		773		Quercétine-3- <i>O</i> -Glu-Glu-7- <i>O</i> -rhamnoside
6	24.9	8	254, 267(ep), 349	785		787		Isorhamnétine-3- <i>O</i> -Glu-Glu-7- <i>O</i> -rhamnoside
7	25.4	8	254, 267(ep), 353	785	639, 179, 125	787		Isorhamnétine-3- <i>O</i> -sophoroside-7- <i>O</i> -rhamnoside
8	25.9	4	373	221		223	205	En cours d'identification
9	26.8	8	254, 267(ep), 345	991	845, 653, 639	993		Quercétine diméthyl éther 3-hydroxyferuoyl-glucosylglucoside-7- <i>O</i> -rhamnoside
10	27.1	8	254, 267(ep), 339	991	769, 623	993	771	Dérivé triglycosylé acylé de l'isorhamnétine
11	27.6	8	254, 267(ep), 319	809	623, 609	811	625	Dérivé glycosylé de l'isorhamnétine
12	28.4	6-7	255, 356	463	300, 179, 151, 125	465	303	Quercétine-3- <i>O</i> -glucoside
13	28.5	8	251, 261(ep), 354	623	477, 461, 315	625	463	Isorhamnétine-3- <i>O</i> -glucoside-7- <i>O</i> -rhamnoside
14	28.9	8	254, 266 (ep), 354	609	301, 257, 149	611	303	Quercétine-3- <i>O</i> -rutinoside
15	30.1	5-6		477	315, 151	479	317, 302	Isorhamnétine monoglycosylé
16	31.6	5-6-7	254, 265(ep), 354	477	315, 314, 285, 271, 179, 151	479	317, 302	Isorhamnétine-3- <i>O</i> -glucoside
17	32.3	8	253, 266 (ep),	623	315, 314, 300	625	317	Isorhamnétine-3- <i>O</i> -rutinoside

Chapitre 4

18	33.4	4	355 255, 268(ep), 368	447	314, 315	449		Dérivé monoglycosylé de l'isorhamnétine Isorhamnétine-3-O-pentoside
19	34.5	4	253, 267(ep), 355	447	301, 179, 151	449		Quercétine-7-O-rhamnoside
20	35.5	1-2	254, (268 ep), 368	301	151, 179, 121, 107	303	153, 137, 165, 121, 229, 257	Quercétine
21	38.1	4		707	545, 477, 315	709	317	Dérivé acylé diglycosylé de l'isorhamnétine
22	38.4	2-3	255, 266 (ep), 370	461	315, 151	463	317, 153	Isorhamnétine-7-O-rhamnoside
23	39.2	1	253, 264(ep), 365	285	151, 185	287	153, 121, 183	Kaempférol
24	40.3	1-2-3	253, 266(ep), 370	315	300, 151, 107	317	302, 285, 229, 153, 139, 165	Isorhamnétine
25	41.1	4		707	545, 477, 315	709	317	Dérivé acylé diglycosylé de l'isorhamnétine

III. Bioactivité des flavonoïdes, de l'extrait PSFME et de ses fractions

III.1. Activité antioxydante

Les antioxydants sont des molécules qui, lorsqu'elles sont présentes à faible concentration par rapport au substrat oxydable, retardent ou stoppent le processus d'oxydation, et ainsi régulent l'équilibre redox cellulaire [34]. La capacité antioxydante de molécules peut être évaluée soit de façon *in vivo*, sur des organismes vivants, soit de manière *in vitro*, en utilisant des tests qui miment le phénomène physiologique. Pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro* d'extraits naturels, différentes méthodes ont été développées. Ces méthodes impliquent le mélange d'espèces oxydantes, tels que des radicaux libres ou des complexes métalliques oxydés, avec un échantillon qui contient des antioxydants capables d'inhiber la génération de radicaux. Ces antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes majeurs [11]: soit par transfert d'atome d'hydrogène, soit par transfert d'électron. Les méthodes basées sur le transfert d'atome d'hydrogène mesurent la capacité globale d'un antioxydant à réprimer les radicaux libres par donation d'un atome d'hydrogène, alors que les méthodes basées sur le transfert d'électron mesurent la capacité d'un antioxydant à transférer un électron qui réduira n'importe quel composé, incluant les métaux, les carbonyles et les radicaux. Ainsi, compte tenu des différents facteurs impliqués, tels que les propriétés physico-chimiques des molécules, le type de test employé ou l'état d'oxydation des substrats, il est recommandé d'utiliser au moins deux tests pour confirmer une activité antioxydante [11, 35]. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur l'utilisation de deux tests chimiques: le test évaluant le piégeage des radicaux libres et employant le 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle sous sa forme radicalaire (DPPH[•]), impliquant le transfert d'atome d'hydrogène et le transfert d'électron, et le test déterminant le pouvoir réducteur antioxydant (FRAP, Ferric Reducing Antioxydant Power) basé sur le transfert d'électron. La détermination de la teneur en composés phénoliques totaux (TPC, Total Phenolic Content) a également été employée pour compléter l'évaluation chimique *in vitro*. En plus de ces tests chimiques, nous avons également testé *in cellulo* l'activité antioxydante sur des fibroblastes humains issus de la peau soumis à un stress oxydatif, permettant ainsi de comparer l'effet de l'extrait brut PSFME et de ses fractions sur des modèles chimiques et cellulaires.

III.2. Détermination de l'activité antioxydante par des tests chimiques *in vitro*

La capacité antioxydante de l'extrait brut PSFME et des fractions a été évaluée à une concentration de 1 mg/mL (Annexe 6).

III.2.1. Mesure du pouvoir anti-radicalaire par le test DPPH[•] (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle)

III.2.1.1. Principe

La méthode du DPPH[•] introduite par Blois [36] est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire stable DPPH[•] en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH), qui aboutit à la formation d'une forme non-radicalaire, le DPPH-H (Fig. IV-12).

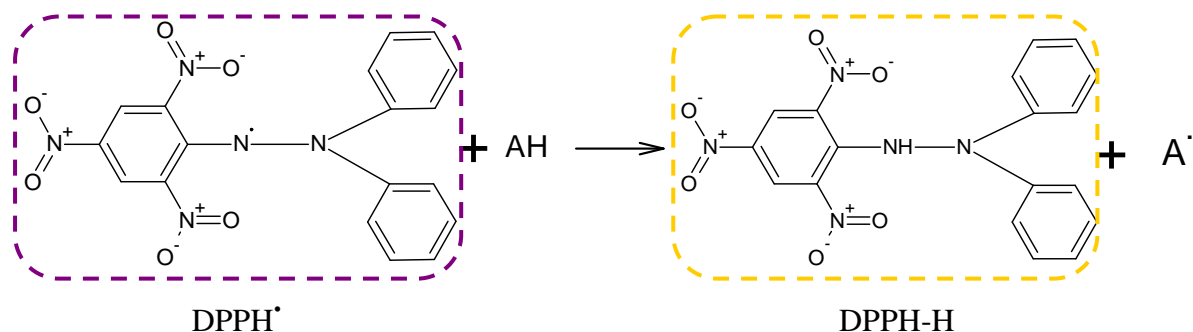


Figure IV-12: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH[•] entre l'espèce radicalaire DPPH[•] et un antioxydant (AH).

La réduction du DPPH[•] en DPPH-H induit une perte de sa couleur violette qui peut être suivie à 517 nm (Annexe 6). La capacité antioxydante de nos échantillons a été exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH[•] suivant l'équation:

$$\% \text{ inhibition} = \left[\frac{A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{blanc}}} \right]_{t=30 \text{ min}} \times 100$$

- A_{blanc} correspond à l'absorbance du blanc après 30 min
- $A_{\text{échantillon}}$ correspond à l'absorbance de l'échantillon après 30 min

Ainsi plus la perte de couleur est rapide plus le donneur d'hydrogène est considéré comme un antioxydant fort.

III.2.1.2. Résultats

La figure IV-13 représente la capacité antioxydante, exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH[•], d'un témoin positif antioxydant, le trolox, analogue hydrosoluble de la vitamine E, de l'extrait PSFME et des huit fractions simplifiées de cet extrait. L'extrait et les fractions ont été évaporés à sec et remis en solution dans MeOH à une

même concentration de 1 mg/mL. Les résultats montrent que l'extrait PSFME est aussi actif voire plus que la solution témoin de trolox. Parmi les fractions, il apparaît que l'activité ne se retrouve pas de la même façon dans toutes les fractions. Les fractions F1, F2 et F5 possèdent la capacité antioxydante la plus faible, tandis que les fractions F3, F4 et F6 présentent des activités comparables à celles de l'extrait brut et du trolox. Les fractions F7 et F8 présentent une activité élevée mais qui est significativement différente de celle de l'extrait brut et du trolox ($p < 0.0001$), et qui peut être donc qualifiée d'intermédiaire.

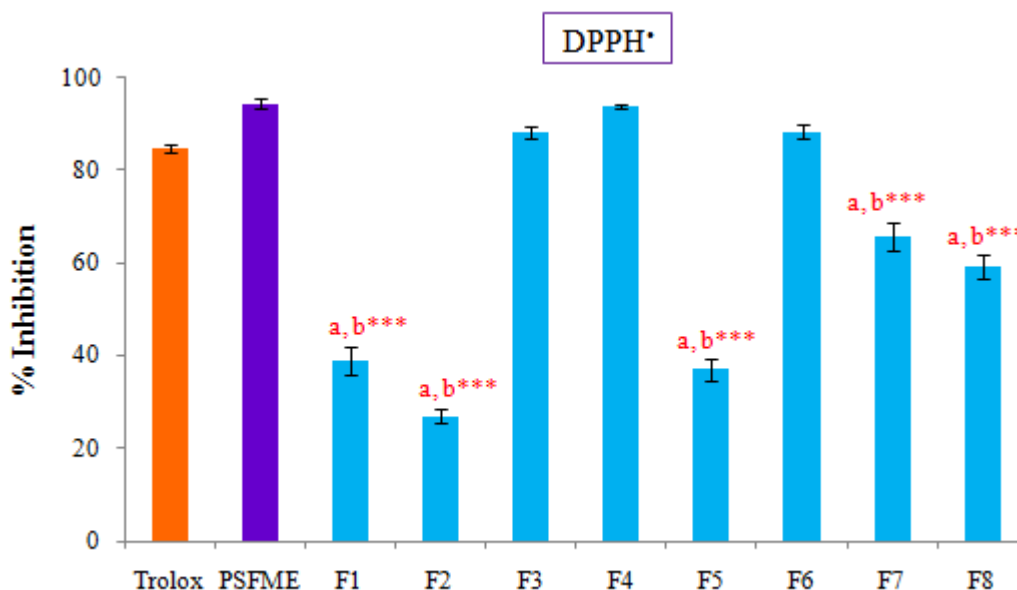


Figure IV-13: Test DPPH[•]: Histogrammes, exprimés en pourcentage d'inhibition (%), illustrant l'activité antioxydante du Trolox, de l'extrait PSFME (PSFME) et des fractions (F1 à F8) à la concentration de 1 mg/mL. **a** et **b** signifient respectivement statistiquement différent du Trolox et de PSFME. *** indique la significativité avec un niveau de confiance de 99.9 %, $n = 3$.

III.2.2. Pouvoir réducteur (FRAP, Ferric Reducing Antioxydant Power)

III.2.2.1. Principe

La méthode FRAP développée par Benzie et Strain [37] correspond à la réduction d'un complexe tripyridyltriazine ferrique $[(\text{Fe(III)-TPTZ})_2]$ en un complexe tripyridyltriazine ferreux $[(\text{Fe(II)-TPTZ})_2]$ par un antioxydant (AH), à un pH de 3.6 pour maintenir la solubilité du fer (Fig. IV-14).

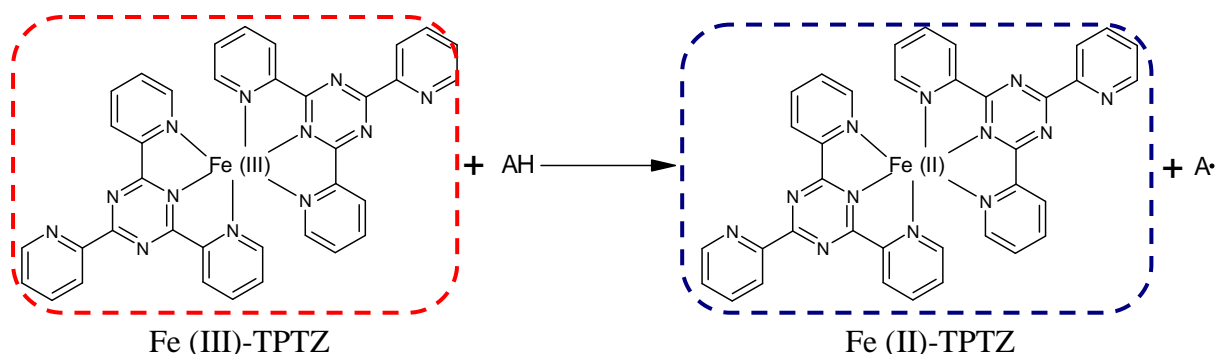


Figure IV-14: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)-TPTZ et un antioxydant (AH).

Lors de la réduction du complexe ferrique en complexe ferreux une coloration bleue intense apparaît très rapidement avec un maximum d'absorption à 593 nm (Annexe 6). Pour s'assurer de la linéarité de la méthode et calculer les résultats, une gamme étalon est d'abord réalisée avec une solution aqueuse de sulfate de fer heptahydraté ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) entre 100 et 1000 μM . A partir des valeurs d'absorbance lues à 593 nm et mesurées à $t = 0$ min puis à $t = 4$ min après le mélange, les résultats peuvent être exprimés en valeur FRAP suivant la formule:

$$\text{valeur FRAP} = \frac{A_{(\text{échantillon})t=4 \text{ min}} - A_{(\text{échantillon})t=0 \text{ min}}}{A_{(\text{standard})t=4 \text{ min}} - A_{(\text{standard})t=0 \text{ min}}} \times [\text{standard}] (\mu\text{M})$$

- $A_{\text{échantillon}}$ correspond à l'absorbance de l'échantillon à $t = 0$ ou $t = 4$ min
- A_{standard} correspond à l'absorbance de la solution de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à $t = 0$ ou $t = 4$ min
- [standard] correspond à la concentration en $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Plus la couleur bleue est intense, plus l'échantillon peut être considéré comme un bon réducteur.

III.2.2.2. Résultats

Les résultats du test FRAP (Fig. IV-15), exprimés en valeur FRAP, sont légèrement différents de ceux obtenus avec le test DPPH $^\bullet$. Pour le test FRAP, l'activité du trolox est significativement supérieure à celle de l'extrait PSFME et des fractions ($p < 0,0001$). Les fractions les plus actives sont les fractions F6, F7 et F8 tandis que les fractions F3 et F4, les plus actives avec le test DPPH $^\bullet$, le sont moins avec le test FRAP. Ceci tend à indiquer que l'activité antioxydante des fractions F6, F7 et F8 serait liée de façon privilégiée à un mécanisme de transfert d'électron, tandis que pour les fractions F3 et F4 l'activité serait due à principalement à un transfert de proton renforcé par rapport au transfert d'électron.

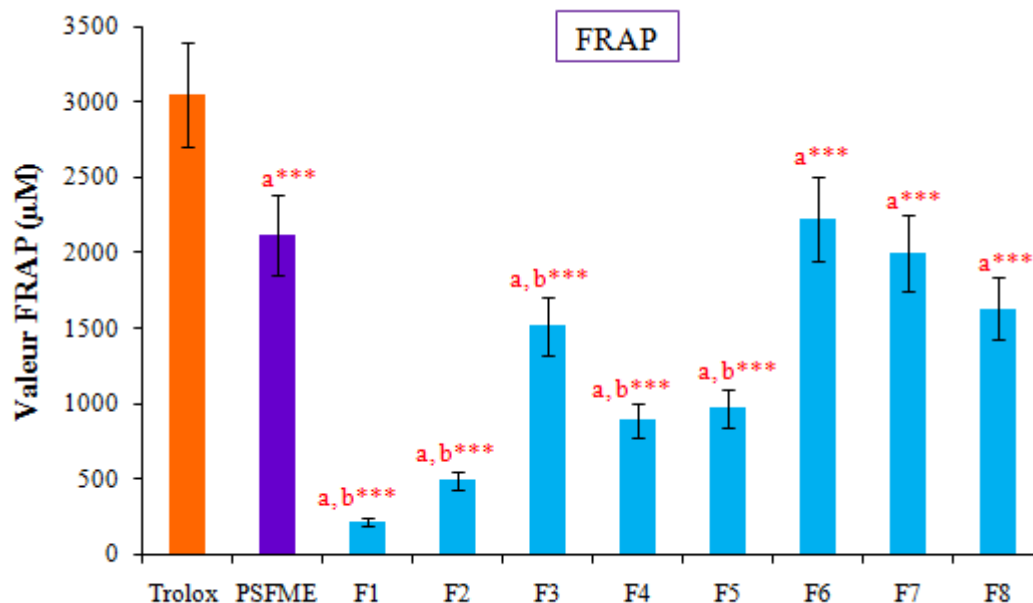


Figure IV-15: Test FRAP: Histogrammes, exprimés en valeur FRAP (μM), illustrant l'activité antioxydante du Trolox, de l'extrait PSFME (PSFME) et des fractions (F1 à F8) à la concentration de 1 mg/mL. **a** et **b** signifient respectivement statistiquement différent du Trolox et de PSFME. *** indique la significativité à un niveau de confiance de 99.9 %, $n = 3$.

Le test FRAP confirme la perte d'activité observée pour les fractions F1, F2 et F5 par rapport à l'extrait brut. Le fractionnement de l'extrait brut s'avère donc efficace pour concentrer l'activité antioxydante dans certaines fractions simplifiées, ce qui sera un atout en vue de l'identification des molécules responsables de cette activité.

III.2.3. Détermination de la teneur en composés phénoliques totaux (TPC, Total Phenolic Content)

III.2.3.1. Principe

La TPC a été déterminée *via* le test de Folin-Ciocalteu (FC) basé sur la réduction d'un complexe jaune de molybdotungstane par les composés phénoliques donnant une coloration bleu au produit de la réaction [38] (Annexe 6). Après une période d'incubation de 2h à l'obscurité, les absorbances ont été lues à 760 nm. Les résultats ont été exprimés en équivalence d'acide gallique (GAE, Gallic Acid Equivalent) en utilisant une gamme étalon allant de 0.1 et 0.5 mg/mL d'acide gallique dissous dans du MeOH.

III.2.3.2. Résultats

La détermination des composés phénoliques totaux via le test FC (Fig. IV-16) met en évidence que les fractions les plus riches en composés phénoliques sont les fractions F4, F6 et la F7 avec respectivement une GAE de 0,74, 1,4 et 0,7 mg/mL. Ce test, basé sur une réaction d'oxydo-réduction, peut être également considéré comme une méthode permettant d'évaluer l'activité antioxydante [11]. De ce fait, les fractions les plus riches en composés phénoliques peuvent être également considérées comme les plus antioxydantes.

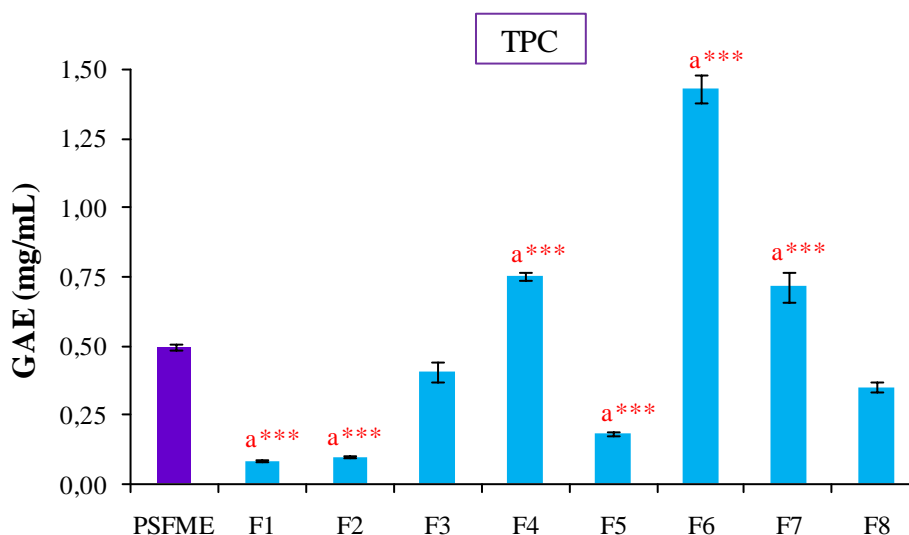


Figure IV-16: Histogrammes, exprimés en équivalence d'acide gallique (GAE), illustrant la teneur en composés phénoliques totaux (TPC) de l'extrait PSFME (PSFME) et des fractions (F1 à F8) à la concentration de 1 mg/mL. **a** signifie statistiquement différent de PSFME. ******* indique la significativité à un niveau de confiance de de 99.9 %, n = 3.

Sur la figure IV-16 on peut remarquer que pour les fractions F4, F6 et F7 la TPC est significativement supérieure à celle de l'extrait brut PSFME ($p < 0.0001$), tandis que la TPC des fractions F1, F2 et F5 est significativement inférieure par rapport à celle de l'extrait brut PSFME ($p < 0.0001$). Ainsi, il peut être suggéré que l'activité des fractions F4, F6 et F7 soit due à la présence de composés phénoliques concentrés dans ces fractions, alors que l'activité observée pour les fractions F3 et F8 ne semble pas liée à une forte teneur en composés phénoliques mais à des antioxydants plus efficaces. La TPC faible des fractions F1, F2 et F5 est ici en bon accord avec les activités faibles de ces trois fractions obtenues avec les tests DPPH[•] et FRAP.

En se basant sur les résultats des trois tests chimiques, les fractions F3, F4, F6 et F7 peuvent être donc désignés comme les plus intéressantes en termes de capacité antioxydante, fortement liée à la présence de composés phénoliques.

III.3. Détermination de l'activité antioxydante cellulaire

Les tests cellulaires ont été réalisés sur des fibroblastes humains, cellules spécifiques du derme de la peau, dans lequel elles ont pour principale fonction la synthèse du collagène et des fibres élastiques [39]. Les fibroblastes, utilisés ici comme modèle cellulaire, sont particulièrement intéressants car ils sont associés au vieillissement de la peau suite à des expositions prolongées à des rayonnements UV. Dans notre étude, les fibroblastes ont été soumis à un stress oxydatif induit par une irradiation UV à 1J/cm² (365nm, UVA) (Annexe 7).

III.3.1. Principe

La mesure de l'activité antioxydante au sein de cellules vivantes est possible en utilisant des sondes fluorescentes capables de traverser la membrane plasmique telles que la 2',7' dichlorodihydrofluoresceine di-acétate (DCFH-DA) et la dihydrorhodamine 123 (DHR123). Dans nos travaux, nous avons utilisé la DHR 123 qui absorbe la lumière dans le visible (> 400 nm) et dans l'UV (< 290 nm), mais pas entre 300 et 400 nm [40]. Cette sonde est donc particulièrement adaptée à la mesure de la quantité d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou le radical O₂⁻, produites lors d'une irradiation UV. Au contact des ERO, la DHR 123 se transforme en rhodamine 123 (RH 123⁺), cation fluorescent, qui s'accumule selon le potentiel de membrane. Celui de la membrane interne de la mitochondrie étant le plus élevé de la cellule, cette molécule s'accumulera préférentiellement dans cet organe (Fig. IV-17).

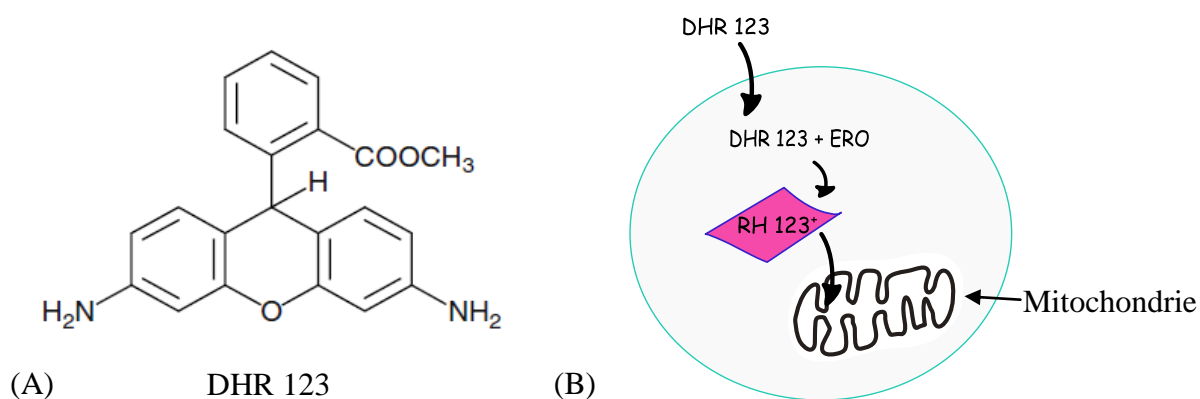


Figure IV-17: Structure chimique (A) et mode d'action (B) de la DHR 123 au sein d'une cellule soumise à un stress oxydatif. ERO, espèces réactives de l'oxygène.

Ainsi le test cellulaire que nous avons réalisé consiste, de manière simplifiée, à ajouter, après incubation de l'extrait brut ou de l'une de ses fractions avec les fibroblastes, la sonde DHR 123 puis soumettre le tout à une irradiation UV à 365 nm (Annexe 7).

L'évolution de la fluorescence au cours du temps a été suivie au spectrofluoromètre avec une longueur d'onde d'excitation à 500 nm et une longueur d'onde d'émission à 536 nm. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition suivant la formule:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{F_{\text{témoin}} - F_{\text{échantillon}}}{F_{\text{témoin}}} \times 100$$

où $F_{\text{échantillon}}$ correspond à la valeur de fluorescence obtenue pour l'échantillon, et $F_{\text{témoin}}$ correspond à la valeur moyenne de fluorescence pour des cellules non traitées.

III.3.2. Optimisation

Les effets de différents paramètres pouvant affecter la réponse des cellules, tels que l'irradiation UV et la concentration en échantillon, ont été évalués afin de déterminer les meilleures conditions de travail. Après incubation avec les échantillons, les fibroblastes ont été soumis à des irradiations UV: 0,1 J/cm² ou 1 J/cm² (365 nm, UVA). Notre étude préliminaire, nous a permis de constater aucune différence significative entre ces deux puissances d'irradiation. Par ailleurs, il est apparu que l'activité antioxydante augmentait avec la concentration en échantillon, et que pour des faibles concentrations, inférieures à 100 µg/mL, les différences d'activité entre fractions étaient peu visibles. Ainsi, il a été décidé pour notre étude approfondie, de soumettre les fibroblastes à une irradiation UV de 1 J/cm², et d'incuber pendant 4 h les cellules stressées avec les différents échantillons (standard positif, extrait PSFME et fractions) dissous dans du milieu de culture à une concentration de 1 mg/mL (Annexe 7).

III.3.3. Résultats

La figure IV-18 illustre le pourcentage d'inhibition (%) des ERO au sein des fibroblastes soumis à un stress oxydatif en présence de trolox, de l'extrait PSFME ou des fractions obtenues par CPC. La première constatation qui peut être faite est l'absence d'activité antioxydante dans ces conditions de l'extrait brut PSFME, et dans une moindre mesure de la fraction F8 qui ne montre aucune différence significative d'activité par rapport à l'extrait brut PSFME ($p > 0.05$), alors que ce même extrait présente une forte activité antioxydante d'après les tests chimiques. Bien que réalisées plusieurs fois, les expériences ont toujours mené à ce même résultat. Si on prend en compte le pourcentage massique de chaque fraction par rapport à l'extrait brut, on constate que la fraction F8 représente à elle seule, plus de 80 % de l'extrait brut. Dans cette fraction F8, il semble donc être regroupées les molécules qui empêchent l'expression d'une activité pour l'extrait brut, activité que l'ont met en

évidence en revanche pour les fractions F1 à F7. Les fractions les plus actives, quant à elles, sont les fractions F2 et F4 qui présentent un pourcentage d'inhibition de 51 %, suivis de la fraction F5 (40 %) et de la fraction F3 (31%). Ces résultats sont légèrement différents de ceux obtenus avec les tests chimiques qui faisaient ressortir les fractions F3, F4, F6 et F7 comme les plus antioxydantes.

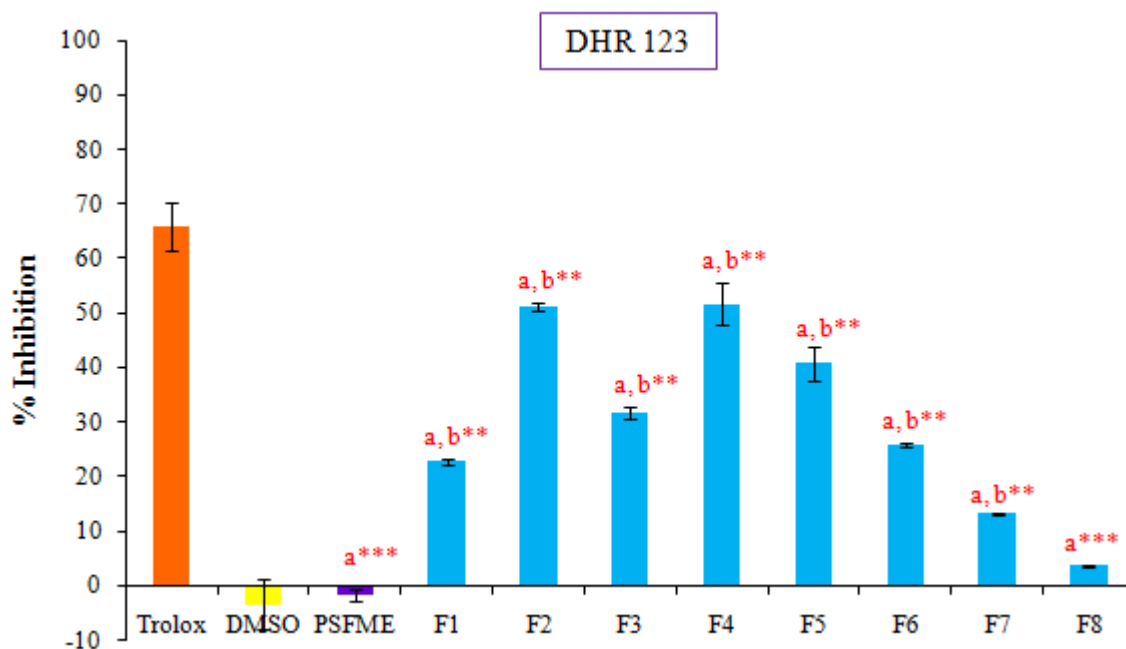


Figure IV-18: Test DHR 123: Histogrammes, exprimés en pourcentage d'inhibition (%), illustrant l'activité antioxydante du Trolox, du solvant (DMSO), de l'extrait PSFME (PSFME) et des fractions (F1 à F8) à la concentration de 1 mg/mL avec le test DHR 123. **a** et **b** signifient respectivement statistiquement différent du Trolox et de PSFME. *** et ** indique respectivement la significativité avec un niveau de confiance de 99.9 % et de 99 %, n = 6.

III.4. Détermination de la cytotoxicité

Une substance cytotoxique se définit comme une molécule qui est toxique pour la cellule à divers degrés, du simple trouble métabolique à l'apoptose. Dans le domaine cosmétique, il est indispensable de déterminer la dose à partir de laquelle un extrait ou une fraction d'extrait de plante est cytotoxique avant tout autre test, dans le but d'éviter de commercialiser des produits toxiques pour la santé humaine. Alors que dans le domaine pharmaceutique les molécules cytotoxiques sont fortement recherchées dans l'espoir de trouver un traitement efficace contre les cancers et autres tumeurs qui sont liés à une prolifération anormale de cellules.

III.4.1. Principe

Afin d'évaluer la toxicité des échantillons sur les fibroblastes, la viabilité cellulaire a été évaluée en utilisant des sels de tétrazolium, le bromure de 3-[4,5 diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium (MTT) et le 2,3-bis-(2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl) (XTT) (Fig. IV-19). Ces sels sont réduits par des mécanismes moléculaires complexes au sein des cellules vivantes faisant intervenir des déshydrogénases mitochondriales, notamment la succinate déshydrogénase et sont transformés en un produit coloré appelé formazan [41]. Ainsi, il est possible de déterminer la viabilité cellulaire par simple lecture d'absorbance au spectrophotomètre UV-vis. Plus l'absorbance diminue plus la viabilité cellulaire diminue (Annexe 7). Le produit de réduction du MTT est un formazan bleu insoluble dans l'eau, ce qui implique sa solubilisation dans un solvant organique avant mesure. Pour s'affranchir de ces étapes supplémentaires, souvent source de variabilité, le XTT a été choisi pour réaliser nos tests. Dans ce cas, la réduction mitochondriale forme un formazan orange soluble dans l'eau [42].

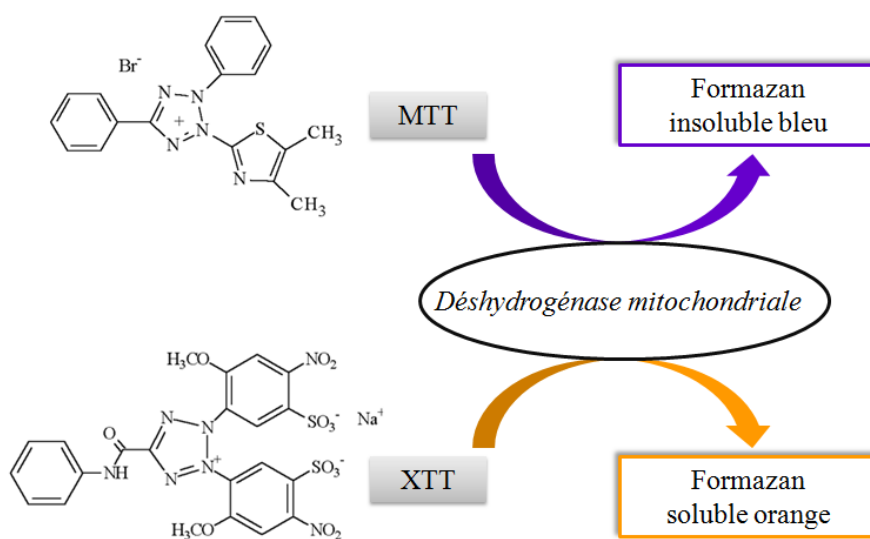


Figure IV-19: Structures et schémas réactionnels impliquant les sels de tétrazolium (MTT et XTT) dans les cellules vivantes.

Les résultats présentés dans cette partie sont ceux qui ont été obtenus avec le XTT. La réduction en formazan orange a été suivie à 450 nm. Les valeurs d'absorbance mesurées sont directement proportionnelles au nombre de cellules vivantes. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire selon la formule :

$$\% \text{ viabilité} = \frac{A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{témoin}}} \times 100$$

où $A_{\text{échantillon}}$ correspond à la valeur d'absorbance obtenue pour l'échantillon, et $A_{\text{témoin}}$ correspond à la valeur moyenne d'absorbance pour des cellules non traitées correspondant à 100 % de viabilité.

III.4.2. Résultats

La figure IV-20 présente la viabilité moyenne (%) des fibroblastes mis en contact avec l'extrait PSFME ou ses fractions. Après 4h d'incubation et à une concentration de 1 mg/mL (Fig. IV-20a) tous les échantillons testés possèdent une toxicité non négligeable, les fractions les plus cytotoxiques sont les fractions F2, F3, F4 et la F5 avec respectivement 46, 40, 25 et 45 % de cellules viables à la fin de l'expérience. Ces fractions présentent également l'activité antioxydante la plus élevée selon le test DHR 123. La fraction la moins toxique est la F7 avec 75 % de viabilité. Cette toxicité importante est certainement liée à la quantité trop élevée d'échantillon mis à incuber avec les fibroblastes. Cette hypothèse est d'ailleurs confirmée au vue des résultats obtenus en diluant par 10 les concentrations testées (0,1 mg/mL, Fig. IV-20b). A cette concentration seule les fractions F3 (88%), F4 (82%) et F5 (88%) présentent encore une toxicité significative ($p < 0.05$), mais beaucoup plus faible avec plus de 80 % de viabilité.

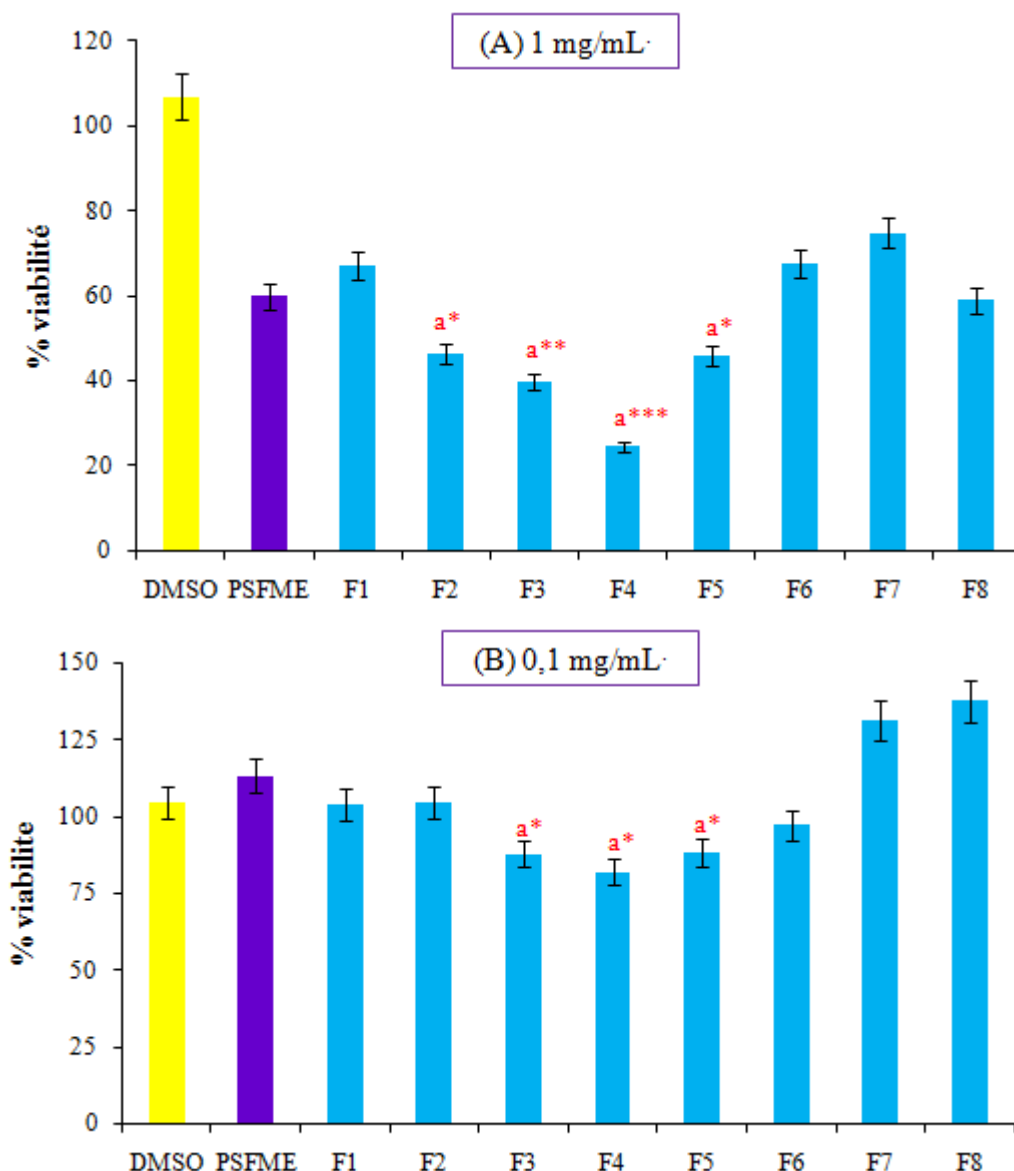


Figure IV-20: Histogrammes, exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire (%), illustrant la cytotoxicité, du solvant (DMSO), de l'extrait PSFME (PSFME) et des fractions (F1 à F8) obtenue à 1 mg/mL (A) et à 0.1 mg/mL (B) en utilisant le sel de tetrazolium XTT sur des fibroblastes. *a* signifie statistiquement différent de PSFME. ***, ** et * indique respectivement la significativité avec un niveau de confiance de 99.9, 99 et de 95 %, n = 6.

En se basant sur les résultats des tests chimiques, les fractions F3, F4, F6 et F7 ont été désignées comme les plus antioxydantes que cette activité a été liée à la présence de composés phénoliques. En revanche, les fractions les plus actives avec le test cellulaire DHR 123 sont les fractions F2 et F4 suivies des fractions F5 et F3. Il y a donc visiblement une différence d'action antioxydante en fonction de la nature du test utilisé ce qui rend l'interprétation des résultats difficile. De plus, l'étude de la viabilité cellulaire en présence de ces fractions a permis de mettre en évidence que les fractions les plus cytotoxiques sont les fractions F2, F3,

F4 et la F5. Dans la partie suivante nous allons discuter ces résultats afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu et de lier l'activité au contenu moléculaire des fractions.

IV. Discussion générale: Relation structure-activité

L'identification par HPLC-MS/MS a permis de caractériser 25 molécules, dont 20 dérivés de flavonols, dans l'extrait PSFME et un fractionnement optimisé par CPC a permis ensuite de regrouper ces molécules selon leurs propriétés physico-chimiques dans 8 fractions simplifiées. Parmi ces composés, il a pu être identifié les flavonols aglycones caractéristiques de l'argousier: la quercétine, l'isorhamnétine et le kaempférol [43], ainsi que leurs principaux dérivés glycosylés communément retrouvés dans les baies d'argousier comme l'isorhamnétine-3-*O*-glucoside-7-*O*-rhamnoside, l'isorhamnétine-3-*O*-rutinoside, l'isorhamnétine-3-*O*-glucoside, l'isorhamnétine-3-*O*-sophoroside-7-*O*-rhamnoside, la quercétine-3-*O*-rutinoside et la quercétine-3-*O*-glucoside [32, 33].

Les flavonoïdes, molécules ubiquitaires du règne végétal, sont avec les vitamines (B et E) et les caroténoïdes, les antioxydants majeurs des végétaux, contribuant ainsi à l'effet bénéfique sur la santé humaine de la consommation régulière d'aliments d'origine végétale [3, 7]. Cet effet est notamment dû à leur capacité à inhiber des enzymes responsables de la production des ERO mais aussi à leur capacité à piéger ou à stabiliser les radicaux libres [3]. La présence de ces molécules dans l'extrait de baies d'argousier justifie notre démarche d'évaluation des propriétés antioxydantes, via des tests chimiques et cellulaires, de nos fractions plus ou moins enrichies en ces molécules.

D'après Rice-Evans *et al.* [7], pour obtenir une activité antioxydante maximale les flavonoïdes doivent comporter une:

- structure ortho-diphénolique (noyau catéchol) sur le noyau B
- une double liaison entre le C₂ et le C₃, qui est en conjugaison avec la cétone du C₄
- des groupements hydroxyles en position 3 et 5

Par ailleurs, les méthylations et glycosylations des flavonoïdes réduisent leur activité par rapport à leur aglycone correspondant. En considérant ces critères structuraux, la quercétine est le flavonol type qui doit posséder une forte capacité antioxydante, ce qui a d'ailleurs été confirmé dans plusieurs études et notamment dans un jus obtenu à partir de baies d'argousier [3, 7, 13]. Une étude réalisée par résonance de spin électronique [13] a d'ailleurs déjà permis de déterminer quelles molécules contribuaient le plus à l'activité antioxydante dans un jus à base de baies d'argousier. Ainsi, l'acide ascorbique, de par sa

concentration, est l'antioxydant majoritaire, et parmi les composés phénoliques les proanthocyanidines sont les molécules qui contribuent le plus à l'activité antioxydante suivies par les flavonols. En nous appuyant sur toutes ces connaissances structurales nous avons cherché à interpréter nos résultats d'activité pour tenter d'établir un lien structure-activité.

Dans nos travaux nous avons évalué l'activité antioxydante de l'extrait PSFME et de ses fractions à la même concentration ce qui permet de déterminer quelle fraction et par conséquent quelles molécules sont les plus actives dans l'extrait. Cependant cette méthode de traitement des résultats ne prend pas en compte le pourcentage relatif de chaque fraction dans l'extrait et ne permet pas de déterminer quel groupe de molécules est le plus antioxydant au sein de la plante. Dans cette étude nous nous sommes focalisés en premier lieu sur les flavonols et nous n'avons pas cherché à identifier les proanthocyanidines car leur séparation et leur identification nécessite une méthodologie particulière qui n'est pas toujours compatible avec celle des flavonols. En effet, de par leur caractère hydrophile les proanthocyanidines sont généralement séparées sur des systèmes HPLC en mode phase normale ou en mode phase inverse mais dans des conditions de phase mobile polaire. De plus leur identification requiert une étape d'hydrolyse afin d'identifier les monomères constitutifs des polymères de flavan-3-ols [44].

L'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante des fractions a permis de montrer que l'extrait PSFME ainsi que les fractions F3, F4, F6 et F7 étaient les plus actives avec les tests chimiques, alors que les fractions F2 et F4 sont les plus actives avec le test cellulaire. La réponse des échantillons est donc différente selon le test utilisé, mais surtout en fonction de la nature de celui-ci (chimique ou cellulaire). F2, par exemple, est une fraction qui ne possède que très peu de capacité antioxydante avec les tests chimiques alors qu'elle est la fraction la plus antioxydante, avec le test cellulaire. A l'inverse, F3 répond mieux avec les tests chimiques qu'avec le test cellulaire. L'identification par HPLC-MS/MS de ces deux fractions a permis de caractériser dans la fraction F2, 3 flavonoïdes: la quercétine (**20**), l'isorhamnétine-7-*O*-rhamnoside (**22**) et l'isorhamnétine (**24**), alors que la fraction F3 est majoritairement constituée de l'isorhamnétine-7-*O*-rhamnoside (**22**). Les critères de Rice-Evans permettent ici d'expliquer la forte activité antioxydante au niveau cellulaire de la F2 qui contient de la quercétine et de l'isorhamnétine.

Cependant un autre paramètre peut expliquer l'activité plus élevée de la fraction F2 au niveau cellulaire. En effet, le passage de la bicouche lipidique des membranes cellulaires est une étape clé du mécanisme d'absorption des molécules bioactives. Pour les flavonoïdes ce

passage s'effectue généralement par diffusion passive [45]. Cependant, selon la nature du composé (lipophile ou hydrophile), la diffusion au travers la membrane plasmique de la cellule se fera plus ou moins facilement. Dans le cas de composés hydrophiles, cette diffusion pourrait faire intervenir des protéines transmembranaires de manière spécifique ou non. Ainsi, les flavonols aglycones, de nature lipophile, peuvent diffuser plus facilement au travers de la membrane plasmique sans intervention de protéines. Ce passage s'effectuant selon le gradient de concentration, c'est à dire du milieu le plus concentré vers le moins concentré. Au contraire, le passage par diffusion des flavonols glycosylés, de nature plus hydrophile avec leur partie osidique, fait intervenir des glycoprotéines transmembranaires qui ont pour rôle le transport du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire de molécules à caractère hydrophile [46]. La fraction F2, constituée de deux flavonols aglycones et d'un monoglycosylé, possède un caractère plus hydrophobe que la fraction F3 et les autres fractions. L'action antioxydante qui diffère selon les tests pour les fractions F2 et F3 pourrait donc être expliquée au niveau cellulaire, par ces phénomènes de diffusion passive, facilités dans le cas de la fraction F2 qui possède des flavonols aglycones contrairement à la fraction F3. Toutefois, la fraction F3 présente une inhibition importante avec les tests chimiques bien qu'elle soit faible avec le test cellulaire. Ce phénomène de diffusion pourrait de même expliquer la faible activité de l'extrait brut *in cellulo*. En effet, celui-ci, de nature complexe, contient diverses molécules telles que des sucres, des acides aminés et des flavonoïdes. Dès lors, il est envisageable que la diffusion à l'intérieur des fibroblastes soit partagée entre ces différents groupes de molécules, réduisant de ce fait l'activité antioxydante observée.

La fraction F4, constituée d'acides phénoliques et de dérivés flavonoïques, peut être considérée, dans nos conditions, comme la plus antioxydante car elle est active à la fois avec les tests chimique et cellulaire. Cette activité peut être due à la présence des acides gallique et catéchique qui possèdent tous les deux un noyau catéchol indispensable pour obtenir une activité antioxydante importante. Cependant, il nous manque ici des données structurales pour établir une relation entre la forte activité antioxydante observé et la structure chimique des composés.

L'analyse des fractions F5, F6 et F7 montre qu'elles contiennent toutes des flavonols glycosylés, notamment la quercétine-3-*O*-glucoside et l'isorhamnétine-3-*O*-glucoside. En se basant sur les critères de Rice-Evans, ces fractions ne devraient pas présenter une telle activité. Néanmoins, il a été démontré que dans l'argousier la quercétine-3-*O*-glucoside était également un très bon piègeur de radicaux libres [13, 47]. De plus, toutes les fractions testées sont composées de plusieurs molécules ce qui peut induire des effets antagonistes ou

synergiques sur l'activité antioxydante. Ainsi deux ou plusieurs molécules différentes peuvent soit agir sur la même cible et la compétition qui en résulte a un effet néfaste sur l'activité, soit elles agissent sur des cibles différentes et l'action combinée des effets induit une diminution de l'activité.

La détermination de la cytotoxicité est importante en cosmétique afin d'éviter de commercialiser des produits toxiques pour la santé humaine, et en pharmaceutique dans l'espoir de trouver un traitement efficace contre les cancers et autres tumeurs qui sont liés à une prolifération anormale de cellules. La plupart des flavonoïdes ne sont pas toxiques pour la santé humaine, mais il a été démontré qu'ils inhibaient la prolifération cellulaire de diverses lignées cellulaires cancéreuses. Ainsi les flavonols, telle que la quercétine, ont été proposés comme agent chimiopréventif capable d'inhiber *in vitro* l'angiogénèse et la prolifération de tumeurs [48]. Dans notre étude, il a pu être démontré que l'extrait brut ainsi que les fractions, riches en flavonoïdes, présentaient une toxicité à 1 mg/mL sur des fibroblastes sains, ce qui serait en contradiction avec les connaissances actuelles sur la toxicité des flavonoïdes. Cependant les résultats obtenus à une concentration inférieure (0.1 mg/mL) montrent que seules les fractions F3 à F5 restent légèrement cytotoxiques. Ainsi la forte cytotoxicité observée à 1 mg/mL serait principalement due à la concentration à laquelle ont été étudiés les échantillons induisant un effet toxique sur des cellules saines. Cette hypothèse est également confirmée par les travaux de Matsuo *et al.* [49] qui ont démontré que certains flavonoïdes étaient cytotoxiques à des concentrations élevées sur des cellules humaines saines. Par ailleurs, des études récentes ont mis en évidence que des extraits végétaux avaient la capacité d'interférer avec les tests employant des sels de tétrazolium tels que le MTT et XTT [50, 51]. Certaines molécules comme les flavonoïdes ont ainsi la capacité de réduire le MTT en formazan, et ce même en absence de cellules vivantes [52]. En conséquence, lorsque les extraits ou fractions testés contiennent des flavonoïdes, comme c'est le cas dans notre étude, la viabilité cellulaire observée peut être due à des interférences avec des molécules de l'échantillon testé. Afin de confirmer nos résultats et de conforter cette hypothèse, il est nécessaire de réaliser d'une part une autre étude de la cytotoxicité avec un autre test comme le test d'Alamar Blue qui induit peu d'interférences et donc moins de variabilité, et d'autre part de déterminer une concentration minimale à partir de laquelle l'extrait brut et les fractions pourraient être utilisées sans effet néfastes sur des cellules saines. De plus, afin de voir si la cytotoxicité observée est due à un effet qui a lieu dans le temps, la lecture des résultats pourra être réalisée à différents temps après l'incubation de 4 h.

V. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons pu relier l'activité antioxydante de l'extrait PSFME de baies d'argousier à la présence de flavonols aglycones et glycosylés. Toutes les fractions possèdent une activité antioxydante soumise à de fortes amplitudes selon le test utilisé, et surtout en fonction de la nature de celui-ci (chimique ou cellulaire). Les différences d'activités selon le test utilisé entre les fractions F2 et F3 ont pu être corrélées avec les différences structurales de leurs molécules constitutives identifiées. La fraction F4, composée de plusieurs structures moléculaires, semble être la fraction la plus antioxydante. Malheureusement, il manque à ce jour des données structurales pour déterminer quelle molécule apporte l'activité antioxydante à cette fraction. La concentration à laquelle les échantillons ont été testés s'est révélée être trop élevée, induisant de ce fait une toxicité cellulaire. Ainsi, des études complémentaires restent nécessaires pour approfondir les résultats obtenus et déterminer les molécules actives de la fraction F4.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Harborne, J.B. and Williams, C.A.** (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
2. **Veitch, N.C. and Grayer, R.J.** (2008) Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Natural Product Reports*, 25(3), 555-611.
3. **Pietta, P.-G.** (2000) Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035-1042.
4. **Boudet, A.-M.** (2007) Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2722-2735.
5. **Dai, J. and Mumper, R.J.** (2010) Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
6. **Rice-evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M. and Pridham, J.B.** (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22(4), 375-383.
7. **Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G.** (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
8. **Favier, A.** (2003) Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité Chimique*, 269-270, 108-115.
9. **Renaud, S. and de Lorgeril, M.** (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, 339(8808), 1523-1526.
10. **Corder, R., Mullen, W., Khan, N.Q., Marks, S.C., Wood, E.G., Carrier, M.J. and Crozier, A.** (2006) Oenology: Red wine procyanidins and vascular health. *Nature*, 444(7119), 566-566.
11. **Prior, R.L., Wu, X. and Schaich, K.** (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.
12. **Gao, X., Ohlander, M., Jeppsson, N., Björk, L. and Trajkovski, V.** (2000) Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1485-1490.
13. **Rösch, D., Bergmann, M., Knorr, D. and Kroh, L.W.** (2003) Structure-antioxidant efficiency relationships of phenolic compounds and their contribution to the antioxidant activity of sea buckthorn juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4233-4239.

14. **Rouessac, F. and Rouessac, A.** (2004) Chromatographie liquide haute performance. In *Analyse chimique-Méthodes et techniques instrumentales modernes*, Paris, pp. 36-59.
15. **de Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Gooijer, C. and Brinkman, U.A.T.** (2006) Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2), 31-63.
16. **Hostettmann, K. and Wolfender, J.-L.** (2001) Application of liquid chromatography/UV/MS and liquid chromatography/NMR for the on-line identification of plant metabolite. In *Bioactive compounds from natural sources: Isolation, characterisation and biological properties*, London, pp. 31-68.
17. **Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B.** (1970) The systematic identification of flavanoids.
18. **De Hoffmann, E. and Stroobant, V.** (2005) Spectrométrie de masse. 3^{ème}, Paris, pp. 425.
19. **Cuyckens, F. and Claeys, M.** (2004) Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(1), 1-15.
20. **Stobiecki, M.** (2000) Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry*, 54(3), 237-256.
21. **De Hoffmann, E. and Stroobant, V.** (2005) Les sources d'ions. In *Spectrométrie de masse*, 3^{ème}, Paris, pp. 14-75.
22. **Fabre, N., Rustan, I., de Hoffmann, E. and Quetin-Leclercq, J.** (2001) Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12(6), 707-715.
23. **Hvattum, E. and Ekeberg, D.** (2003) Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 38(1), 43-49.
24. **Justino, G.C., Borges, C.M. and Florêncio, M.H.** (2009) Electrospray ionization tandem mass spectrometry fragmentation of protonated flavone and flavonol aglycones: a re-examination. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23(2), 237-248.
25. **Arimboor, R., Kumar, K.S. and Arumughan, C.** (2008) Simultaneous estimation of phenolic acids in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) using RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(1), 31-38.
26. **Zu, Y., Li, C., Fu, Y. and Zhao, C.** (2006) Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(3), 714-719.

27. **Ma, Y.L., Li, Q.M., Van den Heuvel, H. and Claeys, M.** (1997) Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11(12), 1357-1364.
28. **Domon, B. and Costello, C.E.** (1988) A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate Journal*, 5(4), 397-409.
29. **Wolfender, J.-L., Waridel, P., Ndjoko, K., Hobby, K., R., Major, H., J. and Hostettmann, K.** (2000) Evaluation of Q-TOF-MS/MS and multiple stage IT-MSⁿ for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts. *Analisis*, 28(10), 895-906.
30. **Rösch, D., Krumbein, A., Mugge, C. and Kroh, L.W.** (2004) Structural investigations of flavonol glycosides from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) pomace by NMR spectroscopy and HPLC-ESI-MSⁿ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(13), 4039-4046.
31. **Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B.** (1970) The systematic identification of flavanoids. Springer, New York, pp. 374.
32. **Chen, C., Zhang, H., Xiao, W., Yong, Z.-P. and Bai, N.** (2007) High-performance liquid chromatographic fingerprint analysis for different origins of sea buckthorn berries. *Journal of Chromatography A*, 1154(1-2), 250-259.
33. **Yang, B., Halttunen, T., Raimo, O., Price, K. and Kallio, H.** (2009) Flavonol glycosides in wild and cultivated berries of three major subspecies of *Hippophaë rhamnoides* and changes during harvesting period. *Food Chemistry*, 115(2), 657-664.
34. **Aruoma, O.L.** (1996) Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73, 1617-1625.
35. **Frankel, E.N. and Meyer, A.S.** (2000) The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1925-1941.
36. **Blois, M.S.** (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
37. **Benzie, I.F.F. and Strain, J.J.** (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
38. **Singleton, V.L. and Rossi, J.A., Jr.** (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16(3), 144-158.
39. **Guillet, G. and Cartier, H.** (1999) Approche dermatologique. In *Dermatologie, guide pratique*, Heures de France, Paris, pp. 8-77.

- 40. Sakurada, H., Koizumi, H., Ohkawara, A., Ueda, T. and Kamo, N.** (1992) Use of dihydrorhodamine 123 for detecting intracellular generation of peroxides upon UV irradiation in epidermal keratinocytes. *Archives of Dermatological Research*, 284(2), 114-116.
- 41. Berridge, M.V., Tan, A.S., McCoy, K.D. and Wang, R.** (1996) The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*, 4.
- 42. Williams, C., Espinosa, O.A., Montenegro, H., Cubilla, L., Capson, T.L., Ortega-Barría, E. and Romero, L.I.** (2003) Hydrosoluble formazan XTT: its application to natural products drug discovery for *Leishmania*. *Journal of Microbiological Methods*, 55(3), 813-816.
- 43. Guliyev, V.B., Gul, M. and Yildirim, A.** (2004) *Hippophae rhamnoides* L.: chromatographic methods to determine chemical composition, use in traditional medicine and pharmacological effects. *Journal of Chromatography B*, 812(1-2), 291-307.
- 44. Callemien, D., Guyot, S. and Collin, S.** (2008) Use of thiolysis hyphenated to RP-HPLC-ESI(-)-MS/MS for the analysis of flavanoids in fresh lager beers. *Food Chemistry*, 110(4), 1012-1018.
- 45. Spencer, J.P.E., Abd El Mohsen, M.M. and Rice-Evans, C.** (2004) Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 423(1), 148-161.
- 46. Walle, T.** (2004) Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(7), 829-837.
- 47. Kim, J.-S., Kwon, Y.-S., Sa, Y.-J. and Kim, M.-J.** (2011) Isolation and identification of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) phenolics with antioxidant activity and α -glucosidase inhibitory effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 138-144.
- 48. Benavente-García, O. and Castillo, J.** (2008) Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6185-6205.
- 49. Matsuo, M., Sasaki, N., Saga, K. and Kaneko, T.** (2005) Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28(2), 253-259.
- 50. Bruggisser, R., Daeniken, K.v., Jundt, G., Schaffner, W. and Tullberg-Reinert, H.** (2002) Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Medica*, 68(05), 445,448.
- 51. Wang, P., Henning, S.M. and Heber, D.** (2010) Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS ONE*, 5(4), e10202.
- 52. Peng, L., Wang, B. and Ren, P.** (2005) Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45(2), 108-111.

CHAPITRE 5

**INVESTIGATION PHYTOCHIMIQUE ET
BIOLOGIQUE DE DIFFERENTS ORGANES DE
L'ARGOUSIER**

I. Introduction

La synthèse bibliographique entreprise au début de ce travail de thèse a permis de constater que les connaissances sur l'argousier se limitaient principalement à l'étude du pouvoir thérapeutique et du contenu phytochimique de ses baies et de ses graines, les autres organes de l'argousier: feuille, tige et racine étant très peu étudiés. Par ailleurs, une demande croissante en ingrédients d'origine naturelle a été observée ces dernières années favorisant par conséquent la recherche de nouveaux composés bioactifs. Cette recherche peut prendre plusieurs formes et avoir plusieurs intérêts mais deux objectifs majeurs reviennent souvent dans la littérature:

- trouver de nouvelles molécules antimicrobiennes afin de remplacer les antibiotiques et antiseptiques actuels face auxquels les micro-organismes ont développés des résistances [1],
- remplacer les additifs et conservateurs synthétiques utilisés en agroalimentaire ou en cosmétique tels que l'hydroxyanisole butylé (BHA, E 320) et l'hydroxytoluène butylé (BHT, E 321) ou les parabènes qui se sont révélés comme nocifs pour la santé humaine [2, 3].

Dans ce contexte, nous nous sommes attachés, à utiliser les différentes méthodologies développées au cours de cette thèse, dans le but de caractériser le pouvoir antimicrobien et antioxydant de plusieurs organes de l'argousier, et particulièrement ceux qui avaient été très peu étudiés jusqu'à présent. Pour atteindre cet objectif l'étude a été réalisée à différents niveaux:

- (i) développer une procédure d'extraction et une méthodologie permettant de tester l'activité antimicrobienne qui soient adaptées au criblage de plusieurs échantillons et micro-organismes
- (ii) effectuer un criblage préliminaire de l'activité antimicrobienne des différents organes de l'argousier
- (iii) corrélérer le pouvoir antimicrobien et antioxydant des organes et de leurs fractions actives à leur contenu phytochimique
- (iv) identifier les molécules majoritaires de la fraction active des racines d'argousier

II. Développement de la méthodologie de criblage

II.1. Choix des organes

L'étude bibliographique réalisée au début de cette thèse (Chapitre 1) avait permis de mettre en évidence que, mis à part les baies, les graines et autres dérivés du fruit de l'argousier, les autres organes tels que les feuilles, les tiges et les racines avaient très peu été étudiés. C'est pourquoi, dans un premier temps, nous nous sommes attachés à tester les différents organes de l'argousier de deux origines différentes (Tableau V-1) sur plusieurs micro-organismes afin de trouver d'éventuelles activités antimicrobiennes. L'activité a été évaluée à partir de fruits (baies), de feuilles, de tiges, de racines et de graines d'argousier. De plus des drêches, résidu solide obtenu après filtration d'un moût en fin de production, et des graines, fournies par l'entreprise NATVIT (vallée de la Haute Durance, Hautes-Alpes, France) ont également été évaluées afin de valoriser ces co-produits de la filière « argousier ».

Tableau V-1: Abréviations, origine et année de récolte des différents organes de l'argousier utilisés lors de ces travaux.

Organe	Origine	Année de récolte	Abréviations
Baie	Roumanie	2008	B8
	Roumanie	2009	B9
Feuille	Roumanie	2008	Fr
	PLANFLOR	2009	Fp
Tige	Roumanie	2008	Tr
	PLANFLOR	2009	Tp
Racine	PLANFLOR	2009	Rp
	Ploudalmézeau	2010	Ra
Graine	Roumanie	2008	Gr
	NATVIT	2009	Gn
Drêche	NATVIT	2009	Dn

II.2. Procédure d'extraction

II.2.1. Choix de la technique d'extraction

Comme introduit dans le chapitre 2, il existe différentes méthodes d'extraction modernes qui sont particulièrement adaptées à l'extraction de produits naturels. Parmi celles-ci, l'extraction par fluide pressurisé (PLE, Pressurised Liquid Extraction), technique simple et automatisée qui utilise des solvants sous haute pression et à température élevée, laquelle offre plusieurs avantages à savoir une extraction rapide et efficace, une faible consommation de

solvant, et des extraits filtrés en ligne à la fin du processus [2]. De plus, la PLE présente l'intérêt de ne jamais avoir été utilisée avec l'argousier. Pour ces raisons, la PLE a donc été choisie pour réaliser les différentes séries d'extraction des organes de l'argousier.

Le but de notre étude étant de cribler des activités biologiques, et de déterminer le cas échéant, les molécules responsables de l'activité, le solvant d'extraction a été choisi de manière à solubiliser un maximum de composés. Deux solvants d'extraction ont ainsi été testés: l'éthanol (EtOH) et l'acétate d'éthyle (AE), qui possèdent une légère différence de polarité et qui vont permettre d'obtenir respectivement pour chaque échantillon un extrait polaire et un extrait moyennement polaire.

II.2.2. Optimisation de l'extraction PLE

A partir de précédents travaux réalisés au laboratoire les paramètres de l'extraction PLE ont été standardisés à un temps d'extraction statique de 5 min, un volume de fuite de 70 %, et une purge de 100 sec. La température d'extraction a, quant à elle, brièvement été optimisée sur les feuilles d'argousier, avec l'EtOH comme solvant d'extraction et en fixant les autres paramètres comme décrit ci-dessus. Le rendement d'extraction augmente de 24 à 30 % (± 0.03 %, $n=3$) lorsque la température varie de 40 à 60°C. Afin d'éviter toute dégradation de molécules sous l'effet de la température, des températures plus élevées n'ont pas été testées.

L'intégralité des extractions a par la suite été réalisée à 100 bar et 60°C. La cellule d'extraction a été remplie aux $\frac{3}{4}$ avec un mélange matrice végétale/sulfate de sodium Na_2SO_4 (1/2). Les extractions ont été réalisées à partir de 3 g pour les feuilles et les racines, 5 g pour les tiges et les graines et 10 g pour les baies et drêches (Annexe 3).

La figure V-1 présente, pour les différents organes, les rendements d'extraction moyens obtenus par PLE dans les conditions optimales en utilisant EtOH ou AE comme solvant. Il peut être constaté que quelque soit l'organe, le rendement d'extraction obtenu avec EtOH est toujours significativement plus élevé que celui obtenu avec AE ($p < 0.05$). Ainsi, un nombre plus important composés sont extraits avec EtOH. Cette différence peut s'expliquer par le simple fait que EtOH est un solvant polaire connu pour extraire une large gamme de molécules telles que les sucres, les composés glycosylés et les composés plus faiblement polaires, tandis que AE est un solvant de polarité intermédiaire qui extrait préférentiellement des composés hydrophobes tels que des aglycones et des molécules à longues chaînes carbonées [3].

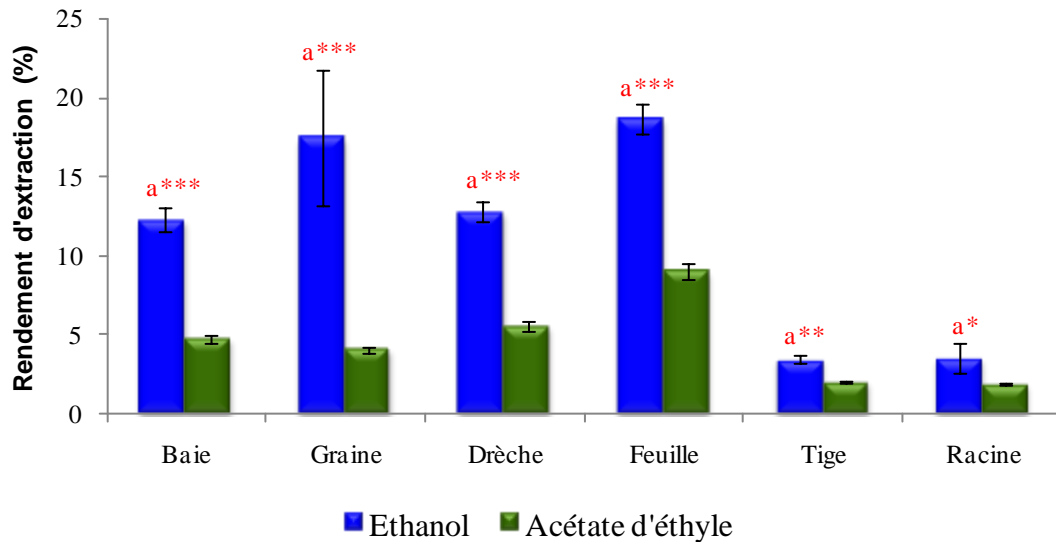


Figure V-1: Rendement d'extraction moyen obtenu par extraction PLE à 100 bar et 60°C de divers organes de l'argousier: baie, graine, drèche, feuille, tige, racine, et en utilisant deux solvants d'extraction: Ethanol ou Acétate d'éthyle. Temps d'extraction statique 5 min, volume de fuite de 70 %, purge de 100 sec. ***, ** et * signifie significativement différent à un niveau de confiance de 99.9, 99 et 95 %. a signifie rendement d'extraction statistiquement différent entre les deux solvants. n = 3.

A partir de la figure V-1 il peut être également remarqué que les rendements d'extraction sont plus élevés dans le cas des baies, graines, drèches et des feuilles alors qu'il est très faible pour les deux organes boisés que sont les tiges et les racines. Le rendement d'extraction des graines et des feuilles est ainsi dix fois supérieur à celui des tiges et des racines.

II.3. Choix des micro-organismes

Les différents extraits de plantes ont été testés sur un panel de micro-organismes comprenant des bactéries, une levure et des champignons fournis par la souchothèque de Bretagne [4], et dont la particularité morphologique et l'origine sont résumées dans le tableau V-2. Ainsi il a été testé : des bactéries souvent responsables d'infections alimentaires, nosocomiales ou urinaires telles que *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica serovar enteritidis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus durans* ainsi qu'une souche phytopathogène *Xanthomonas campestris* ; une levure *Candida albicans* responsable de la candidose ou d'infection cutanée, et deux champignons *Aspergillus niger* responsable d'infection nosocomiale et *Botrytis cinerea* champignon phytopathogène responsable de la pourriture grise.

De plus, différents types morphologiques bactériens ont été testés avec des bactéries à Gram positif (+) et à Gram négatif (–) qui se différencient par des enveloppes extérieures de

natures différentes. Les bactéries à Gram positif sont constituées d'une paroi épaisse de peptidoglycane (muréine) associée à des quantités moindres d'autres polymères tels que des acides teichoïques, teichuroniques et lipotéichoïques. En revanche, les bactéries à Gram négatif sont caractérisées par une paroi de peptidoglycane beaucoup plus fine mais celle-ci est recouverte d'une membrane externe dans laquelle peuvent s'insérer des liposaccharides et des lipoprotéines [5].

Tableau V-2: Description et pouvoir pathogène des souches de bactéries, de levures et de champignons utilisées lors de cette étude.

Type de micro-organisme et morphologie gram	Espèces	ATCC	LMSA	Pouvoir pathogène
Bactérie	<i>Bacille Gram –</i>			
	<i>Escherichia coli</i>	10536	3.11.006	Gastro-entérite, infection urinaire
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	3.11.008	Infection alimentaire
	<i>Salmonella enterica serovar enteritidis</i>	/	3.11.003	Infection alimentaire
	<i>Xanthomonas campestris</i>	/	3.11.011	Phytopathogène
	<i>Bacille Gram +</i>			
	<i>Bacillus cereus</i>	6464	3.05.002	Infection alimentaire
<i>Cocci Gram +</i>				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	3.11.005	Infection alimentaire
	<i>Enterococcus durans</i>	6056	3.08.023	Infection nosocomiale, urinaire
Levure	<i>Candida albicans</i>	2091	2.11.002	Candidadose, infection cutané
Champignon	<i>Aspergillus niger</i>	/	1.01.072	Infection nosocomiale, pulmonaire
	<i>Botrytis cinerea</i>	/	1.01.098	Phytopathogène

ATCC, American Type Culture Collection ; LMSA, Laboratoire de Microbiologie et de Sécurité Alimentaire

II.4. Procédure d'évaluation de l'activité antimicrobienne

Pour évaluer l'activité antimicrobienne d'une substance naturelle ou d'un extrait végétal les méthodes communément employées sont réalisées par dilution ou par diffusion [6]. La méthode de dilution, qui peut être effectuée en milieu liquide ou en milieu solide, consiste à mettre un inoculum microbien au contact de concentrations croissantes de l'échantillon. Le degré d'inhibition de la croissance microbienne détermine le pouvoir antimicrobien des substances testées. La méthode de diffusion, exclusivement réalisée sur milieu solide, consiste à déposer un disque de papier absorbant préalablement imprégné de l'échantillon sur une gélose ensemencée avec l'inoculum microbien. Les molécules actives diffusent à partir des disques et la présence d'une zone d'inhibition, dans laquelle il n'y a pas eu de croissance, indique la présence de molécules actives à l'égard du micro-organisme testé. Cependant ces deux méthodologies, qui sont par ailleurs multi-étapes, ne permettent pas de tester simultanément plusieurs échantillons, et sont de ce fait non adaptées à une démarche de criblage. C'est pourquoi nous nous sommes orientés vers l'utilisation d'un test miniaturisé sur microplaque, variante de la méthode de micro-dilution, qui nous a permis de tester l'effet de plusieurs échantillons à la fois sur le même micro-organisme. De plus, ce test développé et validé au sein du Laboratoire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne (LUBEM, Université de Brest), a déjà été utilisé pour caractériser l'activité antimicrobienne de plantes halophytes [7, 8].

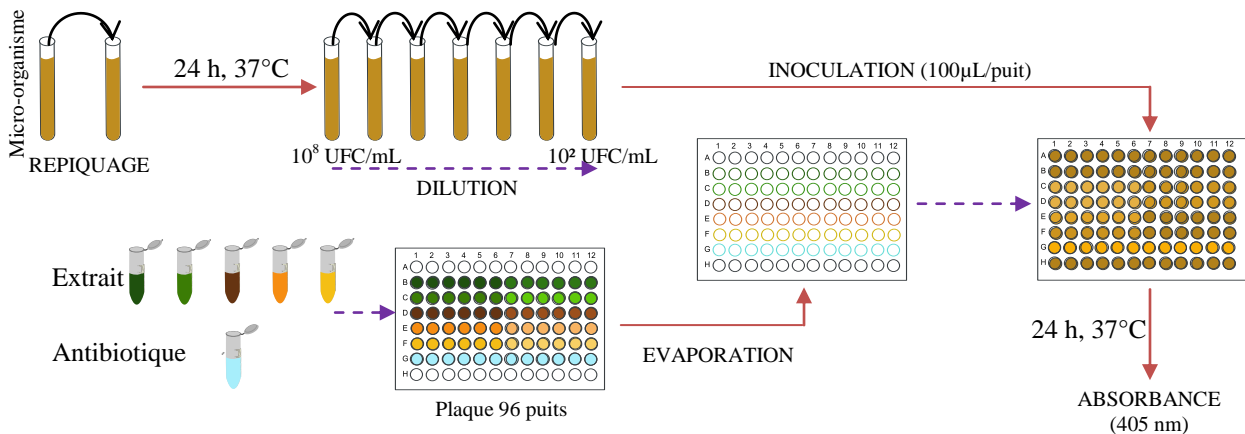


Figure V-2: Représentation schématique de la méthodologie employée pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits d'argousier. UFC, Unité formant des colonies.

La figure V-2 illustre de façon simplifiée les principales étapes de cette méthodologie (Annexe 8). Au cours du criblage initial, trois concentrations d'extraits végétaux ont été évaluées (100, 50 et 25 µg/mL). Après dépôts dans les puits des extraits et des témoins positifs (antibiotique: 5mg/mL de streptomycine + 10 mg/mL de pénicilline G ou fongicide: 10 mg/mL de thioconazole), les microplaques ont ensuite été chauffées entre 30 et 40°C dans

le but d'évaporer complètement le solvant de dépôt (MeOH) et d'obtenir trois doses d'extraits secs: 10, 5 et 2.5 µg. En conditions stériles, 100 µL d'une suspension de micro-organismes à 10² UFC/mL a ensuite été déposée dans tous les puits contenant les extraits secs, ainsi que dans les puits vides correspondant aux témoins négatifs (croissance optimale, aucune inhibition de croissance observée), et dans les puits correspondant aux témoins positifs (inhibition totale de la croissance). Les microplaques sont ensuite recouvertes d'un film autocollant stérile puis mises à incuber à 37°C jusqu'à atteindre la phase stationnaire de croissance soit 24 h pour les bactéries, 48 h pour la levure et 72 h dans le cas des champignons.

La croissance bactérienne a été déterminée par mesure d'absorbance à 405 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. Les valeurs d'absorbance sont relatives à la turbidité de la suspension qui peut être extrapolée à la croissance bactérienne ou fongique. Ainsi, plus la solution est trouble plus la concentration cellulaire est élevée, et inversement. Les résultats ont ensuite été exprimés en pourcentage d'inhibition (%) selon la formule suivante:

$$\% \text{ inhibition} = 1 - \left[\frac{A_{\text{échantillon}} - A_{\text{t positif}}}{A_{\text{t négatif}} - A_{\text{t positif}}} \right] \times 100$$

où $A_{\text{échantillon}}$ correspond à l'absorbance de l'échantillon, $A_{\text{t positif}}$ correspond à l'absorbance du témoin positif et $A_{\text{t négatif}}$ correspond à l'absorbance du témoin négatif.

L'évaluation d'actif antimicrobien est généralement effectuée en déterminant la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des extraits et/ou fractions testés. La CMI correspond à la plus faible concentration en agent actif capable d'inhiber totalement la croissance d'une bactérie donnée. L'objectif du criblage initial étant de différencier les organes en fonction de leur potentiel antimicrobien respectif, nous n'avons pas déterminé la CMI mais nous avons comparé à une même concentration la capacité des extraits à inhiber la croissance des micro-organismes.

III. Etude exploratoire de l'activité antimicrobienne

Nous avons effectué un criblage initial de l'activité antimicrobienne sur sept souches de micro-organismes dont cinq bactéries (*E. coli*, *S. enterica sr enteriditis*, *B. cereus*, *S. aureus* et *X. campestris*) et deux champignons (*A. niger* et *B. cinerea*) en testant pour les six organes (baie, graine, drêche, feuille, tige, racine): deux origines géographiques, deux solvants d'extraction et trois concentrations. Ainsi, la méthodologie développée a conduit à l'obtention d'un grand nombre de données (432) parfois difficiles à interpréter. Le but de notre étude étant de différencier le potentiel antimicrobien de différents organes nous nous sommes

orientés vers une analyse des données par des méthodes statistiques descriptives multidimensionnelles telles que l'Analyse en Composante Principale (ACP), la Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) et l'Analyse Factorielle Discriminante (AFD) afin de différencier les organes et le solvant d'extraction qui induisent une inhibition importante des micro-organismes.

III.1. Principe des méthodes descriptives

III.1.1. L'Analyse en Composante Principale (ACP)

L'ACP est une méthode qui permet d'analyser un ensemble de données quantitatives dans un espace multidimensionnel. Son principe est basé sur un changement de variable qui réduit la dimensionnalité de l'espace et qui fournit en conséquence une représentation simplifiée de celui-ci. Une ACP est généralement utilisée lorsque les données étudiées sont issues de l'observation de n individus situés dans un espace E de p dimensions ($p > 3$) ; l'ensemble des données forme alors un nuage de n points dans E^p . L'objectif de l'ACP est de trouver la meilleure représentation graphique du nuage de n points à l'intérieur d'un sous espace H de E , et de dimension q [9]. La meilleure représentation est soit celle qui minimise les déformations du nuage de points, soit celle qui conserve au maximum la dispersion initiale de celui-ci à l'intérieur de l'espace E . Ainsi le sous espace H optimal est celui dont les q dimensions maximisent la somme des carrées des distances des points projetés et leur centre de gravité [10]. En résumé, l'objectif de l'ACP est de fournir une image simplifiée d'un espace de données complexes, en conservant un maximum d'information.

III.1.2. L'Analyse Factorielle Discriminante (AFD)

L'AFD est une méthode explicative et descriptive dont le principe est similaire à l'ACP. L'objectif de l'AFD est également de réduire le nombre de dimensions mais dans le cas de l'AFD les n observations sont réparties a priori dans g classes définies selon les connaissances préalables que l'on a de ces observations. Contrairement à l'ACP, l'AFD est donc une méthode dite « supervisée » car on impose le nombre et la composition des classes. On recherche alors les dimensions pour lesquelles les classes d'observation se séparent le mieux, c'est-à-dire un modèle qui maximise la distance entre les barycentres des classes [10]. Ainsi, l'objectif de l'AFD est de définir les caractéristiques qui permettent de distinguer des classes d'observation.

III.1.3. La Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)

La CAH fait partie des méthodes de classification semi-supervisée qui recherche à regrouper les individus dans des classes homogènes et les plus distinctes possible entre elles. Contrairement à l'AFD, les classes ne sont pas définies a priori par l'opérateur. L'objectif de la CAH est alors de classer n individus ou observations ayant un comportement similaire sur un ensemble de p variables. Cela nécessite de savoir calculer à chaque regroupement, la distance ou la dissimilarité entre les n individus ainsi que celle entre deux classes. Le regroupement entre individus se fait de manière hiérarchique, car les individus sont classés deux à deux des plus proches vers les plus éloignés. Il en résulte un arbre, ou dendrogramme, regroupant tous les individus selon leurs similitudes en un ensemble de classes. Le nombre de classes différentes est ensuite déterminé par l'expérimentateur à la vue du dendrogramme et en considérant l'écart entre les distances [11].

III.2. Interprétation des résultats obtenus par les méthodes statistiques descriptives

Les méthodes statistiques ont été réalisées avec XLStat. Dans notre étude, les p variables sont les différentes souches de micro-organismes et les n observations correspondent au pourcentage d'inhibition moyen obtenu pour les différents organes.

III.2.1. Distinction entre les organes

III.2.1.1. Traitement de l'ensemble des données

La figure V-3 montre l'ACP réalisée sur l'ensemble des observations, au nombre de 432, obtenues sur les différents micro-organismes et prenant en compte les différents organes, les deux solvants d'extractions et les trois concentrations. Dans notre cas les deux axes principaux (F1 et F2) décrivent seulement 47.88% de la variance totale des observations (Fig. V-3a). Les interprétations faites à partir de cette ACP ne seront donc pas hautement significatives et seules des tendances pourront être dégagées. En effet, 7 composantes principales sont nécessaires pour décrire totalement la variance du système (au moins 6 composantes pour décrire plus de 90% de la variance). On peut néanmoins en conclure que les 7 bactéries et champignons employés pour les tests d'activités sont bien choisis puisqu'ils produisent des informations très peu corrélées. On peut également observer ce fait dans la matrice de corrélation (Tableau V-3). Aucun coefficient de corrélation n'atteint 0.5 donc les activités antibactériennes et antifongiques observées sont bien différentes pour l'ensemble des extraits. De ce fait, l'information est très répartie sur les figures de l'ACP, ce qui les rend peu interprétables.

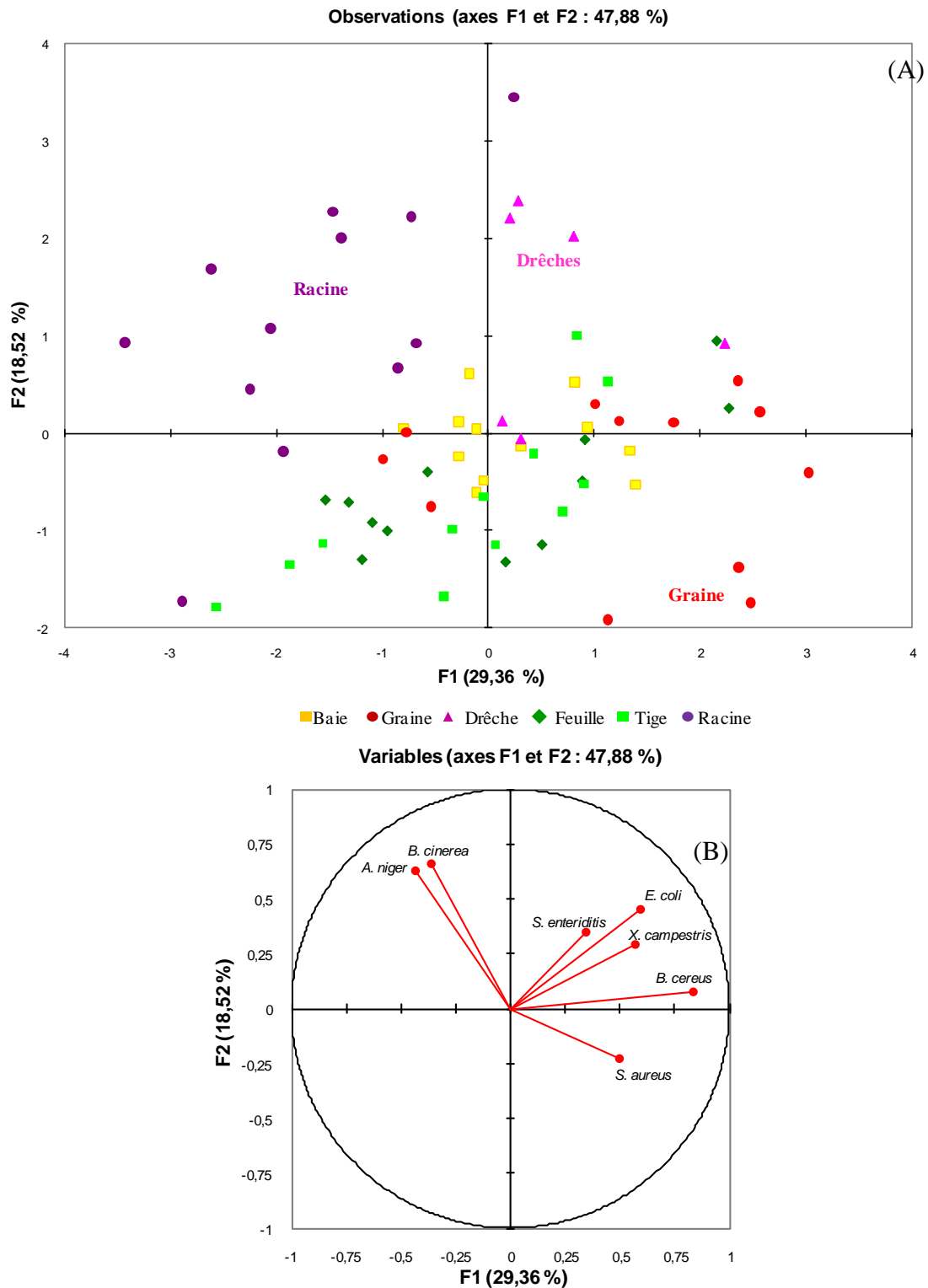


Figure V-3: Analyse en composantes principales basée sur le pourcentage d'inhibition moyen des différents organes obtenu sur différentes souches de micro-organismes. Les organes ont été testés dans les différentes conditions d'extraction et de concentration. (A) graphique d'observations, (B) graphique des variables.

Tableau V-3: Matrice des corrélations entre les différentes souches de micro-organismes obtenues avec le coefficient de corrélation de Pearson.

Variables	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>X. campestris</i>	<i>S. enteriditis</i>	<i>A. niger</i>	<i>B. cinerea</i>
<i>E. coli</i>	1	0,456	0,142	0,232	0,148	-0,012	0,030
<i>B. cereus</i>	0,456	1	0,264	0,415	0,151	-0,267	-0,198
<i>S. aureus</i>	0,142	0,264	1	0,039	0,166	-0,214	-0,134
<i>X. campestris</i>	0,232	0,415	0,039	1	0,136	-0,011	-0,125
<i>S. enteriditis</i>	0,148	0,151	0,166	0,136	1	-0,050	0,081
<i>A. niger</i>	-0,012	-0,267	-0,214	-0,011	-0,050	1	0,279
<i>B. cinerea</i>	0,030	-0,198	-0,134	-0,125	0,081	0,279	1

Néanmoins, les racines (en haut à gauche), les graines (en bas à droite) et les drêches (en haut à droite) semblent bien regroupées chacune dans une partie de la figure ce qui laisse supposer des activités distinctes au moins pour chacun de ces trois organes.

L'utilisation d'une AFD, avec une distinction entre les différents organes et donc une analyse sur 6 classes (baie, graine, drêche, feuille, tige, racine) a été réalisée dans le but de vérifier que les observations obtenues pour les différents organes appartiennent à des groupes communs. Les résultats sont représentés sous forme graphique dans la figure V-4. L'axe F1 représente près de 49% de la variance interclasses, alors que l'axe F2 représente environ 22% de cette variance. Ensemble, les deux premiers axes portent près de 71% de la variance totale, ce qui est raisonnable pour interpréter les résultats. L'observation simultanée de la répartition selon le 3^e axe permet d'observer 90% de la variance, et 99% si on observe aussi F4.

Le graphique des barycentres (Fig. V-4a) montre clairement que les 6 groupes d'organes sont bien répartis en classes distinctes. Ce résultat visuel est conforté par l'analyse de la matrice de confusion (Tableau V-4) qui permet de calculer un pourcentage des observations qui ont été classées a posteriori dans la même classe que celle proposée a priori. Dans notre cas la matrice de confusion permet de dire que 80.30 % des observations sont bien reclassées dans leur classe respective.

Les scores les plus faibles sont obtenus pour les classes 4 (Tige), 2 (Graine) et 6 (Drêche). Le mauvais score de la classe 6 peut être imputé au fait que cette classe contient moins d'individus (6 contre 12 pour les autres classes) ce qui induit des contours moins bien définis pour cette classe. On le remarque particulièrement sur le graphique des barycentres (Fig. V-4a) sur lequel l'ellipse de confiance est plus large pour la classe 6 (Drêche). Les classes 1 (Baie), 3 (Feuille) et 5 (Racine) sont, quant à elles, très bien distinguées des autres, avec un taux de reclassement très élevé.

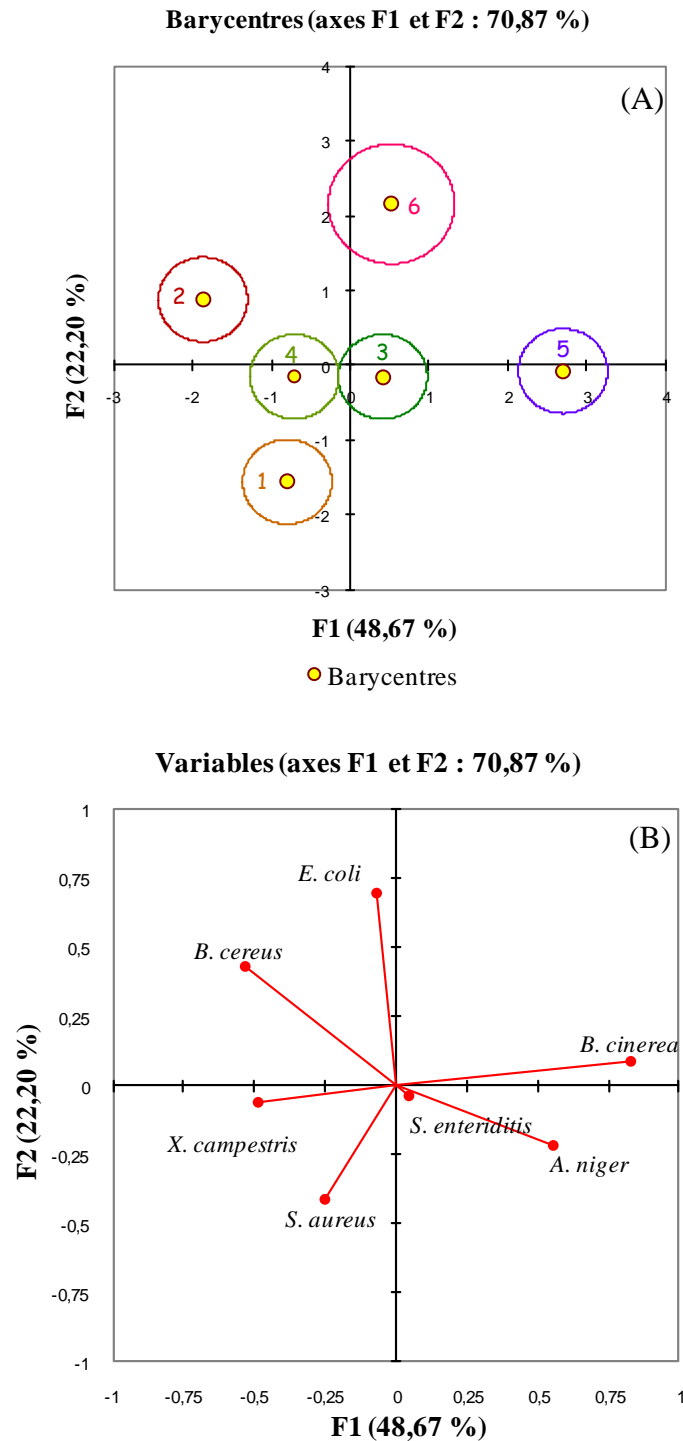


Figure V-4: Représentation graphique de l'AFD réalisée entre les organes dans les différentes conditions d'extraction et de concentration. (A) graphique des barycentres, (B) graphique des variables. 1 (Baie), 2 (Graine), 3 (Feuille), 4 (Tige), 5 (Racine) et 6 (Drèche).

Tableau V-4 : Matrice de confusion de l'AFD réalisée entre les organes. 1 (Baie), 2 (Graine), 3 (Feuille), 4 (Tige), 5 (Racine) et 6 (Drèche).

de \ Vers	1	2	3	4	5	6	Total	Pourcentage
1	12	0	0	0	0	0	12	100,00%
2	2	8	0	2	0	0	12	66,67%
3	1	0	11	0	0	0	12	91,67%
4	2	2	1	7	0	0	12	58,33%
5	0	0	0	1	11	0	12	91,67%
6	0	1	1	0	0	4	6	66,67%
Total	17	11	13	10	11	4	66	80,30%

La figure V-4b montre comment les six variables initiales sont corrélées avec les deux facteurs obtenus. On peut voir que le facteur F1 est corrélé avec *B. cinerea*, *X. campestris*, et *A. niger*, alors que F2 est corrélé avec *E. coli*, *B. cereus* et *S. aureus*. La bactérie *S. enteritidis* est peu discriminante pour les 6 classes : elle apporte très peu d'information car la majorité des extraits produisent une réaction d'amplitude comparable avec cette bactérie. En combinant les informations données par les deux graphiques de la figure V-4, on peut en conclure que le groupe 5 (Racine) se distingue essentiellement par son activité antifongique. Le groupe 1 (Baie) est principalement associé à une activité antibactérienne sur *S. aureus* ; le groupe 2 (Graine), une activité antibactérienne sur *B. cereus* ; le groupe 4 (Tige), une activité antibactérienne sur *X. campestris* ; le groupe 6 (Drèche), une activité antibactérienne sur *E. coli* et *B. cereus*. La classe 3 (Feuille) semble peu discriminée des autres sur F1-F2 mais apparaît plus clairement discriminée sur F3-F4, par son activité antibactérienne sur *S. aureus*.

Ainsi, d'après l'ACP et l'AFD réalisées sur l'ensemble des individus sans distinction d'origines, de solvants d'extraction et de concentration il apparaît en première approche que les organes ont bien un effet différent les uns des autres par rapport aux micro-organismes testés.

Afin de dégager des tendances plus significatives nous avons réduit le nombre d'observations. La figure V-5 montre un exemple représentatif de l'effet de la concentration sur l'activité antimicrobienne. De cette manière, en comparant l'effet de deux extraits, baie et racine, sur deux souches différentes, *B. cereus* et *S. enteritidis*, on observe qu'une augmentation de la concentration n'induit pas forcément une augmentation de l'activité. Il semble que l'activité observée ne soit pas toujours en lien avec la concentration en extrait testé, ce qui peut induire une dispersion large des différentes observations. Dès lors, seule la concentration de 100 µg/mL qui présente le moins de variabilité, sera utilisée par la suite pour évaluer l'effet antimicrobien des différents extraits.

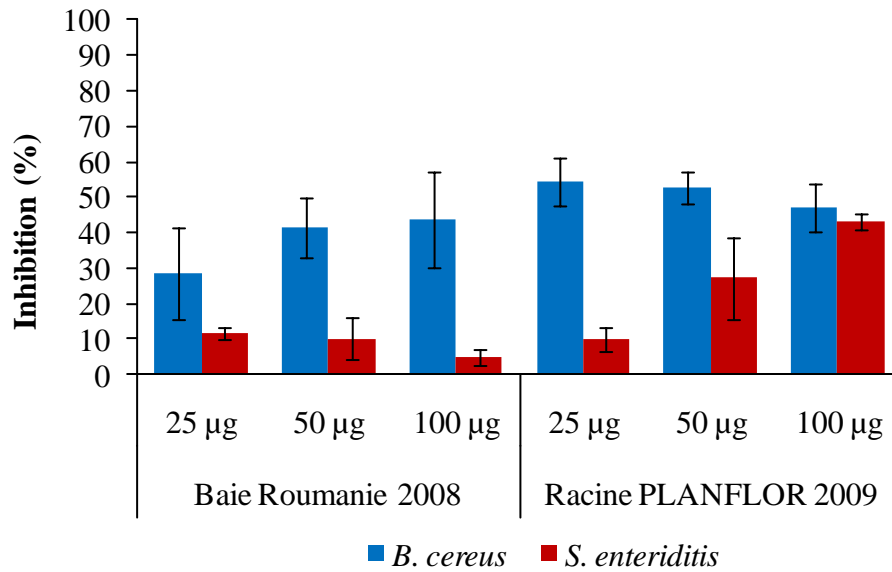


Figure V-5: Pourcentage d'inhibition moyen obtenu à partir d'extraits de baies (Roumanie 2008) et de racines (PLANFLOR 2009) d'argousier sur deux souches bactériennes *B. cereus* et *S. enterica sr enteritidis*. n = 6.

Par ailleurs, la méthodologie utilisée ne semble pas adaptée à l'étude de champignons filamenteux. En effet, la croissance non homogène de ces derniers et leur capacité à se développer sur les parois des puits ont entraîné des problèmes de mesure d'absorbance et a donc rendu l'exploitation des résultats concernant les champignons difficile. Dès lors, les analyses statistiques présentées ci-après ne prendront plus en compte la capacité inhibitrice des organes sur les champignons.

III.2.1.2. Traitement d'un espace réduit de données

Lorsque l'on réalise une ACP sur les observations réduites (égales à 110) obtenues sur les bactéries à une concentration d'extrait de 100 µg/mL (Fig. V-6), les deux axes principaux F1 et F2 décrivent 63.70 % de la variance totale et peuvent être considérés comme une représentation assez complète de l'ensemble des observations. 40.05 % de la variance est portée par la première composante principale où la dispersion est plus forte que sur l'axe de la deuxième composante principale. A partir du graphique des observations (Fig. V-6a) il peut être séparé deux groupes d'organes, d'une part les feuilles, tiges et racines, et d'autre part les baies, graines et drèches. Les ellipses qui entourent ces deux groupes d'organes ont été placées en tenant compte de la CAH suivante (Fig. V-7).

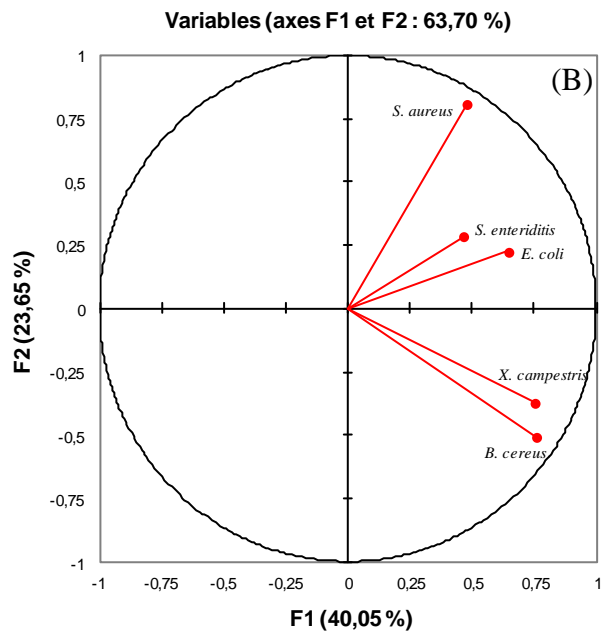
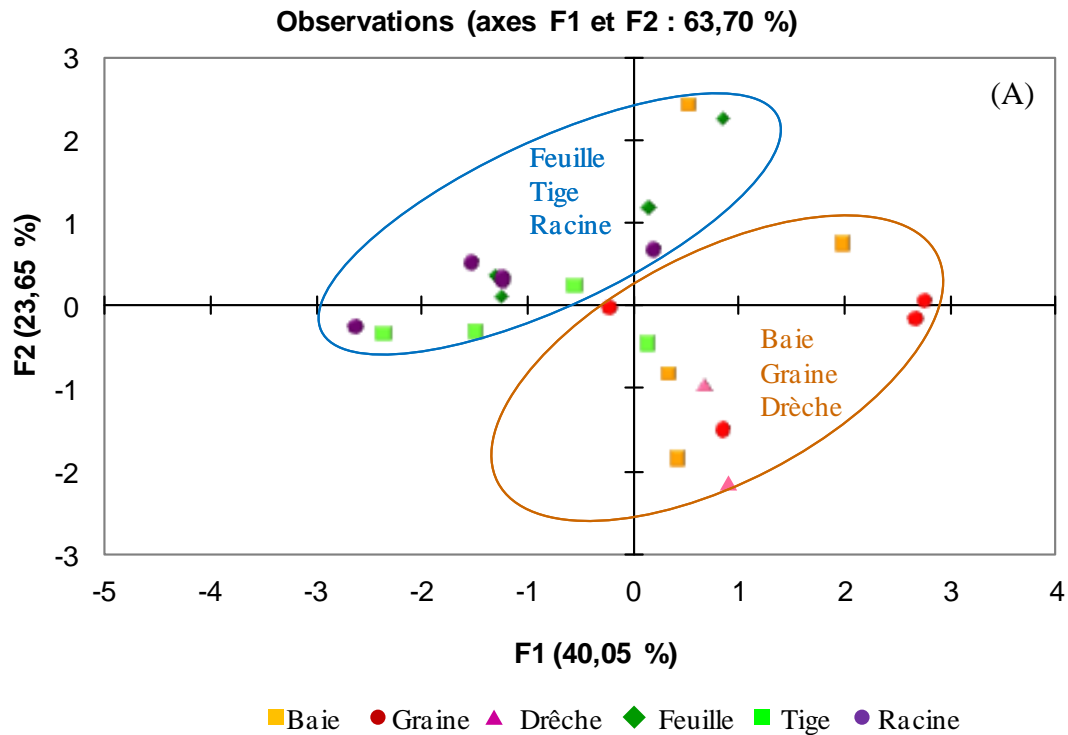


Figure V-6: Analyse en composantes principales basée sur le pourcentage d'inhibition moyen des différents organes obtenu sur différentes souches de micro-organismes. Les organes ont été testés à 100 µg/mL dans les différentes conditions d'extraction. (A) graphique d'observations, (B) graphique des variables.

La réalisation d'une CAH, en prenant en compte la distance euclidienne entre les groupes, sur les observations obtenues à 100 µg/mL permet de diviser, à un niveau de confiance de 95 %, les extraits testés en deux groupes distincts (Fig. V-7): le groupe à gauche du dendrogramme constitué d'extraits de feuilles, de tiges et de racines, et le groupe à droite du dendrogramme constitué d'extraits de baies, de graines et drèches. Ces résultats confirment l'ACP précédemment illustrée avec une importante dissimilarité entre feuille-tige-racine d'une part et baie-graine-drèche d'autre part.

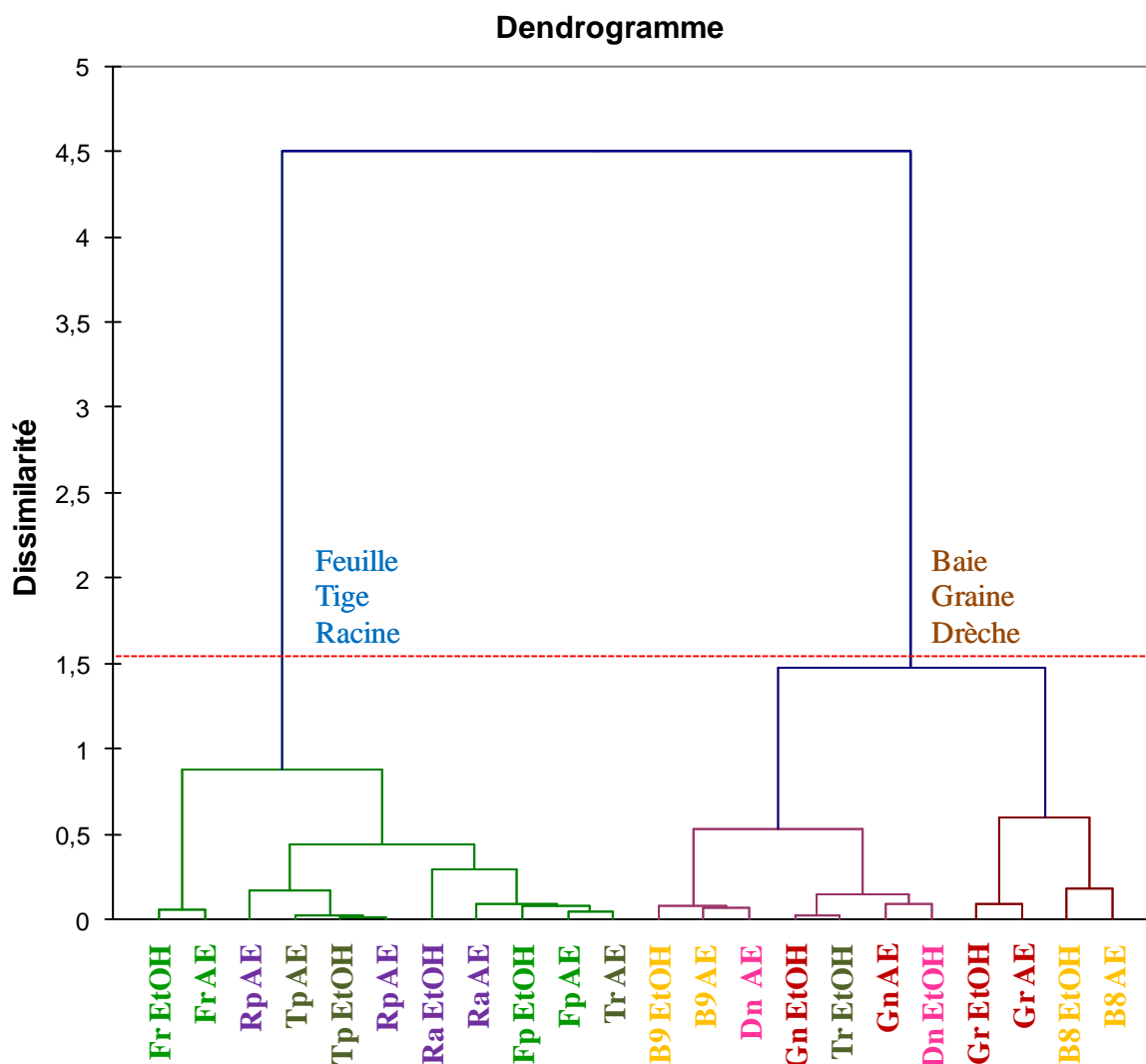


Figure V-7: Dendrogramme de la CAH réalisé à partir des pourcentages d'inhibitions moyens obtenus pour les différents organes de l'argousier à 100 µg/mL sur différentes souches bactériennes. EtOH, Ethanol ; AE, Acétate d'Ethyle ; F, Feuille ; T, Tige ; R, Racine ; B, Baie, G, Graine ; D, Drèche ; r, Roumanie ; p, PLANFLOR ; a, Ploudalmézeau ; n, NATVIT.

La figure V-8 détaille le pourcentage d'inhibition moyen obtenu pour les différents échantillons à 100 µg/mL sur trois souches *B. cereus*, *S. enterica ser enteriditis* et *X. campestris*. Il peut être observé que le groupe feuille-tige-racine présente un potentiel antimicrobien plus intéressant que le groupe baie-graine-drèche, et ceci est particulièrement vrai pour la souche *X. campestris*. Cette activité plus élevée pour le groupe feuille-tige-racine pourrait donc être à la base de la dissimilarité observée lors de la CAH.

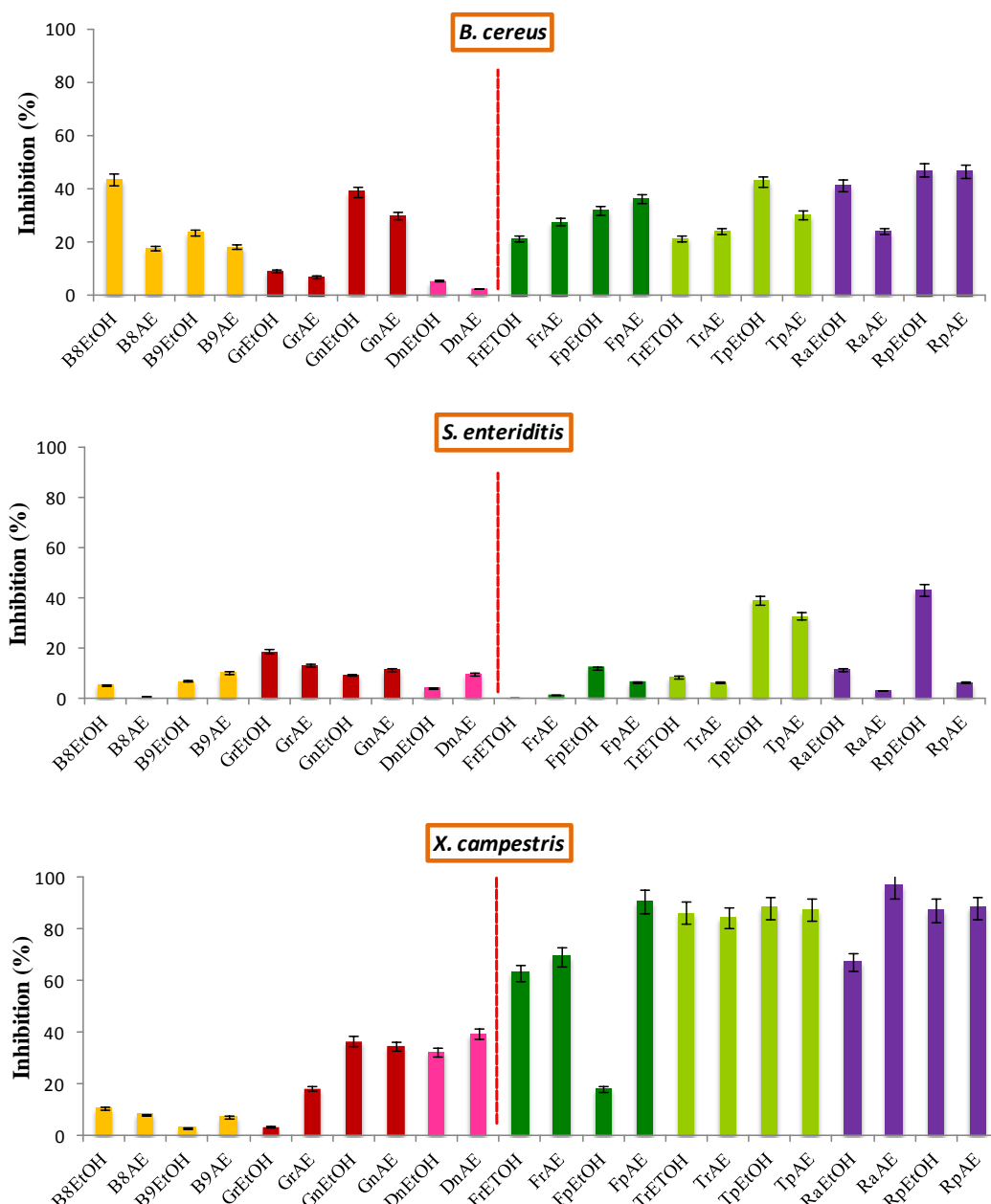


Figure V-8: Pourcentage d'inhibition moyen obtenu à partir d'extraits de différents organes d'argousier à 100 µg/mL sur trois souches bactériennes *B. cereus*, *S. enterica ser enteriditis* et *X. campestris*. n = 6. La ligne rouge verticale représente la démarcation entre les deux groupes d'organes. EtOH, Ethanol ; AE, Acétate d'éthyle ; F, Feuille ; T, Tige ; R, Racine ; B, Baie, G, Graine ; D, Drèche ; r, Roumanie ; p, PLANFLOR ; a, Ploudalmézeau ; n, NATVIT.

III.2.2. Effet du solvant d'extraction

Pour évaluer l'effet du solvant d'extraction sur l'activité antimicrobienne nous avons réalisé une AFD entre les deux solvants utilisés (Classe 1 : Ethanol, Classe 2 : Acétate d'éthyle).

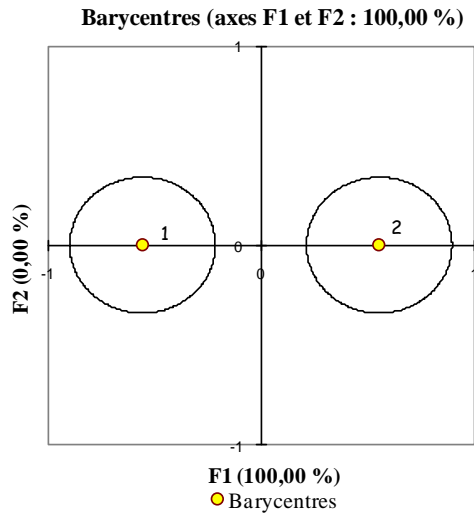


Figure V-9: Graphique des barycentres obtenu par l'AFD réalisée entre les solvants d'extraction: 1 (Ethanol) et 2 (Acétate d'éthyle).

Le graphique des barycentres (Fig. V-9), qui décrit 100 % des informations, montre clairement que les deux solvants d'extraction sont bien répartis en deux classes distinctes. L'aire sous la courbe ROC (Receiver Operating Characteristics), nécessaire à la confirmation du modèle lorsque seules deux classes sont proposées, vaut 0.770 ce qui indique également une discrimination significative entre les deux classes. De plus, la matrice de confusion (tableau V-5) montre que ce résultat est significatif avec 72.73% des points reclassés à l'intérieur de leur classe initiale respective.

Tableau V-5: Matrice de confusion de l'AFD réalisée entre les solvants. 1 (Ethanol), 2 (Acétate d'éthyle).

de \ Vers	1	2	Total	Pourcentage
1	21	12	33	63,64%
2	6	27	33	81,82%
Total	27	39	66	72,73%

Les résultats de l'AFD montrent clairement que l'on peut donc différencier les extractions réalisées avec EtOH de celles réalisées avec AE. Cependant, elle ne détermine pas quel est le solvant d'extraction qui conduit à une meilleure activité des extraits. Pour cela nous avons réalisé une analyse de la variance à un facteur conçue pour comparer les moyennes des différents niveaux qui sont ici EtOH et AE. La figure V-10 permet de juger de l'impact de chaque solvant d'extraction sur l'activité antimicrobienne vis-à-vis des cinq

souches bactériennes testées. On peut remarquer que les extraits EtOH induisent une activité supérieure sur *E. coli*, *B. cereus* et *S. enterica ser enteritidis*, alors que les extraits AE induisent une activité supérieure sur *S. aureus* et *X. campestris*. Cependant ces différences ne sont pas significatives à un niveau de confiance de 95 % ($p > 0.05$).

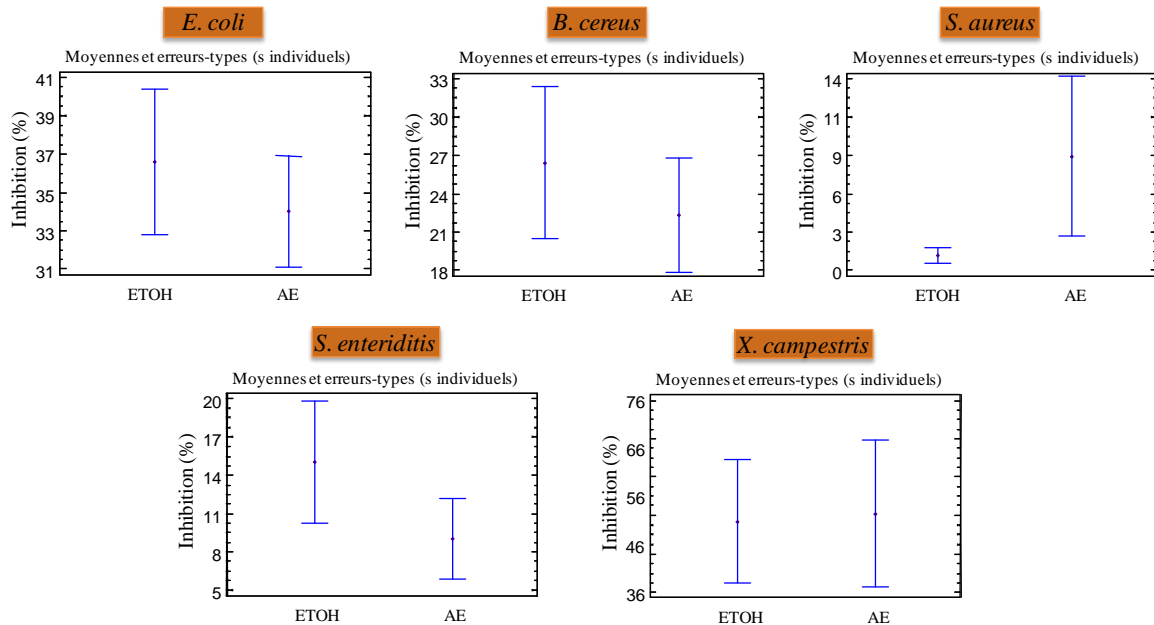


Figure V-10: Graphique de l'analyse de variance à un facteur comparant les moyennes des niveaux éthanol (EtOH) et acétate d'éthyle (AE) obtenus pour les bactéries *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *S. enterica ser enteritidis* et *X. campestris*.

En conclusion de cette étude préliminaire, il s'avère que les résultats d'activité antimicrobienne sont très variables d'un organe à un autre et d'un microorganisme à un autre. Néanmoins, d'après l'étude statistique, deux groupes d'organes se différencient: le groupe feuille-tige-racine et le groupe baie-graine-drèche, avec une capacité inhibitrice du premier groupe qui s'avère être plus élevée que celle du deuxième groupe. De même l'effet du solvant d'extraction est fortement soumis à variation et aucune différence significative n'a pu être dégagée si ce n'est une légère tendance des extraits EtOH à être plus actifs que les extraits AE. De plus, aucun lien entre l'origine des organes et l'activité antimicrobienne n'a pu être mis en évidence.

A partir des résultats de cette étude exploratoire nous avons pu affiner notre domaine de variables pour une étude plus approfondie. La détermination du pouvoir antimicrobien et l'investigation phytochimique seront réalisés à partir d'extraits de feuilles, tiges et racines qui présentent un potentiel antimicrobien plus intéressant et l'intérêt de n'avoir été que très peu étudiés jusqu'à présent. Les graines seront également testées car ce sont des co-produits de la filière argousier, et déjà caractérisées pour leurs activités antimicrobienne et antioxydante [12,

13]. Elles constitueront de ce fait un excellent témoin à partir duquel on pourra s'appuyer et vérifier la qualité de notre procédure. De plus, afin de réduire la variabilité intra-organe nous allons restreindre à une seule origine les différents organes testés: PLANFLOR pour les feuilles, tiges et racines et NATVIT pour les graines. Enfin, EtOH sera le solvant d'extraction utilisé car il induit une bonne activité antimicrobienne et des rendements d'extraction beaucoup plus élevés que ceux obtenus avec AE. De plus EtOH est un solvant biodégradable et peu toxique ce qui nous permet de rester dans l'approche d'extraction « verte » développée dans le premier chapitre de cette thèse.

IV. Bioactivité et investigation phytochimique des feuilles, tiges, racines et graines

Dans cette partie les objectifs de l'étude approfondie seront multiples:

- fractionner les extraits bruts éthanoliques de chaque organe
- confirmer l'activité antimicrobienne des extraits éthanoliques ainsi que de leurs fractions respectives sur des souches pathogènes de l'homme.
- évaluer l'activité antioxydante des extraits bruts et des fractions
- étudier la composition phytochimique des extraits bruts et des fractions

IV.1. Fractionnement des extraits bruts par Extraction Liquide-Liquide (ELL)

Dans l'optique de séparer les extraits bruts éthanoliques des quatre organes (feuille, tige, racine, graine) en fractions de polarités différentes nous avons opté pour un fractionnement ELL qui permet de partager les molécules selon leurs propriétés physico-chimiques entre deux phases liquides non miscibles. Notre but ici était d'obtenir trois fractions pour limiter le nombre de tests de bio-activité, c'est pourquoi nous avons choisi le fractionnement par ELL plutôt que le fractionnement par CPC qui aurait engendré un plus grand nombre de fractions, et dont le nombre de fractions aurait pu être différents suivant les organes. La méthodologie est résumée dans la figure V-11 et en annexe 3. Les extraits bruts éthanoliques sec (300 mg de feuilles ou de graines dans 100 mL et 80 mg de racines et de tiges dans 20 mL de solvant) ont été premièrement dissous dans un mélange H₂O:EtOH (9:1) puis partagés successivement avec trois volumes d'hexane (H) et trois volumes d'acétate d'éthyle (AE) pour constituer respectivement une fraction apolaire dans l'hexane (FH) et une fraction moyennement polaire dans l'acétate d'éthyle (FAE). La solution hydro-alcoolique restant à la fin du partage à été utilisée comme fraction polaire (Faq).

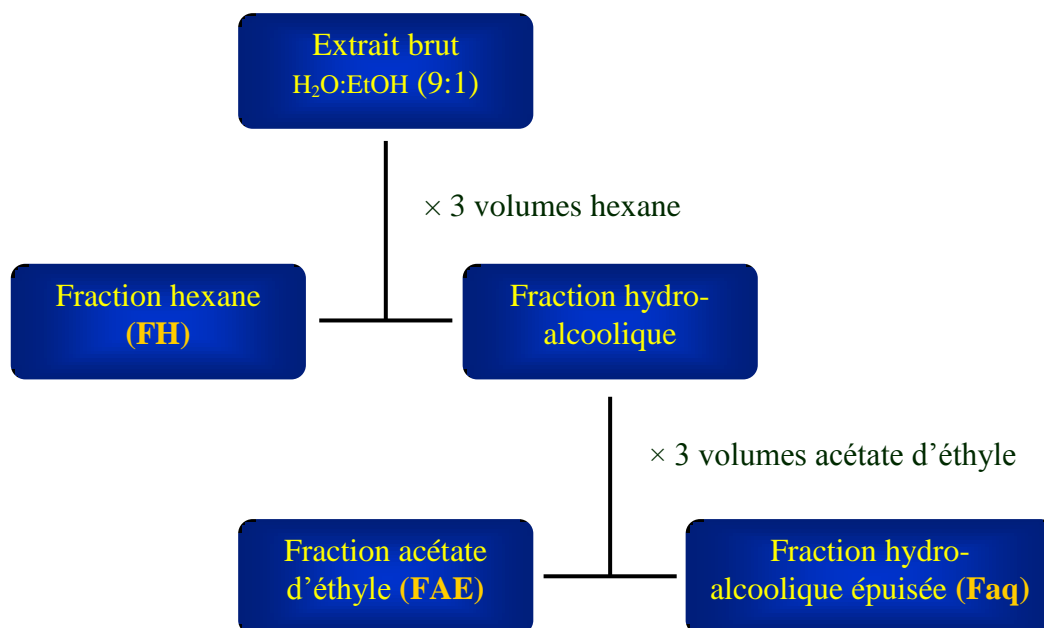


Figure V-11: Schéma de fractionnement ELL adopté pour le partage en trois fractions (FH, FAE et Faq) de l'extrait brut éthanolique de feuilles, tiges, racines et graines.

Le tableau V-6 présente les pourcentages massiques ainsi que les couleurs des trois fractions obtenues à partir des extraits bruts éthanoliques. On peut notamment remarquer que quelque soit l'organe la fraction Faq est toujours la plus importante suivi des fractions FH et FA. En outre, les trois fractions ont des pourcentages massiques assez homogènes, ce qui démontre d'une part que les extraits contiennent des molécules couvrant une large gamme de polarité et d'autre part, que celles-ci ont bien été partagées entre les trois fractions.

Tableau V-6: Pourcentage massique (%) et couleur des fractions obtenues après le fractionnement ELL de l'extrait brut éthanolique.

Organes	Pourcentage massique (%) et couleur		
	FH	FAE	Faq
Feuille	37.60	20.26	40.60
	Vert foncé	Vert	Jaune
Tige	30.75	22.75	49.75
	Vert	Jaune foncé	Jaune
Racine	25.00	22.75	29.75
	Marron	Orangée	Jaune
Graine	27.60	18.75	34.16
	Jaune	Jaunâtre	Rouge

FH, Fraction hexane ; FAE, Fraction acétate d'éthyle, Faq, Fraction aqueuse

IV.2. Activité antimicrobienne

Pour caractériser l'activité antimicrobienne de l'extrait brut éthanolique et de ses fractions, nous avons utilisé préférentiellement des souches pathogènes de l'homme et d'origine connue, c'est-à-dire identifiées avec un numéro ATCC: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. durans* ainsi que la levure *C. albicans*, et similaires à celles utilisées dans l'étude exploratoire.

Tableau V-7: Pourcentage d'inhibition (%) de l'extrait brut éthanolique et des fractions obtenu à 100 µg/mL sur diverses souches microbiennes.

		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. durans</i>	<i>C. albicans</i>
Feuille	EB	42 ± 1	24 ± 3	32 ± 6	72 ± 3	40 ± 6	67 ± 7
	Faq	31 ± 8	24 ± 16	71 ± 12	85 ± 12	/	/
	FAE	24 ± 11	34 ± 1	9 ± 3	26 ± 9	/	/
	FH	/	/	/	/	/	/
Tige	EB	39 ± 1	22 ± 1	41 ± 9	36 ± 8	34 ± 4	53 ± 11
	Faq	33 ± 17	45 ± 4	71 ± 4	48 ± 15	/	/
	FAE	/	36 ± 4	35 ± 10	22 ± 6	/	/
	FH	/	/	/	/	/	/
Racine	EB	40 ± 1	16 ± 3	45 ± 6	25 ± 10	63 ± 6	55 ± 3
	Faq	37 ± 4	43 ± 5	67 ± 6	21 ± 2	/	/
	FAE	23 ± 8	26 ± 2	16 ± 6.6	/	/	/
	FH	/	/	/	/	/	/
Graine	EB	38 ± 11	28 ± 9	64 ± 4	41 ± 12	68 ± 13	68 ± 1
	Faq	45 ± 3	36 ± 2	89 ± 5	42 ± 10	/	/
	FAE	23 ± 3	24 ± 2	12 ± 9	/	/	/
	FH	/	/	/	/	/	/

EB, Extrait Brut ; Faq, Fraction aqueuse ; FAE, Fraction acétate d'éthyle ; FH, Fraction hexane.

Le tableau V-7 donne la capacité inhibitrice de l'extrait brut et des fractions vis-à-vis de ces souches obtenue à une concentration en extrait ou fraction de 100 µg/mL. Cette concentration est celle qui donne le meilleur compromis au niveau du rapport activité-concentration. En effet, des concentrations plus élevées ont parfois mené à des inhibitions plus faibles. Aucune explication précise n'a pu être apportée vis-à-vis de ce phénomène, cependant il pourrait être lié à la nature du test utilisé (micro-dilution). Ainsi, une concentration importante en extrait a parfois induit, non plus une inhibition, mais une croissance des micro-organismes. Dès lors, bien que plusieurs concentrations en extrait (50, 100, 150, 200, 250 and 300 µg/mL) aient été testées nous n'avons pas pu déterminer de valeurs CMI, conventionnellement utilisées pour déterminer une activité antimicrobienne, car aucune de ces concentrations n'a mené à une inhibition totale de 100 %. Les extraits et fractions ont donc été comparés en fonction de leur capacité à inhiber la croissance des micro-organismes.

Les extraits bruts éthanoliques possèdent tous un potentiel antimicrobien mais les résultats d'activité antimicrobienne diffèrent selon les organes et les micro-organismes. Ainsi, l'inhibition maximale est obtenue contre *S. aureus* (72 ± 3 %) pour l'extrait de feuilles, contre *B. cereus* (64 ± 4 %) pour l'extrait de graines, et contre *E. durans* (63 ± 6 et 68 ± 13 %) pour les extraits de racines et de graines. L'inhibition obtenue contre *E. coli* (38 à 42 %) et *C. albicans* (53 à 68 %) est d'une manière générale constante quelque soit l'organe testé. Tandis que l'inhibition obtenue contre *P. aeruginosa* peut être considérée comme minimale car elle présente des inhibitions inférieures aux autres souches quelque soit l'organe testé. Cette capacité inhibitrice inférieure observée pour *P. aeruginosa* peut être liée au fait que cette souche est connue pour acquérir facilement des résistances par mutation vis-à-vis de divers classes d'antibiotiques [14], ce qui lui permet de développer des mécanismes complexes de résistance. Les extraits d'argousiers sont actifs à la fois sur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, mais ici il semble difficile de corréler l'activité d'un organe à un type de bactéries ou de déterminer si un organe est plus actif qu'un autre car les réponses observées varient suivant les organes et les micro-organismes. Cette variabilité peut être expliquée par la nature complexe des extraits et par la différence de composition de l'enveloppe bactérienne entre bactéries Gram positif et négatif pouvant entraîner une sensibilité extrêmement variable en fonction des extraits et des micro-organismes testés.

L'analyse de l'activité antimicrobienne des fractions montre que Faq est la fraction la plus inhibitrice notamment contre *B. cereus* et *S. aureus* pour les quatre organes (Tableau V-7). Faq possède même une activité inhibitrice contre *B. cereus* deux fois plus importante que l'extrait brut, ce qui peut s'expliquer par un phénomène de concentration des molécules actives dans cette fraction. Dans le cas de *E. coli* et *P. aeruginosa* l'action antimicrobienne se partage entre les fractions Faq et FAE, avec la fraction Faq plus inhibitrice que la fraction FAE sauf contre *P. aeruginosa* pour l'extrait de feuilles. En revanche, la fraction FH est la moins active contre tous les micro-organismes testés. Il peut être noté par ailleurs que l'activité inhibitrice des extraits bruts éthanoliques, vis-à-vis de *E. durans* et *C. albicans*, ne se retrouve dans aucune des trois fractions. Cette perte d'activité peut être due à la séparation, dans les différentes fractions, des molécules qui agissaient de manière synergique dans les extraits bruts. En conclusion nous pouvons dire que l'activité antimicrobienne des extraits bruts éthanoliques se retrouvent principalement après fractionnement dans la fraction la plus polaire Faq.

IV.3. Activité antioxydante

L'activité antioxydante a été déterminée en utilisant les deux tests chimiques DPPH' et FRAP précédemment décrits (Chapitre 2 et 4). Compte tenu du nombre d'échantillons à tester dans cette étude, ces méthodologies ont été miniaturisées pour être réalisables en microplaques (Annexe 6), et les résultats ont été exprimés en mg d'Equivalent Trolox/g d'extrait sec (mg ET/g), à partir des données d'absorbance et d'une droite d'étalonnage externe du trolox réalisée entre 0.1 et 1 mg/mL. Les résultats obtenus pour une concentration en extrait de 1000 µg/mL pour ces deux tests sont résumés dans le tableau V-8 ainsi que dans la figure V-12.

L'activité antioxydante des extraits bruts éthanoliques obtenue avec le test DPPH' varie de 175 à 529 mg ET/g. L'activité antioxydante des extraits bruts de racines (500 ± 64 mg ET/g) et de graines (529 ± 79 mg ET/g) est significativement supérieure à celle obtenue pour les extraits de feuilles (175 ± 57 mg ET/g) et de tiges (210 ± 42 mg ET/g) ($p < 0.0001$). Les résultats obtenus avec le test FRAP vont dans le même sens pour les extraits de racines (311 ± 31 mg ET/g) et de graines (454 ± 82 mg ET/g) qui présentent une activité significativement supérieure à celle des extraits de feuilles (171 ± 19 mg ET/g) et de tiges (137 ± 9 mg ET/g) ($p < 0.0001$). Par ailleurs, le coefficient de corrélation de Pearson ($\rho = 0.747$) nous permet de confirmer la forte corrélation entre les résultats de ces deux tests ($p < 0.0001$). De ce fait, les organes peuvent être classés selon leur capacité antioxydante dans l'ordre suivant: graine, racine, feuille et tige du plus antioxydant au moins antioxydant. Ce résultat est en accord avec ceux établis précédemment par Sharma *et al.* [15] qui ont démontré que les graines ont une capacité antioxydante plus importante que les feuilles d'argousier. Pour les résultats concernant les tiges et les racines nous n'avons pas de valeurs comparatives puisqu'aucun travail n'a été fait sur ces organes jusqu'à présent. Néanmoins, nous pouvons vérifier la cohérence des conclusions obtenues pour ces deux organes puisque les tiges apparaissent comme l'organe le moins actif quelque soit le type de test employé (tests chimiques antioxydants ou tests antimicrobiens).

Tableau V-8: Détermination du pouvoir antioxydant des différentes organes et des fractions obtenu à 1000 µg/mL avec les tests DPPH[•] et FRAP.

		DPPH [•] (mg ET/g)	FRAP (mg ET/g)
Feuille	EB	175 ± 57	171 ± 20
	Faq	275 ± 57	148 ± 16
	FAE	161 ± 17	106 ± 17
	FH	87 ± 8	16 ± 3
Tige	EB	210 ± 42	137 ± 9
	Faq	263 ± 19	118 ± 6
	FAE	172 ± 25	69 ± 10
	FH	41 ± 9	5 ± 1
Racine	EB	500 ± 64	311 ± 31
	Faq	304 ± 13	367 ± 32
	FAE	63 ± 9	5 ± 3
	FH	31 ± 6	2 ± 0.2
Graine	EB	529 ± 79	454 ± 82
	Faq	368 ± 15	324 ± 41
	FAE	81 ± 5	28 ± 3
	FH	19 ± 6	7 ± 1

EB, Extrait Brut ; Faq, Fraction aqueuse ; FAE, Fraction acétate d'éthyle ; FH, Fraction hexane.

En ce qui concerne les différentes fractions, lorsque l'on prend en considération les deux tests, elles présentent toutes une activité antioxydante (> 2 mg ET/g). Cependant, l'activité antioxydante de la fraction Faq est toujours la plus élevée quelque soit l'organe. Pour les feuilles et les tiges l'activité se partage entre Faq et FAE, mais Faq est toujours significativement plus active que FAE (DPPH[•]: $p < 0.0001$; FRAP: $p < 0.007$). A contrario, la capacité antioxydante de FH est toujours bien la plus faible quelque soit l'organe.

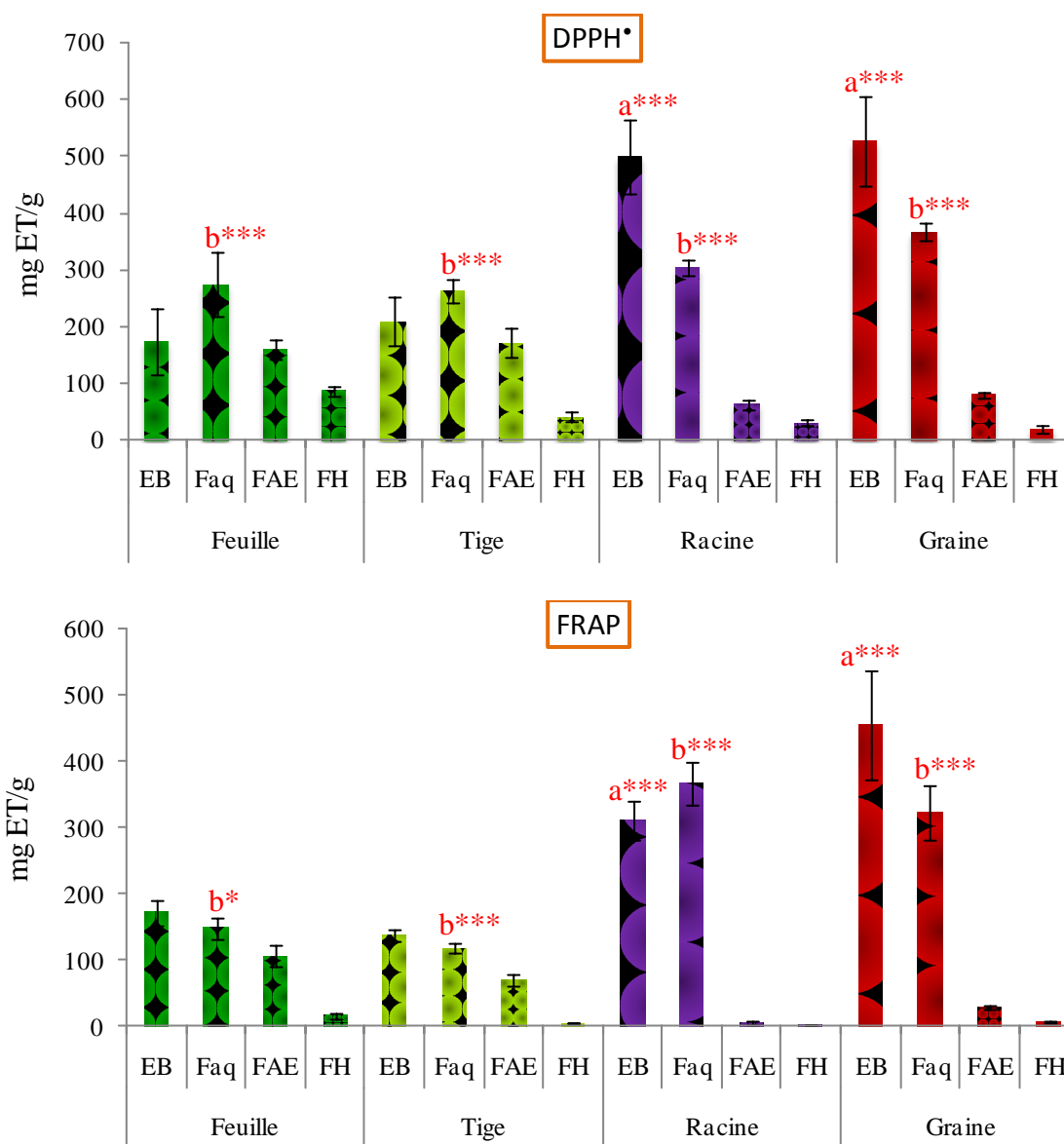


Figure V-12: Activité antioxydante des extraits bruts éthanoliques des différents organes et des fractions obtenus à 1000 µg/mL avec le test DPPH• et le test FRAP. **a** significativement différent des extraits bruts de feuilles et de tiges. **b** significativement différent de FAE de l'organe correspondant. *** statistiquement significatif au niveau de confiance de 99.9 %. EB, Extrait Brut ; FH, Fraction hexane ; FAE, Fraction acétate d'éthyle, Faq, Fraction aqueuse.

Ainsi, comme pour l'activité antimicrobienne, l'activité antioxydante des extraits bruts éthanoliques se retrouvent après fractionnement dans la fraction la plus polaire Faq, ce qui laisse à penser que les activités mises en évidence dans les différents organes de l'argousier seraient dues à la présence de molécules à caractère plutôt polaire tels que des composés phénoliques hydroxylés ou des molécules glycosylées.

IV.4. Caractérisation phytochimique par chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC, High Performance Thin Layer Chromatography)

Pour identifier les familles moléculaires présentes dans les extraits bruts éthanoliques ainsi que dans les fractions nous avons effectué un criblage phytochimique par HPTLC. C'est une technique appréciée en phytochimie car elle fournit une empreinte chromatographique des extraits étudiés et un grand nombre d'échantillons peut être analysé simultanément. De plus, des révélateurs spécifiques aux familles moléculaires ou à des activités biologiques peuvent être appliqués après la séparation, indiquant directement la présence ou non de molécules bioactives [16]. Dans notre cas, nous avons utilisé différents systèmes phase stationnaire-phase mobile combinés à différents révélateurs moléculaires dans le but d'identifier principalement des composés polaires: sucres, acides aminés et polyphénols, mais également des molécules apolaires: acide gras et terpènes (Annexe 5). Bien que celui-ci n'ait pas été systématiquement calculé, le Rapport frontal (Rf) qui correspond, pour une phase stationnaire et une phase mobile données, à la distance parcourue par le composé divisé par la distance parcourue par l'éluant, sera parfois employé par la suite pour aider à évaluer la distance de migration des composés. Ainsi un Rf faible est caractéristique d'une molécule qui a peu migré et qui est donc proche de la ligne de dépôt, alors qu'un Rf élevé est caractéristique d'une molécule qui a fortement migré et qui est donc proche du front de migration, avec une forte affinité pour la phase mobile.

➤ **Caractérisation des sucres et acides aminés**

La figure V-13 présente une photographie dans le visible des plaques HPTLC des acides aminés et des sucres après révélation spécifique. Les acides aminés sont révélés par la ninhydrine en taches roses-violettes, qui virent parfois au brun, comme c'est le cas pour les standards déposés: phénylalanine (Phe), valine (val), sérine (Ser) et arginine (Arg). Bien que la couleur des bandes ne soit pas intense nous pouvons relever la présence d'acides aminés dans l'extrait brut et dans la fraction Faq des feuilles ainsi que dans celles des tiges avec des Rf différents de ceux des standards. D'après la figure V-13, les autres organes semblent moins riches en acides aminés. Seule l'analyse de cette plaque « à l'œil » a permis de révéler la présence de bandes violettes de faibles intensités au niveau de l'extrait brut de tiges, racines et graines et de leurs fractions Faq respectives. Ces bandes n'étant plus visibles sur la photographie.

Les sucres ont été révélés après les acides aminés sur la même plaque par l'application du révélateur molich. Les bandes contenant des sucres apparaissent en violet. On peut

clairement mettre en évidence la présence de sucres dans l'extrait brut et la fraction Faq des feuilles, tiges et graines. En comparant les Rf des bandes obtenues pour les extraits et les Rf du xylose (Xyl), du glucose (Glu) et du saccharose (Sac), on peut émettre l'hypothèse que les sucres présents dans les feuilles et les tiges sont des monosaccharides tel que le glucose, et que les graines contiennent à la fois des monosaccharides et des disaccharides (saccharose).

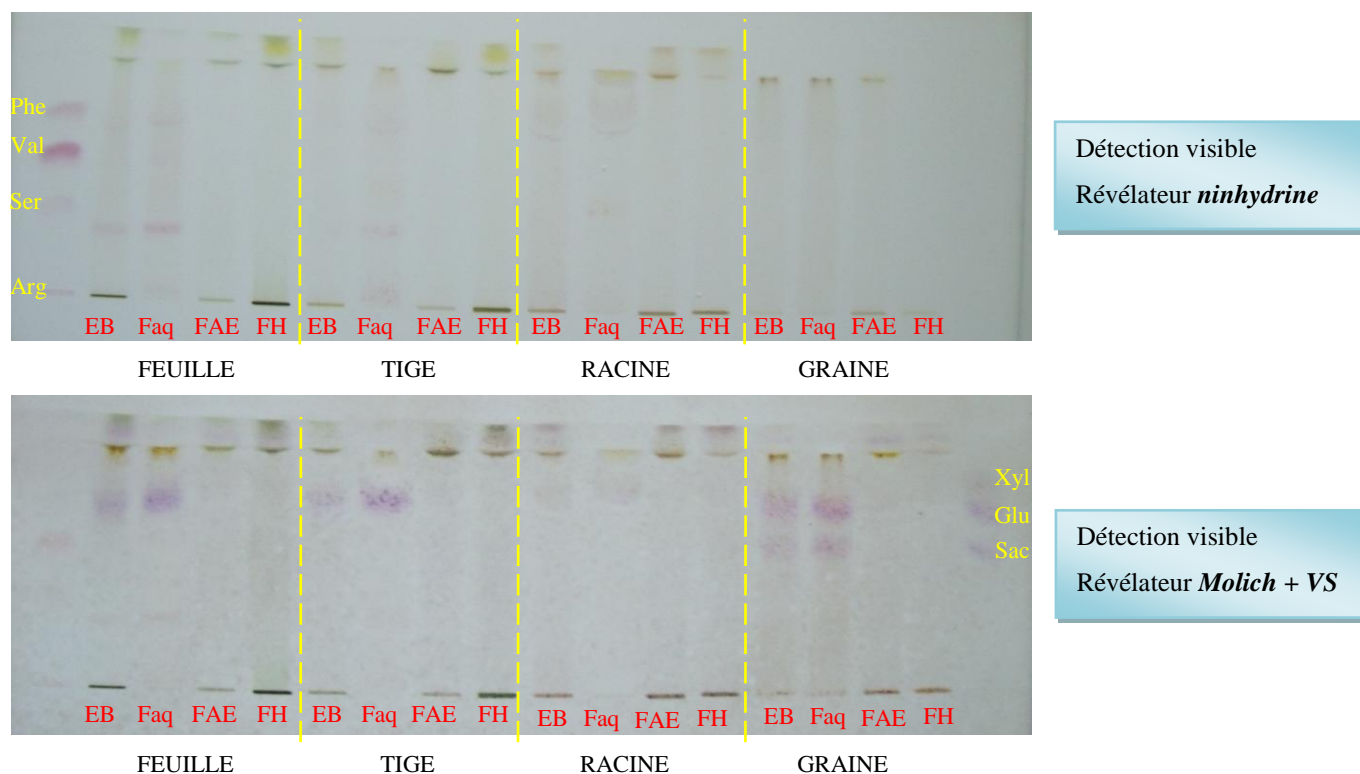


Figure V-13: Empreintes phytochimiques en acides aminés et en sucres des extraits bruts éthanoliques et des fractions des différents organes obtenues par HPTLC. Phase stationnaire: plaque HPTLC silice 60 F₂₅₄ (10 × 20). Solvant de migration: ACN:H₂O (75:25, v/v). Révélation des acides aminés par la ninhydrine, et des sucres par molich. EB, Extrait Brut ; Faq, Fraction aqueuse ; FAE, Fraction acétate d'éthyle ; FH, Fraction hexane ; Phe, phénylalanine ; Val, valine ; Ser, sérine ; Arg, arginine ; Xyl, xylose ; Glu, glucose ; Sac, saccharose.

➤ Caractérisation des terpènes

La figure V-14 présente les empreintes HPTLC obtenues pour les différents extraits avant et après révélation à l'anisaldéhyde. Avant révélation des terpènes, il peut être observé que les feuilles et tiges contiennent de la chlorophylle caractérisée par des bandes rouges à roses sous UV à 366 nm. La chlorophylle est présente dans les extraits bruts et également dans les fractions peu polaires et apolaires FAE et FH. Dans notre étude, les tiges ont été récoltées sur de jeunes pieds d'argousier (2 ans) ce qui explique que cet organe soit toujours chlorophyllien.

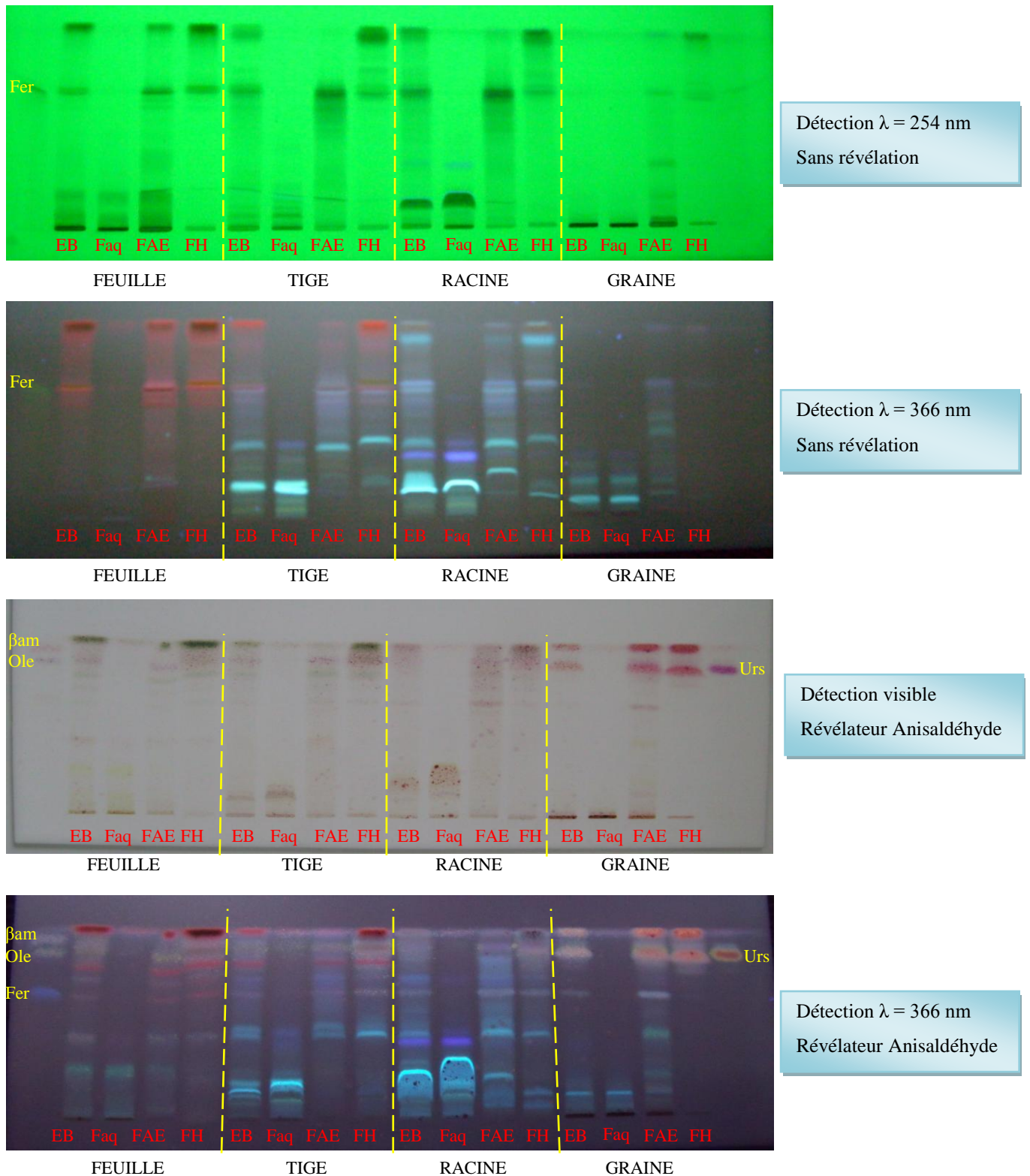


Figure V-14: Empreintes phytochimiques en terpènes des extraits bruts éthanoliques et des fractions des différents organes obtenues par HPTLC. Phase stationnaire: plaque HPTLC silice 60 F₂₅₄ (10 × 20). Solvant de migration: CHCl₃:MeOH:H₂O (90:20:1.5, v/v). Révélation à l'anisaldéhyde. EB, Extrait Brut ; Faq, Fraction aqueuse ; FAE, Fraction acétate d'éthyle ; FH, Fraction hexane ; β am, β -amyrine ; Ole, acide oléanolique ; Fer, acide ferulique ; Urs, acide ursolique.

Après révélation à l'anisaldéhyde les terpènes apparaissent en violet. Il peut être remarqué que dans nos conditions de séparation les terpènes et notamment les triterpènes tels que la β -amyrine (β am), l'acide oléanolique (Ole) et l'acide ursolique (Urs) ne sont pas retenus et possèdent en conséquence un Rf élevé. En comparant les empreintes dans le visible et sous UV à 366 nm des extraits et des standards, il semble que des triterpènes soient présents dans tous les organes, et qu'après fractionnement ceux-ci se retrouvent dans les fractions peu polaires et apolaires FAE et FH. Par ailleurs, tous les composés visibles sous UV à 254 et 366 nm et qui présentent un Rf inférieur à celui de l'acide férulique (Fer) ne semblent pas être des composés terpéniques, mais plutôt des composés plus polaires qui pourraient être des dérivés phénoliques.

➤ **Caractérisation des polyphénols**

La figure V-15 présente les empreintes HPTLC obtenues pour les différents extraits avant et après révélation avec les révélateurs spécifiques des polyphénols NEU+PEG. Avant révélation, il peut être observé que tous les organes contiennent des polyphénols mais que leurs natures semblent différentes suivant les organes. En effet, malgré les effets de bords les feuilles semblent contenir des flavonols tels que l'isorhamnétine (Iso), l'isorhamnétine-3-O-glucoside (I3g) et l'isorhamnétine-3-O-rutinoside (I3r) alors que les autres organes présentent des bandes qui fluorescent fortement à 366 nm. Par exemple, dans les racines on peut observer la présence de molécules fortement fluorescente particulièrement visible même sans révélation. Il est à noter ici que la photographie réalisée modifie les couleurs ainsi, bien que la couleur de fluorescence semble similaire sur la photographie, elle est en fait différente d'un organe à un autre lorsque l'on regarde sous la lampe UV. Par ailleurs, la comparaison des empreintes phytochimiques obtenues pour les extraits bruts et les fractions montrent que les molécules polyphénoliques majoritaires des tiges, racines et graines se retrouvent principalement dans la fraction Faq, alors que pour les feuilles les polyphénols se partagent entre les fractions Faq et FAE.

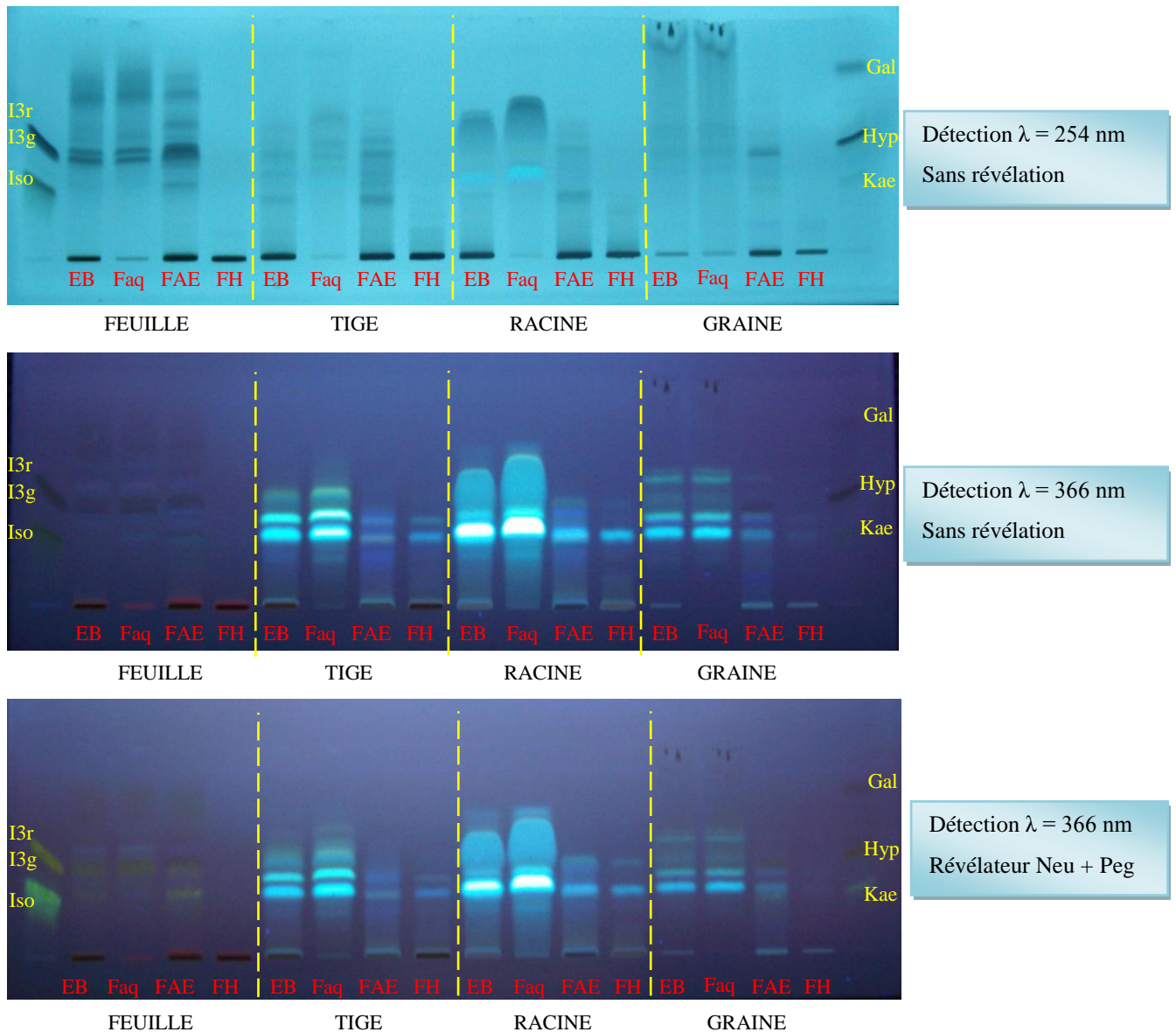


Figure V-15: Empreintes phytochimiques en polyphénols des extraits bruts éthanoliques et des fractions des différents organes obtenues par HPTLC. Phase stationnaire: plaque HPTLC Lichrospher RP18 WF_{254s} (10 × 20). Solvant de migration: ACN:H₂O:HCOOH (50:50:5 v/v). Révélation NEU + PEG. EB, Extrait Brut ; Faq, Fraction aqueuse ; FAE, Fraction acétate d'éthyle ; FH, Fraction hexane ; Iso, isorhamnétine ; I3g, isorhamnétine-3-*O*-glucoside ; I3r, isorhamnétine-3-*O*-rutinoside ; Kae, kaempférol ; Hyp, hypéroside ; Gal, acide gallique.

Le criblage phytochimique en HPTLC a permis de mettre en évidence la présence de différentes familles moléculaires (acides aminés, sucres, terpènes, polyphénols) dans les différents organes d'argousier. De plus, les composés phénoliques majoritaires présents dans l'extrait brut de chaque organe se retrouvent principalement dans la fraction active Faq. En conséquence, on peut émettre l'hypothèse que l'activité antimicrobienne et antioxydante de l'extrait brut et de Faq est principalement due à des composés phénoliques. Pour confirmer la présence de composés phénoliques, nous avons, en complément, évalué quantitativement la

teneur globale en composés phénoliques ainsi que celle en tannins condensés dans les extraits bruts éthanoliques et dans les fractions.

IV.5. Détermination de la teneur en composés phénoliques et en tanins condensés

IV.5.1. Détermination de la teneur en composés phénoliques (TPC, Total Phenolic Content)

La TPC, déjà utilisée dans les chapitres 2 et 4, a été effectuée sur microplaques en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (FC) (Annexe 6). Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique (GAE, Gallic Acid Equivalence)/g d'extrait sec (mg GAE/g), à partir des données d'absorbance et d'une droite d'étalonnage d'acide gallique réalisée entre 0.1 et 0.5 mg/mL.

Pour les extraits bruts éthanoliques, la TPC (Tableau V-9 et Fig. V-16) varie de 65 ± 14 à 139 ± 22 mg GAE/g. La TPC des racines et des graines est significativement plus élevée que celle des feuilles et des tiges ($p < 0.0001$). Aucune différence significative n'a pu être révélée entre les racines et les graines ou entre les feuilles et les tiges.

Concernant les fractions, la fraction Faq possède significativement plus de composés phénoliques que les autres fractions ($p < 0.01$). De plus, la détermination du coefficient de corrélation de Pearson entre les valeurs obtenues avec le test DPPH[•] et la TPC ($\rho = 0.811$, $p < 0.0001$) et entre le test FRAP et la TPC ($\rho = 0.688$, $p < 0.0001$) indique que l'activité antioxydante peut être corrélée à la présence de composés phénoliques. Ainsi, la TPC confirme que l'activité antioxydante des extraits bruts et des fractions Faq est bien liée à la présence de composés phénoliques. Cependant, la différenciation entre les fractions est moins évidente que pour les tests DPPH[•] et FRAP, par exemple, aucune différence significative entre FAE et FH n'a pu être déterminé pour tous les organes ($p > 0.01$). Ce résultat est lié au test TPC qui est connu pour réagir avec diverses classes de composés tels que les composés phénoliques, les vitamines et les acides gras insaturés [17].

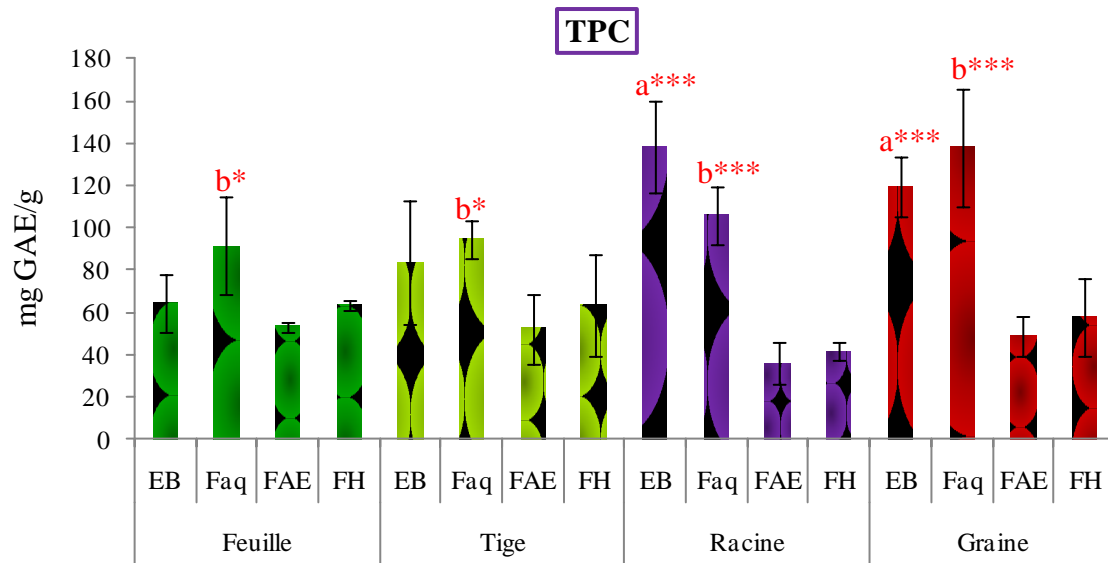


Figure V-16: Détermination du contenu en composés phénoliques (TPC) des extraits bruts éthanoliques des différentes organes et des fractions obtenus à 1000 µg/mL. **a** significativement différent des extraits bruts de feuilles et de tiges. **b** significativement différent de FAE de l'organe correspondant. *** et * statistiquement significatif au niveau de confiance de 99.9 % et de 95 %. EB, Extrait Brut ; Faq, Fraction aqueuse ; FAE, Fraction acétate d'éthyle ; FH, Fraction hexane.

Tableau V-9: Détermination du contenu en composés phénoliques (TPC) et du contenu en tannins condensés (CTC) des extraits bruts éthanoliques des différentes organes et des fractions obtenus à 1000 µg/mL respectivement avec les méthodes TPC et CTC.

		TPC (mg GAE/g)	CTC (mg EC/g)
Feuille	EB	65 ± 14	13 ± 6
	Faq	92 ± 23	5 ± 12
	FAE	53 ± 3	20 ± 15
	FH	64 ± 2	36 ± 12
Tige	EB	84 ± 29	26 ± 13
	Faq	95 ± 9	14 ± 12
	FAE	52 ± 17	34 ± 16
	FH	64 ± 23	33 ± 16
Racine	EB	139 ± 22	42 ± 12
	Faq	106 ± 14	16 ± 13
	FAE	36 ± 10	29 ± 15
	FH	42 ± 5	20 ± 14
Graine	EB	120 ± 14	176 ± 27
	Faq	138 ± 28	161 ± 13
	FAE	49 ± 9	39 ± 14
	FH	58 ± 19	57 ± 12

EB, Extrait Brut ; Faq, Fraction aqueuse ; FAE, Fraction acétate d'éthyle ; FH, Fraction hexane.

IV.5.2. Détermination du contenu en tannins condensés (CTC, Condensed Tanin Content)

La CTC a été effectuée par une miniaturisation de la méthode développée par Sun *et al.* [18]. La CTC évalue le contenu en tannins condensés également connu sous le nom de proanthocyanidines (dérivés polymériques de flavan-3-ol). La méthodologie consiste à dépolymériser les tannins en milieu acide, et après réaction avec la vanilline, à les transformer en anthocyanidols de couleur rouge facilement analysables à 500 nm. Les résultats ont été exprimés en mg d'Equivalent de Catéchine/g d'extrait sec (mg EC/g), à partir des données d'absorbance et d'une droite d'étalonnage de catéchine réalisée entre 0.05 et 1 mg/mL.

La CTC des extraits bruts éthanoliques (Tableau V-9 et Fig. V-17) varient de 13 ± 6 à 176 ± 27 mg CE/g. Parmi les organes testés, ce sont les graines qui possèdent le plus de tannins condensés (176 ± 27 mg CE/g), avec des valeurs significativement supérieures à celles des autres organes ($p < 0.0001$). Les racines (42 ± 12 mg CE/g) et les tiges (26 ± 13 mg CE/g) possèdent peu de tannins condensés avec des valeurs 4 à 6 fois inférieures à celles évaluées pour les graines, alors que les feuilles (13 ± 6 mg CE/g) ne contiennent pratiquement pas de tannins condensés. Toutes les fractions répondent positivement, cependant seule la fraction Faq des graines possède une teneur élevée en tannins condensés et qui est par ailleurs, significativement différente de celle des autres fractions ($p < 0.0001$). Ce résultat suggère donc que les activités antimicrobiennes et antioxydantes obtenues pour l'extrait éthanolique de graines et sa fraction Faq seraient dues à la présence de proanthocyanidines.

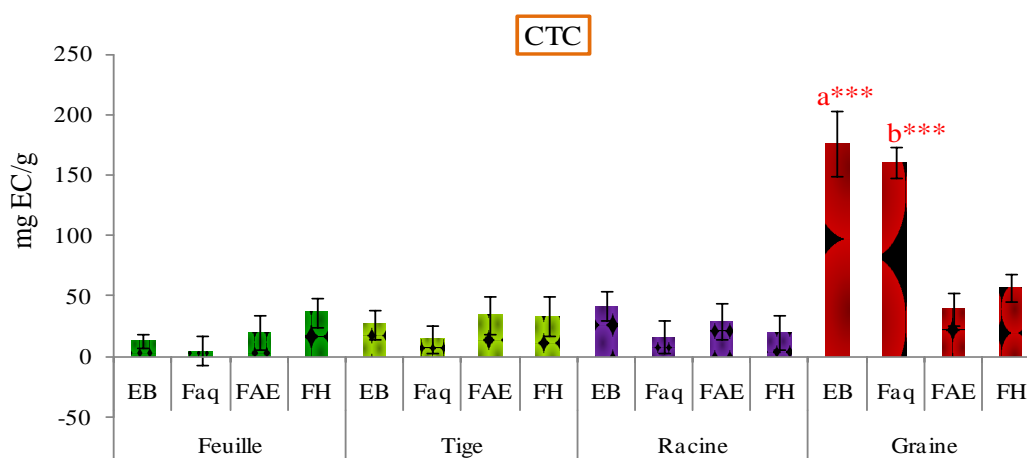


Figure V-17: Détermination du contenu en tannins condensés (CTC) des extraits bruts éthanoliques des différents organes et des fractions obtenus à $1000 \mu\text{g/mL}$. **a** significativement différent des extraits bruts de feuilles, tiges et racines. **b** significativement différent des autres fractions. *** statistiquement significatif au niveau de confiance de 99.9 %. EB, Extrait Brut ; Faq, Fraction aqueuse ; FAE, Fraction acétate d'éthyle ; FH, Fraction hexane.

IV.6. Corrélation entre les bio-activités et le criblage phytochimique

En combinant les résultats de bio-activités et du criblage phytochimique nous avons pu mettre en évidence que les activités antimicrobienne et antioxydante sont liées à la présence de molécules phénoliques dans les différents organes de l'argousier.

Les feuilles d'argousier ont déjà été décrites comme antioxydantes sur différents modèles *in vitro* en corrélation avec la présence de flavonols aglycones (isorhamnétine, quercétine, kaempférol), de flavonols glycosylés (isorhamnétine-3-*O*-glucoside, quercétine-3-*O*-galactoside, quercétine-3-*O*-glucoside, kaempférol-3-*O*- β -D-(6''-*O*-coumaryl)glycoside...) ou des dérivés d'acides phénoliques (1-feruloyl- β -D-glucoside) [15, 19-21]. De même, Upadhyay *et al* [21] ont montré récemment que des extraits aqueux et hydro-alcooliques de feuilles riches en composés phénoliques inhibaient la croissance de *P. aeruginosa*, *B. cereus* et *S. aureus*. Dans notre étude, l'extrait de feuilles est le plus actif contre *S. aureus* et la fraction Faq des feuilles présente également une inhibition importante contre *B. cereus*. Bien que nous n'ayons pas identifié les molécules des fractions actives des feuilles (Faq et FAE), il semble, d'après l'HPTLC, que des dérivés de flavonols soient présents dans ces deux fractions. L'analyse par HPLC-DAD de celles-ci a permis de mettre en évidence des molécules présentant un spectre d'absorption caractéristique de flavonols. De plus, la co-injection de l'isorhamnétine-3-*O*-glucoside, de l'isorhamnétine-3-*O*-rutinoside et de l'isorhamnétine avec la fraction FAE a permis de confirmer leur présence dans cette fraction (Fig. V-18). On peut donc penser que l'activité antioxydante des feuilles soit due à la présence de molécules de types flavonols.

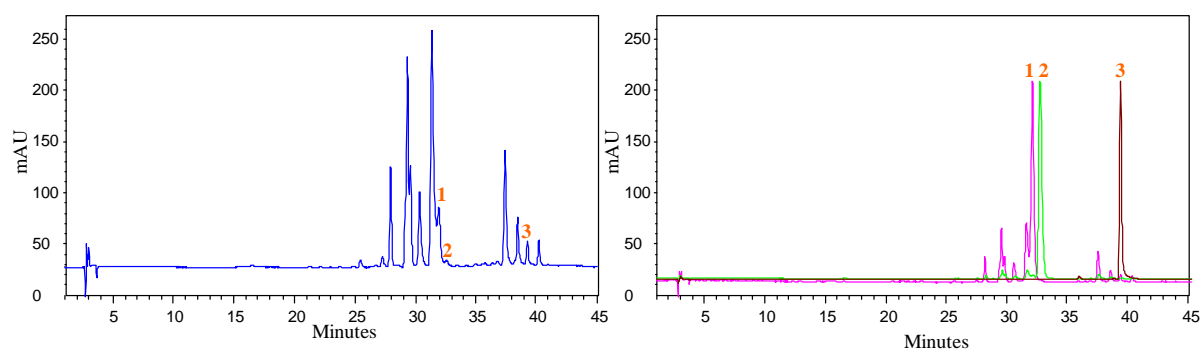


Figure V-18: Chromatogrammes obtenus à 366 nm de la fraction FAE de feuilles d'argousier (A) et des co-injections de l'isorhamnétine-3-*O*-glucoside (1), de l'isorhamnétine-3-*O*-rutinoside (2) et de l'isorhamnétine (3) avec la fraction FAE (B). Colonne Alltima C18 (150 × 4.6mm ID, 5 μ m) ; gradient constitué d'H₂O ultra-pure et de MeOH tous les deux acidifiés à 1% CH₃COOH ; débit de 1 mL/min ; injection d'une solution à 1 mg/mL (20 μ l) ; T = 25°C.

Par ailleurs il a été mis en évidence que les molécules actives des graines d'argousier sont les proanthocyanidines. Ce résultat est en accord avec les précédentes études qui ont pu montrer d'une part, que des extraits aqueux ou hydroalcooliques de graines d'argousier possèdent une capacité antioxydante et antibactérienne intéressante [12, 13], et d'autre part, que les proanthocyanidines sont des antioxydants hydrophiles majeurs des graines d'argousier [22-25]. De plus, les proanthocyanidines ont également été décrites comme des molécules ayant un fort pouvoir antibactérien [26] et notamment une activité antiadhésive [27].

Les résultats de notre étude corroborent ceux trouvés dans de précédents travaux réalisés sur les extraits de feuilles et de graines d'argousier dans lesquels le potentiel antimicrobien et antioxydant ont été corrélés avec la présence des composés phénoliques. Néanmoins, aucune donnée bibliographique n'est aujourd'hui disponible sur l'activité des tiges et racines ce qui constitue l'un des intérêts de notre étude. En comparant l'effet des différents organes, les racines possèdent une activité antimicrobienne et antioxydante importante alors que les tiges sont les moins actives. Il nous a donc paru intéressant d'aller plus loin dans l'identification des molécules majoritaires présentes dans les racines et notamment celles présentes dans la fraction active Faq.

V. Isolement et identification de molécules de la fraction hydro-alcoolique de racine

La figure V-19 montre les chromatogrammes HPLC-UV de la fraction Faq des racines à 279 et 366 nm obtenus dans nos conditions standards d'analyse, c'est-à-dire avec une colonne conventionnelle Alltima C18 (150 × 4.6mm ID, 5 µm) et un gradient d'élution H₂O/MeOH acidifié (Annexe 4). Il peut être observé que la fraction Faq est principalement constituée de deux molécules majoritaires, notées **R1** et **R2**, l'une détectée principalement à 279 nm et l'autre à 366 nm, et qui présentent des spectres d'absorption similaires à ceux de certains flavonoïdes. Par exemple, le composé **R2** possède un spectre qui peut être assimilé à celui d'une chalcone ou aurone [28] avec une bande large donnant un maximum d'absorption à 374 nm.

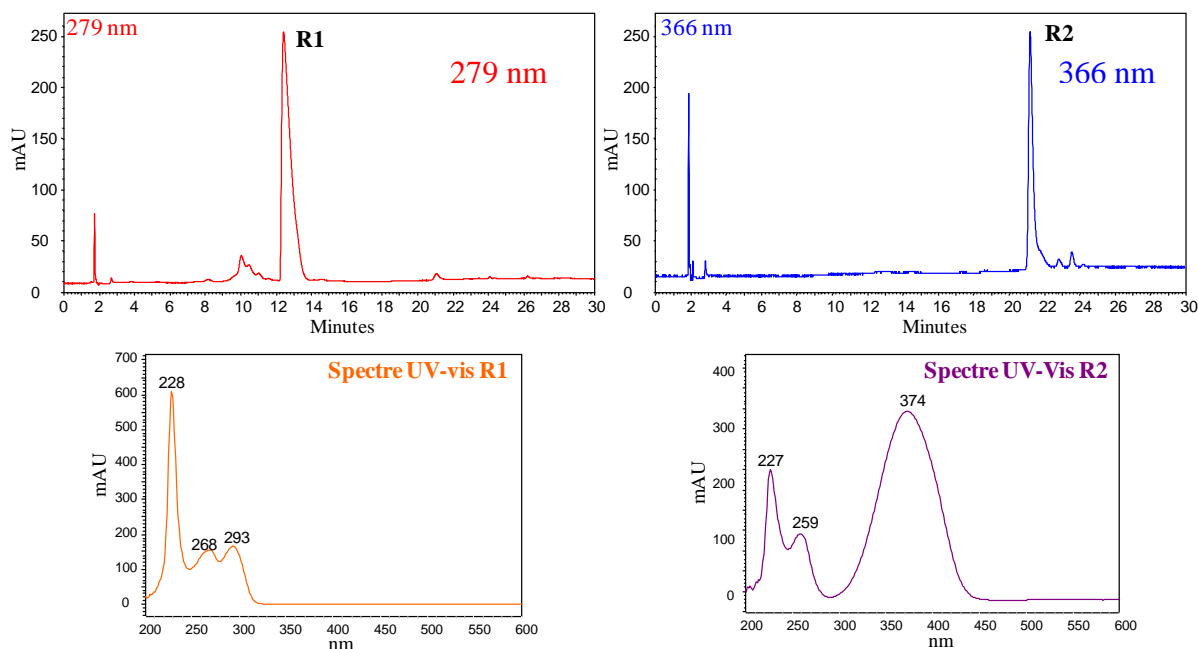


Figure V-19: Chromatogrammes obtenus à 279 nm (rouge) et 366 nm (bleu) de la fraction hydro-alcoolique Faq de racines d'argousier. Colonne Alltima C18 (150 × 4.6mm ID, 5 μm) ; gradient constitué d'H₂O ultra-pure et de MeOH tous les deux acidifiés à 1% CH₃COOH ; débit de 1 mL/min ; injection d'une solution à 1 mg/mL (20 μL) ; T = 25°C.

Pour isoler les molécules nous avons appliqué la démarche méthodologique CPC-HPLC-UV-MS développée lors de cette thèse (Chapitre 3). Pour cela, nous avons tout d'abord optimisé les conditions pour leur séparation CPC en première dimension, puis celles pour leur séparation HPLC en deuxième dimension et enfin vérifié, la compatibilité de nos conditions d'ionisation de MS.

V.1. Choix des conditions de séparation en première dimension CPC

Etant donné le caractère polaire des deux molécules **R1** et **R2** à séparer (un faible ajout de MeOH est nécessaire dans la phase mobile aqueuse pour les éluier en RP-HPLC), il a été choisi de tester pour le développement des conditions CPC, différents systèmes de solvants polaires majoritairement constitués de BuOH et d'H₂O. Le tableau V-10 montre les valeurs de K_D obtenues avec ces différents systèmes de solvants. Le système composé de MtBE:ACN:BuOH:H₂O donne des valeurs de K_D élevées nécessitant un grand volume de phase mobile pour l'éluier de **R2**. A l'inverse le système AE:BuOH:H₂O (2:3:5) montre une faible rétention de **R1**, qui risque d'être élué avec les composés les plus polaires. Les deux systèmes les plus appropriés au fractionnement des molécules **R1** et **R2** sont donc le système BuOH:H₂O (5:5) et le système AE:BuOH:H₂O (1:4:5) qui permettent d'obtenir pour les deux molécules d'intérêt des valeurs K_D différentes, et dans la plage recherchée ($0.5 < K_D < 2$). Bien que la différence de K_D entre **R1** et **R2** soit plus faible nous avons opté pour le système

binaire BuOH:H₂O (5:5) plutôt que pour le système ternaire car il offre une meilleure séparation des molécules minoritaires également contenues dans la fraction hydro-alcoolique de racines.

Tableau V-10: Valeurs des K_D obtenues pour les deux molécules cibles (**R1** et **R2**) de la fraction active Faq de racines d'argousier avec différents systèmes de solvants biphasiques.

Système de solvants	Pics	K_D
MtBE:ACN:BuOH:H ₂ O (2:1:2:5)	R1	1.2
	R2	3.9
BuOH:H ₂ O (5:5)	R1	0.4
	R2	0.9
AE:BuOH:H ₂ O (1:4:5)	R1	0.5
	R2	1.3
AE:BuOH:H ₂ O (2:3:5)	R1	0.3
	R2	0.8

R1, $t_r = 12.5$ min ; **R2**, $t_r = 20.7$ min ; **MtBE**, Méthyl tert-butyl éther ; **ACN**, Acétonitrile ; **BuOH**, Butanol ; **H₂O**, eau.

La phase organique (phase supérieure légère) a été employée comme phase stationnaire. La phase aqueuse (phase inférieure dense) a été choisie comme phase mobile de telle sorte que les molécules cibles soient éluées en mode élution. La séparation CPC a été réalisée à 1200 rpm avec un débit de phase mobile de 2 mL/min. Dans ces conditions opératoires, l'équilibre entre les deux phases a été caractérisé par une perte de charge de 45 bar et un pourcentage de rétention de phase stationnaire de 80%.

V.2. Choix des conditions de séparation en deuxième dimension HPLC

La finalité de cette étape est d'optimiser des conditions chromatographiques capables de séparer rapidement ces deux molécules. En se basant sur les travaux réalisés dans le chapitre 3, nous avons donc évalué le potentiel des deux colonnes adaptées aux analyses rapides sur des appareillages HPLC classiques: la colonne « Fused core » Halo C18 (50 × 4.6 mm ID, 2.7 μ m) et la colonne monolithique Chromolith-RP18e (100 × 4.6 mm ID, 2 μ m). Par ces avantages (analyse plus rapide, meilleure sensibilité et consommation réduite de solvant) la colonne « Fused core » Halo avait été choisie pour réaliser le couplage CPC-HPLC lors du fractionnement des flavonoïdes des baies d'argousier. Dans le cas présent, les deux molécules majoritaires **R1** et **R2** à séparer, couvrent une gamme de polarité plus restreinte que celles des flavonoïdes et sont beaucoup plus polaires. Par conséquent, il a fallu adapter nos conditions de séparation HPLC de deuxième dimension pour les séparer rapidement.

Dans un premier temps nous avons utilisé la colonne « Fused core » dans les conditions optimales utilisées dans le chapitre 3, mais sans succès, puisque la molécule **R1** est

alors éluée en volume mort. Le pourcentage de modificateur organique en début de gradient n'étant que de 5 % nous ne pouvons le diminuer davantage pour aider à la rétention de **R1**. Par conséquent, afin de diminuer la force éluante de la phase mobile nous avons changé le modificateur organique en remplaçant l'ACN par du MeOH, ce qui n'a pas induit de changement dans la rétention de la molécule **R1**. Ce phénomène peut être expliqué par la longueur de la colonne « Fused core » (50 mm) qui n'est pas suffisante pour retenir les composés les plus polaires.

Ces premiers résultats nous ont donc conduit à employer la colonne monolithique Chromolith-RP18e d'une longueur de 100 mm avec comme modificateur organique MeOH permettant ainsi de retenir suffisamment le composé **R1**. Nous avons par la suite optimisé le gradient de sorte que le composé **R2** soit élué et séparé des autres composés en un temps total d'analyse minimum. L'optimisation a mené à un gradient linéaire allant de 5 à 20 % de MeOH 1% CH₃COOH en 7 min avec un débit de phase mobile de 3 mL/min. L'autre solvant est H₂O 1 % CH₃COOH. La figure V-20 présente le chromatogramme de la fraction Faq de racines obtenu avec la colonne Chromolith et une détection UV à 260 nm, longueur d'onde qui permet de détecter à la fois les composés **R1** et **R2**.

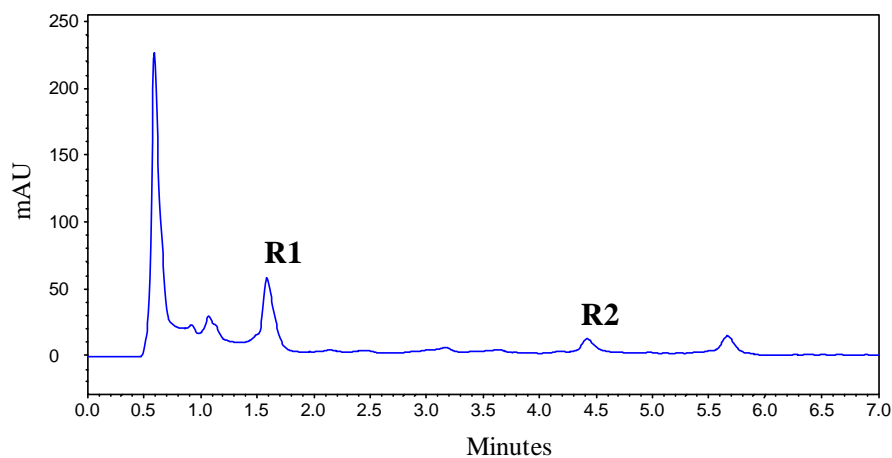


Figure V-20: Chromatogramme obtenu à 260 nm de la fraction hydro-alcoolique Faq de racines d'argousier. Colonne monolithique Chromolith-RP18e (100 × 4.6 mm ID, 2 μm); gradient constitué d'H₂O ultra-pure et de MeOH tous les deux acidifiés avec 1% CH₃COOH ; débit de 3 mL/min ; injection d'une solution à 1 mg/mL (20 μL) ; T = 25°C.

V.3. Vérification des conditions de MS

Afin de vérifier les conditions d'ionisation MS, un couplage HPLC-MS a été réalisé en injectant la fraction Faq à 1 mg/mL dans les conditions HPLC décrites ci-dessus et les conditions de MS décrites dans le chapitre 4 (partie III.4.). Il a été observé qu'une baisse de la température de la source de 400 à 300°C augmentait l'intensité des ions présents associés aux pics **R1** et **R2**. Le couplage a donc été réalisé en employant les conditions suivantes: une

ionisation en mode négatif avec une tension de capillaire de - 4.5 kV, une tension de cône de - 35 V, une température de désolvatation de 96°C, et une température de source fixée à 300°C.

V.4. Séparation des molécules cibles par CPC-HPLC-UV-MS

L'analyse en couplage bidimensionnel CPC-HPLC-UV-MS a été réalisée à partir de 250 mg de la fraction Faq de racines d'argousier, dissous dans 8 mL du système de solvant biphasique, dans les conditions optimales de première et deuxième dimensions décrites ci-dessus. La figure V-21 illustre la séparation de la fraction Faq de racines d'argousier observée dans la première dimension CPC-UV obtenue à 260 nm en mode élution, avec en pointillé les injections d'intérêt vers la deuxième dimension HPLC-UV-MS. Lors de l'élution un fort relargage de la phase stationnaire a été observé entraînant un certain déséquilibre du système biphasique. De plus, les composés étant élués sur une plage de temps très courte, le débit de la phase mobile a été diminué à 1 mL/min à partir de 50 min d'élution afin de ralentir la séparation CPC et ainsi avoir le temps d'envoyer le plus grand nombre de fractions CPC vers la seconde dimension HPLC-UV-MS dont le temps d'analyse est de 7 min.

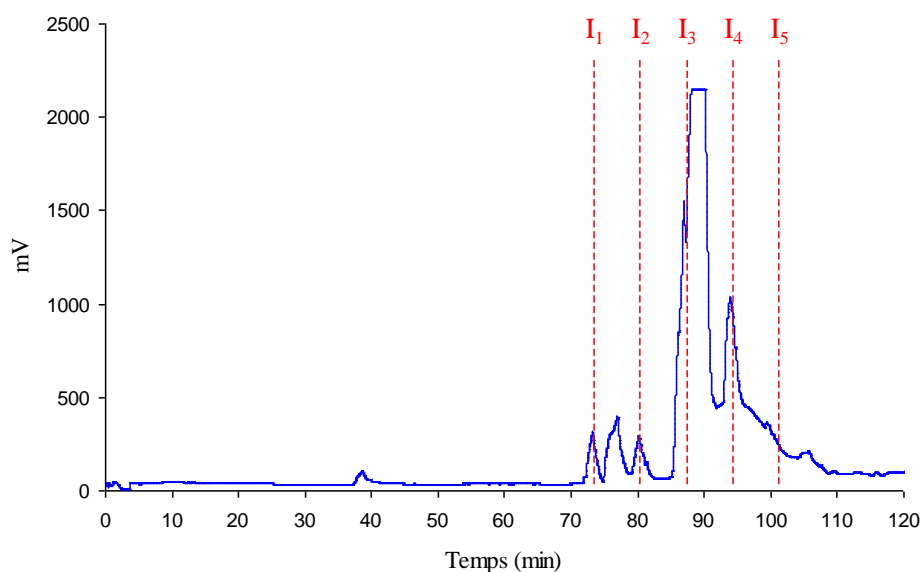


Figure V-21: Chromatogramme obtenu à 260 nm de la Faq de racines d'argousier après fractionnement par CPC avec le système de solvant BuOH/H₂O (5:5). Vitesse de rotation de 1200 rpm, débit 2 mL/min puis 1 mL/min à partir de 75 min.

Dans la première dimension, le chromatogramme CPC-UV montre plusieurs pics plus ou moins bien séparés et sans aucune information sur leur composition (nombres de constituants, présence des deux molécules cibles **R1** et **R2**). Les figures V-22 et V-23 illustrent les chromatogrammes de deuxième dimension HPLC-UV-MS des différentes injections (I₁ à I₅). Il peut être mis en évidence que les molécules présentes sous les premiers

pics du chromatogramme CPC-UV (I_1 et I_2) ne correspondent pas à nos composés d'intérêt car les t_r des molécules présentes sous ces pics CPC-UV ne correspondent pas aux t_r des deux molécules cibles (Fig. V-22). En revanche, I_3 réalisée pendant l'élution du pic majoritaire montre que le composé **R1** ($t_r = 0.88$) est présent dans cette fraction, mais que malheureusement les conditions de séparation CPC n'ont pas permis de l'isoler correctement de molécules minoritaires concentrées par le fractionnement.

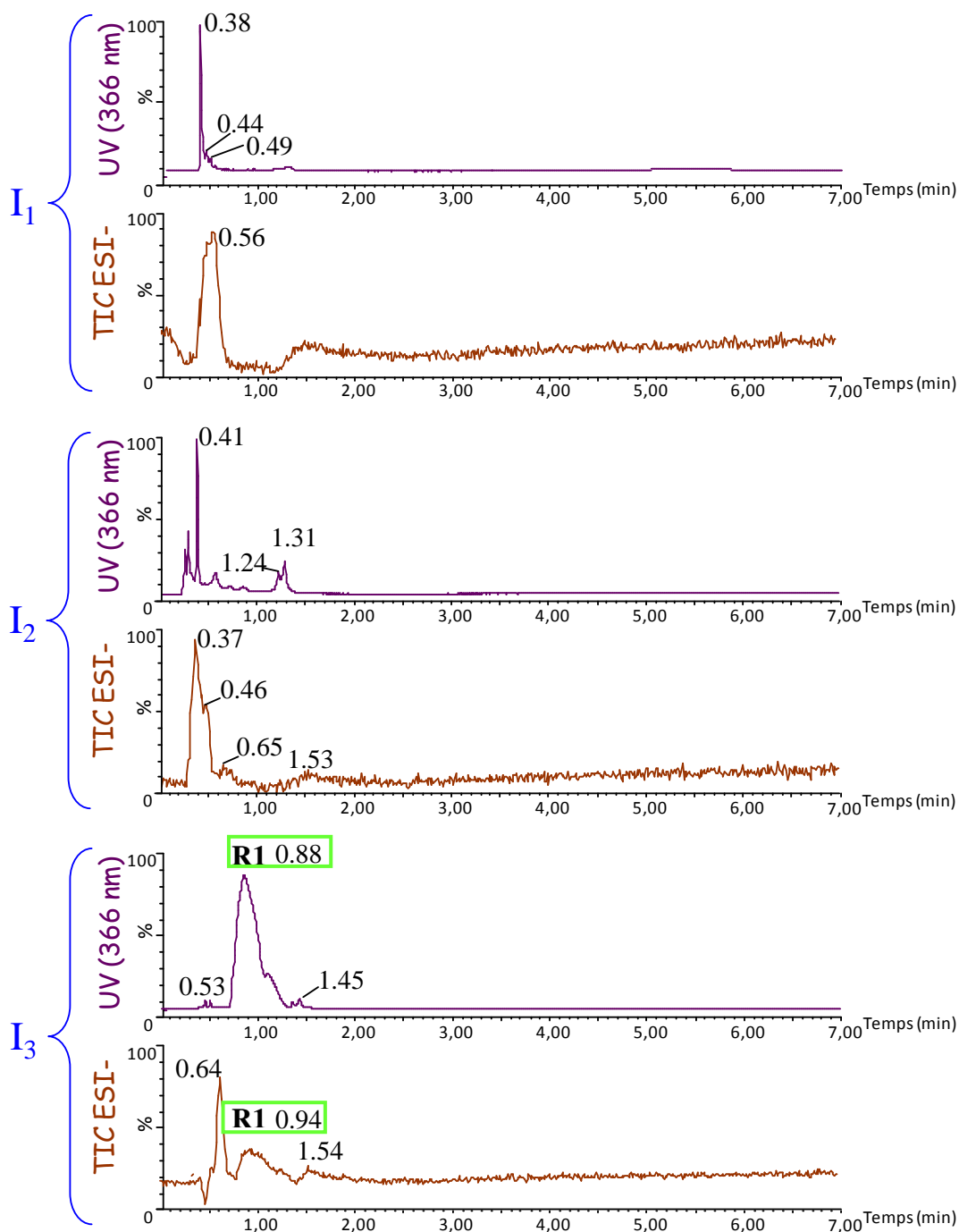


Figure V-22: Chromatogrammes UV (260 nm) et de courant ionique total (TIC, Total Ion Current) obtenu avec une source d'ionisation ESI en mode négatif avec le couplage CPC-

HPLC-UV-MS pendant la phase d'élution. I₁ I₂ et I₃ correspondent aux injections 1, 2 et 3 effectuées lors du transfert de la CPC vers l'HPLC.

L'analyse des injections suivantes (I₄ et I₅) montre que le composé **R2** (tr = 3.9) est présent dans ces deux fractions. Néanmoins, celui-ci se retrouve majoritairement dans I₄ avec très peu d'impuretés, alors qu'il est présent avec des composés minoritaires dans I₅ (Fig.V-22). On peut remarquer que le temps de rétention de R2 varie entre 3.91 et 4.03 min entre l'injection I₄ et I₅. Cela est dû à une variabilité liée à la manipulation, en effet celle-ci étant complètement manuelle, la mise en route des différents systèmes d'acquisition peut mener à de légers écarts de temps de rétention.

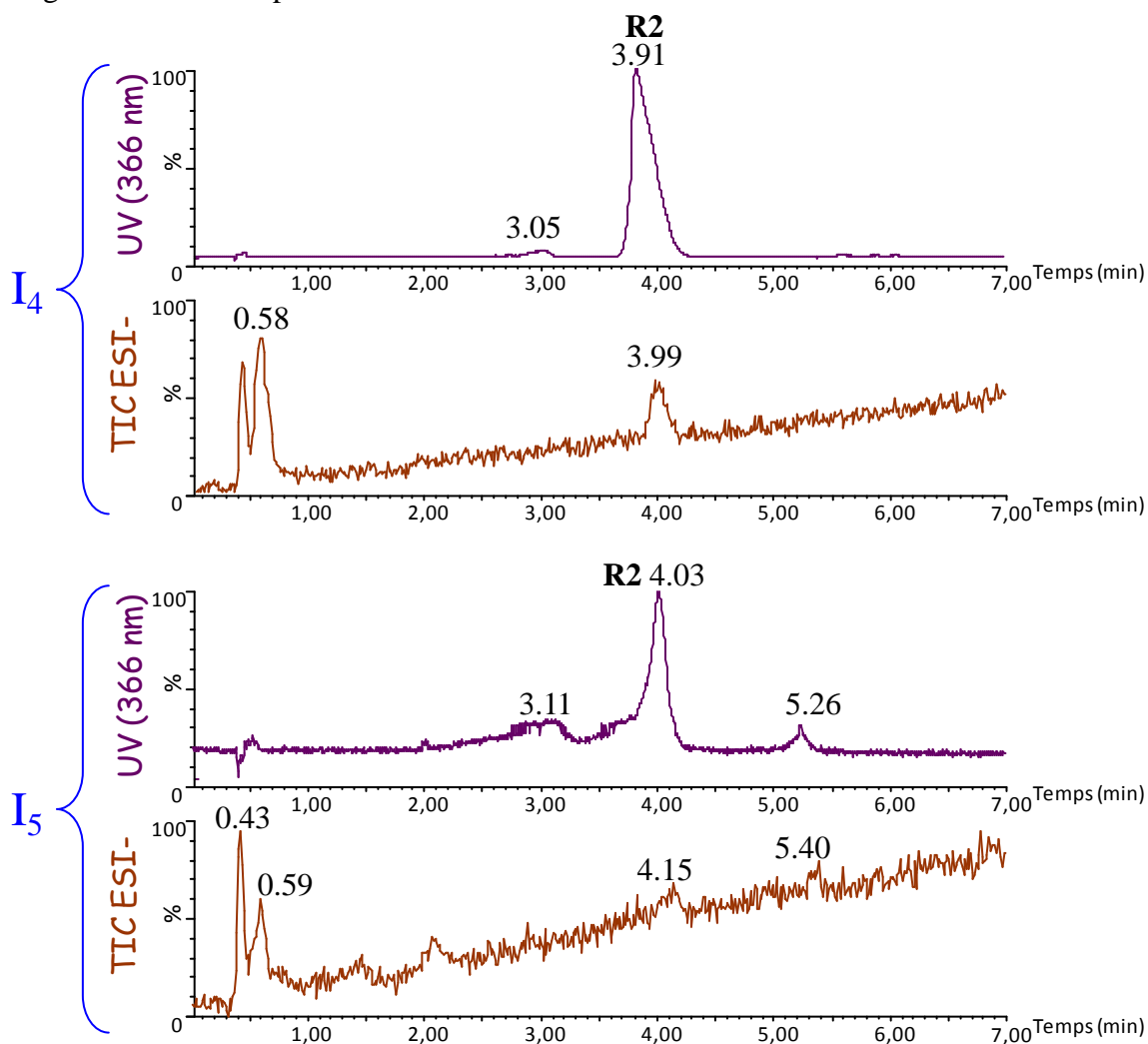


Figure V-23: Chromatogrammes UV (366 nm) et de courant ionique total (TIC, Total Ion Current) obtenu avec une source d'ionisation ESI en mode négatif avec le couplage CPC-HPLC-UV-MS pendant la phase d'élution. I₄ et I₅ correspondent aux injections 4 et 5 effectuées lors du transfert de la CPC vers l'HPLC.

A partir des chromatogrammes HPLC-UV obtenus en ligne après le fractionnement CPC, on peut remarquer que les temps de rétention de **R1** et **R2** sont décalés d'environ 0.5

min par rapport aux chromatogrammes HPLC-UV obtenus hors ligne. Il semble ainsi que les conditions du couplage en ligne induisent une élution plus rapide des molécules en deuxième dimension HPLC. De même, entre deux injections différentes le temps de rétention d'une même molécule est parfois différent. Ceci peut être lié à la variabilité de la manipulation car la réalisation du couplage est complètement manuelle et la mise en route des différents systèmes d'acquisition peut mener à de légers écarts de temps de rétention.

► Informations structurales obtenues pour **R1**

L'analyse des données de MS montre que le spectre de masse, obtenu après soustraction du blanc et correspondant à la molécule **R1** (Fig. V-24) ne permet pas de déterminer clairement un ion pseudo-moléculaire pour cette molécule. On peut tout de même noter la présence d'un ion majoritaire possédant un rapport m/z de 217 et une série d'ions d'intensité intermédiaire possédant des rapports m/z de 201, 215, 241, 278, 375, 464 et 691.

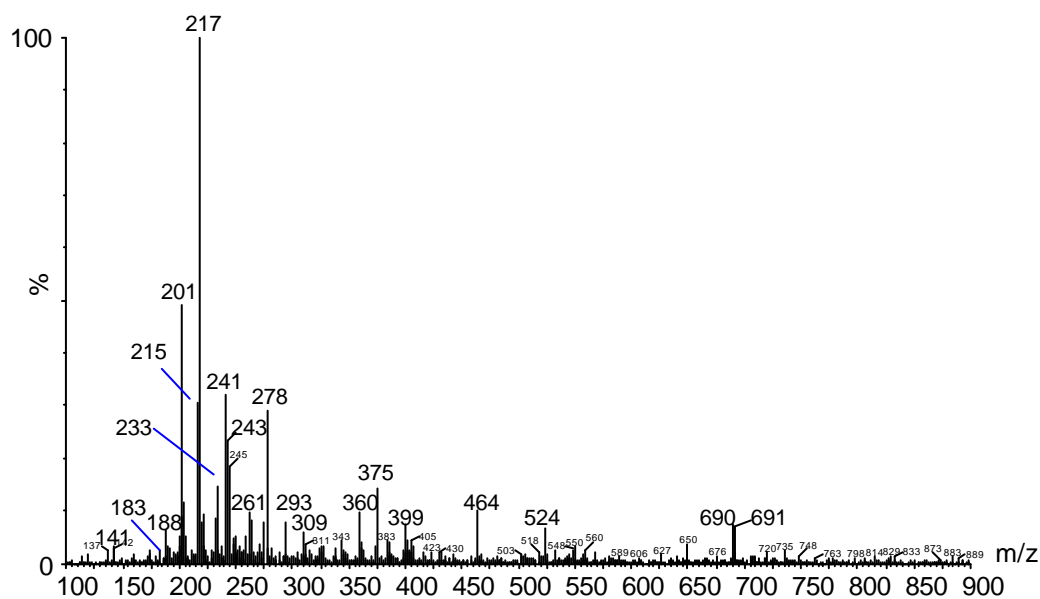


Figure V-24: Spectre de masse du composé **R1** obtenu en mode négatif lors du couplage CPC-HPLC-UV-MS avec un triple quadripôle Quattro Ultima Micromass équipé d'une source ESI.

L'extraction d'ions à partir du courant ionique total (TIC, Total Ion Current) pour l'injection I₃, nous a permis ici de mettre en évidence que l'ion présentant un rapport m/z de 215 est bien spécifique à **R1** puisqu'il est détecté seulement au tr de **R1** (Fig. V-25). De même, l'extraction des ions à un rapport m/z de 201 et 217 montrent que ces ions sont spécifiques à **R1**, alors que les autres ions n'ont pu être détectés par cette méthode. D'une manière générale, on observe un faible signal de la molécule **R1** en MS (Fig. V-22) qui peut être dû à un défaut d'ionisation de cette molécule dans nos conditions.

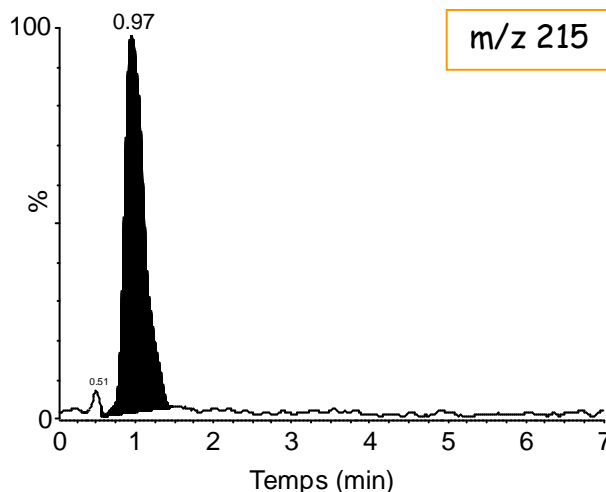


Figure V-25: Chromatogramme d'extrait d'ion caractéristique de la molécule **R1** possédant un rapport m/z de 215.

➤ **Informations structurales obtenues pour R2**

Le spectre de masse (Fig. V-26) associé à la molécule **R2** nous fournit plusieurs ions dont les plus abondants sont les ions présentant un rapport m/z de 199 et 259.

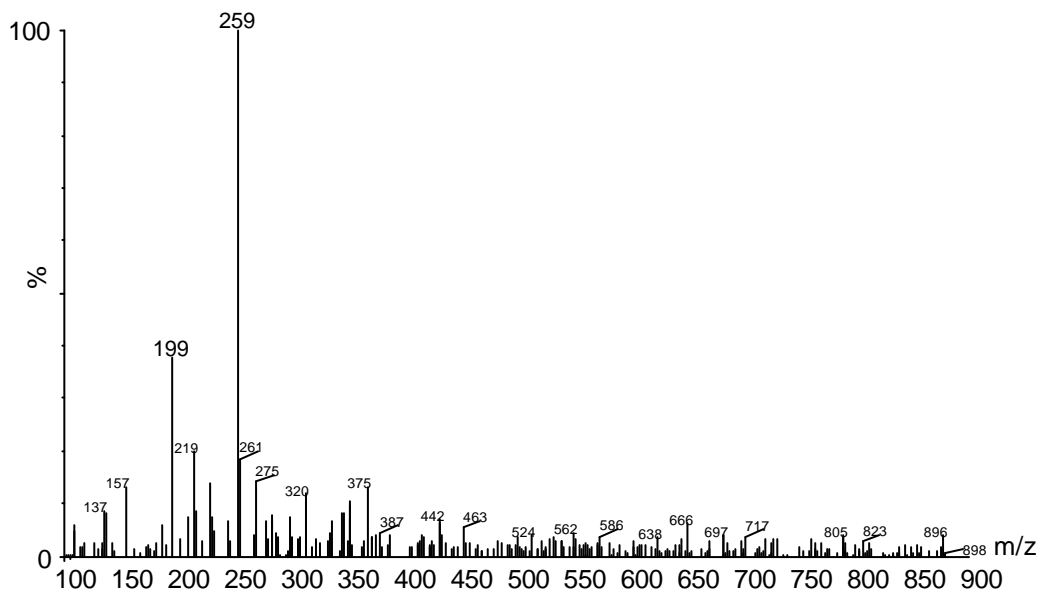


Figure V-26: Spectre de masse du composé **R2** obtenu en mode négatif lors du couplage CPC-HPLC-UV-MS avec un triple quadripôle Quattro Ultima Micromass équipé d'une source ESI.

De plus, l'extraction de ces ions à partir du TIC de I_4 (Fig. V-27) montre clairement que les ions possédant un m/z de 199 et 259 sont fortement caractéristiques de la molécule **R2**. La différence entre ces deux masses équivaut à 60 u. Sachant que la séparation HPLC a été réalisée avec des solvants acidifiés avec CH_3COOH , cette différence de 60 u pourrait être attribuée à un adduit acétate qui se formerait dans la source lors de l'ionisation. Dans ce cas l'ion moléculaire du composé **R2** serait l'ion avec un m/z de 199.

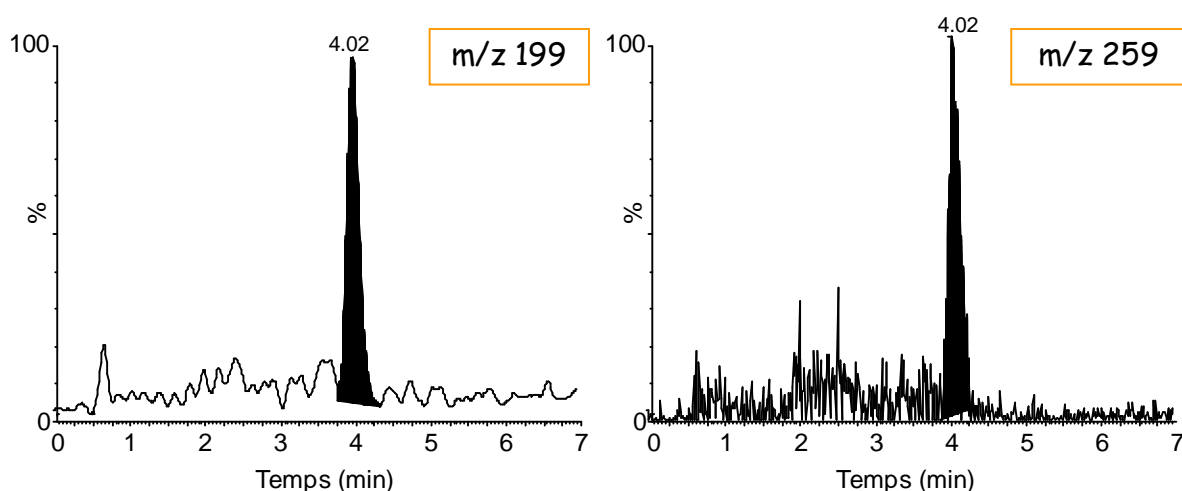


Figure V-27: Chromatogrammes d'extrait d'ion caractéristique de la molécule **R2** possédant un rapport m/z de 199 et 259.

Dans cette étude nous avons adapté la méthodologie CPC-HPLC-UV-MS, développée au cours de cette thèse, dans le but de fractionner ou le cas échéant de purifier les molécules actives de la fraction polaire des racines d'argousier. Il s'avère que les conditions opératoires de première dimension CPC ne permettent pas la purification complète des molécules **R1** et **R2**, car elles sont toujours éluées en présence de composés minoritaires. Cela peut être dû à un mauvais choix du système biphasique de la CPC, mais également à la perte constante de phase stationnaire qui a été observée au cours de cette expérience et qui n'est pas favorable à la rétention des molécules et donc à leur séparation. De plus, compte tenu de la mauvaise séparation en première dimension CPC, l'analyse HPLC de deuxième dimension de 7 min s'avère trop longue, puisque toutes les fractions CPC n'ont pas le temps d'être envoyées en seconde dimension. Cependant, même si les molécules d'intérêt n'ont pas pu être totalement purifiées, ce nouvel exemple illustre l'intérêt du couplage CPC-HPLC qui permet de suivre en ligne le fractionnement et de fournir des informations structurales sur les deux molécules inconnues grâce à la spectrométrie de masse.

V.5. Purification et identification des molécules cibles

Afin de purifier les composés **R1** et **R2**, les fractions enrichies correspondant aux injections I₃ et I₄, ont été injectées sur une colonne semi-préparative Kromasil C18 (250 × 10 mm ID, 7 µm) (Annexe 4). L'isolement des molécules a été effectué par injections successives des fractions I₃ et I₄ (20 µL à 50 mg/mL) et la collecte des pics correspondant aux molécules cibles s'est faite manuellement à la sortie du DAD. Cette purification a mené à l'obtention de 10 mg de **R1** et 2 mg de **R2** (Fig. V-28).

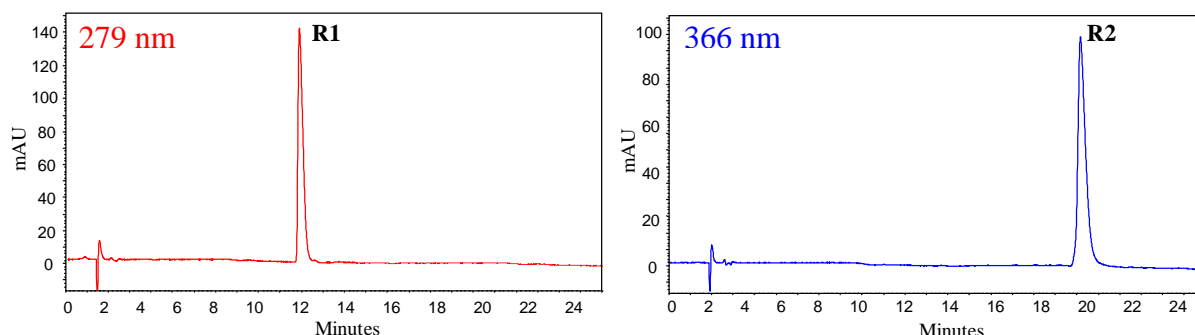


Figure V-28: Chromatogrammes obtenus à 279 nm (rouge) et 366 nm (bleu) des molécules **R1** et **R2** purifiées à partir la fraction hydro-alcoolique Faq de racines d'argousier. Colonne Alltima C18 (150 × 4.6mm ID, 5 μm) ; gradient constitué d'H₂O ultra-pure et de MeOH tous les deux acidifiés avec 1% CH₃COOH ; débit de 1 mL/min ; injection d'une solution à 0.5 mg/mL (20 μL) ; T = 25°C.

L'analyse structurale de ces deux molécules a été réalisée par MS haute résolution (HRMS, High Resolution Mass Spectrometry) et par RMN. Les premiers résultats obtenus en HRMS pour **R1** et **R2** confirment que les rapports m/z observés en mode négatif lors du couplage CPC-HPLC-MS sont bien spécifiques de ces molécules. Ainsi, pour **R1** on retrouve la présence de rapports m/z à 201.10337 et à 217.09799 mais non celui avec un rapport m/z de 215. Un ion intense est tout de même visible à un rapport m/z de 213.10298. Le spectre HRMS de **R2** présente quant à lui, un seul ion majoritaire à un rapport m/z de 199.08859. D'autre part, l'HRMS qui a été réalisée en mode négatif et positif, nous donne des propositions de formules brutes, résumées dans le tableau V-11, pour ces deux molécules. D'après ces propositions de formules brutes, il semble que les composés isolés soient des composés azotés.

Tableau V-11: Valeurs des rapports m/z mesurés et calculés en HRMS ainsi que la proposition des formules brutes pour **R1** et **R2**.

	m/z mesuré	Formule brute	m/z calculé	Erreur (ppm)
R1 négatif	201,10337	C ₁₂ H ₁₃ N ₂ O	201,10334	-0,17
	213,10298	C ₁₃ H ₁₃ N ₂ O	213,10334	1,67
	217,09799	C ₁₂ H ₁₃ N ₂ O ₂	217,09825	1,19
R1 positif	203,11782	C ₁₂ H ₅ N ₂ O	203,11789	0,32
R2 négatif	199,08859	C ₁₂ H ₁₁ N ₂ O	199,08769	-4,54
R2 positif	201,10314	C ₁₂ H ₁₃ N ₂ O	201,10224	-4,47

L'identification par RMN n'est malheureusement pas terminée à ce jour, et la seule information qui peut être dégagée de manière certaine est la présence d'un cycle aromatique. Au vue de ces données et de l'étude bibliographique du chapitre 1, les molécules **R1** et **R2** pourraient être des alcaloïdes indoliques de type β-carboline. En effet, de telles molécules, constituées de deux azotes, ont déjà été identifiées dans l'écorce de tige d'argousier [29, 30],

et présentent la particularité d'être fluorescentes ce que nous observons également pour **R1** et **R2**. De plus, ces alcaloïdes possèdent des masses moléculaires situées entre 182 et 216 g/mol, comme par exemple l'harmalol ($C_{12}H_{12}N_2O$) qui a une masse de 200.2 g/mol et qui pourrait très bien correspondre à notre composé **R2**.

Si notre hypothèse est confirmée, la présence de ces molécules dans la fraction hydro-alcoolique de racines d'argousier pourrait expliquer les problèmes rencontrés lors de l'étape purification et notamment lors de la CPC. Les alcaloïdes sont des molécules ionisables à caractère basique. Ainsi, en CPC le mode de séparation privilégié des alcaloïdes est le pH-zone refining qui consiste à séparer les molécules en fonction de leur force acide et de leur K_D . Afin de confirmer notre hypothèse, il serait intéressant dans un premier temps de vérifier que les molécules **R1** et **R2** sont bien des alcaloïdes, puis le cas échéant, de trouver des conditions favorables à leur séparation par pH-zone refining en utilisant la méthodologie CPC-HPLC-UV-MS.

VI. Conclusion

Cette étude réalisée à partir d'organes peu étudiés de l'argousier a démontré que les feuilles, tiges, racines et graines avaient un potentiel antimicrobien et antioxydant intéressant. Les graines et les racines sont les deux organes qui sont les plus antioxydants alors que les tiges sont les moins actives pour les deux activités testées. L'évaluation, sur les mêmes modèles, des fractions obtenues par extraction liquide-liquide a permis de mettre en évidence que les composés actifs étaient majoritairement présents dans la fraction hydro-alcoolique et donc de nature hydrophile. La réalisation d'empreintes phytochimiques par HPTLC et la détermination du contenu en composés phénoliques et en tannins condensés a permis de corrélérer les activités à la présence de composés phénoliques, et notamment de flavonols dans les feuilles et de proanthocyanidines dans les racines. De plus, le fractionnement par CPC-HPLC-UV-MS suivi d'une purification par HPLC semi-préparative de la fraction hydro-alcoolique de racines a permis d'isoler deux molécules **R1** et **R2** dans les racines d'argousier. Ces résultats indiquent que les feuilles, les racines et les graines d'argousier sont des sources potentielles d'agents inhibiteurs de la croissance microbienne ou d'antioxydants. De plus, les résultats phytochimiques et biologiques obtenus tout au long de ce travail, ne peuvent qu'encourager des études complémentaires sur les différents organes afin de continuer la démarche d'identification des molécules actives.

Une partie des travaux rapportés dans ce chapitre a fait l'objet d'une publication qui vient d'être acceptée dans Food Chemistry.

Food Chemistry 131 (2012) 754–760



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Chemistry

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



Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed

Thomas Michel^a, Emilie Destandau^{a,*}, Gaëtan Le Floch^{b,c}, Marie Elisabeth Lucchesi^{b,d}, Claire Elfakir^a

^a Université d'Orléans, CNRS UMR 6005, Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), BP 67059, rue de Chartres, 45067 Orléans Cedex 2, France

^b Université Européenne de Bretagne, France

^c Université de Brest, EA 3882 Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne, IFR148 ScnBios, ESMISAB, Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané, France

^d Université de Brest, EA 3887 Laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues Marines, Institut Universitaire Européen de la Mer, Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 June 2011

Received in revised form 22 July 2011

Accepted 12 September 2011

Available online 24 September 2011

Keywords:

Hippophaë rhamnoides

Antimicrobial

Antioxidant

Phenolic compounds

Proanthocyanidins

HPTLC

ABSTRACT

The antimicrobial and antioxidant activities of crude ethanolic extract from *Hippophaë rhamnoides* L. (Elaeagnaceae) leaf, stem, root and seed, and their respective fractions, obtained by liquid–liquid extraction (LLE) using hexane (HF), ethyl acetate (EAF) and water (WF), were investigated. The crude extract was obtained by Pressurised Liquid Extraction (PLE), using ethanol at 100 bar and 60 °C. Antimicrobial activity was tested against food-borne and clinical microorganisms. Antioxidant activity was measured using the DPPH-radical scavenging and the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. The phytochemical contents were examined by colorimetric methods. The results showed that crude extracts were active against Gram – and + strains, and that seed and root extracts were better radical scavengers than leaf and stem extracts. For all organs, the two activities tested were found to be higher in WF. These activities were correlated with the presence of phenolic compounds in active fractions. High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) fingerprints confirmed presence of phenolic compounds in active extracts and fractions.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

There is much evidence that consumption of fruits, vegetables and other derived plant products is beneficial for human health because of the presence of bioactive molecules (Crozier, Jagannath, & Clifford, 2009). These substances are secondary metabolites, biosynthesised by plants to prevent pathogen attack, UV stress or to attract pollinator insects. The phenolic compounds including flavonoids, phenolic acid and tannin are a major group of phytochemicals which exhibited strong antioxidant (Pietta, 2000) and antibacterial activities (Mayer et al., 2008; Saleem et al., 2010). Furthermore, because of the resistance that microorganisms built against antibiotic and antiseptic agents (Saleem et al., 2010), and due to the toxicity of food and cosmetic preservatives (i.e. butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene, parabens) (Darbre et al., 2002; Moure et al., 2001), there is an increasing demand for the search of new bioactive molecules from natural sources.

Hippophaë rhamnoides L. (Elaeagnaceae), commonly known as sea buckthorn (SBT), is an Eurasian nitrogen-fixing actinomycetes plant species, producing yellow-orange berries at the end of

summer (Rousi, 1971), from which beverages, jams, candies and cosmetics are manufactured. SBT has recently gained in interest for its nutritional and medicinal values (Guliyev, Gul, & Yildirim, 2004; Zeb, 2004). Literature provided abundant information about health benefits and chemical composition of *H. rhamnoides* berries and seeds. For instance, they are well known for their antioxidative properties, attributed to hydrophilic and lipophilic compounds including ascorbic acid, flavonoids, proanthocyanidins and carotenoids (Fan, Ding, & Gu, 2007; Gao, Ohlander, Jeppsson, Björk, & Trajkovski, 2000; Michel, Destandau, & Elfakir, 2011; Rösch, Bergmann, Knorr, & Kroh, 2003). Recently the leaves of *H. rhamnoides* were also considered for their antioxidant potential correlated to flavonoids and phenolic acids derivatives (Kim, Kwon, Sa, & Kim, 2011; Sharma et al., 2008; Upadhyay, Yogendra Kumar, & Gupta, 2011). Antimicrobial activities have also been reported for SBT berries (Puupponen-Pimiä et al., 2001), seeds (Chauhan, Negi, & Ramteke, 2007; Negi, Chauhan, Sadia, Rohinishree, & Ramteke, 2005) and leaves (Upadhyay et al., 2011). Despite the well documented SBT berry and seed, data on the other SBT organs remain disparate and unequal. In this sense, we focused our work on four SBT organs (leaf, stem, root and seed) which were simultaneously investigated for their therapeutic potential and their phytochemical contents.

The objective was (i) to evaluate the antimicrobial capacities of SBT organs and fractions against food-borne and clinical

* Corresponding author. Tel.: +33 238417074; fax: +33 238417281.

E-mail address: emilie.destandau@univ-orleans.fr (E. Destandau).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Saleem, M., Nazir, M., Ali, M.S., Hussain, H., Lee, Y.S., Riaz, N. and Jabbar, A.** (2010) Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Natural Product Reports*, 27(2), 238-254.
2. **Kaufmann, B. and Christen, P.** (2002) Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis*, 13(2), 105-113.
3. **Jones, W.P. and Kinghorn, A.D.** (2006) Extraction of plant secondary metabolites. In *Natural Products Isolation*, Humana Press, 2^{ème} éd., Totowa, pp. 323-351.
4. **Souchotèque de Bretagne** (Consultée le 12/08/2011) <http://www.ifremer.fr/souchotheque/internet/htdocs/generique.php?pagebody=accueil.php>.
5. **Henri, L.** (1995) Morphologie - Structure. In *Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien*, Paris, pp. 47-104.
6. **Setzer, W.N. and Vogler, B.** (2006) Bioassays for activity. In *Natural products from plants*, Taylor & Francis, 2^{ème} éd., New York, pp.
7. **Meot-Duros, L., Cérantola, S., Talarmin, H., Le Meur, C., Le Floch, G. and Magné, C.** (2010) New antibacterial and cytotoxic activities of faltarindiol isolated in *Crithmum maritimum* L. leaf extract. *Food and Chemical Toxicology*, 48(2), 553-557.
8. **Meot-Duros, L., Le Floch, G. and Magné, C.** (2008) Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(2), 258-262.
9. **Besse, P. and Baccini, A.** (2011) Analyse des données ou statistique exploratoire multidimensionnelle. *Techniques de l'ingénieur*, AF 620, 1-16.
10. **West, C.** (2010) Caractérisation et classification de systèmes chromatographiques. Habilitation à Diriger des Recherches - Orléans: Université d'Orléans.
11. **Classification non supervisée** (Consultée le 11/08/2011) <http://www.math.univ-toulouse.fr/~besse/wiki/st-m-explo-classif.pdf>.
12. **Chauhan, A.S., Negi, P.S. and Ramteke, R.S.** (2007) Antioxidant and antibacterial activities of aqueous extract of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) seeds. *Fitoterapia*, 78(7-8), 590-592.
13. **Negi, P.S., Chauhan, A.S., Sadia, G.A., Rohinishree, Y.S. and Ramteke, R.S.** (2005) Antioxidant and antibacterial activities of various seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, 92(1), 119-124.

14. **Livermore, D.M.** (2002) Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Clinical Infectious Diseases*, 34(5), 634-640.
15. **Sharma, U.K., Sharma, K., Sharma, N., Sharma, A., Singh, H.P. and Sinha, A.K.** (2008) Microwave-assisted efficient extraction of different parts of *Hippophae rhamnoides* for the comparative evaluation of antioxidant activity and quantification of its phenolic constituents by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(2), 374-379.
16. **Marston, A.** (2011) Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2676-2683.
17. **Everette, J.D., Bryant, Q.M., Green, A.M., Abbey, Y.A., Wangila, G.W. and Walker, R.B.** (2010) Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin–Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8139-8144.
18. **Sun, B., Ricardo-da-Silva, J.M. and Spranger, I.** (1998) Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4267-4274.
19. **Kim, J.-S., Kwon, Y.-S., Sa, Y.-J. and Kim, M.-J.** (2010) Isolation and identification of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) phenolics with antioxidant activity and α -glucosidase inhibitory effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 138-144.
20. **Maheshwari, D.T., Yogendra Kumar, M.S., Verma, S.K., Singh, V.K. and Singh, S.N.** (2011) Antioxidant and hepatoprotective activities of phenolic rich fraction of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 49(9), 2422-2428.
21. **Upadhyay, N.K., Yogendra Kumar, M.S. and Gupta, A.** (2010) Antioxidant, cytoprotective and antibacterial effects of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12), 3443-3448.
22. **Hosseinian, F.S., Li, W., Hydamaka, A.W., Tsopmo, A., Lowry, L., Friel, J. and Beta, T.** (2007) Proanthocyanidin profile and ORAC values of manitoba berries, chokecherries, and seabuckthorn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(17), 6970-6976.
23. **Rösch, D., Krumbein, A. and Kroh, L.W.** (2004) Antioxidant galliccatechins, dimeric and trimeric proanthocyanidins from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) pomace. *European Food Research and Technology*, 219(6), 605-613.
24. **Rösch, D., Mügge, C., Fogliano, V. and Kroh, L.W.** (2004) Antioxidant oligomeric proanthocyanidins from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(22), 6712-6718.
25. **Fan, J., Ding, X. and Gu, W.** (2007) Radical-scavenging proanthocyanidins from sea buckthorn seed. *Food Chemistry*, 102(1), 168-177.

26. Mayer, R., Stecher, G., Wuerzner, R., Silva, R.C., Sultana, T., Trojer, L., Feuerstein, I., Krieg, C., Abel, G., Popp, M., Bobleter, O. and Bonn, G.K. (2008) Proanthocyanidins: target compounds as antibacterial agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 6959-6966.
27. Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Alakomi, H.-L. and Oksman-Caldentey, K.-M. (2005) Bioactive berry compounds—novel tools against human pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(1), 8-18.
28. Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B. (1970) The systematic identification of flavanoids. Springer, New York, pp. 354.
29. Massagetov, P.S. (1946) Alkaloids in plants of the family of Elaeagnaceae. *Zhurnal Obshchei Khimii*, 16, 775-776.
30. Tolkachev, O., Abizov, E., Abizova, E. and Mal'tsev, S. (2008) Phytochemical study of the bark of some plants of the Elaeagnaceae family as a natural source of β -carboline indole alkaloids. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 42(11), 630-632.

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

L'objectif de cette thèse était de mettre en œuvre des méthodologies innovantes en matière d'extraction, de fractionnement et d'identification de produits naturels d'origine végétale, en utilisant l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*, Elaeagnaceae) comme plante modèle.

La première partie de notre travail (Chapitre 2) a donc consisté à mettre en œuvre une méthodologie innovante d'extraction « verte ». Nous avons pour cela développé une extraction pressurisée sans solvant assistée par micro-ondes basée sur l'utilisation combinée de la pression, de la température et des micro-ondes pour accélérer la diffusion des solutés du cœur du matériel végétal riche en eau vers l'extérieur. L'originalité de la méthode repose sur le fait que l'extraction est réalisée, sans aucun ajout de solvant, directement à partir de l'eau constitutive de la matrice végétale. En évitant l'utilisation et le retraitement de solvants organiques toxiques pour l'environnement et la santé humaine, ce processus s'inscrit dans une démarche de chimie « verte ». La méthode développée à partir de baies d'argousier riches en eau a été optimisée en établissant un plan d'expériences. Nous avons pu démontrer que l'extraction de polyphénols à partir de fruit frais était possible sans dégradation apparente, et se révèle efficace puisque les extraits ainsi obtenus présentent une activité antioxydante et une teneur en composés phénoliques supérieure à celle des extraits obtenus au moyen des méthodes conventionnelles. Cependant, pour aller plus loin dans l'étude et la compréhension de l'extraction PSFME, différents points seraient à développer:

- évaluer l'extraction PSFME à partir d'une matrice fraîche à différents taux d'humidité, afin de déterminer le seuil d'humidité minimal à partir duquel ce procédé peut être choisi
- mesurer l'évolution de la pression à l'intérieur du réacteur dans le but de mieux comprendre l'impact de la pression pendant le processus d'extraction
- évaluer la sélectivité d'extraction d'autres familles moléculaires
- déterminer l'effet du chauffage sur les autres familles moléculaires
- évaluer l'effet du pH sur la dégradation des molécules glycosylés au sein du réacteur

De plus, il serait intéressant d'étendre cette méthodologie à différentes matrices végétales et différentes familles moléculaires.

Dans la seconde partie de ce travail de thèse (Chapitre 3), nous avons développé une méthodologie multidimensionnelle en ligne couplant la chromatographie de partage centrifuge CPC et l'HPLC-UV-MS. Cette technique permet un fractionnement à l'échelle préparative via

la CPC, ainsi que l'analyse et l'identification simultanées des composés présents dans ces différentes fractions grâce au couplage à l'HPLC-UV-MS. Dans un premier temps, nous avons développé des conditions d'analyse rapide en HPLC (< 7 min) pour pouvoir injecter en HPLC plusieurs fractions d'un même pic CPC. Les différences d'échelles de capacité de chargement (g vs μ g), de pressions et surtout les risques de non miscibilité des phases mobiles CPC et HPLC ont été étudiées afin de valider la faisabilité de ce couplage en ligne. Ainsi, les phénomènes décrits tels que la digitation visqueuse ou l'élargissement de pics liés à la non miscibilité des solvants, ont été limités par l'injection de petit volume (20 μ L) d'effluent CPC vers la deuxième dimension HPLC, et ce, quelle que soit la concentration de l'effluent CPC injecté (10 à 100 mg/mL).

Le couplage CPC-HPLC-UV-MS a été appliqué dans un premier temps au fractionnement des polyphénols des baies d'argousier, précédemment extraits par le processus PSFME, puis dans un deuxième temps à l'isolement de deux molécules majoritaires d'une fraction hydro-alcoolique de racines d'argousier. Dans les deux cas, nous avons démontré la faisabilité d'un tel couplage en ligne qui permet de suivre le fractionnement directement en sortie de CPC, et de plus, permet d'obtenir des informations structurales avec l'identification par MS des molécules fractionnées. Le couplage CPC-HPLC-UV-MS simplifie le regroupement des fractions, et réduit le temps de manipulation post-séparation en combinant analyse et identification des fractions en une seule et même étape. Cependant, ces deux exemples ont permis de révéler certaines faiblesses du couplage telles que l'élargissement des pics en seconde dimension et un temps d'analyse HPLC encore parfois trop long. Ainsi, en perspective de travail, il serait intéressant d'optimiser les volumes morts ainsi que de tester des volumes d'injections inférieurs à 20 μ L afin de réduire l'élargissement des pics en seconde dimension. Outre cela, il serait nécessaire d'évaluer d'autres types de support de phases stationnaires dédiés à l'analyse rapide sur des appareils HPLC conventionnels ou sur des appareils de chromatographie liquide ultra performance (UPLC). De plus, l'automatisation complète du système développé en utilisant une vanne de transfert automatique, un collecteur de fractions et un logiciel capable de piloter l'ensemble des appareils permettrait de simplifier la méthodologie et serait une avancée majeure vers la commercialisation de ce type d'appareil.

Le fractionnement optimisé par CPC d'extrait de baies d'argousier a permis de regrouper les molécules selon leurs propriétés physico-chimiques en 8 fractions simplifiées. Nous nous sommes donc attachés ensuite à identifier par HPLC-MS/MS les composés

présents dans ces 8 fractions. Cette démarche a abouti à l'identification de 25 molécules, dont 20 dérivés de flavonols, dans l'extrait PSFME, ce qui confirme que la procédure d'extraction développée dans le chapitre 2 est adaptée à l'extraction des flavonoïdes des baies d'argousier. La présence de ces molécules dans l'extrait de baies d'argousier nous a également amené à évaluer les propriétés antioxydantes et la cytotoxicité des fractions plus ou moins enrichies en ces molécules, et de tenter d'établir une relation structure-activité. L'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante des fractions a permis de montrer que l'extrait PSFME ainsi que les fractions F3, F4, F6 et F7 étaient les plus actives avec les tests chimiques, tandis que les fractions F2 et F4 étaient les plus actives avec le test cellulaire. La fraction F4, constituée d'acides phénoliques et de dérivés flavonoïques, peut être considérée, dans nos conditions, comme la plus antioxydante car elle est active à la fois avec les tests chimique et cellulaire. Les acides gallique et catéchique identifiés dans la fraction F4 peuvent contribuer à la forte activité antioxydante de cette fraction, toutefois une analyse structurale par RMN est nécessaire pour identifier les autres molécules de cette fraction.

La détermination de la cytotoxicité a également été réalisée pour toutes les fractions. Néanmoins il apparaît que la concentration à laquelle celles-ci ont été testées est trop importante pour pouvoir correctement étudier la viabilité cellulaire. De plus, il a été démontré dans la littérature que le test XTT, employé dans cette étude, induisait des variabilités dans les résultats lorsque celui-ci était utilisé avec des extraits de plantes contenant des polyphénols. Pour confirmer nos premiers résultats il s'avère nécessaire de réaliser d'une part, une autre étude de la cytotoxicité avec un autre test tel que celui d'Alamar Blue qui induit peu d'interférences et donc moins de variabilité et d'autre part, déterminer une concentration minimale à partir de laquelle l'extrait brut et les fractions pourraient être utilisés sans effet néfastes sur des cellules saines tout en conservant une activité antioxydante. Afin de voir si la cytotoxicité observée pour nos fractions dans les conditions testées est due à un effet retard, la lecture des résultats pourra être réalisée à différents temps après l'incubation de 4 h.

La dernière partie de cette thèse (chapitre 5) a permis de réaliser une étude phytochimique des différents organes de l'argousier et notamment ceux qui sont très peu décrits dans la littérature (feuille, tige et racine). Cette étude a été l'occasion de mettre en œuvre les différentes facettes de l'analyse développées au cours de cette thèse telles que l'extraction, le fractionnement, l'analyse, l'identification structurale, les tests d'activité biologique (antioxydant et antimicrobien) ainsi que des notions de statistique descriptive. Cette étude a notamment permis de mettre en évidence d'une part, que les graines, feuilles,

tiges et racines présentaient une activité antimicrobienne plus intéressante que les autres organes testés (baies, drêches) et d'autre part, que l'activité antioxydante et antimicrobienne de ces organes se retrouvaient dans les fractions hydro-alcooliques correspondantes. Cette activité a été corrélée à la présence de composés phénoliques pour les feuilles, tiges et racines et de proanthocyanidines pour les graines. Comme il a mentionné précédemment, la fraction hydro-alcoolique de racines d'argousier a été soumise à un fractionnement guidé par CPC-HPLC-UV-MS dans le but d'isoler les deux molécules majoritaires de cette fraction. Les premiers essais de fractionnement n'ont pas conduit à la totale purification des deux molécules, nécessitant de ce fait une étape supplémentaire de purification par HPLC semi-préparative. Les premières analyses structurales par HRMS et RMN semblent indiquer que ces molécules sont des alcaloïdes. Ceci nous amène à envisager d'autre type de système biphasique afin de purifier par CPC ces molécules voire les autres dérivés en une seule étape. Ces composés seront ensuite testés à différentes concentrations sur différents micro-organismes afin de déterminer leur CMI, puis criblés sur différentes cibles biologiques. Ces résultats encourageant nous incite à continuer l'investigation phytochimique des organes de l'argousier (feuilles, tige, racine, fleur) qui ont été très peu étudiés jusqu'à présent.

En conclusion, nos travaux présentent des avancées majeures dans des techniques d'extraction et de fractionnement de produits naturels qui sont à la fois rapide, efficace et qui s'inscrivent dans une démarche de chimie « verte » avec une réduction des quantités de solvants, de déchets et du temps de manipulation.

ANNEXES

ANNEXE 1

Solvants et réactifs

L'eau utilisée pendant ces travaux est de l'eau ultra-pure (résistance < 18 M Ω) purifiée avec un appareil Elgastat UHQ II (Elga, Antony, France). Le méthanol (MeOH), l'acétonitrile (ACN), l'acétate d'éthyle (AE), l'heptane (Hept), l'hexane (Hex), le chloroforme (CHCl₃) et le diméthylsulphoxide (DMSO) tous de qualité analytique, ont été fournis par SDS Carlo Erba (Val-de-Reuil, France). Les autres réactifs employés au cours de ces travaux sont détaillés dans le tableau A-1.

Tableau A-1: Nom et provenance des réactifs employés au cours de ces travaux.

Nom du produit	Abréviation	Fournisseur
2,3-bis-(2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl)	XTT	
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil	DPPH	Sigma-Aldrich
2,4,6-tripyridyl-S-triazine	TPTZ	Sigma-Aldrich
α -naphтол		Sigma-Aldrich
Acétate de sodium trihydrate	CH ₃ COONa, 3H ₂ O	Sigma-Aldrich
Acide acétique	CH ₃ COOH	Sigma-Aldrich
Acide Chlorhydrique	HCl	Sigma-Aldrich
Acide catéchique		Sigma-Aldrich
Acide gallique		Sigma-Aldrich
Acide oléanolique	Ole	Extrasynthese
Acide sulfurique	H ₂ SO ₄	Prolabo
Acide ursolique	Urs	Extrasynthese
Anisaldéhyde		Sigma-Aldrich
Bicarbonate de sodium	Na ₂ CO ₃	Sigma-Aldrich
β -sitostérol		Sigma-Aldrich
Bromure de 3-[4,5 diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium	MTT	
Chlorure ferrique hexahydrate	FeCl ₃ , 6H ₂ O	Acros organics
Chlorure de potassium	KCl	Sigma-Aldrich
Chlorure de sodium	NaCl	Sigma-Aldrich
Dihydrorhodamine 123	DHR 123	Sigma-Aldrich
Ester éthylamine de l'acide borique diphenyle		Sigma-Aldrich
Folin-Ciocalteu	FC	Sigma-Aldrich
Glucose	Glu	Sigma-Aldrich
Isorhamnétine	Iso	Extrasynthese
Isorhamnétine-3-O-glucoside	I3g	Extrasynthese
Isorhamnétine-3-O-rutinoside	I3r	Extrasynthese
Kaempférol	Kae	Extrasynthese
Pénicilline G		Sigma-Aldrich
Polyéthylène glycol	PEG	J.T. Baker
Quercétine	Que	Sigma-Aldrich
Quercétine-3-O-galactoside		Sigma-Aldrich
Quercétine-3-O-glucoside		Sigma-Aldrich
Saccharose	Sac	Sigma-Aldrich
Streptomycine		Sigma-Aldrich
Sulfate ferreux heptahydrate	FeSO ₄ , 7H ₂ O	Acros organics
Sulfate de sodium	Na ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich
Thioconazole		Sigma-Aldrich
Tween 80		Sigma-Aldrich
Valine	Val	Sigma-Aldrich
Xylose	Xyl	Sigma-Aldrich

ANNEXE 2

Matériel végétal

Les baies d'argousier utilisées pour les développements méthodologiques (Chapitre 2 à 4) ont été cueillies dans la Moldavie Roumaine entre Aout et Septembre 2008, puis conservées à -20°C. Avant utilisation les restes de pédoncules floraux ont été enlevés. Une masse moyenne de 4 g de baies entières, représentant entre 15 et 17 baies, a été utilisée pour les différentes extractions.

L'investigation phytochimique des différents organes de l'argousier (Chapitre 5) a été réalisée à partir d'organes d'argousier d'origines diverses (Tableau A-2). Il est à noter que parmi ces organes, les drêches et les graines sont des résidus ou co-produits de la production de jus d'argousier fournis par la société NATVIT (Hautes Alpes, France). Les baies sont comme précédemment un échantillon sauvage provenant de la région Moldave de la Roumanie. L'origine PLANFOR (Uchacq, France) correspond à des plants d'argousier achetés dans la pépinière du même nom. Les organes PLANFLOR ont été échantillonnés sur le même pied d'argousier cultivé en terre, puis récolté en Septembre 2010. Les racines Ploudalmézeau, récoltées à la fin de l'été 2010, proviennent de pieds sauvages d'argousier qui se développent sur l'arrière d'un massif dunaire (Dunes de Tréopan, Ploudalmézeau, Finistère).

Tableau A-2: Abréviation, origine et année de récolte des différents organes de l'argousier utilisés lors de ces travaux.

Organe	Origine	Année de récolte	Abréviation
Baie	Roumanie	2008	B8
	Roumanie	2009	B9
Feuille	Roumanie	2008	Fr
	PLANFLOR	2009	Fp
Tige	Roumanie	2008	Tr
	PLANFLOR	2009	Tp
Racine	PLANFLOR	2009	Rp
	Ploudalmézeau	2010	Ra
Graine	Roumanie	2008	Gr
	NATVIT	2009	Gn
Drêche	NATVIT	2009	Dn

ANNEXE 3

Traitement d'échantillons

Annexe 3a: Procédures d'extraction (Chapitre 2)

❖ PSFME (Pressurised Solvent Free Microwave Extraction)

La procédure d'extraction PSFME a été réalisée dans un four micro-onde MycroSynth (Milestone, Sorisole, Italie) en utilisant le module MonoPREP, adapté à des températures et des pressions élevées, dans lequel est introduit le réacteur en verre d'une capacité de 50 mL. Le logiciel easyCONTROL permet de piloter et de contrôler les différents paramètres que sont le temps d'irradiation, la puissance micro-ondes et la température. Cette dernière pouvant être enregistrée à l'intérieur et l'extérieur du réacteur grâce à une fibre optique ATC-FO introduite directement dans le récipient et grâce à une sonde infrarouge placée sur les parois du four. Les extraits obtenus ont été centrifugés (5000 rpm, 4 min) puis filtrés sur un filtre hydrophile Millipore Millex-HV (0,45 µm, Billerica, États-Unis).

❖ PMAE (Pressurised Microwave Assisted Extraction)

Les extraits PMAE réalisés avec solvant ont été effectués dans le même système micro-ondes décrit précédemment, sauf que dans ce cas 4 mL d'eau ultra-pure ou d'éthanol ont été ajoutés à l'intérieur du réacteur. Les extraits obtenus ont été centrifugés (5000 rpm, 4 min) puis filtrés sur un filtre hydrophile Millipore Millex-HV (0,45 µm, Billerica, États-Unis).

❖ PLE (Pressurised Liquid Extraction)

L'extraction PLE a été réalisée avec un système ASE 100 Dionex (Voisins le Bretonneux, France) dans une cellule d'extraction de 34 mL en acier inoxydable. Les baies entières ont été introduites dans la cellule sans étape de pré-traitement, puis soumises à extraction avec de l'eau ultra-pure chauffée à 40, 60 et 100° C. Les conditions d'extractions sont des conditions standardisées comprenant cinq cycles statiques de 5 min chacun, un volume de chasse de 65% et une purge de 100 sec à la fin de chaque extraction avec du diazote. L'extrait aqueux (114 mL) a ensuite été évaporé puis solubilisé dans un volume final de 5 ml de MeOH ou de H₂O ultra-pure en fonction des expériences.

Annexe 3a (suite)

❖ **Macération**

Les extraits obtenus par macération ont été réalisés en agitant les baies entières dans de l'eau ultra-pure (5 mL) à température ambiante et pendant 10 min. L'extrait recueilli est d'abord centrifugé (5000 rpm, 4 min) puis filtré sur un filtre hydrophile Millipore Millex-HV (0,45 µm, Billerica, États-Unis). Par la suite, l'extrait a été solubilisé dans un volume final de 5 mL de MeOH ou d'H₂O ultra-pure selon les expériences.

❖ **Pressage**

Les extraits obtenus par pressage ont été réalisés en pressant manuellement les baies entières dans de la gaze hydrophile purifiée (Wuhlin, Hondouville, France). L'extrait juteux récupéré a ensuite été centrifugé (5000 rpm, 4 min) puis filtré sur un filtre hydrophile Millipore Millex-HV (0,45 µm, Billerica, États-Unis), avant d'être solubilisé dans un volume final de 5 mL de MeOH ou d'H₂O ultra-pure selon les expériences.

Annexe 3b: Broyage, extraction et fractionnement (Chapitre 5)

❖ Broyage

Les organes riches en eau telles que les baies et les drêches ont été broyées dans un mortier à l'azote liquide. Les organes souples facilement broyables (feuille et graine) ont été broyées avec un moulin à café domestique Bosch. Les parties boisées, plus rigides, ont été broyées par effet de percussion avec un broyeur à fléaux SK 100 Retsch GmbH (Haan, Allemagne).

❖ PLE

L'extraction PLE des différents organes utilisés dans le chapitre 5 a été réalisée avec un système ASE 100 Dionex (Voisins le Bretonneux, France) dans une cellule d'extraction de 34 mL en acier inoxydable. Les organes, finement broyés, ont été introduits dans les cellules avec du Na₂SO₄ en proportion 1 pour 2, de manière à remplir la cellule d'extraction au ³/₄. Les extractions ont été réalisées à partir de 3 g pour les feuilles et les racines, 5 g pour les tiges et les graines et 10 g pour les baies et drêches. Le mélange matrice végétale/ Na₂SO₄ a ensuite été soumis à extraction avec deux solvant différents EtOH ou AE chauffés à 60°C. La température d'extraction a été préalablement optimisée en testant trois températures: 40, 50 et 60°C. Les conditions d'extraction sont des conditions standardisées comprenant cinq cycles statiques de 5 min chacun, un volume de chasse de 70 % et une purge de 100 sec à la fin de chaque extraction avec du di-azote. Les extraits obtenus ont été ensuite évaporés à l'évaporateur rotatif (Buchi Labortechnik AG, Switzerland) à 40°C. Les extraits secs obtenus, constituant les extraits bruts, ont été conservés au réfrigérateur avant utilisation. Chaque extrait a été réalisé trois fois.

❖ Extraction Liquide-Liquide (ELL)

Le fractionnement par ELL, utilisé pour séparer les extraits bruts en trois fractions de polarité différente, a été réalisé à partir de l'extrait brut éthanolique. Le résidu sec a été solubilisé dans une solution H₂O:EtOH (9:1) (300 mg dans 100 mL pour les feuilles et les graines et 80 mg dans 20 mL pour les racines et tiges), puis séparé par une succession de partage liquide-liquide H₂O:Hex (1:3), puis H₂O:AE (1:3). Les volumes de solvants ont été adaptés selon la quantité d'extrait brut éthanolique disponible 3×20 mL (tige et racine) ou 3×100 mL (feuille et graine).

ANNEXE 4

Appareillage de Chromatographie Liquide

❖ Colonnes

- Colonne Alltima C18 (150 × 4.6 mm ID, 5 µm ; Alltech, Deerfield, Etats-Unis)
- Colonne Chromolith Performance RP-18e (100 × 4.6 mm ID, 5 µm ; Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Colonne HALO C18 (50 × 4.6 mm ID, 2.7 µm ; Advanced Materials Technology, Wilmington, Etats-Unis)
- Colonne semi-préparative Kromasil C18 (250 × 10 mm ID, 7 µm ; EKA Chemicals, Bohus, Sweden)

❖ Analyses HPLC-DAD

Les différents extraits et fractions obtenus pendant ces travaux ont été analysés par HPLC sur un appareil LaChrom Elite (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) couplé avec un DAD et piloté avec le logiciel EZChrome Elite.

La majorité des analyses a été réalisée en utilisant un gradient constitué de H₂O ultra-pure et de MeOH tous les deux acidifiés avec 1% d'acide acétique (CH₃COOH) dont les proportions sont résumées dans le tableau A-3. La séparation a été réalisée à 1 mL/min et à 25°C sur la colonne C18 Alltima (150 × 4.6mm ID, 5 µm), en injectant 20 µL d'extrait. Les analyses ont été enregistrées entre 200 et 600 nm, cependant trois longueurs d'ondes ont été fixées (254, 279 et 366 nm) permettant d'obtenir des empreintes caractéristiques des extraits.

Tableau A-3: Conditions du gradient d'analyse HPLC.

Temps (min)	% Solvant A (H ₂ O 1% CH ₃ COOH)	% Solvant B (MeOH 1% CH ₃ COOH)
0	95	5
5	95	5
10	80	20
15	80	20
25	50	50
30	50	50
40	20	80
45	20	80
46	95	5
55	95	5

❖ Couplage CPC-HPLC-UV-MS/MS

➤ Première dimension CPC

L'ensemble des fractionnements CPC-UV-DEDL a été réalisé avec un appareil semi-préparatif Fast CPC (Kromaton, Angers, France) équipé d'une colonne de 200 mL, couplé à un détecteur Merck L-4000 UV (Val de Fontenay, France), et un Détecteur Évaporatif à Diffusion de la Lumière (DEDL). Ce dernier est un modèle SEDEX 45 fourni par SEDERE (Alfortville, France) réglé de manière suivante: gaz de nébulisation (azote): 2,2 bars, température du tube d'évaporation: 50°C, gain photomultiplicateur: 6.

Pour diviser le flux entre le collecteur de fraction et le système de détection destructif (DEDL), une vanne de division de flux active commercialisée par SEDERE (Alfortville, France) sous le nom de SEDEX Variable Flow Splitter (VFS) a été utilisée.

Les différentes phases liquides ont été introduites dans la colonne CPC via une pompe isocratique préparative à double piston LC-8A de Shimadzu (Champs sur Marne, France). Les extraits ont été injectés au moyen d'une vanne Upchurch basse pression à 6 voies muni d'une boucle d'injection de 10 mL.

➤ Vanne de commutation entre la première et la deuxième dimension

Le lien entre les deux dimensions a été réalisé grâce à une vanne Valco® six voies (Valco Instruments, Houston, USA), permettant la permutation entre la première dimension CPC et la deuxième dimension HPLC (Fig. A-1)

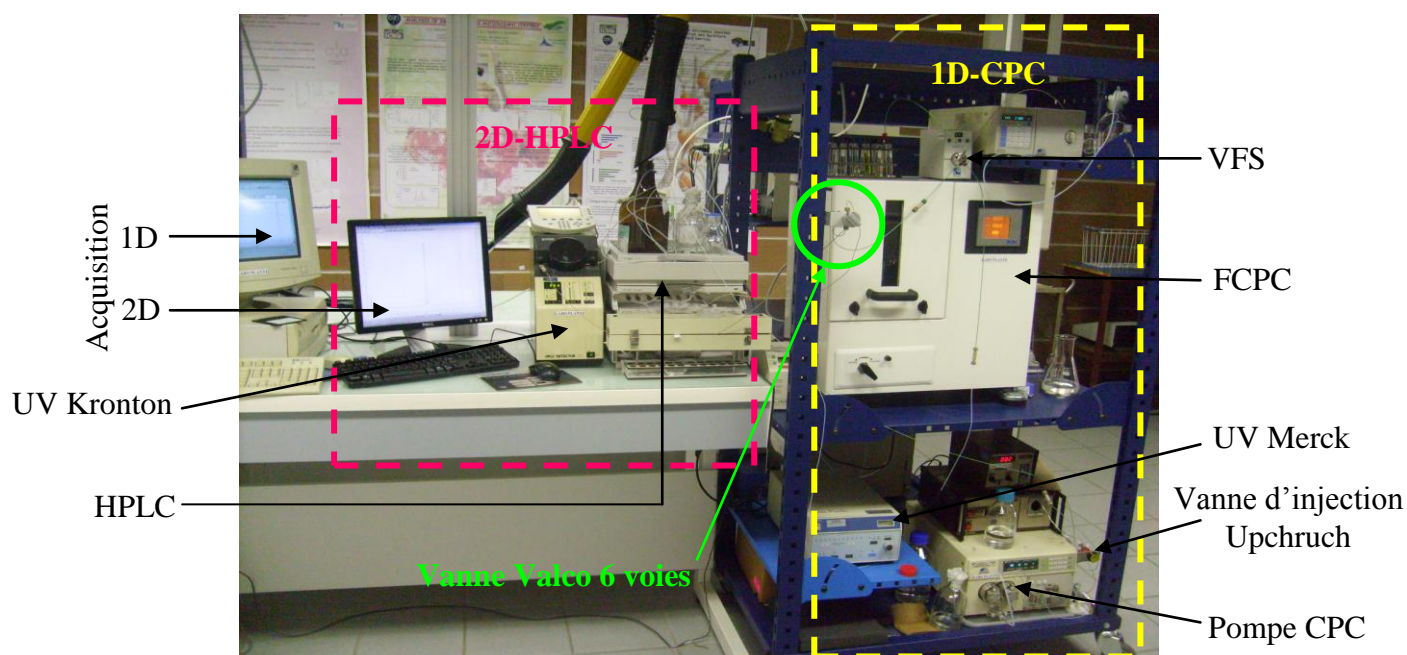


Figure A-1: Photographie du couplage CPC-HPLC-UV. 1D, Première dimension ; 2D, deuxième dimension ; VFS, Variable Flow Splitter.

➤ Deuxième dimension HPLC-UV-MS

Les analyses HPLC-UV-MS ont été réalisées avec un appareil de chromatographie liquide HP 1100 (Agilent, Waldron, Allemagne) couplé à un détecteur UV mono-longueur d'onde (Kronton Instrument, Montigny le Bretonneux, France) et à un triple quadripôle Quattro Ultima Micromass équipé d'une source électrospray Z-spray de géométrie orthogonale (Waters, Saint Quentin, France). Les données enregistrées d'un rapport m/z de 100 à 1000 u ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel MassLynx1 4.0. Lors du couplage HPLC-MS, un diviseur de flux en T a été utilisé entre l'HPLC et la MS dans le but de réduire le débit de l'effluent HPLC à 0.3 mL/min, débit compatible avec une source d'ionisation ESI (Fig. A-2).

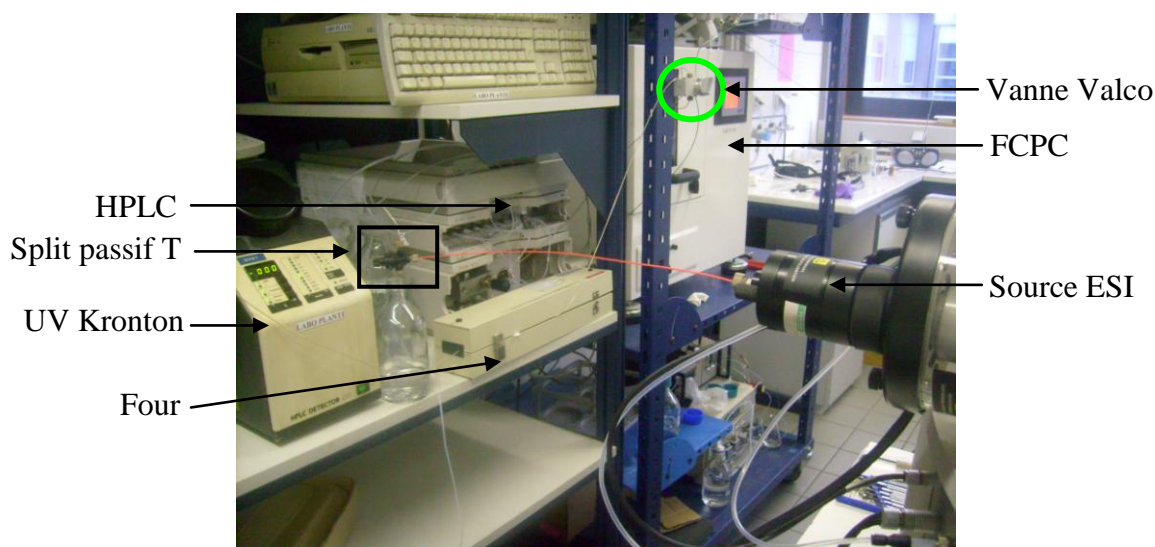


Figure A-2: Photographie du couplage CPC-HPLC-UV-MS réalisé avec une source électrospray (ESI). Split, diviseur de flux.

La séparation des molécules en deuxième dimension a été évaluée sur deux colonnes: la colonne Chromolith Performance RP-18e (100 × 4.6 mm ID, 5 μm) et la colonne HALO C18 (50 × 4.6 mm ID, 2.7 μm). Pour les deux colonnes, la séparation a été réalisée en utilisant un gradient linéaire constitué de H₂O ultra-pure (A) et de MeOH ou d'ACN (B) tous les deux acidifiés avec 1% de CH₃COOH et dont les proportions varient de 5 % à 45 % de B en 10 min. Le débit de la phase mobile a été fixé à 3 mL/min et 2 mL/min respectivement pour la colonne Chromolith et la colonne Halo, et le volume d'injection à 20 μL. Les analyses ont été effectuées à 35°C et enregistrées à 366 nm.

❖ Purification par HPLC semi-préparative

La purification des molécules d'intérêt a été réalisée sur l'appareil HPLC LaChrom Elite précédemment décrit. La séparation a été réalisée à 4 mL/min et à 25°C sur la colonne semi-préparative Kromasil C18 (250 × 10 mm ID, 7 µm) en injectant 20 µL d'extrait concentré (50 mg/mL). Les pics correspondant aux molécules cibles ont été collectés manuellement à la sortie du DAD. Les deux solvants utilisés sont A: H₂O 1% CH₃COOH et B: MeOH 1% CH₃COOH. La proportion de solvants a été modifiée comme suit: 5 % de B pendant 5 min, augmentation à 20 % de B en 5 min, 20 % de B pendant 5 min, augmentation à 50 % de B en 10 min, 50 % de B pendant 5 min. La durée totale de séparation est de 30 min.

ANNEXE 5

Analyses HPTLC

❖ Dépôts

Les dépôts ont été réalisés avec un déposeur semi-automatique Linomat IV (Camag, Muttenz, Suisse) à une vitesse de dépôt de 7 sec/ μ L avec du di-azote comme gaz de vaporisation. Avant les dépôts, les plaques ont été lavées avec du MeOH (100 %) puis séchée à 100°C. Les échantillons ont été déposés en forme de bande fine sur 7 mm de largeur, à 10 mm du bord inférieure et à 5 mm du coté gauche de la plaque. Un espace de 3.5 mm a été laissé entre deux bandes successives.

Echantillon: 10 μ L à 10 mg/mL

Standard: 5 μ L à 1 mg/mL

Plaque silice 60 F₂₅₄: Echantillon dissous dans MeOH 0.1% Hexane

Plaque RP18 WF_{254s}: Echantillon dissous dans MeOH

❖ Conditions de séparation

L'intégralité des séparations ont été effectuées dans une chambre d'élution horizontale.

➤ Plaque sucres-acides aminés

Phase stationnaire: HPTLC silice 60 F₂₅₄ (10 × 20)

Phase mobile: ACN:H₂O (75:25, v/v)

➤ Plaque terpènes

Phase stationnaire: HPTLC silice 60 F₂₅₄ (10 × 20)

Phase mobile: CHCl₃:MeOH:H₂O (90:20:1.5, v/v)

➤ Plaque polyphénols

Phase stationnaire: HPTLC Lichrospher RP18 WF_{254s} (10 × 20).

Phase mobile: ACN:H₂O:HCOOH (50:50:5 v/v)

❖ **Révélateurs**

➤ **Ninhydrine** à 0.1% (acides aminés)

- 100 mg ninhydrine
- 100 mL Ethanol

Mode d'emploi : Vaporiser suffisamment sans mouiller, puis placer la plaque au four à 120°C pendant 8 à 10 minutes. La lecture se fait dans le visible. Acides aminés et peptides apparaissent en rose.

Conservation à température ambiante

→ Non destructif, possibilité d'appliquer un autre révélateur par la suite comme Molich

➤ **Molich** (Sucres)

Solution a:

- 2 g d' α -naphthol
- 100 mL d'éthanol

Solution b:

- H₂SO₄ à 5% dans l'éthanol

Mode d'emploi : Vaporiser légèrement la solution a puis la solution b. Sécher puis placer la plaque à 120°C pendant 5 minutes environ. La lecture se fait dans le visible, les oses et hétérosides apparaissent en violet. Conservation à température ambiante

➤ **Anisaldéhyde** (terpènes)

- 0.5 g mL d'anisaldéhyde
- 10 mL acide acétique glacial
- 85 mL de méthanol
- 5 mL de H₂SO₄ concentré

Mode d'emploi :

Pulvériser puis chauffer (100°C) la plaque pendant 5 à 10 minutes. Lecture dans le visible et à 366 nm. A conserver au frais, se dégrade rapidement.

➤ **NEU + PEG** (polyphénols)

NEU (à conserver au congélateur)

- 1 g de l'ester éthylamine de l'acide borique diphényle
- 100 mL de MeOH

PEG (à conserver à température ambiante, et à passer aux ultrasons avant utilisation)

- 5 g de PEG 4000
- 100 mL EtOH (dissolution longue)

Mode d'emploi : Pulvériser NEU puis PEG sans chauffage, lecture à 366 nm, nette intensification de la fluorescence naturelle des flavonoïdes.

ANNEXE 6

Protocoles des tests chimiques

Appareillage:

- Test en cuve: spectrophotomètre Cary 100 Scan UV–VIS (Varian, Les Ulis, France)
- Test en microplaque 96 puits: spectrophotomètre Multiskan FC (Thermo scientific) adapté à la lecture de microplaques (NUNC, Fisher Bioblock)

Annexe 6a: Test d'activité antioxydante

❖ Test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil)

Le DPPH[•], sous forme radicalaire, a été préparé quotidiennement dans du MeOH à une concentration de 75 µM. La solution est ensuite gardée à l'obscurité et dans la glace avant d'être employée. Après 30 min d'incubation à l'obscurité, le degré de décoloration a été mesuré à 517 nm.

- Test en cuve
 - 10 µL d'extrait à 1 mg/mL ou de la solution standard ou de MeOH (blanc)
 - 990 µL de DPPH[•]
- Miniaturisation microplaque 96 puits
 - 2 µL d'extrait à 1 mg/mL ou de la solution standard ou de MeOH (blanc)
 - 198 µL de DPPH[•]

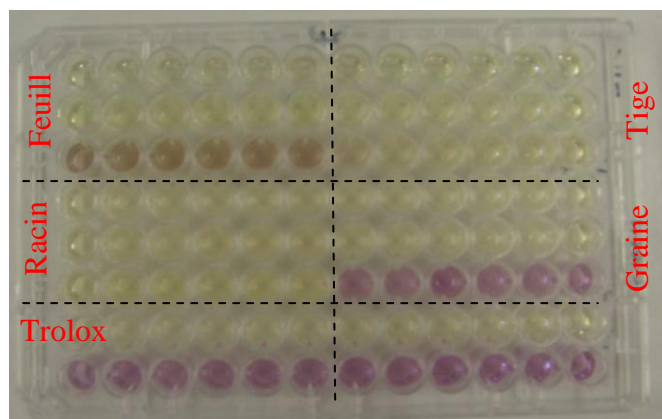


Figure A-3: Photographie d'une microplaque obtenue avec le test DPPH[•].

❖ **Test FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power)**

Cette technique nécessite le mélange à température ambiante de trois solutions en proportion 10:1:1 respectivement: du tampon acétate (300 mM dans H₂O, pH = 3.6), du TPTZ (10 mM préparé dans HCl à 40 mM) et du chlorure de fer (FeCl₃, 20 mM dans H₂O). Le mélange chauffé à 37°C constitue le réactif FRAP.

➤ Test en cuve

- 10 µL d'extrait à 1 mg/mL ou de la solution standard ou de H₂O ultra-pure (blanc)
- 100 µL de H₂O ultra-pure
- 890 µL de réactif FRAP

➤ Miniaturisation microplaque 96 puits

- 2 µL d'extrait à 1 mg/mL ou de la solution standard ou de MeOH (blanc)
- 20 µL de H₂O ultra-pure
- 178 µL de réactif FRAP

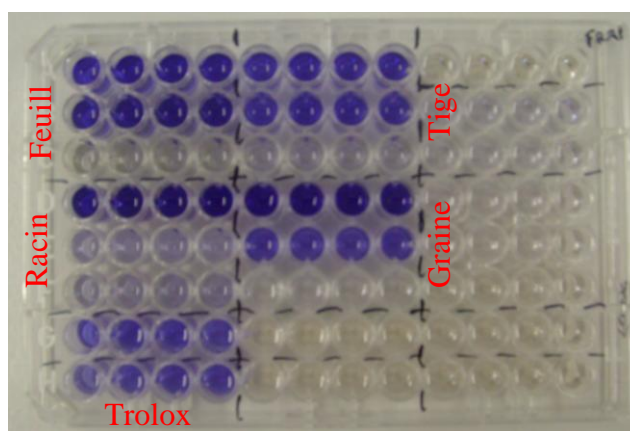


Figure A-4: Photographie d'une microplaque obtenue avec le test FRAP.

Annexe 6b: Estimation colorimétrique de familles moléculaires

❖ Estimation de la teneur en composés phénoliques totaux (TPC, Total Phenolic Content)

➤ Test en cuve

- 20 μL d'extrait à 1 mg/mL ou de la solution standard ou de MeOH
- 100 μL de réactif FC
- 300 μL de Na_2CO_3 à 20 % après 5 min d'incubation échantillon-réactif FC
- 1580 μL H_2O ultra-pure

➤ Miniaturisation microplaque 96 puits

- 2 μL d'extrait à 1 mg/mL ou de la solution standard ou de MeOH
- 10 μL de réactif FC
- 30 μL de Na_2CO_3 à 20 % après 5 min d'incubation échantillon-réactif FC
- 158 μL H_2O ultra-pure

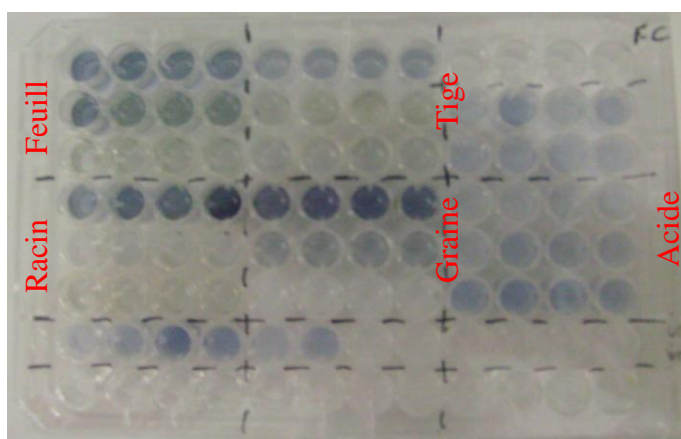


Figure A-5 Photographie d'une microplaque obtenue avec le test TPC.

❖ Estimation de la teneur en tannins condensés (CTC, Condensed Tannin Content)

➤ Miniaturisation microplaque 96 puits

- 10 μL d'extrait à 1 mg/mL ou de la solution standard ou de MeOH
- 120 μL de vanilline à 4 % dans du MeOH
- 60 μL de HCl concentré

ANNEXE 7

Tests cellulaires

Appareillage:

- Microplaque 96 puits (Fisher Bioblock, Illkirch, France)
- Lecteur de microplaque VICTOR³™ V Multilabel Counter modèle 1420 (PerkinElmer, Courtaboeuf, France) permettant des lectures de fluorescence et d'absorbance (UV-Vis)
- Système d'irradiation UV Bio-Sun (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Allemagne)

Milieu de culture: DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) low glucose (PAA Laboratories, Allemagne) contenant des facteurs de croissance cellulaires (sérum de veau foetal à 10 %), une solution d'antibiotiques à 1 % (Pénicilline G et Streptomycine) et du glutamax (1 %).

Les fibroblastes utilisés sont des fibroblastes humains d'un donneur féminin de 30 ans (LVMH, Saint-Jean de Braye) cultivés dans le milieu DMEM à 37°C et sous une atmosphère contenant 5% de CO₂. Chaque lundi et vendredi les cellules sont repiquées et le milieu est changé tous les deux jours.

Pour la réalisation des tests, chaque puits des microplaques a étéensemencé de cellules à une concentration de 3.10⁴ cellules/puits dans 100 µL de milieu DMEM. Après 24 h à 37°C et 5% de CO₂, le milieu a été éliminé délicatement et remplacé par les échantillons à tester (témoin positif et négatif, extrait PSFME et fractions) dissous dans 100 µL de milieu de culture. Les échantillons ont tous été préalablement préparés à une concentration de 10 mg/mL dans un mélange MeOH:DMSO (60:40) puis dilués à la concentration voulue (0.1 et 1 mg/mL) dans 100 µL de milieu de culture. Les plaques ont ensuite été mises à incuber pendant 4, 6, 12 ou 24h à 37°C et sous 5 % de CO₂.

Le tampon phosphate salin (PBS, Phosphate Buffered Salin) utilisé pour rincer les cellules est composé de phosphate, de NaCl et de KCl à un pH de 7.5. Il a été premièrement préparé à une concentration de 10X puis dissous à 1X dans de l'eau distillée.

❖ Détermination de l'activité antioxydante via le test DHR 123 (Dihydrorhodamine 123)

- **Après incubation**, éliminer le milieu de culture des plaques
- Rincer avec du PBS (×2)
- Ajouter 100 µL de la solution de DHR 123 à 10 µM dissous dans du PBS
- Incuber 45 min à 37°C, 5% CO₂
- Irradier aux UVA (1J/cm², 365 nm)
- Incuber 30 min à 37°C, 5% CO₂
- Lecture au spectrofluorimètre

$$\lambda_{\text{excitation}} = 500 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{émission}} = 536 \text{ nm}$$

→ Préparation de la DHR 123

- Solution mère à 10 mg /mL soit 29 mM ($MW_{\text{DHR 123}} = 346.4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
- Solution intermédiaire à 10 mM
- A utiliser à 10 µM final dilué dans du PBS 1X

❖ Test de cytotoxicité XTT (2,3-bis-(2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl)

- Mettre à incuber à 37°C les 2 réactifs du Kit Roche XTT pour le décongeler, puis agiter avec un vortex pour obtenir une solution limpide.
- Préparer le réactif XTT en proportion (50 : 1) soit un petit flacon d'*Electron coupling reagent* dans un grand flacon de *XTT reagent*. Le mélange peut être gardé à -20°C.
- **Après incubation**, éliminer le milieu de culture des plaques et rincer avec du PBS
- Ajouter 100 µL de réactif XTT par puits après l'avoir dilué (5 mL de réactif + 5 mL de milieu de culture)
- Incuber 3h à 37°C, 5% CO₂
- Lecture à 450 nm ou filtre 450-500 nm

ANNEXE 8

Tests antimicrobiens

Annexe 8a: Milieu de culture

❖ **Bouillon nutritif BHI** (Bactérie et levure)

- Tryptone 10 g
- Extrait de viande 5 g
- Chlorure de sodium 5 g
- H₂O distillée 1000 mL

❖ **Bouillon Tryptone-sel**

- Tryptone 1 g
- Chlorure de sodium 8.5 g
- H₂O distillée 1000 mL

❖ **Bouillon dextrosé à la pomme de terre** (Champignon)

- Infusion de pomme de terre 1 g
- Dextrose 20 g
- H₂O distillée 1000 mL

Après avoir été mis en solution ces milieux sont d'abord agités à froid pour les deux premiers, le milieu dextrosé à la pomme de terre est quant à lui porté à ébullition pendant 1 min. Les milieux sont ensuite répartis dans des tubes (9 mL), puis mis à autoclaver à 120°C pendant 15 min.

Annexe 8b: Méthode de micro-dilution en microplaque

L'ensemble des manipulations de micro-organismes a été réalisé sous une hotte à flux laminaire.

➤ Repiquage

Les solutions mères de micro-organismes sont repiquées en introduisant 0.1 mL de la solution mère dans 9 mL de bouillon. Cette opération a été réalisée 24 h (bactérie), 48 h (levure) ou 72 h (champignon) avant les tests en microplaque de sorte à obtenir, après incubation à 37°C, des solutions bactériennes ou fongiques à 10^8 UFC/mL ou 10^8 spores/mL. Il est à noter ici que pour la souche *Staphylococcus aureus* le temps d'incubation a été fixé à 13h.

➤ Dénombrement

Le dénombrement en micro-organisme a été effectué parallèlement par un dénombrement sur boîte de pétri pour les bactéries et levures ou à l'aide d'une cellule de Malassez pour les champignons.

➤ Test en microplaque

Le jour du test les suspensions en micro-organismes, dont on s'est assuré de la concentration 10^8 UFC/mL ou 10^8 spores/mL, sont diluées de façon à obtenir des solutions à 10^2 UFC/mL ou 10^2 spores/mL. L'ensemble des dilutions a été réalisé dans du bouillon tryptone-sel (bactérie et levure) ou dans un mélange eau + Tween 80 (champignon), sauf la dilution menant à 10^2 qui a été effectuée dans le bouillon de culture approprié aux micro-organismes.

Après dépôt dans les puits des extraits et des témoins positifs (antibiotique: 5mg/mL de streptomycine + 10 mg/mL de pénicilline G ou fongicide: 10 mg/mL de thioconazole), les microplaques ont ensuite été chauffées entre 30 et 40°C dans le but d'évaporer complètement le solvant (MeOH) et d'obtenir différentes doses d'extraits secs. Ensuite, 100 μ L d'une suspension de micro-organismes à 10^2 UFC/mL ou 10^2 spores/mL ont été déposés dans tous les puits de la microplaque. Les microplaques sont ensuite recouvertes d'un film autocollant stérile puis mises à incuber à 37°C jusqu'à atteindre la phase stationnaire de croissance soit 24 h pour les bactéries (13 h pour *S. aureus*), 48 h pour la levure et 72 h dans le cas des champignons. La croissance microbienne a été mesurée à 405 nm avec spectrophotomètre Multiskan FC (Thermo scientific) adapté à la lecture de microplaques.

ANNEXE 9

Traitement statistique

Les différentes expériences réalisées pendant ces travaux de thèse ont toutes été répétées au moins trois fois pour évaluer la répétabilité des procédures. A partir de ces mesures, le logiciel Microsoft XLSTAT (Microsoft Corporation, Redmond, USA) a ensuite été employé pour calculer la moyenne et l'écart-type des différentes conditions testées. Les différences significatives entre conditions ont ensuite été évaluées en effectuant une comparaison multiple de moyennes via une ANOVA, à différents intervalles de confiance: 95, 99 et 99.9 %. Les différences avec des p-values supérieures à 0.05, 0.01 ou 0.001 n'ont pas été considérées comme significatives.

Par ailleurs, ce logiciel a également été utilisé pour effectuer les tests statistiques multivariés tels que les ACP, AFD, CAH ainsi que pour déterminer le coefficient de corrélation de Pearson (ρ).

Le développement et l'analyse du plan d'expérience ont été réalisés avec logiciel NemrodW (LPRAI, Marseille, France).

ANNEXE 10

Autres protocoles

Annexe 10a: Détermination du taux d'humidité des baies d'argousier (Chapitre 2)

Pour déterminer la teneur en eau 455 g de baies ont été lyophilisées sur une période de 10 jours en utilisant un lyophilisateur RP2 V de Serail (Le Coudray Saint Germer, France). La lyophilisation a été réalisée deux fois pour s'assurer d'un taux d'humidité équivalent quelque soit les baies utilisées.

Le taux d'humidité (T_h) a été obtenu en calculant le rapport entre la masse sèche (M_s) et la masse fraîche (M_f) de baies d'argousier tel que décrit ci-dessous :

$$T_h = 1 - M_s/M_f * 100$$

Annexe 10b: Microscopie optique (Chapitre 2)

Afin de visualiser l'effet répété de l'irradiation micro-ondes sur la structure des baies d'argousier, un échantillon a été prélevé après chaque cycle d'extraction, puis conservé à -80°C. Les observations, effectuées sur des échantillons traités et non-traités, ont été réalisées à l'aide d'un microscope optique VHX-1000 équipé d'une caméra numérique (Keyence, Courbevoie, France).

Glossaire

Actinomycète: Bactérie filamenteuse, ramifiée, ressemblant aux champignons microscopiques, que l'on trouve dans le sol, l'eau et la matière en décomposition.

Angiosperme: Sous-embranchement des spermatophytes comprenant les plantes à fleurs dont les graines sont enfermées dans des fruits après fécondation.

Angiogenèse: Processus physiologique qui décrit la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants.

Apoptose: Processus physiologique de mort cellulaire programmée.

Bractée: Feuille souvent colorée à la base de laquelle se développe la fleur ou l'inflorescence.

Déréplication: Procédure permettant d'identifier des molécules connues dans un extrait de plante sans à avoir à les isoler.

Derme: Couche profonde de la peau, recouverte par l'épiderme et formée de tissu conjonctif composé principalement de collagène et de fibres élastiques.

Drêche: Résidu solide qui est obtenu après filtration d'un moût en fin de production.

Dicotylédone: Classe de végétaux supérieurs dont l'embryon possède deux cotylédons (feuille embryonnaire).

Dioïque: Se dit d'une plante à fleurs unisexuées, les fleurs mâles et femelles étant sur des pieds différents.

Fibroblaste: Les fibroblastes humains sont des cellules jeunes et spécifiques des tissus conjonctifs comme le derme de la peau, dans lequel elles ont pour principale fonction la synthèse du collagène et des fibres élastiques.

Génine: Partie non glucidique (aglycone) d'une molécule glycosylée.

Halophyte: Végétal adapté à la croissance en milieu salin.

Hétéroside: Substance glucidique composée d'un ou plusieurs sucres (oses) et d'une partie non glucidique (aglycone), et qui peut être décomposée par hydrolyse.

Périanthe: Ensemble des enveloppes (pétales et sépales) protégeant les organes reproducteurs de la fleur.

Probiotique: Se dit d'un aliment, tel que le yaourt, qui contient des micro-organismes vivants (bactéries, levures...) et qui exerce un effet bénéfique sur l'organisme qui les ingère.

Rhizome: Tige souterraine des plantes vivaces qui porte des racines adventives et des tiges feuillées aériennes.

Spermatophyte: Embranchement du règne végétal comprenant toutes les plantes à graines.

Nosocomiale: Se dit d'une maladie due à des micro-organismes, contractée au cours d'un séjour en milieu hospitalier.

Thomas MICHEL

Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*)

Résumé:

La richesse moléculaire des végétaux constitue une source importante de molécules bioactives d'origine naturelle. La mise en évidence de ces molécules nécessite de nombreuses étapes souvent longues et coûteuses. L'objectif de cette thèse a donc consisté en l'innovation et le développement de nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification de produits naturels d'origine végétale. Pour cela nous avons utilisé comme modèle végétal l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*, Elaeagnaceae) qui est un arbuste épineux du plateau Eurasiatique connu pour sa richesse phytochimique et son potentiel thérapeutique.

Ce travail a d'abord conduit au développement d'une méthode d'extraction « verte » sans solvant assistée par micro-ondes, basée sur l'utilisation combinée de la pression, de la température et des micro-ondes. Il a pu être démontré que cette méthodologie permet d'extraire rapidement et efficacement des composés phénoliques tout en conservant un potentiel antioxydant important. Dans une seconde partie, une nouvelle approche multidimensionnelle couplant la CPC et l'HPLC-UV-MS a été développée. Cette technique permet la séparation à l'échelle semi-préparative et l'identification en ligne des molécules séparées. Il a ainsi pu être identifié par HPLC-MS/MS 3 acides phénoliques et 20 dérivés de flavonols dans l'extrait micro-ondes sans solvant de baies d'argousier. L'activité antioxydante et la cytotoxicité des fractions a également été étudiée *in vitro* et *in cellulo*. Enfin la dernière partie de ce travail a démontré le potentiel antioxydant et antimicrobien de différents organes de l'argousier, qui a été corrélé à la présence flavonoïdes et de proanthocyanidine. L'intérêt du couplage CPC-HPLC-UV-MS a également été illustré par le fractionnement de deux molécules d'un extrait actif de racines d'argousier.

Mots clés: Argousier, Extraction assistée sous micro-ondes, CPC, HPLC-MS, Antioxydant, Antimicrobien

New extraction, fractionation and identification methodologies: Application to sea buckthorn bioactive molecules

Summary:

Plant materials constitute an important source of natural bioactive molecules. Characterisation of these molecules requires often multiple, long and expensive development steps. The aim of this PhD thesis consists of innovation and development of new methods of extraction, fractionation and identification of natural metabolites from plants. We used sea buckthorn as plant model (*Hippophaë rhamnoides*, Elaeagnaceae) an Eurasian thorny shrub known to possess various phytochemical properties and pharmaceutical effects.

In the first part of this work a "green" solvent-free microwave assisted extraction, based on the combined use of pressure, temperature and microwave irradiation has been developed. This approach allows fast and efficient extraction of phenolic compounds while maintaining an important antioxidant capacity. In the second part of this work, a new multidimensional approach coupling CPC and HPLC-UV-MS was developed. This technique allows the separation at semi-preparative scale and the online identification of isolated molecules. Using this approach, 3 phenolic acids and 20 flavonols from the solvent free sea buckthorn berries extract were identified by HPLC-MS/MS. Antioxidant activity and cytotoxicity of fractions were studied *in vitro* and *in cellulo*. In the last part of this work, the antioxidant and antimicrobial potentials of different sea buckthorn organs, which were correlated to the presence of flavonoids and proanthocyanidins has been demonstrated. The CPC-HPLC-UV-MS technique was also applied to the fractionation and the partial identification of compounds extracted from sea buckthorn root.

Key words: Sea buckthorn, Microwave assisted extraction, CPC, HPLC-MS, Antioxidant, Antimicrobial



Institut de Chimie Organique et Analytique
Université d'Orléans, CNRS UMR 6005, BP 67059, rue de
Chartres, 45067 Orléans Cedex 2, France

