



HAL
open science

Contribution à l'étude phytochimique de *Solidago virgaurea*: application dans le domaine bucco-dentaire et étude de la variabilité phytochimique pour la création d'une filière

Lise Laurençon

► **To cite this version:**

Lise Laurençon. Contribution à l'étude phytochimique de *Solidago virgaurea*: application dans le domaine bucco-dentaire et étude de la variabilité phytochimique pour la création d'une filière. Autre. Université Nice Sophia Antipolis, 2013. Français. NNT : 2013NICE4018 . tel-01141427

HAL Id: tel-01141427

<https://theses.hal.science/tel-01141427>

Submitted on 13 Apr 2015

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

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

UNIVERSITE NICE SOPHIA ANTIPOLIS
UFR SCIENCES

Ecole Doctorale Sciences Fondamentales et Appliquées
INSTITUT DE CHIMIE DE NICE

THESE

Présentée pour obtenir le titre de

Docteur en Sciences
de l'Université Nice Sophia Antipolis

Discipline : Chimie

par

Lise LAURENÇON

**Contribution à l'étude phytochimique de *Solidago virgaurea*
Application dans le domaine bucco-dentaire et étude de la variabilité
phytochimique pour la création d'une filière**

Soutenue publiquement le 12 avril 2013 devant le jury composé de :

Cécile BADET <i>Rapporteur</i>	Maître de Conférences HDR Praticien hospitalier - <i>Université Bordeaux Segalen</i>
Marc LITAUDON <i>Rapporteur</i>	Ingénieur de recherche HDR - <i>Institut de Chimie des Substances Naturelles</i>
Gaëtan HERBETTE <i>Examineur</i>	Ingénieur de recherche - <i>Spectropole Aix-Marseille Université</i>
Robert KISS <i>Examineur</i>	Professeur - <i>Université Libre de Bruxelles</i>
Olivier THOMAS <i>Examineur</i>	Professeur - <i>Université Nice Sophia Antipolis</i>
Xavier FERNANDEZ <i>Directeur de Thèse</i>	Professeur - <i>Université Nice Sophia Antipolis</i>
Isabelle PRECHEUR <i>Co-directrice de Thèse</i>	Professeur Praticien hospitalier - <i>Université Nice Sophia Antipolis</i>

A mes parents,

A Emilie et Marianne,

A Nicolas



REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement l'ensemble des personnes qui ont participé à l'élaboration de cette Thèse et avec qui j'ai pu échanger au cours de ces trois années passionnantes et extrêmement enrichissantes.

J'adresse tout particulièrement ma profonde reconnaissance à mon directeur de Thèse Xavier Fernandez, pour m'avoir accordé sa confiance pour la réalisation de ces travaux de Thèse, mais également pour sa bienveillance, sa patience, ses précieux conseils et pour toutes ses qualités d'encadrant.

Un grand merci également à ma co-directrice Isabelle Prêcheur, pour son accueil chaleureux au sein du Laboratoire Santé Buccale et Vieillessement, pour sa gentillesse et son aide en microbiologie.

J'exprime toute ma gratitude au Docteur Cécile Badet de l'Université de Bordeaux Segalen et à Marc Litaudon de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette, pour avoir accepté de juger ces travaux de Thèse.

Je remercie chaleureusement le Professeur Robert Kiss de l'Université Libre de Bruxelles pour avoir accepté d'être examinateur et avec qui j'ai pu collaborer et échanger de manière tout à fait passionnante et sympathique à la suite de notre rencontre au Young Scientists Meeting, à Kolymvari en Crète.

Je remercie également le Professeur Olivier Thomas de l'Institut de Chimie de Nice pour avoir accepté d'examiner ce travail, mais également pour sa sympathie et ses conseils enrichissants.

J'adresse enfin mes remerciements à Gaëtan Herbette du Spectropole de Marseille pour avoir accepté d'être examinateur et pour sa précieuse aide en RMN, sa disponibilité et sa bonne humeur.

Je n'oublie bien évidemment pas le Conseil Général des Alpes-Maritimes et l'Université Nice Sophia Antipolis qui ont financé ces travaux de thèse, ainsi que l'ensemble des membres du comité de pilotage « Développement des plantes de la Tinée » et en particulier Marie-Pascale Morgades et Muriel Pastor du Conseil Général, Katia Diadema et François Boillot du Conservatoire Botanique National Méditerranéen, Philippe Fenin de Green Objects et Jean-Louis Polidori pour l'identification des plantes. Un merci tout particulier à l'association Biophyto de Jean-Paul Gherardi, pour l'approvisionnement gracieux des différentes populations de plantes, mais aussi pour sa grande implication dans le projet et pour les randonnées et déjeuners en montagne, toujours agréables et enrichissants.

Je tiens aussi à remercier vivement les différentes personnes qui ont pu m'aider pendant ces trois années et en particulier Elise Sarrazin, pour m'avoir encadré et pour son aide et ses conseils, notamment lors de la relecture du manuscrit, ainsi que Marlène Chevalier, pour son aide en microbiologie, Jérôme Golebiowski pour avoir effectué la modélisation moléculaire, Bouchaib Khadari pour avoir réalisé l'étude de génétique des populations.

Un grand merci également à Rémi Laville (eh oui *maman* ne t'oublie pas...), Mohamed Mehiri et Jean-Jacques Filippi pour leur complicité et leurs conseils distillés tout au long de ces trois années.

J'ai bien sûr une pensée particulière pour Céline, Bastien, Flo, Audrey, les Claires (« *Fauve* » et « 2 »), Alex, Tiên, Emilie..., les étudiants, devenus amis, aux côtés desquels j'ai pu évoluer, ainsi que tous les stagiaires. Merci à tous pour tous ces bons moments passés en votre compagnie, pour tous nos fous rires, nos délires et pour votre soutien.

Pour finir, je ne remercierai jamais assez mes proches et en particulier mes parents et mes sœurs, qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans mes choix, et Nico pour tout ce qu'il a pu m'apporter et tous ces merveilleux moments partagés à ses côtés.

ABREVIATIONS ET SYMBOLES UTILISES

- [α]_D*** Pouvoir rotatoire spécifique
- δ*** Déplacement chimique
- λ_{max}*** Longueur d'onde d'absorption maximum
- ACP*** Analyse en Composantes Principales
- ANOVA*** Analyse de la variance (*ANalysis Of VAriance*)
- Api*** D-apiose
- Ara*** L-arabinose
- CAH*** Classification Ascendante Hiérarchique
- CCM*** Chromatographie sur Couche Mince
- COSY*** Séquence RMN (*COrelated SpectroscopY*)
- DAD*** Détecteur à barrette de diode (*Diode Array Detector*)
- ELSD*** Détecteur évaporatif à diffusion de lumière (*Evaporative Light Scattering Detector*)
- ESI-MS*** Spectrométrie de masse en mode ionisation par électrospray (*ElectroSpray Ionization-Mass Spectrometry*)
- FID*** Détecteur à ionisation de flamme (*Flame Ionization Detector*)
- Fuc*** D-fucose
- GC*** Chromatographie en phase gazeuse (*Gas Chromatography*)
- Glc*** D-glucose
- HSQC*** Séquence RMN (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*)
- HMBC*** Séquence RMN (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*)
- 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*)
- IgA*** Immunoglobuline A

- MS** Spectrométrie/spectromètre de masse (*Mass Spectrometry/Spectrometer*)
- NOESY** Séquence RMN (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*)
- PDMS** Polydiméthylsiloxane
- ppm** Partie par million
- QTOF** Quadropole - détecteur de masse à temps de vol (*Quadropole Time-Of-Flight*)
- Rha** L-rhamnose
- RMN** Résonance Magnétique Nucléaire
- ROESY** Séquence RMN (*Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy*)
- THF** Tétrahydrofurane
- TMSI** Triméthylsilylimidazole
- TOCSY** Séquence RMN (*TOTAL Correlation Spectroscopy*)
- t_R** Temps de Rétention
- UV** UltraViolet
- Xyl** D-xylose

GLOSSAIRE BOTANIQUE



Ascendant - étalé à la base, puis redressé.

Basilaire - situé à la base de la tige.

Bractée - petite feuille accompagnant les pédoncules ou les fleurs, et différant des autres feuilles par sa forme ou sa couleur.

Calice - enveloppe extérieure de la fleur, formée de sépales libres ou soudés.

Capitule - inflorescence à fleurs sessiles ou subsessiles et serrées en tête sur un réceptacle commun, simulant une seule fleur (caractéristique des Astéracées).

Caulinaire - qui tient à la tige.

Corolle - deuxième enveloppe de la fleur, située entre le calice et les étamines, formée par l'ensemble des pétales, libres ou soudés.

Endémisme - localisation d'une espèce spécifiquement dans une région.

Glabre - dépourvu de pilosité.

Involucre - réunion de bractées, verticillées ou imbriquées, insérées à la base d'une inflorescence.

Lancéolé - en forme de fer de lance, atténué aux deux bouts, plus longuement au sommet.

Ligule - appendice membraneux apparaissant à la jonction du limbe et de la gaine des feuilles ou des fleurs.

Ligulé - en forme de languette. Chez les Astéracées, petite fleur possédant une ligule, située à la périphérie du capitule ou partout sur celui-ci.

Limbe - partie élargie d'une feuille ou d'un pétale.

Obovale - en ovale dont la plus grande largeur est en haut.

Panicule - inflorescence dans laquelle les axes secondaires, plus ou moins ramifiés, vont en décroissant de la base au sommet.

Pédoncule - support d'une ou plusieurs fleurs.

Pétiolé - muni d'un pétiole (support ou queue de la feuille), par opposition à sessile.

Pubérulent - faiblement et brièvement pubescent.

Pubescent - garni de poils fins, mous, courts et peu serrés.

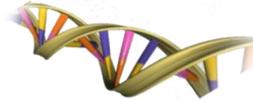
Sessile - dépourvu de support, de pétiole, de pédoncule.

Tubulé - en forme de tube, c'est-à-dire la partie cylindrique d'une corolle ou d'un calice, formée par des éléments soudés.

Vasculaire (plante) - se caractérise par la présence de vaisseaux (xylème et phloème) assurant la circulation de la sève.

Verticillées - feuilles qui sont insérées par plusieurs à la même hauteur.

GLOSSAIRE MEDICAL ET BIOLOGIQUE



Aérobiose - mode de vie exigeant ou tolérant la présence d'oxygène.

Anaérobiose - mode de vie exigeant ou tolérant l'absence d'oxygène.

Apoptose - processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal (mort cellulaire programmée).

Biofilm - communauté plus ou moins complexe et symbiotique de micro-organismes (bactéries, champignons, algues ou protozoaires), adhérant entre eux et à une surface, et marquée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice.

Cytostatique - substance capable de bloquer la multiplication cellulaire.

Cytotoxique - substance capable de détruire les cellules.

Flore commensale - ensemble complexe de micro-organismes qui colonisent un organisme (l'être humain par exemple) sans provoquer de maladies dans des conditions normales.

Gougerot-Sjögren (syndrome de) - maladie auto-immune systémique caractérisée par une atteinte des glandes exocrines, en particulier des glandes lacrymales et salivaires.

Hyphe - cellule unique en forme de filament plus ou moins ramifié, cloisonné ou non.

Hyposialie - diminution de la fabrication de salive par les glandes salivaires.

Nématode - ver rond, non segmenté, pouvant être libre ou parasite des animaux et des végétaux.

Parodontopathies - ensemble des affections du parodonte, c'est-à-dire des tissus de soutien de l'organe dentaire : la gencive, le cément, le ligament alvéolo-dentaire et l'os alvéolaire.

Protozoaire - organisme unicellulaire eucaryote hétérotrophe qui ingère sa nourriture par phagocytose.

Vulnérable - désigne de manière générale ce qui est propre à la guérison des plaies ou des blessures.

Xérostomie - sécheresse excessive de la bouche.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	V
ABREVIATIONS ET SYMBOLES UTILISES	VII
GLOSSAIRE BOTANIQUE	IX
GLOSSAIRE MEDICAL ET BIOLOGIQUE	X
SOMMAIRE	XI
INTRODUCTION GENERALE	1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE **5**

CHAPITRE I - PROTECTION ET VALORISATION DE LA BIODIVERSITE VEGETALE DES ALPES-MARITIMES	7
I.1. LE CONCEPT DE HOTSPOT : UN PEU D'HISTOIRE...	7
I.2. LES ALPES-MARITIMES : UN HOTSPOT REGIONAL	8
I.3. POURQUOI PROTEGER LA BIODIVERSITE ?	9
I.4. LA RECHERCHE DE NOUVEAUX ACTIFS NATURELS	10
I.5. LES APPLICATIONS POSSIBLES	11
I.6. LE DEVELOPPEMENT D'UNE FILIERE	12
I.7. LES OBJECTIFS DE CETTE THESE	12
CHAPITRE II - PATHOLOGIES INFECTIEUSES – CAS PARTICULIER DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>	13
II.1. INTRODUCTION	13
II.2. LA FLORE MICROBIENNE	13
II.3. LES PATHOLOGIES INFECTIEUSES	14
II.4. DESCRIPTION DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>	15
II.4.1. Morphologie	15
II.4.2. Métabolisme	15
II.4.3. Facteurs de virulence	16
II.4.4. Facteurs de l'hôte favorisant l'infection	17
II.5. TRAITEMENTS ACTUELS	19
II.6. PHENOMENES DE RESISTANCE ET RECHERCHE DE NOUVEAUX ANTIFONGIQUES	20
CHAPITRE III - DESCRIPTION DE <i>SOLIDAGO VIRGAUREA</i>	21
III.1. INTRODUCTION	21
III.2. TAXONOMIE	23
III.3. CAS PARTICULIER DE <i>S. VIRGAUREA VIRGAUREA</i>	24
III.3.1. Description botanique et répartition géographique	24
III.3.2. Utilisations traditionnelles	26
III.3.3. Chimiodiversité	27
III.4. CAS PARTICULIER DE <i>S. VIRGAUREA ALPESTRIS</i>	38

III.4.1. Description botanique et répartition géographique	38
III.4.2. Chimiodiversité	38
III.5. COMPARAISON AVEC LES AUTRES ESPECES DU GENRE <i>SOLIDAGO</i>	39
CHAPITRE IV - LA CLASSE DES SAPONINES : GENERALITES	43
IV.1. INTRODUCTION	43
IV.2. STRUCTURE DES SAPONINES	44
IV.2.1. Structure des génines	44
IV.2.2. Structure des sucres	45
IV.3. BIOSYNTHESE	47
IV.3.1. Biosynthèse des génines	47
IV.3.2. Biosynthèse des sucres et glycosylation des génines	52
IV.4. DISTRIBUTION DES SAPONINES	53
IV.4.1. les saponines à génine triterpénique	53
IV.4.2. Les saponines à génine stéroïdique	53
IV.5. ROLE DES SAPONINES DANS LES PLANTES	53
IV.6. PROPRIETES BIOLOGIQUES	54
IV.6.1. Hémolysé/Perméabilisation membranaire	54
IV.6.2. Cytotoxicité envers les cellules cancéreuses	56
IV.6.3. Activités antifongique et antibactérienne	56
IV.6.4. Activité antivirale	56
IV.6.5. Activité molluscicide	57
IV.6.6. Antiparasitaire	57
IV.7. EXTRACTION, IDENTIFICATION ET DOSAGE DES SAPONINES	57
IV.7.1. Extraction	57
IV.7.2. Séparation et isolement	58
IV.7.3. Caractérisation	58
IV.7.4. Le dosage	60
IV.8. APPLICATIONS DANS L'INDUSTRIE	60
CHAPITRE V - L'ETUDE DES PRODUITS NATURELS	61
V.1. CHOIX DES PLANTES	61
V.2. TECHNIQUES D'EXTRACTION	61
V.2.1. Cas particulier de la macération assistée par ultrasons	62
V.2.2. Cas particulier de l'extraction par CO ₂ supercritique	63
V.3. TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT ET D'ISOLEMENT	64
V.3.1. Cas particulier de la chromatographie sous vide	64
V.3.2. Cas particulier de l'HPLC préparative	65
V.4. STRATEGIES POUR LA DECOUVERTE D'ACTIFS	66
V.5. TECHNIQUES D'ANALYSE	68
V.5.1. L'HPLC	68

V.5.2. L'HPTLC	72
V.5.3. La chromatographie en phase gazeuse	74
V.6. TECHNIQUES DE CARACTERISATION	75
V.6.1. La résonance magnétique nucléaire	75
V.6.2. Le pouvoir rotatoire	76

TRAVAUX REALISES **79**

CHAPITRE I - CARACTERISATION PHYTOCHIMIQUE DE *S. VIRGAUREA ALPESTRIS* : APPLICATION

BUCCO-DENTAIRE	81
I.1. INTRODUCTION	81
I.2. EXTRACTION	82
I.3. ACTIVITE MICROBIOLOGIQUE DE L'EXTRAIT	83
I.4. FRACTIONNEMENT	85
I.5. ACTIVITE MICROBIOLOGIQUE DES FRACTIONS	86
I.6. ISOLEMENT	87
I.7. IDENTIFICATION	88
I.7.1. Composé <i>S1</i>	89
I.7.2. Composé <i>S2</i>	100
I.7.3. Composé <i>S7</i>	103
I.7.4. Composé <i>S8</i>	111
I.7.5. Composé <i>S9</i>	117
I.7.6. Composés <i>S3, S4, S5, S6, S10</i> et <i>S11</i>	121
I.8. ACTIVITE MICROBIOLOGIQUE DES COMPOSES PURIFIES	126
I.9. CONCLUSION	129

CHAPITRE II - ETUDE DE LA VARIABILITE PHYTOCHIMIQUE DE *S. VIRGAUREA* **131**

II.1. INTRODUCTION	131
II.2. OPTIMISATION DE L'EXTRAIT	132
II.3. SELECTION DES POPULATIONS A ETUDIER	133
II.4. MISE EN PLACE D'UNE METHODE DE DOSAGE DES SAPONINES TOTALES PAR HPLC-ELSD	135
II.5. ETUDE DE LA VARIABILITE DE <i>S. VIRGAUREA</i> PAR DOSAGE DES SAPONINES TOTALES PAR HPLC-ELSD	139
II.5.1. Localisation des actifs au sein de la plante	141
II.5.2. Influence de la période de récolte	142
II.5.3. Influence du mode de conservation	143
II.5.4. Variabilité selon la sous-espèce et sa localisation géographique	144
II.5.5. Influence de l'année de récolte	145
II.5.6. Comparaison avec un échantillon commercial	146
II.5.7. Etude d'acclimatation	147

II.6. MISE EN PLACE D'UNE METHODE DE DOSAGE DES SAPONINES TOTALES PAR HPTLC	151
II.7. COMPARAISON DES DEUX METHODES	160
II.8. MISE EN PLACE D'UNE METHODE DE DOSAGE DES SAPONINES MAJORITAIRES PAR HPLC-ELSD	166
II.9. ETUDE DE LA VARIABILITE DE <i>S. VIRGAUREA</i> PAR DOSAGE DES SAPONINES MAJORITAIRES	170
II.9.1. Sélection des saponines à doser	170
II.9.2. Analyse des résultats	171
II.10. CONCLUSION	195
CHAPITRE III - CARACTERISATION PHYTOCHIMIQUE DE <i>S. VIRGAUREA ALPESTRIS</i> :	
VALORISATION DANS LE DOMAINE PHARMACEUTIQUE ET COSMETIQUE	197
III.1. INTRODUCTION	197
III.2. ETUDE DES COMPOSES HYDROPHILES	198
III.2.1. Extraction	198
III.2.2. Tests biologiques préliminaires	198
III.2.3. Fractionnement	201
III.2.4. Tests biologiques des fractions	202
III.2.5. Etude de la fraction F0	204
III.2.6. Isolement et identification des composés de la fraction F1	205
III.2.7. Isolement et identification des composés de la fraction F2	216
III.2.8. Etude des fractions F3 et F4	219
III.3. ETUDE DES COMPOSES HYDROPHOBES	221
III.3.1. L'extrait au dichlorométhane	221
III.3.2. L'extrait au CO ₂ supercritique	232
III.4. CONCLUSION	237
CONCLUSION GENERALE	239
<u>PARTIE EXPERIMENTALE</u>	<u>243</u>
CHAPITRE I - MATIERES PREMIERES NATURELLES UTILISEES	245
CHAPITRE II - REACTIFS ET SOLVANTS	249
CHAPITRE III - APPAREILLAGE	249
III.1. HPLC-UV-ELSD	249
III.2. HPTLC	250
III.3. HRMS	250
III.4. GC-MS	251
III.5. RMN	251
III.6. POUVOIR ROTATOIRE	251
CHAPITRE IV - CONDITIONS OPERATOIRES	252
IV.1. CARACTERISATION PHYTOCHIMIQUE DE <i>S. VIRGAUREA</i> : ETUDE DES SAPONINES	252

IV.1.1. Extraction	252
IV.1.2. Fractionnement	253
IV.1.3. Isolement	254
IV.1.4. Caractérisation	255
IV.1.5. Configuration absolue des sucres	304
IV.1.6. Tests biologiques	305
IV.1.7. Etude statistique	306
IV.1.8. Modélisation moléculaire	306
IV.1.9. Génétique des populations	306
IV.2. ETUDE DE LA VARIABILITE CHIMIQUE DE <i>S. VIRGAUREA</i>	306
IV.2.1. Optimisation de l'extrait	306
IV.2.2. Technique de dosage des saponines totales par HPLC-ELSD	307
IV.2.3. Technique de dosage des saponines totales par HPTLC	307
IV.2.4. Technique de dosage des saponines majoritaires par HPLC-ELSD	308
IV.2.5. Etude statistique	309
IV.3. CARACTERISATION PHYTOCHIMIQUE DE <i>S. VIRGAUREA</i> : ETUDE GLOBALE	309
IV.3.1. Etude des composés hydrophiles	309
IV.3.2. Etude des composés hydrophobes	327
IV.3.3. Tests biologiques	330

ANNEXES **331**

ANNEXE 1 - ENSEMBLE DES CLERODANES IDENTIFIES CHEZ <i>S. VIRGAUREA</i>	333
ANNEXE 2 - ENSEMBLE DES SAPONINES IDENTIFIEES CHEZ <i>S. VIRGAUREA</i>	334
ANNEXE 3 - DOSAGE DES SAPONINES TOTALES PAR HPLC-ELSD	336
QUANTITE DE SAPONINES TOTALES DANS LES DIFFERENTS EXTRAITS BRUTS	336
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	337
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	355

INTRODUCTION GENERALE

Les produits naturels ont toujours été utilisés par l'Homme et représentaient la majorité de la pharmacopée jusqu'à l'avènement de la synthèse organique, au début du XX^e siècle. Mais l'apparition de la robotique, de la chimie combinatoire et du criblage haut-débit a largement réduit l'utilisation des produits naturels. Cependant, malgré la prédominance de la synthèse organique, les actifs issus des produits naturels représentent encore aujourd'hui entre 25 et 50 % des médicaments sur le marché.¹

La Nature représente en effet une source inépuisable de nouvelles structures, grâce à une précieuse biodiversité végétale, animale et microbienne. Mais cette richesse n'est pas répartie de manière homogène sur Terre. Certaines zones, nommées *hotspots*, ont été définies pour leur exceptionnelle biodiversité particulièrement menacée d'extinction par les impacts anthropiques. Le pourtour méditerranéen en particulier, fait partie des 34 *hotspots* actuels et au sein même de la région méditerranéenne, les Alpes-Maritimes se caractérisent par une richesse et un endémisme* végétal particulièrement élevé.

La biodiversité des Alpes-Maritimes et plus généralement de la région Provence-Alpes-Côte-d'Azur reste cependant relativement peu étudiée et peu valorisée. Ces travaux de Thèse s'inscrivent ainsi dans un projet visant à valoriser la biodiversité végétale régionale, dans des domaines tels que la pharmacutique ou la cosmétique.

En effet, les besoins en nouveaux actifs sont toujours de plus en plus importants. Le vieillissement de la population, les phénomènes de résistance aux antibiotiques et la recrudescence de maladies lourdes représentent un véritable problème de santé publique. Cependant, la sur-médicamentation entraîne également des effets néfastes. Des maladies opportunistes font ainsi leur apparition chez des patients déjà affaiblis, se traduisant par différentes pathologies et en particulier bucco-dentaires. Par exemple, une sécheresse buccale due à la prise de certains médicaments entraîne un déséquilibre de la flore commensale,* ce qui peut entraîner, entre autre, l'apparition de candidoses, une malnutrition et une aggravation de l'état général.

Dans le cadre de la lutte contre ces pathologies bucco-dentaires, une plante commune dans les Alpes-Maritimes, *Solidago virgaurea*, s'est montrée particulièrement prometteuse pour la réalisation d'un traitement ciblé contre *Candida albicans*, micro-organisme responsable des infections de type candidose. *S. virgaurea* est couramment utilisée en médecine traditionnelle comme diurétique, anti-inflammatoire ou encore cicatrisant et aucune toxicité n'a été détectée. Par ailleurs, les études phytochimiques réalisées sur cette plante ont mis en évidence plusieurs familles de métabolites secondaires comme des acides phénoliques, des flavonoïdes, des

terpénoïdes et en particulier des saponines. De plus, diverses activités biologiques ont été mises en évidence comme des potentiels antimicrobiens ou antioxydants.

Deux sous-espèces ont ainsi été sélectionnées pour une étude préliminaire, la sous-espèce principale *virgaurea*, courante en Europe et en Asie principalement, et la sous-espèce *alpestris*, endémique des Alpes et de certaines montagnes européennes. Les extraits bruts aqueux de ces deux sous-espèces ont été testés sur *C. albicans* et ont montré une activité inhibitrice de la conversion levure-hyphe* de ce champignon sans inhiber sa croissance ni celle des autres micro-organismes endogènes de la muqueuse buccale. La formation d'hyphes étant un des facteurs clés de virulence de ce micro-organisme, ce type d'activité serait particulièrement adapté pour un traitement spécifique, ciblant uniquement la forme agressive de *C. albicans* sans déséquilibrer la flore commensale.* Les résultats de ces travaux ont donné lieu à un brevet² et un traitement bucco-dentaire contenant les extraits aqueux des deux sous-espèces est actuellement en développement.

L'objectif de cette thèse a été, dans un premier temps, de rationaliser l'activité de l'extrait aqueux de *S. virgaurea* en identifiant les actifs responsables de son activité inhibitrice singulière envers la conversion levure-hyphe de *C. albicans*, grâce à une approche bioguidée.

De plus, dans un désir de valorisation « durable », la mise en place d'une filière dans les Alpes-Maritimes a été initiée, afin de contrôler les cueillettes et mettre la plante en culture, en impactant le moins possible sur les écosystèmes et en maîtrisant la qualité des matières premières. Le second objectif de cette thèse était ainsi d'étudier la variabilité phytochimique de *S. virgaurea* selon différents paramètres, comme la localisation, l'année, la période de récolte, le mode de stockage, l'organe de la plante choisi ou encore le bouturage, afin d'avoir une meilleure connaissance du comportement des actifs de la plante.

Enfin le dernier objectif était une étude plus générale de la composition et des activités de cette plante dans le but de la valoriser dans d'autres domaines et ainsi de favoriser la mise en culture et la mise en place de la filière.

Ce mémoire de thèse s'articulera en trois grandes parties, une étude bibliographique, une présentation des travaux réalisés et une partie expérimentale. L'étude bibliographique présentera tout d'abord des généralités sur la protection et la valorisation de la biodiversité, puis abordera le thème des pathologies infectieuses avec le cas particulier de *C. albicans*. Elle présentera ensuite les deux sous-espèces de *S. virgaurea* d'un point de vue botanique et phytochimique et enfin exposera des généralités sur la classe des saponines. La présentation des travaux réalisés a été quant à elle construite en trois parties, chacune tentant de répondre aux trois objectifs de cette thèse. La première partie exposera les résultats du fractionnement

bioguidé et de la caractérisation des actifs de la sous-espèce *alpestris*, qui n'a encore jamais été étudiée. La deuxième partie présentera l'étude de la variabilité des actifs de *S. virgaurea* selon divers facteurs, réalisée grâce à différentes méthodes de dosage, par HPLC-ELSD et HPTLC. La troisième partie visera à valoriser la plante dans différents domaines tels que la pharmaceutique et la cosmétique. Elle présentera ainsi la composition phytochimique et le screening biologique d'extraits de polarités différentes. Enfin la partie expérimentale exposera l'ensemble des protocoles utilisés lors de ces travaux.



ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I - PROTECTION ET VALORISATION DE LA BIODIVERSITE VEGETALE DES ALPES-MARITIMES

I.1. LE CONCEPT DE HOTSPOT : UN PEU D'HISTOIRE...

Le concept de *hotspot* a été initié par l'écologiste britannique Norman Myers au milieu des années 1980, époque à laquelle les chercheurs ont pris conscience de l'accélération du processus d'extinction de certaines espèces liée aux activités anthropiques.^{3,4}

Norman Myers voulait répondre à l'urgence écologique en identifiant des zones prioritaires à conserver pour leur biodiversité. En 1988, il identifia tout d'abord dix forêts tropicales caractérisées par un exceptionnel taux d'endémisme mais aussi par une grave perte de surface de l'habitat. En 1990, Myers ajouta huit *hotspots*, dont quatre écosystèmes de type méditerranéen.³

En 1989, l'ONG *Conservation International* adopta ce concept et en fit le fondement de son action. Jusqu'en 1999, l'organisation entreprit plusieurs réévaluations du concept et a en particulier introduit des seuils quantitatifs pour la désignation des *hotspots* de biodiversité : *pour être qualifiée de hotspot, une région doit répondre à deux critères stricts, la zone géographique doit comprendre au moins 1500 espèces de plantes vasculaires endémiques (soit 0,5 % des espèces présentes sur la Terre) et elle doit avoir subi une perte d'au moins 70 % de son habitat d'origine.*⁴

L'intérêt de cette priorisation a été amplifié par l'adoption de la Convention sur la Diversité Biologique lors de la conférence de Rio en 1992, puisqu'elle engagea les 189 pays membres dans la conservation de la biodiversité.

Ces dernières années, le nombre de *hotspots* et la surface de ceux-ci ont de nouveau été réévalués pour arriver actuellement à un total de 34 *hotspots*, couvrant seulement 2,3 % de la surface de la Terre alors que plus de 50 % des espèces de plantes vasculaires du monde sont endémiques de ces zones (Figure 1).

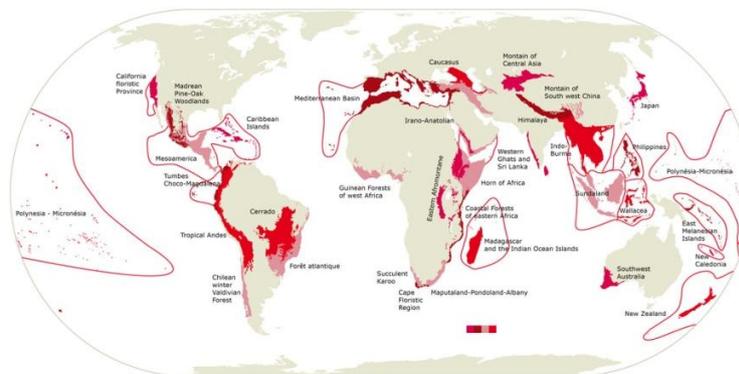


FIGURE 1 - REPARTITION DES 34 HOTSPOTS IDENTIFIEES PAR CONSERVATION INTERNATIONAL

Le concept de *hotspot* est donc un outil pour les organismes mondiaux impliqués dans le financement de la conservation de la biodiversité. Leur identification permet de préserver les espèces et les territoires les plus menacés, de diminuer l'action de l'homme sur ces territoires pour stopper les extinctions d'espèces, de créer un outil de communication pour faire prendre conscience du défi actuel concernant la biodiversité et enfin de trouver des financements.

I.2. LES ALPES-MARITIMES : UN HOTSPOT REGIONAL

Le Bassin Méditerranéen a été identifié comme l'un des 34 *hotspots* de biodiversité, il s'étend d'Ouest en Est du Portugal à la Jordanie, et du Nord au Sud de l'Italie au Maroc. Ce *hotspot* s'étale sur plus de 2 millions de kilomètres carrés (2 085 292 km²), il inclut également l'Espagne, la France, les pays des Balkans, la Grèce, la Turquie, la Syrie, le Liban, l'Israël, l'Egypte, la Libye, la Tunisie et l'Algérie. Il comporte également près de 5000 îles (Açores, Canaries, Madère, Cap Vert...).⁵

Estimée à 25 000 espèces ou 30 000 espèces et sous-espèces, la richesse floristique de la région méditerranéenne équivaut à environ 10 % des végétaux supérieurs du globe présents sur seulement 1,6 % de la surface terrestre.⁶

Au sein de cette région, 10 points chauds régionaux ont été définis (Figure 2) : les îles Canaries et Madère, les hautes et moyennes montagnes de l'Atlas, les Cordillères Bétiques (Espagne), les Alpes-Maritimes et Ligures, les îles Tyrrhéniennes, la Grèce centrale et du sud, la Crète, le sud de l'Anatolie et Chypre, la région de Syrie-Liban-Israël et la côte de Cyrénaïque.³

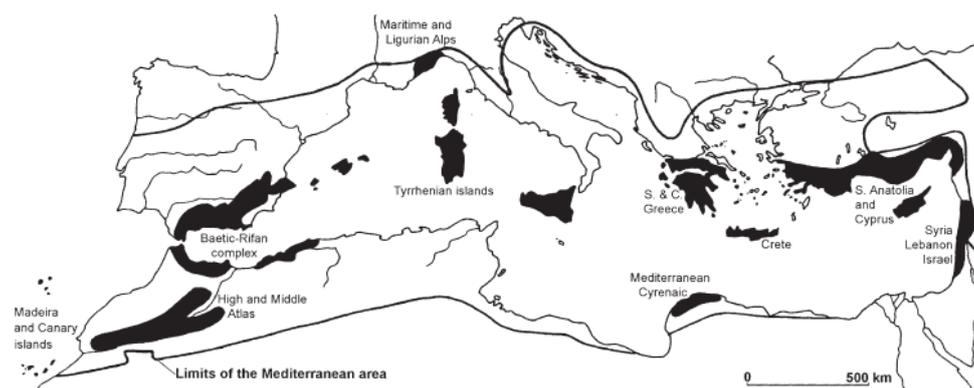


FIGURE 2 - LES DIX HOTSPOTS REGIONAUX DU BASSIN MEDITERRANEEN

En tant que *hotspot* régional méditerranéen, les Alpes-Maritimes se caractérisent par une richesse floristique égale à environ 2870 espèces et sous-espèces de végétaux vasculaires et un endémisme élevé pour un secteur continental puisque 108 espèces endémiques sont présentes sur une superficie de 4500 km.^{2,6}

Cela s'explique par une topographie morcelée, avec des milieux très hétérogènes sur le plan géologique et pédologique, des variations climatiques très contrastées sur de courtes distances, mais aussi par l'existence de nombreux refuges des périodes glaciaires. La diversité floristique des différents secteurs se traduit également par la coexistence d'éléments floristiques d'origines biogéographiques variées, les Alpes-Maritimes représentent en effet un carrefour phytogéographique principal entre les influences de Méditerranée orientale et occidentale d'une part, et entre les Alpes et la Méditerranée d'autre part.

Cependant, sur le plan anthropique, les Alpes-Maritimes sont un territoire très menacé et déséquilibré. Le climat doux et la proximité de la mer ont entraîné un surpeuplement des zones littorales et à l'inverse un abandon des zones cultivables et un dépeuplement de l'arrière-pays montagneux, difficile d'accès et possédant un climat plus rude. La région s'est alors peu à peu tournée vers le tourisme en abandonnant l'agriculture. Ainsi, les zones littorales possèdent actuellement 95 % de la population des Alpes-Maritimes et reçoivent chaque année 8 millions de visiteurs, ce qui représente 1,5 % du tourisme mondial. Cette évolution a entraîné l'apparition de nombreuses constructions, toujours plus étendues vers le moyen pays.⁶ Cette urbanisation met ainsi en danger la végétation, en particulier de nombreuses espèces endémiques de cette région.

En revanche, le classement des Alpes-Maritimes en tant que *hotspot* régional a entraîné une prise de conscience des problèmes environnementaux et a permis la mise en place d'actions de connaissance et de conservation de la flore indigène à l'échelle régionale. Le Parc National du Mercantour et le Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles, créés en 1979, multiplient ainsi les actions. Par exemple, la réalisation du plus grand inventaire de la flore et de la faune d'Europe a débuté en 2007 dans le parc national du Mercantour. De plus, l'inventaire de la flore et des habitats naturels et semi-naturels a été réalisé dans toute la zone du conservatoire, ainsi que de nombreuses actions de communication pour la sensibilisation de la population, comme la création de jardins/sentiers botaniques ou encore de sites internet et de livres.

1.3. POURQUOI PROTÉGER LA BIODIVERSITÉ ?

La préservation de la biodiversité est essentielle à plusieurs niveaux. D'une part, maintenir une biodiversité élevée est indispensable au bon fonctionnement des écosystèmes (chaîne alimentaire, parasitisme, pollinisation...), au maintien de la qualité de l'air, de l'eau et des climats et plus généralement au maintien de l'équilibre et de la vie terrestre.

D'autre part, la biodiversité est importante pour la qualité de notre vie quotidienne, d'un point de vue socio-économique, alimentaire, mais aussi pharmaceutique. En effet, les produits naturels sont la source d'inspiration d'une grande partie de la pharmacopée actuelle. Suivant les estimations, 25 à 50 % des médicaments actuellement sur le marché doivent leur existence à la Nature. Dans le cas des agents anticancéreux et anti-infectieux, la proportion est encore plus importante, près de deux tiers sont en effet issus d'une matière active naturelle extraite du vivant.¹

La Nature représente en effet une source inépuisable de nouvelles structures potentiellement utilisables, grâce à une exceptionnelle biodiversité végétale, animale et microbienne.⁷ Une des conséquences de l'interaction de cette grande variété d'organismes entre eux et avec leur environnement est l'évolution de divers complexes chimiques naturels dans les organismes, afin d'augmenter leur compétitivité et leur taux de survie. Des millions de structures chimiques naturelles sont ainsi le fruit de la chimie combinatoire de la nature, fournissant une diversité chimique presque inimaginable et idéale pour interagir spécifiquement avec des cibles biologiques.

I.4. LA RECHERCHE DE NOUVEAUX ACTIFS NATURELS

La découverte de nouveaux actifs est laborieuse, des centaines de composés peuvent être évalués pour trouver un seul composé actif. De plus, ce n'est que la première étape, l'actif doit être stable, non toxique, adapté à la formulation désirée, et il doit être disponible en quantité suffisante (plante cultivable, actif synthétisable...). Ce sont ainsi des études longues et délicates, délaissées ces dernières décennies en raison de plusieurs inconvénients et d'une conjoncture peu favorable.

D'une part, les extraits naturels bruts, très complexes, sont peu compatibles avec le criblage « haute-performance » de l'industrie pharmaceutique qui utilise des tests très spécifiques, ils peuvent entraîner de faux positifs ou au contraire de faux négatifs.¹ De plus, même si un extrait brut est sélectionné, l'approche du fractionnement bioguidé, utilisée classiquement en recherche en chimie des produits naturels, s'avère beaucoup trop longue et trop coûteuse pour l'Industrie pharmaceutique. D'autre part, l'avènement de la chimie combinatoire, même si très peu d'actifs ont été découverts par cette méthodologie, a évincé le screening des produits naturels. D'autres problèmes techniques ont pu également rentrer en ligne de compte comme la variabilité du matériel végétal, la difficulté d'approvisionnement, la difficulté d'isolement des actifs, ou la possibilité de trouver des actifs déjà connus.

Cependant, les nouvelles méthodes et technologies auxquelles nous pouvons avoir accès de nos jours permettent de régler ou d'éviter un bon nombre de ces problèmes. Les techniques analytiques ont évolué, les investigations sont plus rapides, plus précises et permettent de détecter des composés à l'état de traces, ce qui entraîne la découverte de nouveaux composés, même dans des plantes déjà étudiées auparavant. C'est en partie ce qui explique le regain d'intérêt pour les actifs naturels de nos jours.

D'autre part, après l'omniprésence de la pétrochimie et de la synthèse organique au quotidien et les différents problèmes de santé publique récents, la conjoncture actuelle est à nouveau favorable au retour du naturel. Pour ne citer que quelques exemples, le chlordécone, un produit phytosanitaire organochloré non biodégradable s'est avéré neurotoxique, hépatotoxique, délétère pour la spermatogénèse et potentiellement cancérigène. Interdit en 1976 aux Etats-Unis, il n'a été interdit qu'en 1990 en France métropolitaine, et en 1993 aux Antilles françaises après avoir gravement pollué une grande partie des sols cultivables. Plus récemment, le benfluorex, le principe actif du Mediator[®], médicament indiqué dans le traitement du diabète de type II et prescrit aux patients désireux de perdre du poids, a été retiré du marché en 2009 après la mort de nombreux patients due à de graves problèmes cardiaques comme des valvulopathies. Ainsi s'est installé depuis quelques années un phénomène sociologique de rejet en masse des produits issus de la synthèse organique, les consommateurs sont maintenant très demandeurs d'actifs d'origine naturelle, qui peuvent paraître à leurs yeux moins agressifs, moins toxiques et dans une logique de retour aux sources.

I.5. LES APPLICATIONS POSSIBLES

Les applications les plus importantes pour la recherche et le développement d'actifs naturels sont les industries pharmaceutiques, cosmétiques, les nutraceutiques, l'agrochimie, les arômes et parfums...⁷ L'illustration la plus marquante est certainement celle du paclitaxel (Taxol[®]) découvert et identifié comme cytotoxique dans des extraits de *Taxus brevifolia* (If Américain) en 1971. Mais il existe de nombreux autres exemples d'utilisation des produits naturels dans notre quotidien. Le resvératrol en particulier, stilbène antioxydant contenu dans certaines plantes dont la vigne, rentre à présent dans la composition de cosmétiques. De plus de nombreuses plantes fournissent des huiles essentielles, concrètes et absolues utilisées en parfumerie.

I.6. LE DEVELOPPEMENT D'UNE FILIERE

L'utilisation des ressources naturelles pour la santé, le bien-être ou encore l'alimentation humaine ne doit pas se faire au détriment de la nature. A travers le monde, les pillages de plantes médicinales et/ou aromatiques, ou encore les destructions de forêts primaires pour laisser place à l'agriculture intensive ont définitivement éliminé de nombreuses espèces potentiellement utilisables par l'Homme. Cependant, la prise de conscience de ce problème a motivé la mise en place de nombreuses actions concrètes et règlementées. Des filières durables sont peu à peu mises en place, comme la replantation d'espèces utilisées (bois exotiques, plantes aromatiques et médicinales...), la rémunération des populations locales, la réhabilitation de forêts primaires, l'utilisation des biotechnologies...

I.7. LES OBJECTIFS DE CETTE THESE

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans une volonté de valorisation des plantes de la région Provence-Alpes-Côte-d'Azur dans différents domaines tels que la pharmaceutique, la cosmétique ou la parfumerie.

Le domaine de la santé bucco-dentaire étant particulièrement demandeur de nouveaux actifs, des plantes de la région potentiellement valorisables dans ce domaine ont été sélectionnées et une plante indigène s'est révélée intéressante.

Le premier objectif de cette thèse était donc de rationaliser l'activité de cette plante en identifiant les métabolites responsables de cette activité. De plus, dans l'optique de mettre un traitement sur le marché, le second objectif était une étude du comportement des actifs de la plante afin d'apporter le maximum d'éléments importants pour une mise en culture de la plante dans le département des Alpes-Maritimes. Enfin, le dernier objectif était une étude plus générale de la composition et des activités de cette plante dans le but de la valoriser dans d'autres domaines et de mettre en place une véritable filière durable.

CHAPITRE II - PATHOLOGIES INFECTIEUSES – CAS PARTICULIER DE *CANDIDA ALBICANS*

II.1. INTRODUCTION

Les maladies infectieuses, c'est-à-dire provoquées par un micro-organisme, représentent un problème majeur de santé publique. La plupart des micro-organismes pathogènes ont développé des mécanismes de résistance aux antibiotiques et aux antifongiques. De plus, l'utilisation d'antibiotiques entraîne souvent un déséquilibre au niveau de la flore naturellement présente dans le corps humain (flore commensale*) et ainsi une opportunité de colonisation pour d'autres agents pathogènes.

Cette situation complexe nécessite donc une approche différente, des traitements plus spécifiques et moins agressifs.

Dans le cas des problèmes de santé bucco-dentaire, des déséquilibres fréquents de la flore buccale sont observés depuis la recrudescence des maladies immunodéprimantes et/ou des traitements lourds (trithérapies, chimiothérapies, antibiothérapies...), ce qui entraîne des infections toujours plus difficiles à soigner.

Les traitements actuels pour les infections buccales comme les candidoses (bains de bouche, antifongiques) peuvent aggraver le déséquilibre de la flore buccale, chez des patients souvent déjà polymédicamentés. La mise au point d'actifs spécifiques contre *Candida albicans* est nécessaire, ciblant uniquement la forme pathogène et non la forme commensale ni les autres micro-organismes endogènes.

Dans ce chapitre, la flore microbienne chez l'être humain ainsi que l'apparition de pathologies infectieuses seront abordées, avant de détailler le cas particulier de *C. albicans*, l'une des principales causes d'infection chez l'être humain.

II.2. LA FLORE MICROBIENNE

Les micro-organismes (bactéries, champignons...) sont omniprésents dans le monde. Grâce à leur formidable capacité d'adaptation, ils ont réussi à coloniser les zones de la Terre les plus hostiles. De nombreuses espèces de micro-organismes se développent sur chaque plante, chaque animal et bien évidemment sur chaque être humain. Ils représentent la flore microbienne endogène commensale. Cette flore est présente sur chaque parcelle du corps humain en contact avec l'environnement extérieur, la peau, les yeux, la cavité orale et les systèmes respiratoire, urinaire, reproducteur et gastro-intestinal.⁸ Chaque être humain porte environ 1,25 kg de micro-organismes, ce qui représente environ 1500 taxons différents.

La flore commensale humaine est indispensable au maintien de la santé de chaque individu, en empêchant sa colonisation par des pathogènes extérieurs. C'est une barrière naturelle, qui permet également le bon développement et la nutrition de l'hôte, en neutralisant par exemple certains composés potentiellement toxiques de la nourriture. Cette flore fournit également 10 % des besoins en énergie de l'hôte, une gamme de vitamines et aide au bon fonctionnement de son système immunitaire et à l'intégrité de ses muqueuses.⁸

Cependant, même si cette flore est inoffensive et même bénéfique pour l'homme dans des conditions normales, elle peut également devenir pathogène dans certaines conditions.

II.3. LES PATHOLOGIES INFECTIEUSES

La flore commensale est inoffensive dans des conditions normales mais certains de ces micro-organismes peuvent infecter l'hôte lorsque le système immunitaire est altéré. La plupart des infections contractées sont en fait dues à la flore commensale, et non à des pathogènes extérieurs.⁸

Il est nécessaire de visualiser l'être humain comme un ensemble d'écosystèmes, composés d'être vivants variés, en interaction avec leur milieu physique et en équilibre les uns avec les autres. Un déséquilibre de l'écosystème mène alors à la prédominance d'une flore pathogène et ainsi à une infection.

Certains micro-organismes ne provoquent que de modestes infections, rapidement endiguées, mais d'autres sont responsables d'infections graves, parfois mortelles (*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*...).

Dans le cas de la cavité buccale par exemple, de très nombreux micro-organismes coexistent dans cet écosystème, comme des souches de *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*... Ils ont la capacité de s'organiser entre eux en biofilm. Un biofilm peut être défini comme une communauté microbienne, souvent fixée sur une surface solide et protégée par une matrice extracellulaire polysaccharidique générée par les organismes microbiens eux-mêmes. Cette organisation permet la colonisation des muqueuses et des dents, et assure la protection de l'ensemble des colonies. La salive et le système immunitaire des muqueuses assurent l'équilibre de cet écosystème complexe.

Mais lorsque l'équilibre est rompu, certains micro-organismes se développent de manière trop importante et pathogène, ce qui entraîne l'apparition d'infections, comme des caries dentaires, des parodontopathies,⁹ ou encore des candidoses, infections fréquentes dues principalement au champignon *C. albicans*.

II.4. DESCRIPTION DE *CANDIDA ALBICANS*

Le genre *Candida* est composé de plus de 150 espèces, réparties de manière ubiquitaire à travers le monde, aussi bien dans les sols et les océans que chez les animaux.⁹ *C. albicans* est l'espèce la plus courante chez l'être humain. C'est un micro-organisme eucaryote unicellulaire appartenant au règne des champignons et à la famille des *Saccharomycetaceae* (levures). Il appartient généralement à la flore commensale de la peau et des muqueuses (bouche, tube digestif, muqueuses génitales...), mais peut devenir pathogène dans certaines conditions.¹⁰⁻¹²

II.4.1. MORPHOLOGIE

C. albicans est un champignon de type levure ayant la particularité d'être dimorphique.¹⁰ En effet, il se développe sous forme de cellules rondes de 3 à 6 µm de diamètre protégées par une paroi polysaccharidique (Figure 3a) mais peut rapidement former des filaments, appelés hyphes, sous certaines conditions (Figure 3b), en particulier lorsqu'il manque d'oxygène.⁸

Il se reproduit par bourgeonnement et forme alors une cellule fille (Figure 3a). Lorsque la cellule fille ne se détache pas, une chaîne de cellules peut se former, appelée pseudo-hyphe (Figure 3c).⁸

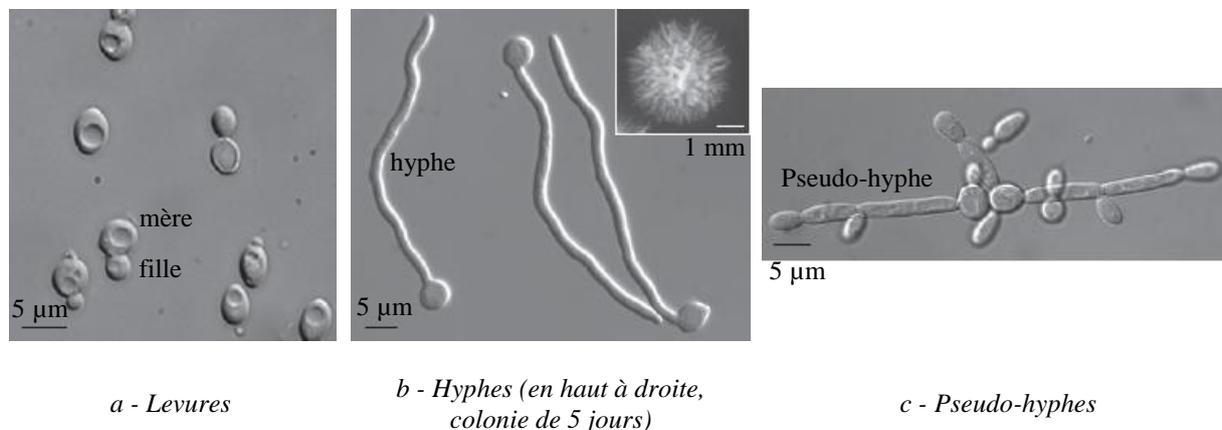


FIGURE 3 - DIMORPHISME CHEZ *C. ALBICANS*¹⁰

II.4.2. METABOLISME

C. albicans se développe à environ 37°C et à un pH optimum entre 5 et 7, même s'il peut supporter des conditions de température et de pH plus extrêmes.⁸ Il peut également supporter l'anaérobiose mais se développe beaucoup mieux en aérobiose. Sa croissance est généralement inhibée par la lumière et la sécheresse, il se développe donc principalement au niveau des muqueuses et des plis de la peau.

Il peut utiliser une large gamme de sucres comme source de carbone et d'énergie notamment le glucose, le maltose, le saccharose, le galactose ou le xylose.^{8,9} Il produit également une *N*-acétylglucosaminidase et de nombreuses aspartyl protéinases, qui lui permettent de dégrader partiellement les mucines, oligosaccharides et protéines présents dans la salive et les muqueuses pour obtenir sucres et acides aminés comme sources de carbone, azote et énergie.

C. albicans produit de nombreuses adhésines, qui permettent, comme leur nom l'indique, l'adhésion aux cellules épithéliales ou aux molécules de la matrice extracellulaire de l'hôte.^{8,9} Il peut également produire des toxines antibactériennes et des immunosuppresseurs ainsi que des antibiotiques, ce qui lui donne un avantage lorsqu'il est en compétition avec les bactéries endogènes ou lorsqu'il est attaqué par le système immunitaire de l'hôte.

II.4.3. FACTEURS DE VIRULENCE

C. albicans fait naturellement partie de la flore commensale de l'être humain, il est considéré comme bénin la plupart du temps. Cependant il peut facilement passer à l'état pathogène lorsqu'une altération de l'environnement favorisant son développement survient. Pour cela, il possède trois grands types de stratégie : l'adhérence à l'hôte, l'esquive des défenses de l'hôte, qui favorisent la rétention, ainsi que l'invasion et la destruction du tissu de l'hôte (Tableau 1).^{8,9,13}

TABLEAU 1 - FACTEURS DE VIRULENCE DE *C. ALBICANS*

Facteur de virulence →	Effet
Adhérence → Favorise la rétention dans l'hôte	
⊗ Hydrophobicité de la surface cellulaire →	Adhérences non spécifiques
⊗ Expression d'adhésines cellulaires →	Adhérences spécifiques
Esquive des défenses de l'hôte → Favorise la rétention dans l'hôte	
⊗ Changement de phénotype →	Modification des antigènes
⊗ Développement des hyphes →	Réduction de la phagocytose
⊗ Production de protéinases →	Destruction des IgA
⊗ Liaison au système du complément →	Masquage des antigènes
Invasion et destruction du tissu hôte → Accroît la pathogénicité	
⊗ Développement des hyphes →	Favorise l'invasion de l'épithélium
⊗ Production d'enzymes hydrolytiques →	Dommages sur les cellules hôtes et la matrice extracellulaire

L'adhérence peut être non spécifique (interactions hydrophobes) ou au contraire très spécifique, grâce à la production d'adhésines. Elles peuvent en effet se lier à la cellule épithéliale de l'hôte par des interactions récepteur-ligand voire par des liaisons covalentes.^{8,9}

L'esquive des défenses immunitaires de l'hôte peut être effectuée de plusieurs manières. *C. albicans* est d'une part capable de modifier ou de dissimuler ses antigènes afin de ne plus être reconnu par le système immunitaire.⁹ Il produit également des protéinases qui détruisent les anticorps des muqueuses appelés IgA. D'autre part, il peut diminuer sa sensibilité à la phagocytose en formant des hyphes. En effet, le passage d'une petite cellule ronde à une très longue cellule, souvent ramifiée, entrave le travail des phagocytes.⁹

Mais les hyphes ne sont pas formés uniquement pour contrer le système immunitaire. Ils permettent également l'invasion des tissus hôtes. La formation des hyphes est associée à la production d'enzymes hydrolytiques, qui détruisent les tissus hôtes, permettant aux hyphes de pénétrer en profondeur dans la muqueuse et de s'y accrocher solidement grâce aux adhésines (Figure 4).^{8-10,13,14}

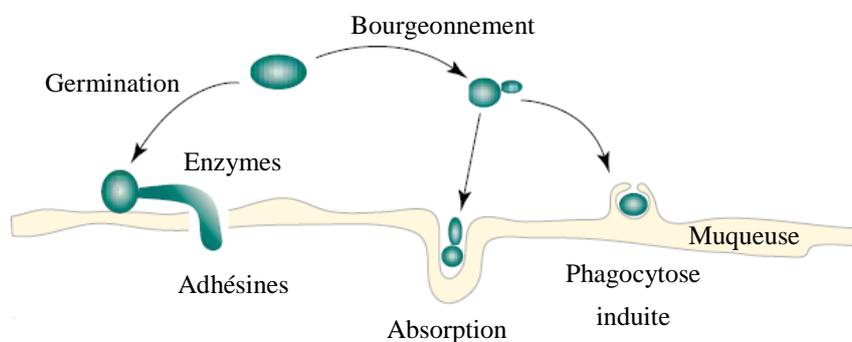


FIGURE 4 - MECANISME DE PROLIFERATION DE *C. ALBICANS*¹³

La virulence de *C. albicans* est donc le fruit de nombreux facteurs, exprimés conjointement pour assurer la prolifération et l'invasion du tissu hôte.⁹

Mais il est à noter que les deux formes (forme ronde et hyphes) se rencontrent également chez les individus sains.⁹ En effet *C. albicans* est naturellement inhibé par un système immunitaire sain, il devient pathogène uniquement si le système immunitaire devient défaillant ou si un dérèglement quelconque survient chez l'hôte.

II.4.4. FACTEURS DE L'HOTE FAVORISANT L'INFECTION

C. albicans a la capacité de survivre dans n'importe quelle zone du corps humain, ce que ne peuvent pas faire la plupart des micro-organismes, qui colonisent généralement une zone particulière avec des conditions environnementales précises. C'est donc un pathogène opportuniste.¹³

Le plus souvent, les causes de ces infections à *Candida* sont en rapport avec une déficience du système immunitaire. En effet, s'il n'assure plus le contrôle de *C. albicans*, celui-ci peut facilement envahir les tissus de l'hôte. Ce dérèglement peut ainsi être dû à une

immunodéficience sévère (SIDA, leucémie...), ou à des causes plus indirectes, comme la vieillesse, la dénutrition, une mauvaise hygiène bucco-dentaire, le port de prothèses dentaires qui favorisent le développement de biofilms*... (Tableau 2)⁹

Les candidoses sont aussi souvent favorisées par les traitements systémiques utilisés pour soigner certaines maladies, comme les chimiothérapies anticancéreuses, les corticoïdes, les antibiotiques. Au niveau local, les bains de bouche antiseptiques en utilisation prolongée peuvent détruire la flore bactérienne endogène, barrière naturelle contre les agents potentiellement pathogènes. Enfin, de nombreux médicaments entraînent une diminution de la sécrétion salivaire, essentielle pour un bon équilibre de la flore bucco-dentaire.¹⁵

TABLEAU 2 - FACTEURS FAVORISANT LA PROLIFERATION DE *C. ALBICANS*⁹

Généraux	<ul style="list-style-type: none"> âges extrêmes dénutrition immunodéficiences (sida, leucémie...) maladies endocriniennes (diabète...) maladies sanguines sévères (agranulocytose, anémies ferriprives...) radiothérapie médicaments qui diminuent la sécrétion salivaire ou modifient la flore endogène : <ul style="list-style-type: none"> ☒ antibiotiques ☒ psychotropes : antidépresseurs, neuroleptiques... ☒ corticoïdes ☒ chimiothérapie anticancéreuse...
Locaux	<ul style="list-style-type: none"> hyposialie*, xérostomie* (sécheresse buccale) prothèses amovibles (résine) tabac, sucre... mauvaise hygiène bucco-dentaire bains de bouche

Cas particulier de la sécheresse buccale

La salive est essentielle pour le maintien de la santé de la cavité orale et de l'équilibre de la flore buccale endogène. En effet la salive est naturellement antibactérienne, reminéralisante, digestive, réparatrice, lubrifiante et nettoyante. Ainsi, une diminution de la production de salive, qui apparaît chez les patients atteints du syndrome de Gougerot-Sjögren* et chez les patients polymédicamentés, peut directement contribuer à des complications au niveau buccal, comme par exemple une infection due à *C. albicans*.^{16,17} En effet il a été montré que la salive limitait la filamentation de *C. albicans*.¹⁸ Il est donc souhaitable d'essayer de réduire ou d'éliminer les facteurs diminuant la production de salive.

II.5. TRAITEMENTS ACTUELS

Les infections causées par *C. albicans* sont la plupart du temps superficielles, chez les patients souffrant d'un léger affaiblissement. L'action la plus efficace est alors la suppression des facteurs favorisant son développement, lorsque cela est possible. Par exemple, une bonne hygiène, le nettoyage des prothèses dentaires, de bonnes habitudes alimentaires et l'arrêt de l'utilisation abusive d'antibiotiques permettent de réduire les risques d'infection et de rééquilibrer la flore endogène.

Chez les malades immunodéprimés, l'infection peut devenir systémique (candidémie) et provoquer la mort dans 30 à 50 % des cas.⁹ Un traitement antifongique ciblé doit alors être utilisé.

Les agents antifongiques sont classés selon leur cible, il existe entre autres deux grandes familles, les polyènes et les azolés (Tableau 3).

TABLEAU 3 - ANTIFONGIQUES PRINCIPAUX UTILISES DANS LE TRAITEMENT DES CANDIDOSES

Antifongiques	Mode d'action
Polyènes : ☒ Nystatine ☒ Amphotéricine B...	Liaison avec l'ergostérol et destruction de la membrane plasmique (fongicide)
Analogues de pyrimidine : ☒ 5-flucytosine...	Inhibition de la synthèse de l'ADN et des protéines (fongicide)
Azolés : ☒ Fluconazole ☒ Miconazole ☒ Ketoconazole...	Inhibition de la biosynthèse de l'ergostérol (fongistatique)
Allylamines : ☒ Terbinafine ☒ Naftifine...	Inhibition de la biosynthèse de l'ergostérol (fongistatique)
Morpholines : ☒ Amorolfine	Inhibition de la biosynthèse de l'ergostérol (fongistatique)
Echinocandines : ☒ Caspofungine ☒ Micafungine ☒ Anidulafungine	Inhibition de la synthèse du β -1,3-D-glucane (paroi cellulaire)

Les polyènes (nystatine, amphotéricine B) se lient directement à l'ergostérol de la membrane cellulaire du champignon, ce qui augmente la perméabilité de la membrane, entraîne une fuite de cytoplasme et conduit à la mort cellulaire. Le cholestérol des mammifères ayant moins d'affinité pour les polyènes, les cellules de l'hôte sont moins sensibles à leur toxicité, les polyènes montrent cependant une certaine toxicité pour l'homme à haute dose. Leur

utilisation est limitée, à cause de leur faible absorption par l'intestin, à une application topique ou en suspension orale principalement.

Les azolés sont des fongostatiques (fluconazole, itraconazole...). Ils inhibent la synthèse de l'ergostérol par l'inhibition d'une enzyme (lanostérol déméthylase), ce qui bloque la croissance cellulaire. Les azolés sont mieux absorbés, ce qui permet une administration orale et donc systémique.

Les besoins en nouveaux antifongiques étant de plus en plus importants, d'autres familles ont fait leur apparition, comme les échinocandines, qui représentent une alternative aux polyènes et aux azolés. Ils inhibent la D-glucane synthase, enzyme nécessaire à la synthèse de la paroi cellulaire. Cette enzyme étant absente des cellules des mammifères, ce mécanisme réduit les risques de toxicité envers l'hôte.

II.6. PHENOMENES DE RESISTANCE ET RECHERCHE DE NOUVEAUX ANTIFONGIQUES

Ces dernières années, tout comme dans le cas de la résistance des bactéries envers les antibiotiques, des phénomènes de résistance des *Candida* aux azolés sont apparus. Ces résistances passent par plusieurs mécanismes, comme la surproduction de l'enzyme inhibée, l'altération légère de sa structure, ce qui la rend moins sensible, l'utilisation de transporteurs pour éliminer les azolés de la cellule, ou encore l'intégration dans la membrane cellulaire de stérols alternatifs.

Par ailleurs, l'efficacité des traitements contre les candidoses est grandement diminuée par la formation de biofilms*. En effet, lorsque *Candida* est organisé en biofilm, il montre une grande tolérance envers les traitements antifongiques et les bains de bouches antimicrobiens.

Des stratégies alternatives sont alors mises en place, comme la création de biomatériaux sur lesquels *Candida* ne peut pas se fixer, ou encore l'utilisation d'agents capables de rompre les biofilms.

Une autre stratégie consiste à rechercher des traitements moins lourds et moins agressifs, destinés aux patients déjà polymédicamentés dont la flore buccale est déséquilibrée. Elle consiste à utiliser des agents les plus spécifiques possibles, inhibant uniquement les facteurs de virulence de *C. albicans*, comme par exemple la forme filamenteuse. Des études préliminaires de recherche d'inhibiteurs potentiels de la forme filamenteuse de *C. albicans* ont été réalisées.¹⁹⁻²¹ Par exemple, 43 hydrosols, 7 infusions et 12 huiles essentielles ont été testés sur l'inhibition de la forme filamenteuse et certains ont montré des résultats très prometteurs.

CHAPITRE III - DESCRIPTION DE *SOLIDAGO VIRGAUREA*

III.1. INTRODUCTION

Dans le cadre de la recherche de nouveaux actifs contre la forme pathogène de *C. albicans*, des recherches bibliographiques et ethnobotaniques ont été réalisées dans le but de sélectionner des plantes potentiellement actives. L'objectif étant également de valoriser les plantes de la région PACA, les recherches se sont particulièrement concentrées sur ces dernières.

Une plante indigène des Alpes-Maritimes s'est avérée particulièrement intéressante : *Solidago virgaurea* (*S. virgaurea*). C'est une plante commune en Europe, très utilisée en médecine traditionnelle et connue pour des activités antifongiques. De plus, aucune toxicité n'a été jusqu'ici détectée. Par ailleurs, c'est une plante abondante, aisée à cueillir et potentiellement cultivable.

Deux sous-espèces sont présentes dans les Alpes-Maritimes, la sous-espèce principale *virgaurea* et la sous-espèce *alpestris*, endémique des Alpes et des montagnes européennes. N'ayant encore jamais été étudiée, ces travaux de thèse se sont concentrés sur cette dernière.

Dans ce chapitre, les caractéristiques de *S. virgaurea virgaurea* et les travaux antérieurs réalisés sur cette sous-espèce seront détaillés, suivis des caractéristiques de *S. virgaurea alpestris*. Enfin, des données bibliographiques sur les autres espèces du genre *Solidago* seront abordées.

III.2. TAXONOMIE

Le genre *Solidago* fait partie des angiospermes dicotylédones (Figure 5). Il appartient à l'ordre des Astérales et à la famille des Astéracées (anciennement famille des Composées). Il est composé de 125 espèces environ, présentes pour la plupart dans l'hémisphère Nord. *S. virgaurea* est l'une des espèces les plus importantes de ce genre. Elle comprend plusieurs sous-espèces et notamment la sous-espèce principale *S. virgaurea virgaurea* et la sous-espèce indigène des Alpes *S. virgaurea alpestris*.

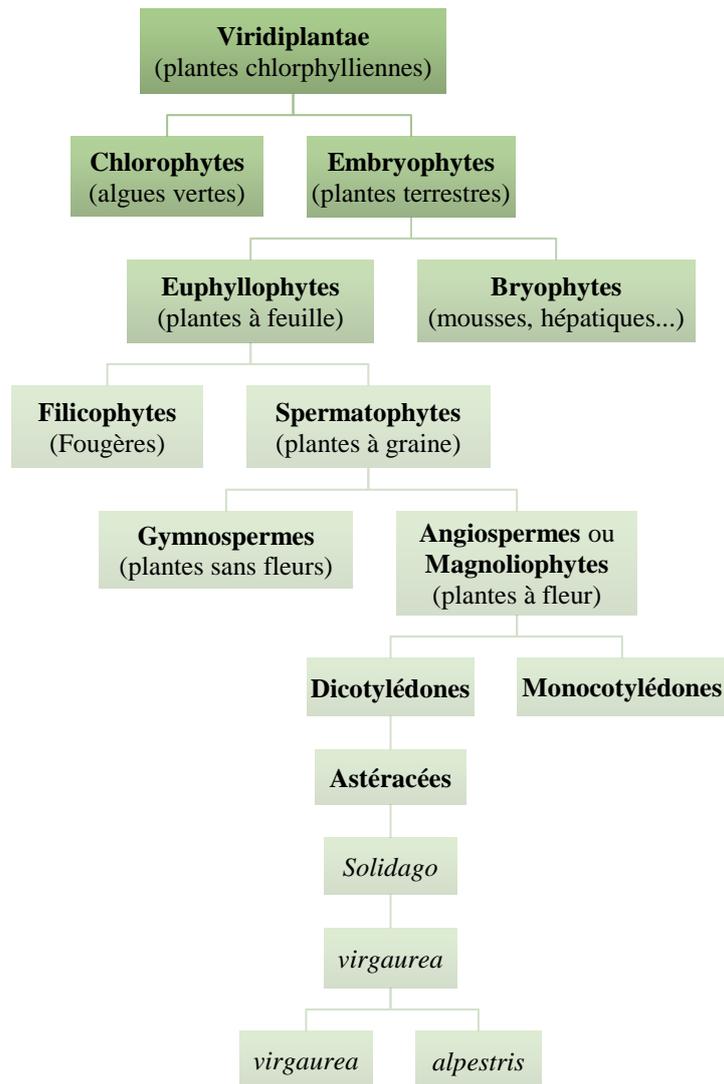


FIGURE 5 - POSITION SYSTEMATIQUE DE *S. VIRGAUREA*

III.3. CAS PARTICULIER DE *S. VIRGAUREA VIRGAUREA*

III.3.1. DESCRIPTION BOTANIQUE ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE

NOM SCIENTIFIQUE	<i>Solidago virgaurea</i> L. ssp. <i>virgaurea</i>
NOMS VERNACULAIRES	Solidage, Verge d'or
ORIGINE	Eurasie
ECOLOGIE ET REPARTITION	Commune dans une grande partie de l'hémisphère Nord. Présente dans les étages collinéen et montagnard (jusqu'à 1500 m d'altitude, Figure 9).
UTILISATIONS	En médecine traditionnelle, l'infusion est utilisée en tant que diurétique, anti-inflammatoire, antiseptique... ²²⁻²⁴
DESCRIPTION BOTANIQUE	<p>C'est une vivace qui peut atteindre 1 m de hauteur (Figure 6).^{24,25}</p> <p>La tige est dressée ou brièvement ascendante[♦], cylindrique et striée, glabre[♦] ou pubérulente[♦] vers le haut et rameuse à son extrémité.</p> <p>Les feuilles sont glabres ou légèrement pubescentes[♦] (Figure 7). Les feuilles basilaires[♦], disposées en rosette, sont lancéolées[♦] à obovales[♦], longuement pétiolées[♦], dentées en scie sur les bords alors que les feuilles caulinaires[♦], plus petites, sont alternes, sessiles[♦] et ont un bord entier ou légèrement denté.</p> <p>Un involucre[♦] de 2 à 4 rangées de bractées[♦] (4,5-6,5 mm) entoure le capitule[♦] haut d'environ 10-13 mm et large de 15-20 mm (Figure 8). Chaque capitule est composé de 6-12 fleurs ligulées[♦] femelles, espacées, jaunes, deux fois plus longues que les bractées, et de 10-30 fleurs tubulées[♦] hermaphrodites, jaunes. Les capitules sont disposés le long de la partie supérieure rameuse de la tige, sur chaque ramure.</p>



FIGURE 6 - VUE GLOBALE DE *S. VIRGAUREA* SSP. *VIRGAUREA* EN DEBUT DE FLORAISON



FIGURE 7 - DETAIL D'UNE FEUILLE BASILAIRE (A GAUCHE) ET D'UNE FEUILLE CAULINAIRE (A DROITE)



FIGURE 8 - DETAIL D'UN CAPITULE EN PLEINE FLORAISON (A GAUCHE) ET D'UN INVOLUCRE ET CAPITULE EN DEBUT DE FLORAISON (A DROITE)

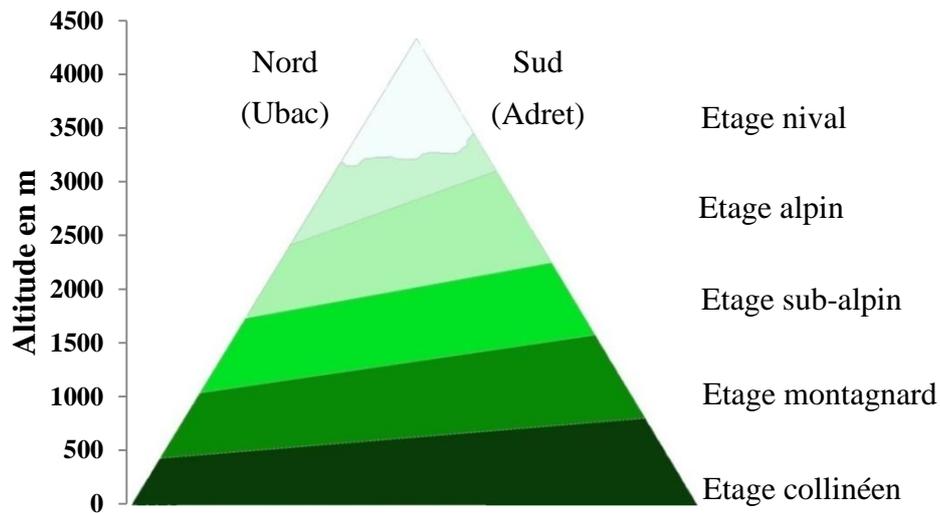


FIGURE 9 - REPARTITION DE LA VEGETATION ALPINE EN FONCTION DE L'ALTITUDE

III.3.2. UTILISATIONS TRADITIONNELLES

S. virgaurea est une plante médicinale connue pour ses propriétés diurétiques, anti-inflammatoires, spasmolytiques et anti-hypertensives.²⁶⁻²⁸

D'après Bader *et al.*, les premiers écrits sur l'utilisation de cette plante contre les maladies urologiques remonteraient au moins au XVIII^e siècle comme indiqué par Tabernaemontanus²⁸ mais elle serait connue depuis le Moyen-âge pour ces mêmes propriétés²⁵ et pour un usage externe comme vulnéraire[♦] et cicatrisant. En effet, son nom botanique dérive du latin *solido* qui veut dire « consolider » dans le sens de soigner des blessures. Elle serait donc employée pour le traitement et la cicatrisation des plaies, ainsi qu'en bain de bouche ou gargarisme lors d'inflammations de la cavité buccale ou de pharyngites.



Forte de cette réputation, *S. virgaurea* rentre actuellement dans la composition de traitements de phytothérapie et fait l'objet de plusieurs brevets^{2,29-32} mais également de nombreuses études phytochimiques, dans le but de rationaliser ces utilisations traditionnelles, mettre en évidence de nouvelles activités et identifier les composés responsables de ces activités.

Le paragraphe suivant rassemble et résume les différents travaux réalisés sur *S. virgaurea*.

III.3.3. CHIMIODIVERSITE

Les extraits bruts étudiés sont essentiellement des extraits aqueux et/ou alcooliques (Tableau 4). Ils se sont principalement révélés être antioxydants (activité moyenne par rapport à l'acide ascorbique et le BHT) et antimicrobiens^{22,23,33,34} mais ont également montré des activités biologiques plus spécifiques tels que l'inhibition de la contraction de la vessie chez le rat³⁵, utile dans le traitement du syndrome de la vessie hyperactive, ou encore une activité antiparasitaire³⁶, qui permettrait de traiter l'amibiase, maladie mortelle due à un protozoaire, et enfin une activité anticoagulante³⁷, utile dans le traitement des maladies thrombotiques.

Ces tests préliminaires sur les extraits bruts ont été complétés par d'autres travaux sur des molécules purifiées. En effet, différentes familles de composés ont pu être identifiées chez *S. virgaurea* et différents tests d'activité biologique ont été réalisés (Tableau 4).

Les composés de l'huile essentielle des parties aériennes ont également été étudiés (Tableau 5 p. 30). Une soixantaine de composés a pu être identifiée, principalement des mono- et sesquiterpènes, mais également des composés aromatiques.²⁶ Trois zones de récolte ont été comparées (trois zones de Pologne, Lodz, Warszawa, Kielce) et des différences quantitatives pour certains composés ont pu être mises en évidence. Les trois huiles essentielles ont été obtenues avec des rendements d'environ 0,38 % à Lodz, 0,37 % à Warszawa et 0,32 % à Kielce. En revanche elles n'ont été testées pour aucune activité biologique.

TABLEAU 4 - TRAVAUX ANTERIEURS REALISES SUR *S. VIRGAUREA VIRGAUREA*

Composé identifié	Type d'extrait et partie de la plante étudiée (localisation)	Activité biologique observée	Réf.
Extraits bruts			
	Infusion des parties aériennes (Bulgarie)	Antioxydant (ABTS)	23
	Extrait MeOH au Soxhlet des parties aériennes (Turquie)	Anti-radicalaire (DPPH) Antibactérien contre <i>E. fecalis</i> , <i>S. aureus</i> et <i>B. cereus</i>	34
	Extrait aqueux basique des parties aériennes (Pologne)	Anti-coagulant	37
	Extrait aqueux des feuilles (Allemagne)	Inhibition des contractions de la vessie chez le rat	35
	Extrait MeOH et EtOH de culture <i>in vitro</i> (Pologne)	Antibactérien modéré (diverses souches)	22
	Extrait MeOH des parties aériennes (Pologne)	Antiparasitaire (amoebicide)	36
	Extrait EtOH/Eau (75:25) des parties aériennes (Croatie)	Antifongique (<i>Trichophyton</i> sp., <i>Microsporium</i> sp.)	33
Classe des Acides Phénoliques et Glycosides Phénoliques			
Acide salicylique (1), Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque (2), Acide vanillique (3), Acide syringique (4), Acide gentisique (5), Acide protocatéchique (6), Acide <i>p</i> -coumarique (7), Acide caféique (8), Acide férulique (9), Acide sinapique (10)	Extrait MeOH/Eau (80:20) à chaud des parties aériennes (Pologne)	-	38
Acide 5-caféylquinique (Acide chlorogénique, 11), Acide 5- <i>p</i> -coumaroylquinique (12), Acide 3,5-dicaféylquinique (13)	Extrait MeOH des feuilles (Allemagne)	-	39
Leiocarposide (14)	Extrait MeOH des parties aériennes (Pologne, Allemagne)	Diurétique Anti-inflammatoire et analgésique	40-42
Virgaureoside A (15)	Extrait MeOH des parties aériennes (Allemagne)	-	43
Classe des Flavonols et Flavonosides			

Quercétine (16) Kaempférol (17) Isorhamnétine (18)	Extrait Eau/MeOH (50:50) et hydrolyse acide des feuilles (sources commerciales)	-	44
Rutine (19) Kaempférol-3- <i>O</i> -rutinoside (20) Kaempférol-3- <i>O</i> -robinobioside (21) Isorhamnétine-3- <i>O</i> -rutinoside (22)	Extrait EtOH/Eau (50:50) à chaud (sources commerciales : Italie, Allemagne)	-	27
Classe des Diterpènes type Clérodanes			
Acides solidagoïques C à I (23-29), Cléroda-3,13(14)-dien-16,15:18,19-diolide (30), Cléroda-3,13(14)-dien-15,16:18,19-diolide (31),	Extrait EtOH-AcOEt (50:50) des parties aériennes (Bulgarie)	Antibactérien contre <i>S. aureus</i>	45
Solidagolactones II, III, V, VII (32-35a), + 8 autres <i>cis</i> -Clérodane lactones (35b-43)	Extrait CHCl ₃ au Soxhlet des parties aériennes (Inde)	-	46
Classe des Saponines triterpéniques			
Solidagosaponines I à XXIX (44-72)	Extrait aqueux à chaud de la plante entière ou extrait EtOH/Eau (50:50) des parties aériennes (Japon et Allemagne)	Antifongique contre <i>Candida</i> sp. (XIV (57) et XVIII (61)) Cytotoxique contre 2 lignées cancéreuses (XIV (57) et XVIII (61))	47-51
Bellissaponine BA ₂ (73)	Extrait aqueux à chaud de la plante entière (Japon)	Cytotoxique contre une lignée cancéreuse	48,52
Virgaureasaponine 1 et 2 (74, 75)	Extrait EtOH/Eau (45:55) et hydrolyse alcaline (Allemagne)	Antifongique contre <i>Candida</i> sp. (différentes souches) et <i>Cryptococcus neoformans</i> Cytotoxique contre 2 lignées cancéreuses	51,53-56
Virgaureasaponine 3 (76)	Extrait EtOH/Eau (45:55) et hydrolyse alcaline (Allemagne)		57
Virgaureasaponines D et E (69, 77)	Extrait EtOH/Eau (50:50) des parties aériennes (Allemagne)	Pas d'activité anti-fongique contre <i>Candida</i> sp. Cytotoxique contre 2 lignées cancéreuses	28,50,51
Classe des Polyacétylènes			
2,8-(<i>Z</i>)-(<i>Z</i>)-Matricaria ester (78),	Huile essentielle des racines Extrait Ether de Pétrole des racines		58,59
(<i>Z</i>)-Matricaria- γ -lactone (79), (<i>E</i>)-Matricaria- γ -lactone (80), Lachnophyllum lactone (81)	Extrait Ether de Pétrole des racines	-	59

TABLEAU 5 - COMPOSES IDENTIFIES DANS L'HUILE ESSENTIELLE DE *S. VIRGAUREA VIRGAUREA*²⁶

N°	Identification	IR	Echantillons (%)		
			1	2	3
1	α -Pinène	1009	32,5	34,1	27,4
2	Camphène	1040	0,6	0,5	0,4
3	Sabinène	1068	0,4	0,5	11,8
4	Myrcène	1068	17,9	9,0	7,8
5	β -Pinène	1077	5,4	7,5	7,5
6	3-Carène	1109	0,4	0,7	0,1
7	α -Terpinène	1116	0,08	tr	0,3
8	Limonène	1125	14,1	3,3	3,0
9	<i>p</i> -Cymène	1152	tr	tr	0,3
10	(<i>E</i>)- β -Ocimène	1144	1,5	2,5	2,0
11	Linalol	1218	0,6	0,8	0,3
12	Nonanal	1218	0,3	0,6	0,9
13	<i>trans</i> -Verbénol	1311	0,07	tr	0,06
14	<i>trans</i> -Pinocarvéol	1311	0,2	0,2	0,09
15	Décanal	1320	0,08	0,04	0,09
16	Terpinèn-4-ol	1337	0,1	0,2	1,1
17	Bornéol	1353	tr	tr	tr
18	α -Terpinéol	1358	0,2	0,3	0,4
19	γ -Terpinéol	1374	0,2	0,04	0,09
20	<i>p</i> -Cymèn-8-ol	1395	0,04	0,04	0,03
21	<i>trans</i> -Carvéol	1410	0,07	0,06	0,05
22	Myrténal	1418	0,04	0,03	0,06
23	Géraniol	1434	0,08	0,1	0,2
24	Verbénone	1444	tr	0,06	tr
25	α -Cubébène	1451	tr	0,04	0,02
26	δ -Elemène	1455	tr	0,1	0,2
27	Acétate de bornyle	1456	1,1	0,4	0,3
28	Carvone	1466	0,08	0,04	tr
29	α -Copaène	1480	0,04	0,2	0,2
30	β -Bourbonène	1508			
10	β -Cubébène	1508	0,7	1,7	1,8
32	β -Elémène	1508			
33	Acétate de géranyle	1543	tr	tr	tr
34	Benzoate d'isobutyle	1552	tr	tr	tr
35	(<i>Z</i>)- β -Farnésène	1559	0,5	tr	tr
36	β -Caryophyllène	1567	1,7	3,1	3,3

37	α -Humulène	1617	3,6	4,1	3,3
38	γ -Muuroène	1638	0,2	0,1	0,1
39	Germacrène-D	1650	8,2	17,0	13,5
40	Benzoate d'isoamyle	1666	0,08	0,2	0,4
41	α -Muuroène	1679	0,6	3,6	2,0
42	Bicyclogermacrène	1684	0,9	tr	0,2
43	γ -Cadinène	1695	0,4	0,7	0,6
44	(<i>E</i>)-Nérolidol	1721	0,07	0,08	0,1
45	Calaménène A	1774	0,1	tr	0,2
46	Epoxyde de caryophyllène	1831	0,4	0,4	0,6
47	Spathuléol	1831	0,6	0,8	0,7
48	Benzoate de (<i>Z</i>)-hex-3-ényle	1831	0,08	0,08	0,1
49	Torréyol	1861	tr	tr	tr
50	T-Muuroolol	1866	0,4	0,6	0,7
51	Epoxyde d'humulène II	1866	0,5	0,3	0,5
52	α -Cadinol	1898	0,4	0,3	0,3
53	Salicylate de (<i>Z</i>)-hex-3-ényle	1928	0,1	0,2	0,09
54	Eudesma-4(15),7-dièn-1 β -ol	1967	0,1	0,2	0,2
55	Mintsulphide	2042	tr	tr	tr
56	Cyclocolorénone	2120	0,07	tr	0,07
57	Benzoate de benzyle	2190	0,2	0,2	0,2
58	Benzoate de géranyle	2279	tr	0,07	0,1
59	Salicylate de benzyle	2292	0,1	0,4	0,3
60	Salicylate de β -phényléthyle	2392	0,3	0,3	0,1

tr = <0,02 %, colonne DB-17 (30 m \times 0,32 mm \times 0,5 μ m), identification par GC-MS et RMN 1 H

III.3.3.1. CLASSE DES ACIDES PHENOLIQUES ET GLYCOSIDES PHENOLIQUES

Les acides phénoliques font partie de la grande famille des polyphénols, très commune dans le règne végétal. Ils sont caractérisés par un ou plusieurs cycles aromatiques portant un ou plusieurs hydroxy et au moins une fonction acide carboxylique, et par leur forte activité antioxydante.

Plusieurs acides phénoliques ont pu être identifiés chez *S. virgaurea* (Figure 10) dont 7 acides hydroxycinnamiques et dérivés (7-13) et 6 acides hydroxybenzoïques (1-6).^{38,39} De plus, des esters d'acide benzoïque et d'acide salicylique ont été identifiés dans l'huile essentielle.²⁶ Enfin, deux glycosides phénoliques caractéristiques de *S. virgaurea* ont également été identifiés : le leiocarposide et le virgaureoside A (14,15).^{43,60,61}

Le leiocarposide a montré une activité diurétique intéressante accompagnée d'une inhibition de la formation des calculs rénaux,^{40,41} ainsi qu'une activité anti-inflammatoire et analgésique modérée.⁴² C'est très certainement l'un des composés responsables de l'utilisation traditionnelle de *S. virgaurea* pour soigner les problèmes urinaires.

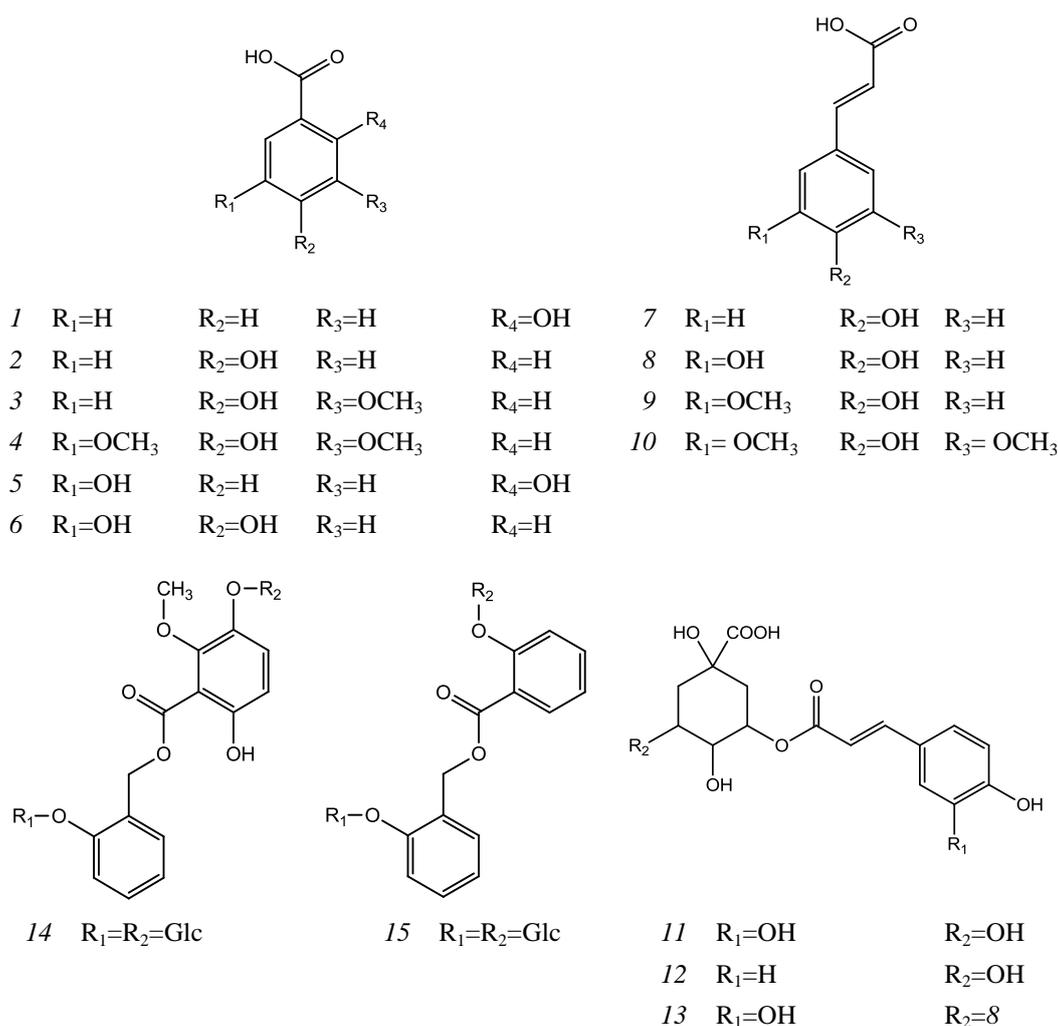
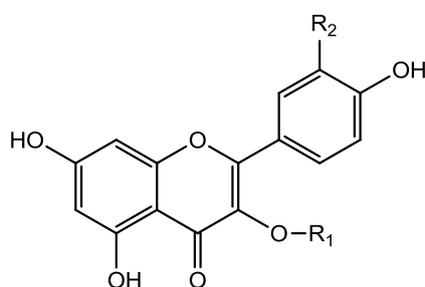


FIGURE 10 - ACIDES PHENOLIQUES IDENTIFIES CHEZ *S. VIRGAUREA*

III.3.3.2. CLASSE DES FLAVONOÏDES ET FLAVONOSIDES

Les flavonoïdes font également partie de la famille des polyphénols. Ce sont eux aussi de puissants antioxydants. Ils sont constitués de deux cycles benzéniques reliés par trois atomes de carbones qui forment souvent un troisième cycle, ce qui constitue un ensemble aromatique. Plusieurs classes de flavonoïdes peuvent être distinguées en fonction de ce troisième cycle. Parmi ces classes, les flavonols et leurs dérivés glycosylés, possèdent un squelette 3-hydroxy-2-phényl chromén-4-one.

Chez *S. virgaurea*, trois flavonols ont été identifiés (16-18), la quercétine, le kaempférol et l'isorhamnétine, ainsi que quatre de leurs dérivés glycosylés (19-22), la rutine, les kaempférols-3-*O*-rutinoside et -3-*O*-robinobioside et l'isorhamnétine-3-*O*-rutinoside (Figure 11). Ce sont des pigments jaunes qui participent notamment à la couleur des fleurs.



16	R ₁ =H	R ₂ =OH
17	R ₁ =H	R ₂ =H
18	R ₁ =H	R ₂ =OCH ₃
19	R ₁ =Glc- ⁶ -Rha	R ₂ =OH
20	R ₁ =Glc- ⁶ -Rha	R ₂ =H
21	R ₁ =Gal- ⁶ -Rha	R ₂ =H
22	R ₁ =Glc- ⁶ -Rha	R ₂ =OCH ₃

FIGURE 11 - FLAVONOÏDES IDENTIFIÉS CHEZ *S. VIRGAUREA*

III.3.3.3. CLASSE DES DITERPENES DE TYPE CLERODANES

Les clérodanes sont des diterpènes bicycliques présents dans diverses familles de plantes, principalement chez les Lamiacées, et chez certains champignons, bactéries et organismes marins.⁶² Ces composés possèdent de nombreuses activités biologiques telles qu'antimicrobienne,^{63,64} cytotoxique⁶⁵ mais la plus étudiée est de loin l'activité antiappétante chez les insectes.⁶²

Leur utilité au sein de la plante n'est pas toujours bien connue mais certaines plantes les utilisent pour inhiber la croissance des autres espèces avec lesquelles elles sont en compétition, ou encore comme mécanisme de défense contre les herbivores et les infections.⁶²

De nombreux clérodanes ont été isolés chez *S. virgaurea* (exemples en Figure 12 et détails de toutes les structures en Annexe 1), dont 12 à partir d'un extrait au chloroforme⁴⁶ (32-43) identifiés comme étant des solidagolactones et autres clérodanes lactones et 9 à partir d'un extrait éthanol-acétate d'éthyle (50:50)⁴⁵ (23-31) identifiés comme étant des acides solidagoïques. Ces derniers ont pratiquement tous montré une activité antibactérienne modérée contre *Staphylococcus aureus*. Il serait donc possible d'utiliser ces diterpènes comme point de départ pour l'hémisynthèse de composés fortement actifs, comme c'est souvent le cas pour ce genre de composés.⁶²

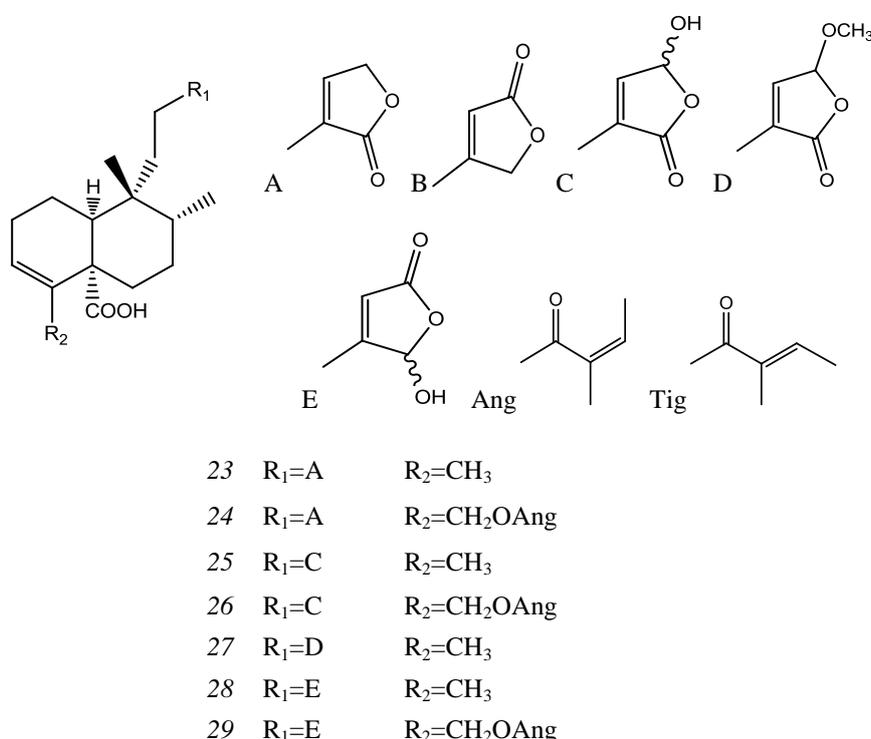


FIGURE 12 - EXEMPLES DE CLERODANES IDENTIFIES CHEZ *S. VIRGAUREA*

III.3.3.4. CLASSE DES POLYACÉTYLÈNES

Les polyacétylènes sont assez communs dans la nature mais sont surtout présents chez les Astéracées, les Apiacées et les champignons du groupe des Basidiomycètes.⁶⁶ Ils sont en général présents dans les racines, en très faible quantité. Ils servent de défense contre les attaques des prédateurs et des microorganismes et sont ainsi souvent très toxiques pour les mammifères.⁶⁷ Certains ont montré des propriétés antifongiques intéressantes et d'autres des propriétés immunostimulantes.⁶⁶

Chez *S. virgaurea*, quatre polyacétylènes différents ont été identifiés dans les racines (78-81), le 2,8-(Z)-(Z)-matricaria ester, les (Z)- et (E)-matricaria- γ -lactones et la lachnophyllum lactone (Figure 13).^{58,59}

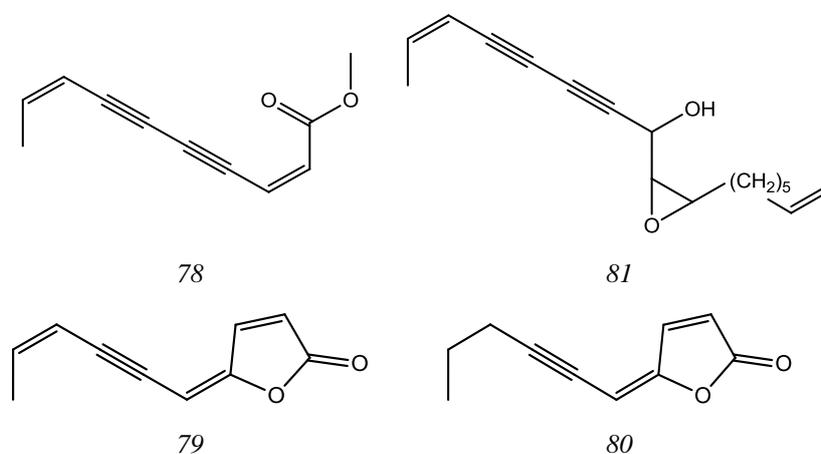


FIGURE 13 - POLYACÉTYLÈNES IDENTIFIÉS CHEZ *S. VIRGAUREA*

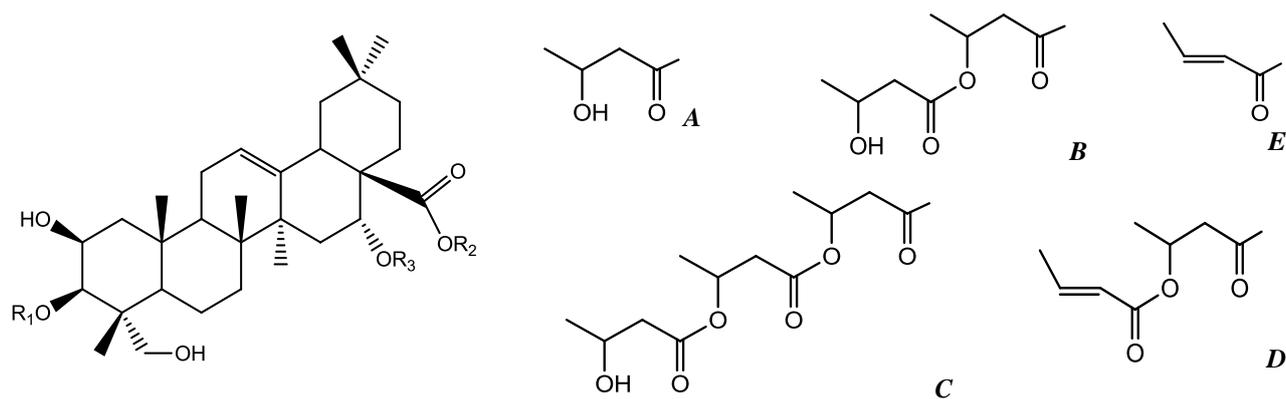
III.3.3.5. CLASSE DES SAPONINES

Les saponines triterpéniques représentent certainement la classe la plus importante au sein de *S. virgaurea*. Des généralités sur les saponines seront ainsi développées dans le chapitre IV.

Les études les plus anciennes ont été réalisées par l'équipe de Bader & Hiller à partir du début des années 1980. Les premiers tests biologiques à partir d'extraits enrichis en saponines ont mis en évidence une activité anti-exsudative⁶⁸ et une activité antifongique⁶⁹ sur différentes souches de *Candida* et *Cryptococcus*.

Les trois premières saponines, les Virgaureasaponines 1, 2 et 3 (74-76), ont été isolées et identifiées en 1987 et 1992,^{53,54,57} à partir d'extraits ayant subi une hydrolyse alcaline partielle (Figure 14). Ces saponines ont montré une activité anti-fongique prometteuse grâce à des tests de diffusion sur boîte de Petri⁵⁵ alors que leurs analogues monodesmosides (hydrolyse basique totale) sont beaucoup moins actifs. Par la suite, cette même équipe a isolé quatre Virgaureasaponines supplémentaires (B (57), C (61), D (69) et E (77)) provenant cette fois-ci d'extraits bruts non hydrolysés²⁸ mais toutes n'ont pas montré d'activité anti-fongique⁵⁰ (Figure 14). En effet, deux grandes études de relation structure-activité des saponines ont été réalisées en 1996 et 2000, sur des lignées cellulaires tumorales pour l'une⁵¹ et sur différentes souches de *Candida* pour la seconde.⁵⁰ Les Virgaureasaponines 1, 2, B, C, D et E ont été testées pour ces deux activités. Elles ont toutes montré une activité similaire contre les cellules tumorales, cependant de grandes différences d'activité ont été mises en évidence contre les souches de *Candida*. La Virgaureasaponine 1 s'est révélée la plus active contre toutes les souches de *Candida* testées (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*), suivie des Virgaureasaponines B et C, actives contre 3 souches sur 4. La Virgaureasaponine 2 a montré une activité contre toutes les souches mais uniquement à la concentration la plus importante, et enfin les Virgaureasaponines D et E n'ont montré aucune activité. La partie sucres est donc importante pour l'activité anti-fongique comme le nombre et séquence des sucres, site d'attachement ou encore la présence d'une chaîne hydroxybutyrate.

Parallèlement à ces études, l'équipe d'Inose & Miyase a également travaillé sur les saponines de *S. virgaurea* de 1992 à 1994.⁴⁷⁻⁴⁹ Pas moins de 29 nouvelles saponines, les Solidagosaponines I à XXIX (44-72), ont été isolées et identifiées à partir d'une décoction de la plante entière fraîche (exemples en Figure 14 et détails de toutes les structures en Annexe 2). Des structures mono-, bis- et tridesmosides ont été mises en évidence mais aucune n'a été testée pour une activité biologique.



<i>n</i> ^o	R ₁	R ₂	R ₃	Formule brute	Masse
44	R ₁ =H	R ₂ =H	R ₃ =Glc- ² -Ara	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₅	798
51	R ₁ =H	R ₂ =Ara	R ₃ =Glc- ² -Ara- ⁴ -A	C ₅₀ H ₈₀ O ₂₁	1016
52	R ₁ =Glc- ⁴ -Glc	R ₂ =H	R ₃ =H	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₆	828
53	R ₁ =Glc	R ₂ =(Ara- ⁴ -Ac)- ³ -Ac	R ₃ =Glc- ² -Ara- ⁴ -A	C ₆₀ H ₉₄ O ₂₈	1262
57	R ₁ =Glc	R ₂ =(Fuc- ⁴ -C)- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	R ₃ =H	C ₇₁ H ₁₁₄ O ₃₃	1494
60	R ₁ =Glc	R ₂ =(Fuc- ⁴ -A- ³ -Ac)- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	R ₃ =H	C ₆₅ H ₁₀₄ O ₃₀	1364
61	R ₁ =Glc	R ₂ =(Fuc- ⁴ -B)- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	R ₃ =H	C ₆₇ H ₁₀₈ O ₃₁	1408
62	R ₁ =Glc	R ₂ =(Fuc- ⁴ -D)- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	R ₃ =H	C ₆₇ H ₁₀₆ O ₃₀	1390
64	R ₁ =Glc- ³ -Xyl	R ₂ =(Fuc- ⁴ -C)- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	R ₃ =H	C ₇₆ H ₁₂₂ O ₃₇	1626
66	R ₁ =Glc- ³ -Xyl	R ₂ =(Fuc- ³ -Api- ⁵ -Ac)- ⁴ -C)- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	R ₃ =H	C ₈₃ H ₁₃₂ O ₄₂	1800
69	R ₁ =Glc- ³ -Glc	R ₂ =(Fuc- ⁴ -C)- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	R ₃ =H	C ₇₇ H ₁₂₄ O ₃₈	1656
70	R ₁ =Glc- ⁴ -Glc	R ₂ =Fuc- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	R ₃ =H	C ₆₅ H ₁₀₆ O ₃₂	1398
71	R ₁ =Glc- ³ -Glc	R ₂ =(Fuc- ³ -Api)- ⁴ -Ac)- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	R ₃ =H	C ₇₂ H ₁₁₆ O ₃₇	1572
73	R ₁ =Glc	R ₂ =(Fuc- ⁴ -E)- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	R ₃ =H	C ₆₃ H ₁₀₀ O ₂₈	1304
74	R ₁ =Glc	R ₂ =Fuc- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	R ₃ =H	C ₅₉ H ₉₆ O ₂₇	1236
75	R ₁ =Glc- ³ -Glc	R ₂ =Fuc- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	R ₃ =H	C ₆₅ H ₁₀₆ O ₃₂	1398
76	R ₁ =Glc- ³ -Glc	R ₂ =Fuc- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha- ² -Fuc	R ₃ =H	C ₇₁ H ₁₁₆ O ₃₆	1544
77	R ₁ =Glc- ³ -Glc	R ₂ =(Fuc- ⁴ -B)- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	R ₃ =H	C ₇₃ H ₁₁₆ O ₃₀	1472

FIGURE 14 - EXEMPLES DE SAPONINES IDENTIFIEES CHEZ *S. VIRGAUREA*

III.4. CAS PARTICULIER DE *S. VIRGAUREA ALPESTRIS*

III.4.1. DESCRIPTION BOTANIQUE ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE

NOM SCIENTIFIQUE *Solidago virgaurea* L. ssp. *alpestris* (Waldst. & Kit.) Grelli

SYNONYMES *Solidago virgaurea* L. ssp. *minuta*,

Solidago virgaurea L. ssp. *alpina*

NOMS VERNACULAIRES Petit solidage, Petite verge d'or, Solidage alpestre

ORIGINE Alpes

ECOLOGIE ET REPARTITION Pentes rocailleuses des étages alpin et sub-alpin (de 1400 à 2700 m d'altitude environ, Figure 9 p. 26)

UTILISATIONS Pas de données, probablement à cause de son habitat limité (altitude...)

DESCRIPTION BOTANIQUE La sous-espèce *alpestris* est plus courte que la sous-espèce *virgaurea*, en effet elle ne dépasse habituellement pas 40 cm (Figure 15).

La tige possède les mêmes caractéristiques morphologiques que la sous-espèce *virgaurea* à l'exception qu'elle ne se ramifie pas. Les feuilles sont également identiques, parfois moins larges.

Les capitules* sont moins nombreux et plus espacés, répartis le long de l'unique tige. L'involucre* entourant le capitule est légèrement plus long que chez la sous-espèce *virgaurea* (6-8 mm).

Il est à noter que ces deux sous-espèces, poussant à des altitudes différentes, sont reliées par des formes intermédiaires et qu'aucune étude génétique n'a encore confirmé une réelle différence entre ces deux sous-espèces.

III.4.2. CHIMIODIVERSITE

Aucune investigation phytochimique n'a été réalisée sur cette sous-espèce, probablement à cause de son habitat limité.



FIGURE 15 - VUE D'ENSEMBLE (A GAUCHE) ET DETAIL DE LA TIGE DE *S. VIRGAUREA* SSP. *ALPESTRIS*



FIGURE 16 - DETAIL DES CAPITULES (A GAUCHE) ET D'UNE ROSETTE DE FEUILLES BASILAIRES (A DROITE) DE *S. VIRGAUREA* SSP. *ALPESTRIS*

III.5. COMPARAISON AVEC LES AUTRES ESPECES DU GENRE *SOLIDAGO*

Le genre *Solidago* est composé de 125 espèces environ, présentes pour la plupart dans l'hémisphère Nord. *S. virgaurea*, la véritable Verge d'Or est, comme expliqué précédemment, très utilisée en médecine traditionnelle, traitement de phytothérapie et très étudiée sur le plan phytochimique. Mais d'autres espèces du genre *Solidago*, parfois moins connues mais plus grandes et plus productives,⁷⁰ ont également été étudiées, pour remplacer *S. virgaurea*, ou pour trouver de nouveaux actifs (Tableau 6).

TABLEAU 6 - TRAVAUX ANTERIEURS REALISES SUR DIFFERENTES ESPECES DU GENRE *SOLIDAGO*

Espèce	Origine	Utilisations traditionnelles	Composés identifiés	Activités biologiques	Réf.
<i>altissima</i>	Amérique du Nord	-	acylphloroglucinol glycoside, flavonoïdes, dérivés d'acide caféique, polyacétylènes, diterpènes de type clérodane	-	71,72
<i>canadensis</i>	Amérique du Nord	analgésique, traitement des brûlures, ulcères, problèmes gastro-intestinaux	diterpène de type labdane, acides phénoliques, flavonoïdes, glycoside phénolique, triterpènes de type lupane, lupéol, acétate de lupéyle, acide ursolique, cycloarténol, cycloarténylpalmitate, acétate d' α -amyrin, stigmastérol, saponines	cytotoxicité (différentes lignées cancéreuses + cellules saines) inhibition de la ADN-polymérase β	42,68,73-76
<i>chilensis</i>	Amérique du Sud	en remplacement de l' <i>Arnica</i> (traitement des inflammations superficielles), diurétique	quercitrine, solidagénone	activité anti-inflammatoire (extraits aqueux et hydroalcooliques)	77,78
<i>decurrens</i>	Sud de la Chine	traitement des infections et inflammations	mono et sesquiterpènes, leiocarposide et son isomère, benzoates de benzyle, dérivés de l'acide 3-deoxy-D-manno-2-octulosonique	-	79,80
<i>gigantea</i>	Amérique du Nord	-	<i>trans</i> -phytol, acétate de β -amyrin, acide oléanolique, kaempférol et dérivé, acide 3,5-di- <i>O</i> -caféoylquinique et dérivé, β -dictyoptérol, saponines, <i>ent</i> -germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-ols	activité anti-fongique contre plusieurs souches (extrait aqueux des fleurs)	41,70,81,82
<i>microglossa</i>	Amérique du Sud	stimulant gastro-intestinal, cicatrisant, anti-inflammatoire	quercitrine, quercetine, rutine, β -farnésène, α -amyrine, α -spinastérol, glucopyranoside, solidaginone, mono- et sesquiterpènes	-	83,84

Les différentes espèces du genre *Solidago* montrent des similitudes dans leur composition chimique. En effet, certaines familles de composés se retrouvent aussi bien chez *S. virgaurea* que chez d'autres espèces du genre *Solidago*, des plus classiques comme les acides phénoliques ou les flavonoïdes, à des familles moins communes comme les clérodanes ou les polyacétylènes (Tableau 6).

La famille des saponines se retrouve uniquement chez *S. canadensis* et *S. gigantea*. Cependant le squelette triterpénique est légèrement différent de celui de *S. virgaurea*, il correspond à la bayogénine et non à l'acide polygalacique.^{85,86}

CHAPITRE IV - LA CLASSE DES SAPONINES : GENERALITES

IV.1. INTRODUCTION

Les saponines sont des métabolites secondaires non volatils, produits principalement par les végétaux supérieurs. Le terme saponine dérive du latin *sapo* qui signifie « savon », à cause de la capacité de la plupart des saponines à former une mousse stable en milieu aqueux.^{87,88} Cette propriété vient du caractère amphiphile de ce type de molécules, constituées d'une génine terpénoïdique hydrophobe liée à un ou plusieurs oses hydrophiles.

Plusieurs plantes comme la saponaire (*Saponaria officinalis*), la noix de lavage (*Sapindus mukorossi*, *Sapindus saponaria*), ou le bois de Panama (*Quillaja saponaria*), historiquement utilisées comme savon/détergent, doivent en fait leur propriété moussante à la présence de saponines.⁸⁹

Les saponines, présentes dans un grand nombre de plantes utilisées en médecine traditionnelle, sont de plus en plus étudiées, aussi bien au niveau de leur structure particulière qu'au niveau des nombreuses propriétés biologiques et pharmacologiques que ce type de structure leur confère.⁸⁹

Comme exposé précédemment, les travaux antérieurs réalisés sur *S. virgaurea* ont mis en évidence la présence de nombreuses saponines dans les extraits aqueux ou hydro-alcooliques.^{47,53} De plus des tests biologiques ont été réalisés et certaines saponines se sont révélées être antifongiques contre *C. albicans*.⁵⁶ Par ailleurs très peu d'études mettent en évidence une potentielle activité antibactérienne de ces extraits. Les saponines de *S. virgaurea* sont donc des composés tout à fait prometteurs pour l'élaboration de nouveaux actifs antifongiques non agressifs envers la flore bactérienne.

Ce chapitre sera consacré à la description de la structure et de la biosynthèse des saponines, ainsi qu'à leur distribution et leur rôle au sein des plantes, leurs nombreuses activités biologiques, et enfin à la description des techniques employées pour l'extraction, la caractérisation et le dosage de ce type de molécules.

IV.2. STRUCTURE DES SAPONINES

Les saponines sont constituées d'une génine terpénoïdique liée par une ou plusieurs liaisons *O*-glycosidiques à un ou plusieurs oses. Les différents types de génines seront tout d'abord décrits puis la structure de la partie osidique sera abordée.

IV.2.1. STRUCTURE DES GENINES

Les saponines peuvent être classées en deux groupes : les saponines triterpéniques et les saponines stéroïdiques. Cette différenciation est basée sur la structure et la biosynthèse de leurs génines.⁹⁰

IV.2.1.1. LES SAPONINES A GENINE TRITERPENIQUE

Les saponines à génine triterpénique sont les plus courantes. Elles possèdent un squelette à 30 carbones et peuvent être classées en 10 sous-groupes selon la structure du triterpène : les dammaranes, tricullanes, cucurbitanes et lanostanes sont tétracycliques, tandis que les lupanes, hopanes, oléananes, taraxastéranes, ursanes et cycloartanes sont pentacycliques (Figure 17). La structure de type oléanane est de loin la plus rencontrée.^{24,90}

IV.2.1.2. LES SAPONINES A GENINE STEROÏDIQUE

Les saponines à génine stéroïdique sont moins courantes. Elles possèdent un squelette à 27 carbones (Figure 17) qui comporte habituellement six cycles, appelé spirostane. Quand l'hydroxy en C-26 est engagé dans une liaison avec un ose, la structure reste alors pentacyclique et est appelé furostane. Ce type de structure ne peut exister qu'à l'état hétérosidique (son hydrolyse conduit spontanément à un dérivé spirostanique).²⁴ Il existe également des saponines possédant un squelette tétracyclique cholestane.⁹¹

Chaque squelette, triterpénique ou stéroïdique, étant décliné en une série de dérivés, la structure de la génine est un facteur important dans la variabilité des saponines existantes.

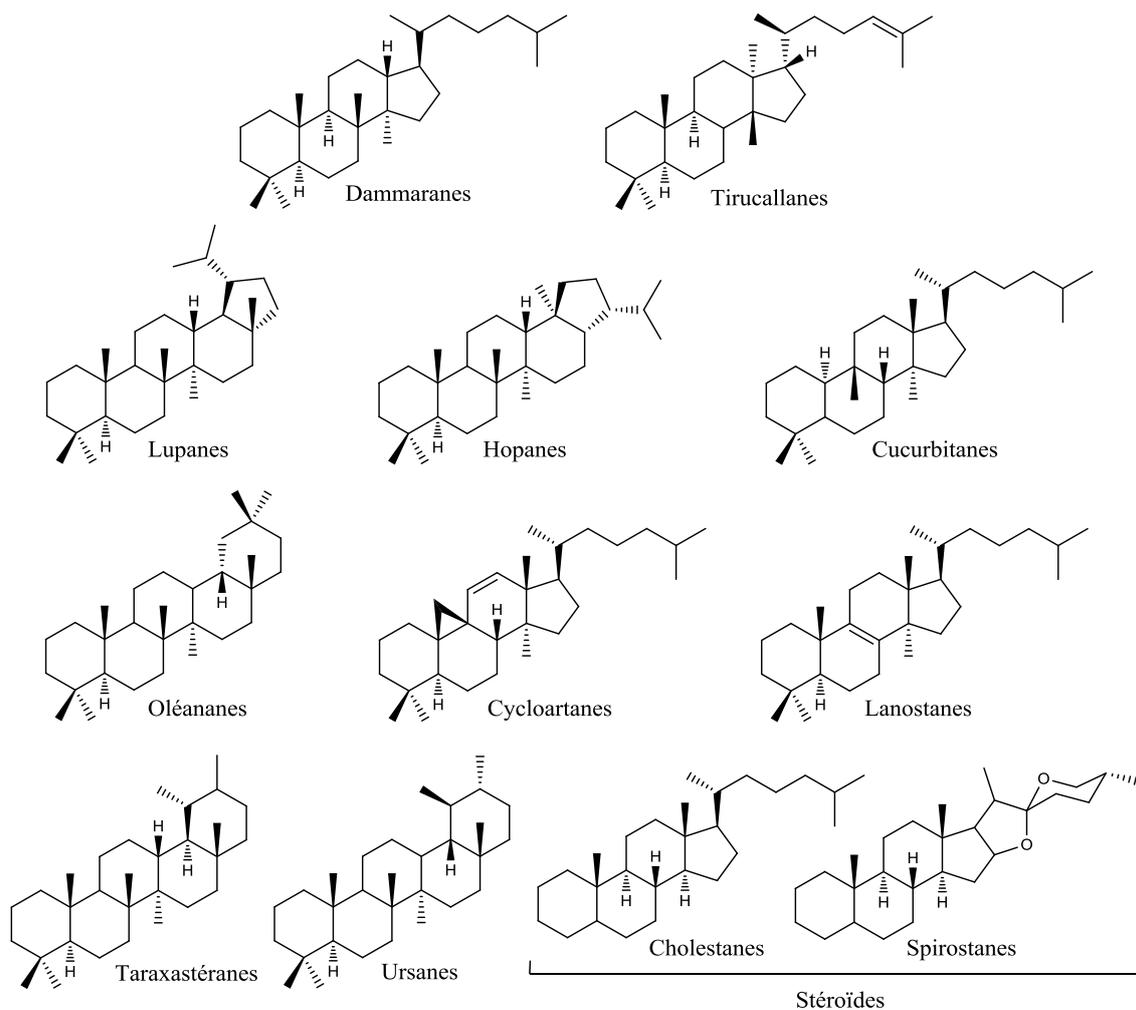


FIGURE 17 - STRUCTURES DES 11 PRINCIPALES CLASSES DE SQUELETTES DE SAPONINES ET LEURS DERIVES

IV.2.2. STRUCTURE DES SUCRES

Les oses constitutifs des saponines les plus courants sont le β -D-glucose, le β -D-galactose, l' α -L-rhamnose, le β -D-fucose, le β -D-xylose, l' α -L-arabinose et plus rarement l'acide β -D-glucuronique et le β -D-apiose (Figure 18). Ils sont présents sous forme cyclique, la plupart du temps sous forme pyranosique, mais aussi parfois sous forme furanosique, comme dans le cas de l'apiose. Dans le cas d'oligosides, ils sont liés ensemble par une liaison *O*-glycosidique entre l'hydroxy du carbone anomérique du premier sucre et l'hydroxy d'un carbone de position variable du second sucre.

Une saponine peut être constituée uniquement d'une génine et d'un sucre, mais ce n'est pas le cas le plus courant. Une saponine possède généralement 3 à 5 sucres, et peut en compter jusqu'à 11. Ils sont généralement agencés sous forme d'oligosides, linéaires ou ramifiés, reliés à la génine par une liaison *O*-glycosidique de type éther ou de type ester.²⁴ Les liaisons *O*-

glycosidiques se font toujours entre l'hydroxy du carbone anomérique du sucre et l'hydroxy ou l'acide carboxylique de la génine.

Les saponines *monodesmosidiques* ne possèdent qu'une seule chaîne osidique, en général liée au niveau de l'hydroxy du carbone 3 de la génine (liaison éther).⁸⁹ Les saponines *bidesmosidiques* possèdent deux chaînes osidiques, et il existe même des saponines *tridesmosidiques*, possédant trois chaînes osidiques, mais ces dernières sont beaucoup plus rares. D'autres groupements divers, comme des chaînes hydroxybutyrates, des monoterpénoïdes, des groupements aromatiques, des acétates, peuvent également être liés à la génine ou aux sucres.^{49,90}

Les oses pouvant être liés à différentes positions de la génine et pouvant être reliés entre eux de différentes manières, avec un ordre, une nature et un nombre très variable, la structure de la partie osidique est un facteur essentiel dans la variabilité des saponines existantes. Ce facteur cumulé avec la variabilité des génines entraîne un nombre de possibilités de structures extrêmement important.

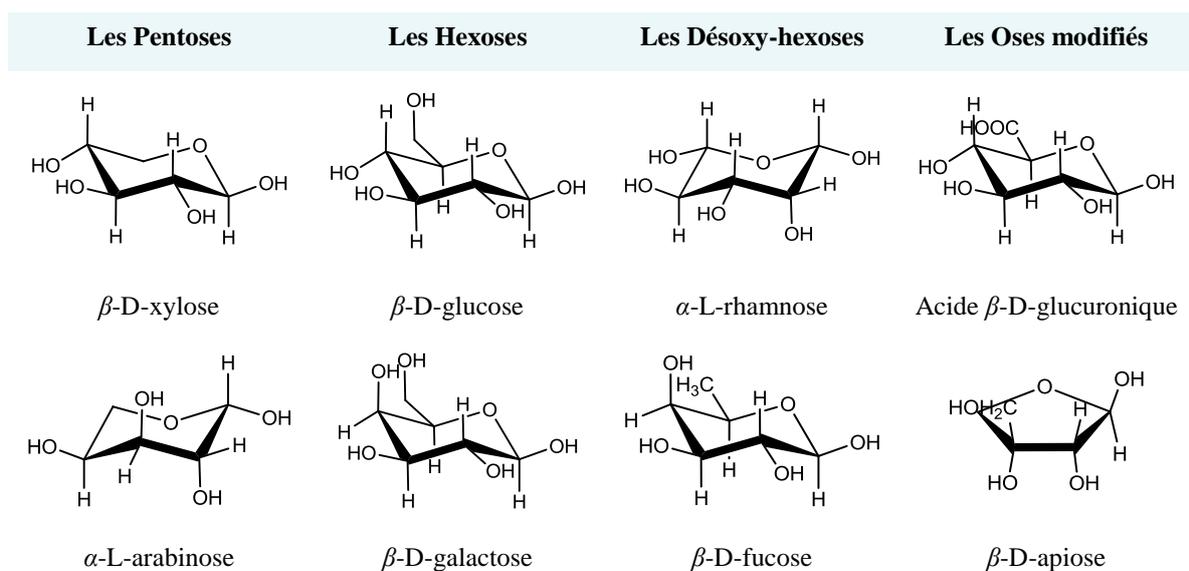


FIGURE 18 - LES OSES LES PLUS COURANTS CONSTITUANT LES SAPONINES

IV.3. BIOSYNTHESE

La biosynthèse, production de composés organiques par un être vivant, permet d'obtenir deux groupes majeurs de molécules : les métabolites primaires et les métabolites secondaires. Le métabolisme primaire synthétise les molécules de base essentielles à la vie (sucres, protéines, lipides, acides nucléiques) tandis que le métabolisme secondaire, dérivant du primaire et réalisé principalement par les végétaux, conçoit d'autres classes de composés comme les polyphénols, les alcaloïdes, les terpénoïdes... Ces composés ne sont pas considérés comme essentiels à la vie de l'individu mais sont indispensables à sa survie dans son environnement (reproduction, défense, communication...).⁶⁶

Les saponines font partie des métabolites secondaires à cause de leur squelette terpénique même si elles sont en partie constituées par des métabolites primaires (sucres).

IV.3.1. BIOSYNTHESE DES GENINES

Les triterpènes et les stéroïdes dérivent tous du même précurseur, l'oxydosqualène.⁹⁰ La différence majeure entre les deux types de structures est la perte de trois carbones entre le squelette triterpénique et le squelette stéroïdique.

La voie de biosynthèse des terpénoïdes et des stéroïdes est la voie du mévalonate. Structuellement, ils sont formés par l'association d'un nombre entier d'unités pentacarbonées ramifiées dérivées de l'isoprène (3-méthylbuta-1,3-diène). En fonction du nombre d'unités isopréniques associées, divers composés sont obtenus, comportant toujours un nombre d'atomes de carbone multiple de cinq.

Leur biosynthèse débute, à l'image d'une condensation de Claisen, par l'association de deux molécules d'Acétyl-Coenzyme A (Ac-CoA) en Malonyl-CoA (Figure 19).⁶⁶ Une troisième molécule d'Ac-CoA s'ajoute pour donner le β -hydroxy- β -méthyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA). Ce dernier subit une réduction enzymatique et une hydrolyse afin de former l'acide (*R*)-mévalonique. Une première molécule d'adénosine triphosphate (ATP) phosphoryle l'acide (*R*)-mévalonique, puis une seconde permet la déshydratation et la décarboxylation de l'acide mévalonique diphosphate. Enfin, une déphosphorylation entraîne la formation de l'isopentényl pyrophosphate (IPP) qui s'isomérisé en partie en diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP). L'association de l'IPP et du DMAPP génère le géranyl pyrophosphate (GPP), précurseur des monoterpènes (C10). Une autre molécule d'IPP peut se combiner pour former le farnésyl pyrophosphate (FPP), précurseur des sesquiterpènes (C15).

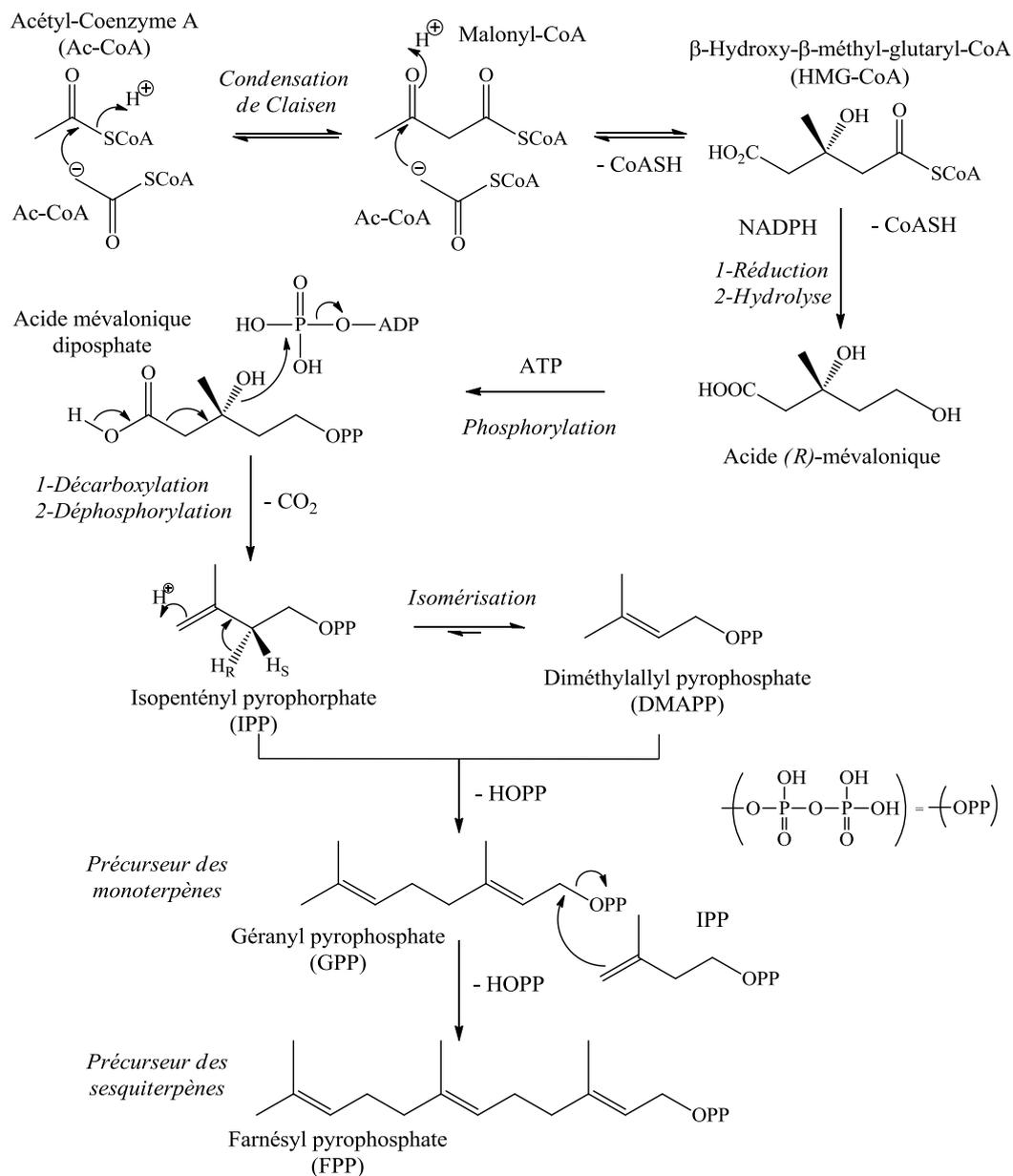


FIGURE 19 - BIOSYNTHESE DES TERPENES

De même, le géranylgeranyl pyrophosphate (GGPP), précurseur des diterpènes (C₂₀), est formé grâce à la combinaison d'une autre molécule d'IPP avec le FPP. En revanche, le squalène, précurseur des triterpènes (C₃₀), est formé grâce à l'association de deux molécules de FPP (Figure 20).

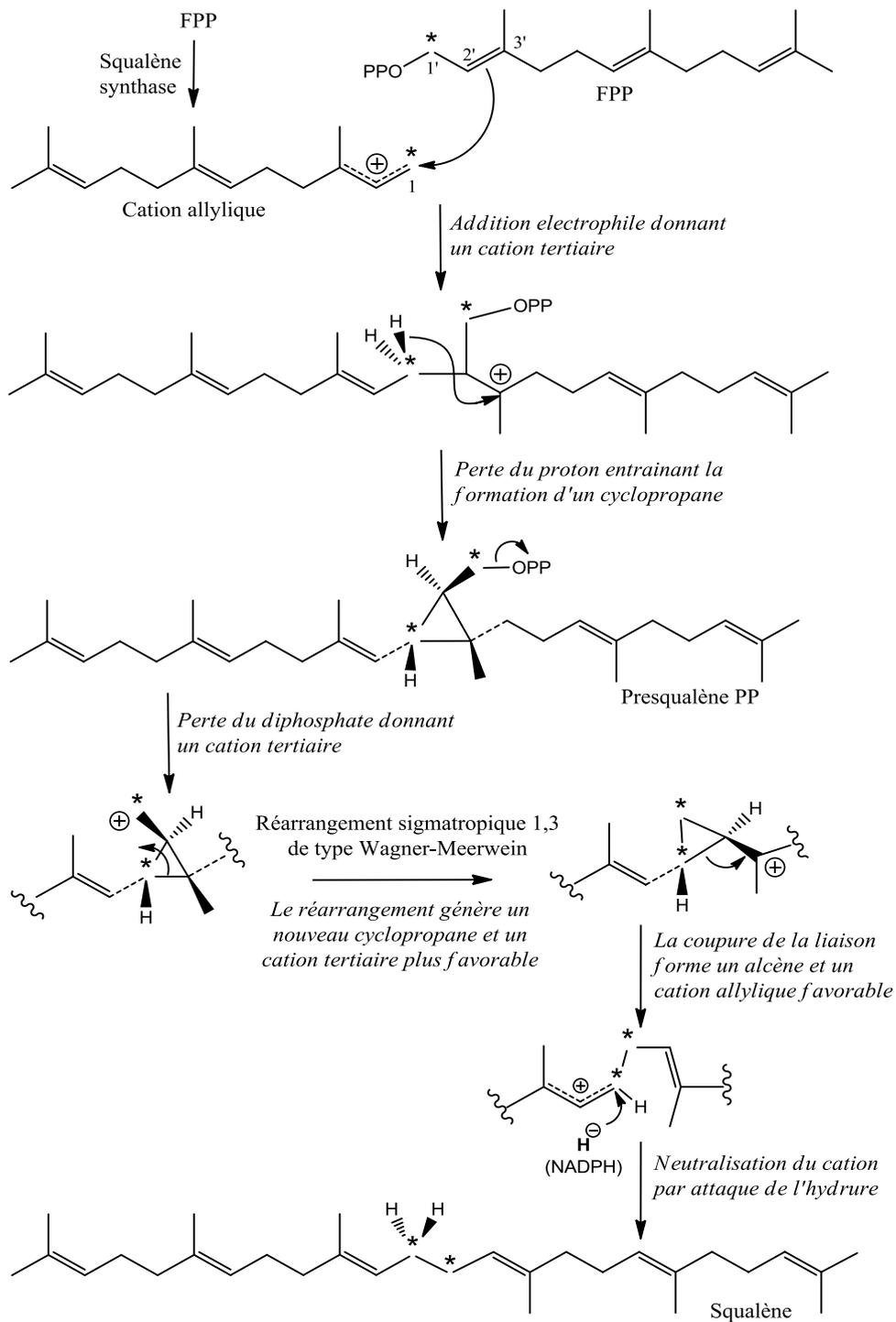


FIGURE 20 - FORMATION DU SQUALENE

Le squalène est ensuite oxydé en oxydosqualène, point de départ des différentes réactions de cyclisation.^{90,92} L'oxydosqualène est converti en dérivés cycliques grâce à la protonation et l'ouverture de l'époxyde, ce qui forme un carbocation et entraîne plusieurs réactions de cyclisation (Figure 21). Après ces cyclisations, divers réarrangements se produisent impliquant la formation de nouveaux carbocations. Enfin, les carbocations sont neutralisés par élimination d'un proton pour donner une double liaison ou un cyclopropane, ou par réaction avec l'eau pour donner un groupement hydroxy. La Figure 21 résume les principales réactions de cyclisation et réarrangement connues donnant les principales familles de génines impliquées dans la structure des saponines.

Selon le type de *cyclase* impliquée, la cyclisation de l'oxydosqualène peut se faire de deux manières, soit par la conformation « chaise-chaise-chaise », soit par la conformation « chaise-bateau-chaise », ce qui entraîne une différence importante au niveau de la stéréochimie. Une cyclisation en « chaise-chaise-chaise » va former le carbocation dammarényle, à l'origine des squelettes de type dammaranes, puis après divers réarrangements, des squelettes de type tirucallanes, lupanes, hopanes, oléananes, taraaxastéranes et ursanes. En revanche une cyclisation en « chaise-bateau-chaise » va former le carbocation protostéryle, à l'origine des squelettes de type cucurbitanes, cycloartanes, lanostanes et des stéroïdes.

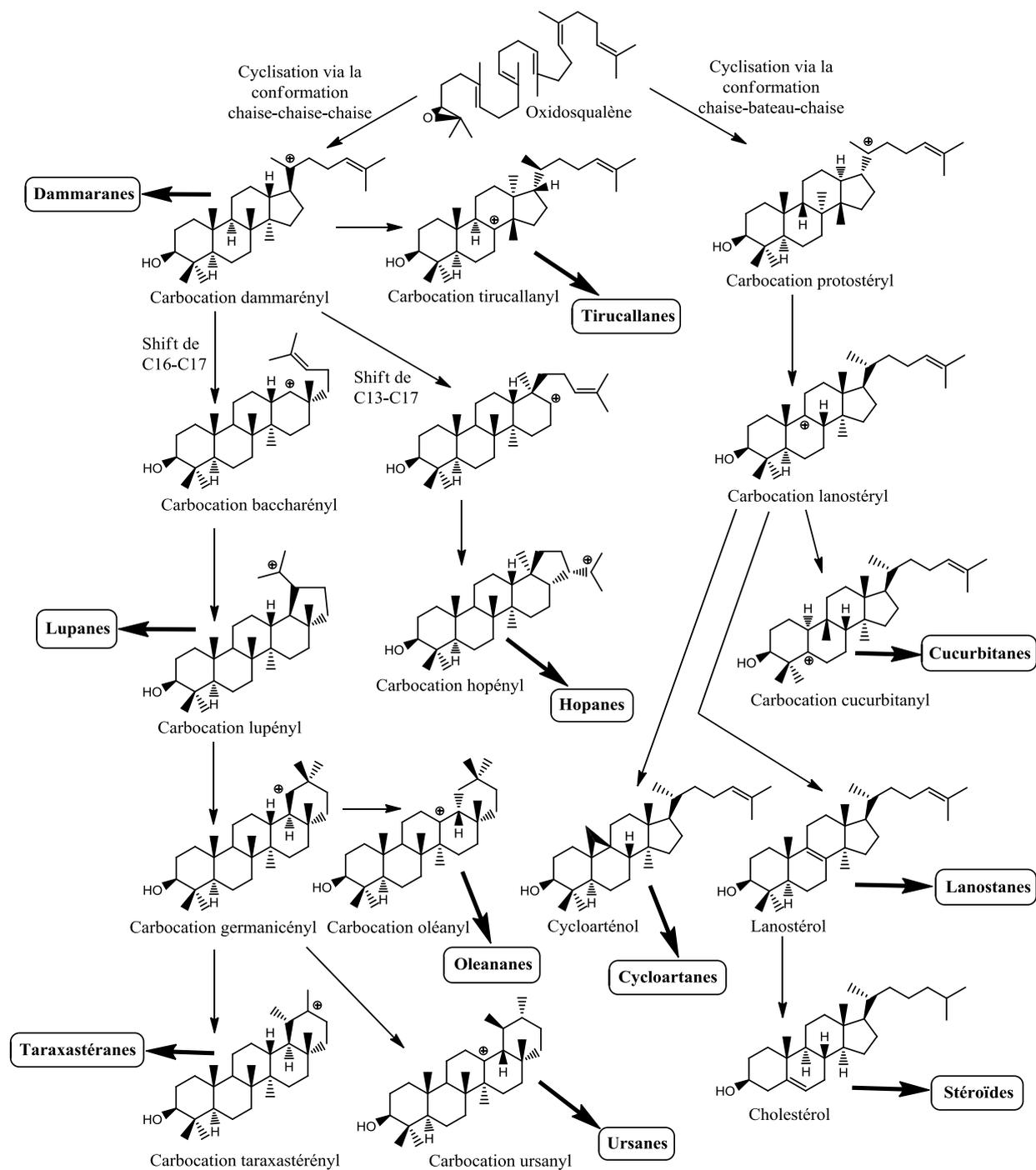


FIGURE 21 - LA CYCLISATION DE L'OXIDOSQUALÈNE À L'ORIGINE DES DIVERS SQUELÈTTES

IV.3.2. BIOSYNTHESE DES SUCRES ET GLYCOSYLATION DES GENINES

Les sucres sont des métabolites primaires, essentiels à la vie de chaque organisme. Chez les organismes photosynthétiques, ils sont les premiers composés à être produits par la photosynthèse et sont ainsi les plus abondants dans le monde vivant. Ils servent en premier lieu aussi bien de réserves de nourriture que d'éléments de structure, mais sont aussi à la base des métabolismes primaire et secondaire. Ils participent même fréquemment à la structure des métabolites secondaires. En effet, il n'est pas rare de rencontrer des métabolites secondaires glycosylés, comme les saponines.⁶⁶

L'élaboration des sucres par photosynthèse commence par la formation du glycéraldéhyde 3-phosphate à partir du CO₂ (Figure 22). C'est la condensation de ce sucre à 3 carbones et de son isomère la dihydroxyacétone 3-phosphate (suivie d'une série de déphosphorylations et d'isomérisations), qui est à l'origine de la formation des différents sucres (hexoses, pentoses...).

L'étape ultime de la biosynthèse des saponines est la glycosylation de la génine. Elle est réalisée grâce à des saponine-glycosyltransférases et à l'UTP, qui catalysent l'addition de monosaccharides sur la partie aglycone de la saponine, et l'allongement de la chaîne saccharidique.^{87,92}

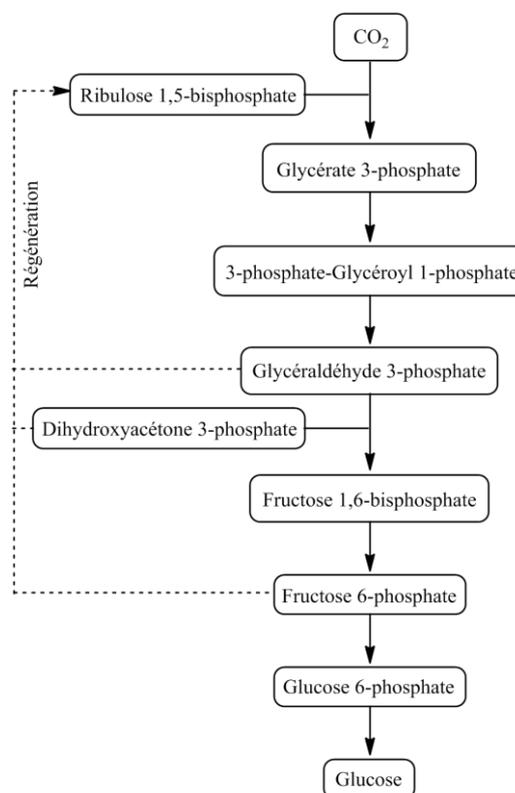


FIGURE 22 - EXEMPLE DE LA BIOSYNTHESE DU GLUCOSE

IV.4. DISTRIBUTION DES SAPONINES

IV.4.1. LES SAPONINES A GENINE TRITERPENIQUE

Elles sont de loin les plus nombreuses et sont essentiellement présentes chez les angiospermes dicotylédones (*Magnoliopsida*) : Araliacées, Astéracées, Caryophyllacées, Cucurbitacées, Fabales, Primulacées, Renonculacées, Rosacées, Sapindacées...^{24,93} Elles peuvent se retrouver chez quelques Ptéridophytes, Poacées et organismes marins^{94,95} mais elles sont pratiquement inexistantes chez les Gymnospermes.²⁴ Certains squelettes triterpéniques sont caractéristiques de certaines familles comme l'acide polygalacique, qui appartient à la famille des oléananes, est assez rare et principalement présent chez les Astérales et en particulier chez les Astéracées (*Bellis bernardii*, *Bellis perennis*, *Bellium bellidioides*, *Conyza blinii*, *Platycodon grandiflorum*...).^{52,96-99}

IV.4.2. LES SAPONINES A GENINE STEROÏDIQUE

Elles sont presque exclusivement présentes chez les angiospermes monocotylédones (*Liliopsida*) : Alliacées, Agavacées, Asparagacées, Dioscoreacées, Liliacées, mais également chez les Fabacées, les Solanacées, les Plantaginacées^{24,90,93} ou encore chez certains organismes marins.^{100,101}

IV.5. ROLE DES SAPONINES DANS LES PLANTES

Les métabolites secondaires sont généralement produits dans un but de défense et/ou de communication inter- et intra-espèces. Dans le cas des plantes, ils peuvent servir par exemple à l'attraction des pollinisateurs, la destruction ou l'inhibition des prédateurs, l'inhibition de la croissance d'autres espèces de plantes, ou encore de signal d'alerte au sein d'une même espèce...^{102,103}

Dans le cas de la défense contre les prédateurs, il existe deux grands types de métabolites de défense, les molécules formées pendant le développement de la plante, déjà présentes avant l'attaque et appelées « phytoanticipines », et les molécules induites par l'attaque d'un pathogène, appelées « phytoalexines ».¹⁰⁴ Ces deux mécanismes sont complémentaires. Cependant ce classement n'est pas fondé sur la structure de la molécule mais bien sur sa biosynthèse, une même molécule peut être une phytoanticipine dans une plante et une phytoalexine dans une autre, ou même être une phytoanticipine et une phytoalexine dans différents organes d'une même plante.

Le rôle physiologique des saponines dans les plantes n'est pas encore entièrement élucidé. Peu de publications décrivent leur fonction, cependant, de nombreuses saponines sont

connues pour être antimicrobiennes ou pour protéger les plantes des attaques d'insectes, elles sont donc considérées comme un système de défense.^{88,90} Elles sont en général produites pendant le développement de la plante et sont ainsi présentes avant toute attaque de pathogènes. Les saponines sont donc considérées comme des phytoanticipines. Elles peuvent être stockées dans les cellules végétales sous forme de précurseurs inactifs puis transformées par les enzymes de la plante en composés actifs en réponse à l'attaque d'un pathogène.

Certains facteurs environnementaux peuvent influencer la production de saponines, comme la quantité d'eau et de nutriments disponibles, le rayonnement lumineux...⁸⁷ De plus, la répartition des saponines peut être très différente d'un organe à l'autre ou d'une saison à l'autre. Ces variations peuvent être considérées comme une *anticipation* de la plante pour surmonter au mieux une éventuelle difficulté.

IV.6. PROPRIETES BIOLOGIQUES

La structure particulière des saponines leur confère de nombreuses activités biologiques. La bibliographie sur ce sujet étant très abondante, seules les activités biologiques les plus courantes sont décrites dans ce paragraphe.

IV.6.1. HEMOLYSE/PERMEABILISATION MEMBRANAIRE

Les saponines ont la capacité de rompre les érythrocytes. Cette propriété hémolytique est généralement attribuée à l'interaction entre les saponines et les stérols des membranes érythrocytaires. La membrane se rompt, causant un accroissement de la perméabilité et une perte en hémoglobine.^{93,105}

Cette activité a conduit au développement de tests hémolytiques pour détecter la présence de saponines dans les extraits de plantes.²⁴ Cependant, les saponines n'ayant pas toutes le même pouvoir hémolytique, il est difficile d'utiliser ce test pour une détection ou une quantification précise.

De manière générale, les saponines peuvent former des pores dans la plupart des membranes. Cependant, certains travaux montrent que l'interaction entre les saponines et les membranes biologiques pourraient être plus complexes.⁸⁸ Les deux modèles les plus courants sont expliqués dans la Figure 23. Tous les mécanismes ne sont pas encore élucidés mais la composition de la membrane ainsi que la structure des saponines influenceraient fortement cette activité. La structure de l'aglycone est bien évidemment importante, mais il faut également prendre en compte le nombre de chaînes de sucres liées à l'aglycone, leur longueur et la stéréochimie du sucre terminal de la chaîne, qui pourrait influencer la forme globale de la molécule.^{87,88}

L'activité hémolytique, et de manière plus générale la perméabilisation membranaire est donc caractéristique des saponines, mais de grandes différences d'activité sont constatées d'une saponine à l'autre.

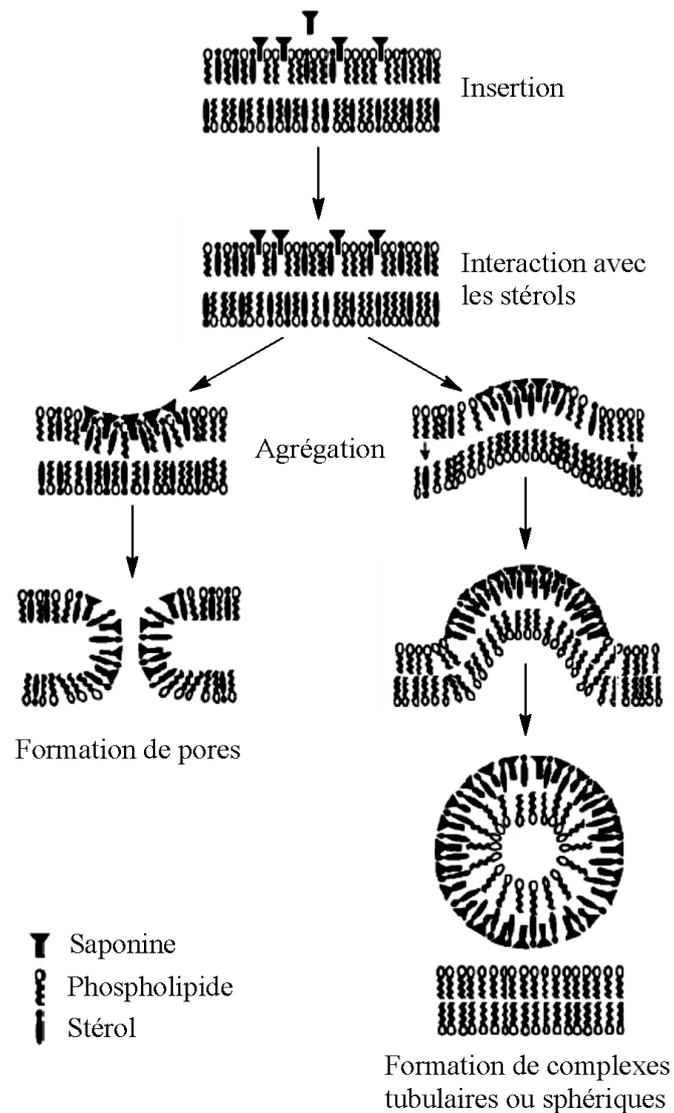


FIGURE 23 - MODELES PROPOSES POUR EXPLIQUER LA PERTURBATION DES MEMBRANES PAR LES SAPONINES

IV.6.2. CYTOTOXICITE ENVERS LES CELLULES CANCEREUSES

Le cancer étant l'une des premières causes de mortalité dans le monde, l'activité cytotoxique est probablement la plus testée actuellement. De nombreuses saponines ont montré une activité cytotoxique envers diverses lignées cellulaires cancéreuses. Les saponines pourraient inhiber la croissance de cellules tumorales en arrêtant leur cycle cellulaire ou en provoquant leur apoptose.^{106,107} Les mécanismes entraînant cette activité sont très complexes et variés, ils sembleraient cependant être indépendants de la capacité des saponines à rompre les membranes.⁸⁸

Le type de génine influencerait assez peu l'activité puisque les saponines sont tout aussi actives qu'elles soient de type triterpénique ou stéroïdique.^{106,108,109} En revanche, la partie osidique est importante. Le type de sucre, le site d'attache et la longueur de chaîne sont des facteurs influençant fortement l'activité cytotoxique.^{110,111} Le nombre et la position des hydroxy sur l'aglycone influenceraient également l'activité anti-cancéreuse ainsi que la toxicité envers les cellules saines.^{107,112}

IV.6.3. ACTIVITES ANTIFONGIQUE ET ANTIBACTERIENNE

Les saponines sont en général fortement antifongiques, et dans une moindre mesure antibactériennes. Le mécanisme le plus souvent proposé est l'interaction des saponines avec les stérols des membranes, tout comme dans le cas du pouvoir hémolytique.^{62,88} Mais l'activité peut être très différente d'une espèce de micro-organisme à l'autre et d'un type de saponine à l'autre. Outre la structure de l'aglycone, le nombre, le type et l'agencement des sucres influencent de manière très importante l'activité antifongique.^{93,113-115} Par exemple, 10 saponines stéroïdiques monodesmosidiques isolées de *Yucca elephantipes* ont été testées contre plusieurs champignons et bactéries, et seules 2 saponines spirostaniques se sont révélées actives contre les champignons *C. albicans* et *Cryptococcus neoformans*, mais inactives contre les bactéries *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Mycobacterium intracellulare*.¹¹³

IV.6.4. ACTIVITE ANTIVIRALE

Certaines saponines ont montré une capacité à désactiver des virus. L'Arganine C par exemple, ainsi que la Maesasaponine VI, des saponines triterpéniques, ont montré une activité contre le VIH.^{116,117}

IV.6.5. ACTIVITE MOLLUSCICIDE

Bien que les saponines soient très peu toxiques pour les animaux à sang chaud probablement à cause d'un très faible taux d'absorption, elles montrent une forte toxicité envers les animaux à sang froid et en particulier envers les mollusques⁹³. Elles ont ainsi été étudiées en tant que potentiels molluscicides dans le contrôle de la shistosomiase. La shistosomiase est une maladie parasitaire causant de graves problèmes digestifs et urogénitaux, qui touche plus de 250 millions de personnes dans les régions tropicales et subtropicales. La meilleure méthode pour lutter contre cette maladie est la prévention par la destruction des escargots hôtes.¹¹⁸ Les genres *Bulinus* et *Biomphalaria* en particulier, sont des hôtes intermédiaires dans le cycle de vie du shistosome. Plusieurs saponines ont montré une activité contre ces mollusques, comme par exemple certaines saponines d'*Agave decipiens* ou de *Solanum sisymbriifolium*.^{88,118,119}

IV.6.6. ANTIPARASITAIRE

Certaines saponines se sont révélées actives contre plusieurs protozoaires* tels que *Plasmodium falciparum*, *Leishmania infantum*, ou encore des espèces du genre *Giardia*.^{88,93} Cette propriété pourrait être exploitée dans le traitement d'infections à protozoaires.

D'autres saponines ont montré une activité prometteuse contre le nématode* *Meloydogyne javanica* ou la larve du papillon *Spodoptera littoralis* et pourraient être utilisées dans le développement de pesticides naturels.¹²⁰

IV.7. EXTRACTION, IDENTIFICATION ET DOSAGE DES SAPONINES

L'étude des saponines s'avère généralement très délicate, aussi bien au niveau de l'extraction et de la séparation que de l'identification structurale. En effet, les saponines sont souvent présentes dans les plantes sous forme de mélanges complexes.¹²¹ La polarité, la relative fragilité et les très faibles différences structurales entre les constituants de masse moléculaire importante font qu'il est souvent long et difficile d'obtenir une molécule pure et intacte. De plus, ces molécules cristallisent très mal, sont hygroscopiques et ne donnent que rarement des points de fusion nets et sans décomposition.²⁴

IV.7.1. EXTRACTION

Historiquement, l'extraction des saponines de la matière végétale était réalisée à chaud avec de l'eau ou des solutions hydro-alcooliques.^{47,96} Cependant la chaleur peut facilement détruire certaines fonctions labiles et créer des artefacts, les liaisons *O*-glycosidiques étant particulièrement fragiles.^{24,121} L'extraction doit donc se faire à froid pour obtenir un ensemble de saponines le plus intact possible.

Par la suite, l'extraction était habituellement suivie (après évaporation de l'alcool éventuel) d'une extraction liquide-liquide au butanol puis d'une précipitation par ajout d'éther ou d'acétone.^{96,122} Mais ce type de pré-purification n'est pas toujours total et ne permet pas d'extraire toutes les saponines, en particulier les plus polaires.^{24,121} Il peut être alors préférable de passer directement à une séparation sur phase solide.

IV.7.2. SEPARATION ET ISOLEMENT

La séparation des saponines est réalisée de manière classique grâce à des techniques chromatographiques (CCM, colonnes « ouvertes », HPLC préparative, flash chromatographie...) sur silice ou sur phases greffées comme la C18.²⁴

Mais l'isolement d'une saponine est rarement réalisé en une seule étape. Il est généralement nécessaire de recourir à une succession de séparations chromatographiques sur des supports différents pour parvenir à une purification correcte. Cette succession d'étapes oblige à utiliser de grandes quantités d'extraits car les pertes en saponines peuvent être importantes à chaque étape.

IV.7.3. CARACTERISATION

IV.7.3.1. PROPRIETES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES

Les premières méthodes de caractérisation des saponines se basaient sur leurs propriétés chimiques et biologiques, comme leur propriété moussante ou leur pouvoir hémolytique.

La capacité des saponines à provoquer la rupture des membranes érythrocytaires a conduit au développement de tests permettant de détecter leur présence dans une plante ou partie de plante et d'évaluer leur abondance en mettant cette propriété en évidence.^{24,123} Cependant, certaines substances tensio-actives non saponosidiques peuvent interférer et donner de faux positifs, et à l'inverse, certaines saponines ne sont que peu, voire pas hémolytiques ce qui entraîne une absence de détection. De manière générale, le pouvoir hémolytique des saponines est fortement dépendant de leur structure, ainsi ce test ne peut être utilisé que pour une évaluation préliminaire et doit être complété par d'autres tests.

Les saponines ont également la capacité à former une mousse stable en milieu aqueux. L'indice de mousse a ainsi été défini. Il représente le degré de dilution d'un décocté aqueux de la plante ou partie de plante (réalisé dans des conditions définies) qui donne une mousse persistante après une forte agitation et un temps défini.²⁴ Cependant, certaines saponines, notamment des bi- et tridesmosides, ne forment pas de mousse stable, et à l'inverse, quelques extraits végétaux, dépourvus de saponines, peuvent mousser après agitation. De ce fait, ce test peut compléter le précédent mais ne peut être utilisé que pour une évaluation préliminaire.

IV.7.3.2. REACTIONS COLOREES

La caractérisation des saponines peut faire intervenir des réactions colorées, en particulier pour révéler les CCM. Bien qu'aucune ne soit strictement spécifique, il est toutefois possible de mettre en œuvre l'une des réactions suivantes (liste non exhaustive) :

- ✓ avec l'anhydride acétique en milieu sulfurique (réaction de Liebermann). Les colorations sont différentes selon le type de génine (triterpénique : rose à rouge, ou stéroïdique : bleu-vert) ;
- ✓ avec la vanilline, l'aldéhyde anisique et d'autres aldéhydes aromatiques en milieu acide minéral fort. Il se forme des produits fortement colorés ;
- ✓ avec le trichlorure d'antimoine en milieu anhydride acétique ;
- ✓ avec l'acide phosphotungstique ;
- ✓ avec le sulfate de cérium en milieu sulfurique.^{24,123}

IV.7.3.3. ETUDE STRUCTURALE

L'étude des structures des saponines passe par diverses techniques, qu'elles soient chromatographiques, spectroscopiques ou chimiques. La CCM (ou l'HPTLC) peut être utilisée associée aux réactions colorées ci-dessus, mais cette technique apporte peu d'informations structurales (génine triterpénique ou stéroïdique). La chromatographie liquide (HPLC par exemple) peut être associée à l'UV, mais les saponines possèdent très rarement un chromophore notable, elles sont donc détectées à de courtes longueurs d'onde (200-220 nm) non spécifiques. Les meilleures techniques de caractérisation sont la spectrométrie de masse et la RMN, techniques s'étant développées très rapidement ces dernières années. La spectrométrie de masse haute résolution va permettre d'accéder à la masse exacte de la saponine et donc à sa formule brute, mais aussi au nombre, à la nature et à l'enchaînement des sucres. La RMN 1D et 2D permet quant à elle d'accéder à la structure globale de la molécule, à sa configuration relative et à la configuration anomérique des sucres, cependant un instrument suffisamment puissant est nécessaire. Ces techniques sont généralement complétées par la mesure du pouvoir rotatoire, l'acquisition du spectre infrarouge, et par l'hydrolyse (alcaline ou acide) des sucres liés à la génine, combinée à une étude chromatographique (CCM, HPLC, GC...) afin de confirmer la nature des sucres mais également d'accéder à la configuration absolue de ces derniers (colonnes chirales, formation de diastéréoisomères...).

IV.7.4. LE DOSAGE

Les saponines peuvent être dosées par différentes techniques. L'HPLC est la méthode la plus courante, mais les saponines absorbent généralement peu en UV.¹²³ Il est donc nécessaire de recourir à d'autres détecteurs, comme la spectrométrie de masse ou encore le détecteur évaporatif à diffusion de lumière.^{124,125} L'HPTLC est également un outil adapté, de plus en plus utilisé pour le dosage de composés, en général en association avec un densitomètre.¹²⁶

Le dosage des saponines reste cependant délicat en raison de l'absence de standards purs dans le commerce et de la difficulté à les purifier en quantité suffisante pour réaliser une gamme étalon.¹²¹

IV.8. APPLICATIONS DANS L'INDUSTRIE



Plus de 6000 brevets sont répertoriés sur les saponines (source SciFinder, 2012), qu'elles soient utilisées pures¹²⁷ ou dans des extraits naturels.¹²⁸ Elles sont utilisées dans de nombreux domaines, de la cosmétique à l'industrie pharmaceutique,¹²⁹ en passant par l'agroalimentaire¹³⁰ et l'industrie phytosanitaire.¹³¹

Certains produits à base de saponines sont commercialisés. Le Canada, par exemple, a autorisé en 2011 la commercialisation d'un produit phytosanitaire à base de saponines de *Chenopodium quinoa* permettant de lutter contre le rhizoctone brun (maladie cryptogamique causée par le champignon *Rhizoctonia solani*) sur les pommes de terre de semence, en tant que bio-pesticide. De plus les saponines sont souvent utilisées en tant qu'adjuvant dans des vaccins pour animaux, pour stimuler la réponse immunitaire.¹³² Par ailleurs, les noix de lavage, fruits de *Sapindus Mukorossi*, sont utilisées et commercialisées en tant que lessive naturelle depuis longtemps.

CHAPITRE V - L'ÉTUDE DES PRODUITS NATURELS

Différentes stratégies et techniques utilisées pour l'étude des produits naturels sont rassemblées dans ce chapitre. Elles doivent être choisies en fonction de l'objectif de l'étude et du type de matrice étudiée. Les techniques qui ont été utilisées lors de ces travaux de thèse seront davantage détaillées.

V.1. CHOIX DES PLANTES

Deux approches différentes peuvent initier une étude de produits naturels. D'une part la valorisation d'une ou plusieurs plantes (plantes d'une région précise par exemple), d'autre part le besoin d'actifs pour une application particulière. Dans le premier cas, la ou les plantes sont testées pour de nombreuses applications. Dans le second, de nombreuses plantes sont testées pour une application précise.

Cependant dans les deux cas, des stratégies sont employées pour cibler les travaux, telles que des recherches bibliographiques approfondies sur les activités visées ou sur les plantes/molécules ciblées, ainsi que des recherches ethnopharmacologiques, sur l'utilisation des plantes par les populations en médecine traditionnelle.

V.2. TECHNIQUES D'EXTRACTION

Il existe deux types principaux d'extraction, l'extraction par solvant (organique et/ou aqueux) et les techniques de distillation par la vapeur.

L'extraction par solvant regroupe les extractions liquide-liquide et solide-liquide comme la macération, l'infusion, la décoction, la percolation, le soxhlet... Certaines de ces pratiques sont parfois assistées par des techniques modernes d'activation comme les ultrasons, les micro-ondes, le contrôle de la pression et de la température (ASE, extraction par fluides supercritiques)...¹³³ L'extraction par solvant permet *principalement* l'extraction de composés non volatils, même si certaines techniques permettent d'obtenir également de nombreux composés volatils et semi-volatils. Le choix du type et du nombre de solvants, ainsi que du type de technique à utiliser dépend de l'objectif de l'étude.

Les techniques de distillation par la vapeur regroupent principalement l'entraînement à la vapeur et l'hydrodistillation. Elles peuvent également être assistées par des techniques modernes, comme les micro-ondes.¹³⁴ Elles sont utilisées pour obtenir des huiles essentielles, principalement constituées de composés volatils.

Le monde de la recherche et de l'industrie étant de plus en plus attentif aux problèmes de pollution environnementale et de santé publique, des protocoles et des solvants moins polluants et moins dangereux ont été développés. La « chimie verte » est ainsi de plus en plus présente de nos jours. L'extraction par solvant étant très consommatrice en solvants organiques et largement utilisée dans l'industrie, des solutions alternatives sont peu à peu mises en place.

Hormis les extractions sans solvant, l'eau est l'alternative la plus écologique.^{135,136} Elle permet d'extraire les composés les plus polaires, mais ne peut pas être utilisée pour toutes les applications. L'ajout d'un solvant moins polaire et peu polluant comme l'éthanol permet davantage de possibilités. D'autres solvants compatibles avec la chimie verte peuvent également être utilisés comme les fluides supercritiques (CO₂...), les agrosolvants (éthanol, terpènes...), ou encore les solvants fluorés et les liquides ioniques. Chaque alternative a cependant ses inconvénients, il est de ce fait nécessaire de poursuivre la recherche de nouveaux solvants et procédés d'extraction éco-compatibles.

V.2.1. CAS PARTICULIER DE LA MACERATION ASSISTEE PAR ULTRASONS

L'extraction d'une matrice végétale par un solvant est un procédé simple à mettre en œuvre. La plante est mise en contact avec le solvant et l'extraction se déroule alors en trois étapes successives. Tout d'abord le solvant doit diffuser à travers les membranes cellulaires, puis solubiliser les métabolites contenus dans ces cellules et enfin ressortir des cellules enrichi en métabolites. Cette extraction est généralement facilitée par le broyage de la plante, qui détruit une partie des cellules et augmente la surface de contact. L'extrait est alors obtenu après filtration et évaporation du solvant. Le ou les solvants utilisés doivent être choisis en fonction du type de matrice et du type de composés ciblés. Cette technique est cependant longue et consommatrice de solvant.

La macération assistée par ultrasons est une méthode de macération modifiée dans laquelle l'extraction est facilitée par l'utilisation d'ultrasons (impulsions à haute fréquence). La plante sous forme de poudre est mélangée au solvant et placée dans un flacon, le flacon est placé dans le bain à ultrasons et les ultrasons sont utilisés pour induire un stress mécanique sur les cellules à travers la production de bulles de cavitations dans l'échantillon.¹³⁷ La rupture cellulaire augmente la solubilisation des métabolites dans le solvant et améliore ainsi le rendement d'extraction. L'efficacité de l'extraction dépend de la fréquence de l'instrument, de la durée et de la température de sonication. Elle est communément utilisée pour faciliter l'extraction des métabolites intracellulaires des cellules de plante, en particulier lorsque l'eau, diffusant difficilement dans les cellules, est utilisée comme solvant d'extraction.¹³⁸ C'est ainsi

une technique plus rapide et plus efficace que la macération classique, malgré certains inconvénients comme la pollution sonore et la consommation en énergie.

V.2.2. CAS PARTICULIER DE L'EXTRACTION PAR CO₂ SUPERCRITIQUE

Dans la course aux procédés d'extraction moins polluants, l'extraction par un fluide supercritique s'est révélée être une excellente alternative aux solvants organiques de type hexane, chloroforme ou autres, en particulier dans le domaine des arômes et parfums. C'est une technique relativement couteuse mais beaucoup moins polluante et toxique que les solvants organiques.¹³⁹

Les fluides supercritiques possèdent des propriétés inhabituelles qui les rendent très utiles aussi bien pour l'extraction et la séparation que pour la synthèse organique. Une substance entre en phase supercritique lorsque les conditions passent au-delà de sa température et de sa pression critique.¹³⁶ Dans ces conditions la substance se maintient en équilibre gaz-liquide.¹³⁹ Ce fluide est proche d'un liquide dense mais possède les propriétés pénétrantes d'un gaz, ce qui en fait un solvant d'extraction très efficace. De plus, les problèmes d'oxydation ou de dégradation thermique de certains composés sont beaucoup moins importants avec l'utilisation de ces fluides.

Le fluide supercritique le plus utilisé est le CO₂ mais d'autres substances peuvent être utilisées comme l'éthane, le butane, le pentane, ou encore l'eau. L'exemple le plus connu d'utilisation des fluides supercritiques dans l'extraction des produits naturels est certainement l'extraction sélective de la caféine contenue dans le café.^{139,140}

V.3. TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT ET D'ISOLEMENT

Un extrait brut peut être constitué d'un très grand nombre de composés. Il est donc nécessaire d'utiliser des techniques de fractionnement pour isoler les différents constituants de ce mélange. L'extrait doit tout d'abord être séparé en plusieurs fractions. Ce fractionnement peut s'opérer par extraction liquide-liquide ou plus communément par chromatographie sur phase solide. Plusieurs procédés peuvent alors être mis en place, comme la chromatographie sur colonne ouverte, la chromatographie sous vide, la chromatographie liquide à moyenne pression, la flash-chromatographie... Plusieurs phases peuvent également être utilisées en fonction du type de composés ciblés, comme la silice (phase normale), la silice greffée C18 (phase inverse), l'exclusion stérique, ainsi que d'autres phases plus spécifiques.

D'autres fractionnements plus fins, doivent ensuite être effectués. Ces étapes d'isolement peuvent à nouveau être réalisées sur colonne ouverte ou autre, mais la plupart du temps, des techniques plus modernes et plus précises sont utilisées, comme l'HPLC préparative ou semi-préparative, avec une détection en ligne par UV.

V.3.1. CAS PARTICULIER DE LA CHROMATOGRAPHIE SOUS VIDE

La chromatographie sous vide diffère peu de la chromatographie classique. Les mêmes phases stationnaires sont utilisées et un gradient de solvant est appliqué par étapes lorsque la phase stationnaire est de type silice (phase normale ou phase inverse). En revanche, l'élution par gravité (colonne ouverte...) ou par pression positive (flash chromatographie, MPLC...) est remplacée par l'application d'un vide en fin de colonne (Figure 24).¹⁴¹ Il peut être difficile de contrôler le débit de solvant, mais ce dispositif est cependant très utilisé dans le domaine des produits naturels pour réaliser le premier fractionnement de l'extrait brut.

Ce système peut également être utilisé avec des cartouches d'extraction sur phase solide pré-remplies (SPE), disponibles en plusieurs tailles et avec différents types de phases. Elles sont parfaitement adaptées pour le développement de méthode ou la préparation d'échantillons à petite échelle.

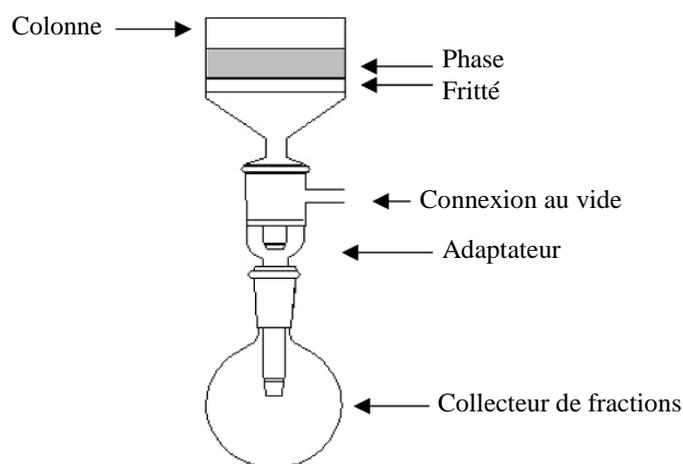


FIGURE 24 - PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE SOUS VIDE¹⁴¹

V.3.2. CAS PARTICULIER DE L'HPLC PREPARATIVE

Le détail sur le fonctionnement de l'HPLC est expliqué dans le paragraphe V.5.1 p. 68.

L'HPLC préparative représente l'une des principales techniques d'isolement des produits naturels. La différence majeure avec les autres techniques de chromatographie est la taille des particules de la phase stationnaire.¹⁴² En effet, elle est essentielle pour la séparation d'un mélange, plus les particules seront fines et meilleure sera la séparation. En HPLC, la taille des particules se situe entre 2 et 10 μm contre 60 μm environ en chromatographie basse pression. De plus les particules sont beaucoup plus sphériques et homogènes, ce qui permet d'obtenir des colonnes remplies de manière uniforme et reproductible. Cependant une pression importante doit être appliquée pour éluer le solvant à travers la colonne, ce qui nécessite un appareillage performant doté de pompes puissantes.

Différents types de colonne sont disponibles en fonction de la nature des composés à purifier (phases normales, phases inverses, échange d'ion...). La taille des colonnes doit également être choisie, en fonction de la quantité de composé pur requise. Pour isoler quelques centaines de microgrammes, une colonne de type analytique (diamètre interne 4,6 mm) est suffisante. En revanche si quelques milligrammes sont requis, pour réaliser différentes expériences de caractérisation par exemple, il est nécessaire de choisir une colonne de type semi-préparative (diamètre interne 10 mm), adaptable sur des systèmes HPLC analytiques. Enfin si une plus grande quantité est nécessaire, un système HPLC préparatif ainsi qu'une colonne de diamètre bien plus important doivent être utilisés.

Les solvants classiquement utilisés pour un isolement par HPLC préparative en phase inverse sont l'eau, le méthanol, l'acétonitrile et l'isopropanol, acidifiés ou non.

Dans tous les cas, l'isolement par HPLC préparative est toujours guidé par un détecteur, généralement un détecteur UV, ce qui permet de suivre l'élution des composés et de les récolter avec précision. Pour les composés n'absorbant pas en UV (assez rare), un système de split vers un autre détecteur (ELSD par exemple) peut être mis en place.

La mise au point du gradient se faisant généralement sur des colonnes analytiques avant d'utiliser les colonnes préparatives ou semi-préparatives, le débit adapté à la colonne peut être calculé en utilisant l'équation suivant : $F = \frac{L_p \times A_p}{L_a \times A_a}$ où L est la longueur de la colonne, A l'aire de la section de la colonne, pour p la colonne préparative et a la colonne analytique. Le débit en analytique doit être multiplié par le facteur F .¹⁴² Il est cependant souvent nécessaire d'ajuster cette valeur afin de rester dans une gamme de pressions acceptable, elle peut par exemple devenir trop grande lorsque les deux paramètres de longueur et d'aire sont modifiés.

V.4. STRATEGIES POUR LA DECOUVERTE D'ACTIFS

Plusieurs stratégies peuvent être mises en place pour monitorer la recherche de nouveaux actifs et ainsi gagner du temps par rapport à une recherche empirique.

Chaque étape de l'étude est toujours suivie par des analyses chromatographiques, elle peut cependant être suivie par d'autres techniques comme par exemple des tests biologiques (Figure 25), c'est l'approche *bioguidée*. Elle permet de sélectionner les extraits et fractions les plus actifs en laissant de côté ceux n'ayant pas montré d'activité, ce qui permet d'identifier rapidement les composés actifs.

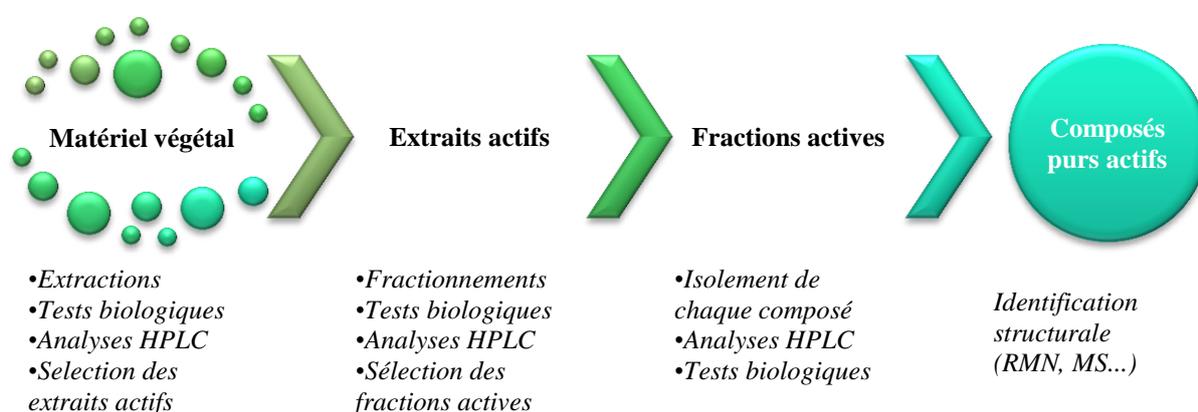


FIGURE 25 - UN EXEMPLE DE STRATEGIE POUR LA RECHERCHE DE NOUVEAUX ACTIFS : L'APPROCHE BIOGUIDEE

Cette stratégie possède cependant certains inconvénients. D'une part les tests peuvent parfois donner de faux positifs, en particulier lorsque ceux-ci sont basés sur des enzymes ou des récepteurs,¹ ce qui entraîne une perte de temps puisque l'opérateur est envoyé sur une fausse piste. D'autre part, les tests sur les extraits bruts peuvent à l'inverse être négatifs, alors que ces extraits possèdent des composés actifs, mais en trop faible proportion pour que l'activité soit détectée. Le fractionnement bioguidé est de ce fait une technique pratique et efficace, mais qui doit être utilisée avec précautions.

Il existe d'autres stratégies complémentaires comme le suivi *structure-guidé*. Cette technique peut être très efficace lorsque la famille de molécules ciblées est connue. En effet les étapes d'extraction, fractionnement et isolement peuvent être suivies par des techniques spectroscopiques comme la RMN ou la spectrométrie de masse afin de sélectionner les extraits/fractions contenant un type de fonction chimique bien particulière.

V.5. TECHNIQUES D'ANALYSE

V.5.1. L'HPLC

L'HPLC est une technique de choix pour l'analyse des produits naturels, particulièrement pour les composés non volatils. Comme expliqué précédemment, elle dérive de la chromatographie sur colonne ouverte dont les performances, en termes de sélectivité et de résolution, se sont trouvées grandement améliorées par la miniaturisation et l'utilisation de phases stationnaires très élaborées.¹⁴³

De plus différents types de séparations peuvent être effectués en HPLC grâce à la grande variété de colonnes disponibles, comme la chromatographie de partage sur phase polaire ou apolaire, la chromatographie d'adsorption, d'exclusion stérique, d'échange d'ion...

Les phases étant constituées de microparticules sphériques dont le diamètre est compris entre 2 et 10 μm , une forte pression doit être exercée sur la phase mobile pour obtenir un débit convenable (50-350 bars). Un appareillage adapté est donc utilisé (Figure 26), composé de plusieurs modules spécialisés, reliés entre eux par des tubulures de très faible diamètre (< 0,1 mm).

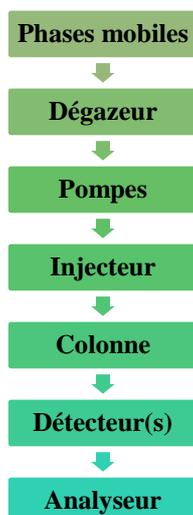


FIGURE 26 - SCHEMA D'UNE INSTALLATION HPLC

Les phases mobiles sont des solvants de qualité HPLC, les plus utilisés sont l'eau, le méthanol, l'acétonitrile et l'isopropanol. Ils sont particulièrement adaptés pour des analyses en phase inverse, le type de chromatographie le plus courant en HPLC.

Le dégazeur est essentiel pour s'assurer de l'absence de bulles dans le système, qui pourraient perturber les analyses et endommager les colonnes.

La ou les pompes sont conçues pour maintenir un débit stable. Elles sont généralement associées à un mélangeur pour réaliser des gradients de solvants.

L'injection d'un volume précis de l'échantillon en tête de colonne doit se faire en un temps bref afin de perturber le moins possible la circulation de la phase mobile. Une vanne haute pression à plusieurs voies est ainsi placée juste avant la colonne. Elle peut être motorisée dans le cas d'un injecteur automatique. Elle fonctionne en deux temps, le chargement à pression atmosphérique, dans une boucle indépendante, d'un volume précis, puis l'injection dans le flux de phase mobile.

Les types et tailles de colonnes sont très variés. Les colonnes analytiques les plus classiques possèdent un diamètre interne de 4,6 mm et une longueur de 150 ou 250 mm. Cependant elles tendent de plus en plus vers la miniaturisation avec l'amélioration des performances des phases stationnaires (granulométrie de plus en plus faible et de meilleure qualité). Les phases à base de silice sont les plus utilisées mais généralement avec un greffage, la phase normale classique est en effet trop fragile, peu efficace et peu reproductible en HPLC. C'est donc la phase inverse la plus utilisée en HPLC (C18, C8..., pouvant être modifiée par l'ajout de divers groupements). Ceci dit, il existe des phases adaptées pour la séparation des composés les plus polaires, comme les phases HILIC (*Hydrophilic Interaction Chromatography*) à base de silice greffée avec des groupements polaires, donc utilisables avec les solvants de la phase inverse.

La chromatographie de partage sur phase apolaire met en jeu deux mécanismes de rétention, la rétention réversible du soluté sur les chaînes alkyles dû à l'effet hydrophobe et la fixation du solvant organique de la phase mobile sur les chaînes alkyles, ce qui entraîne un partage des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire liquide adsorbée.¹⁴⁴

Les modes de détection reposent généralement sur les propriétés optiques des analytes (absorption, fluorescence, indice de réfraction). Les principaux détecteurs sont ainsi les détecteurs UV-visible, spectrofluorimétrique, réfractométrique, à diffusion de lumière, mais l'HPLC peut également être couplée à la spectrométrie de masse ou encore à la RMN.

Ces dernières années l'UPLC (ultra-haute performance) a fait son apparition. Le principe reste le même que l'HPLC mais avec un système adapté à des pressions bien plus importantes puisque les particules des phases stationnaires possèdent une taille inférieure à 2 µm de diamètre. Ceci entraîne un temps d'analyse beaucoup plus court et une résolution bien meilleure. Cependant c'est un système uniquement analytique, il n'est pas adapté à la purification d'échantillon.

Le détecteur UV

Les détecteurs UV sont généralement équipés d'une lampe au deutérium qui émet une lumière de longueur d'onde comprise entre 190 et 400 nm. Le faisceau lumineux passe à travers une cellule connectée à la colonne et l'intensité lumineuse est mesurée par une diode. Les signaux de celle-ci et d'une diode de référence mesurant l'intensité lumineuse initiale, sont ensuite convertis en absorbance.¹⁴⁵

La détection est basée sur la loi de Beer-Lambert, l'absorbance de la phase mobile est mesurée en sortie de colonne, à la longueur d'onde λ ou à plusieurs longueurs d'onde dans l'UV ou dans le visible. La phase mobile ne doit pas ou très peu absorber par elle-même. L'intensité de l'absorption du composé dépend du coefficient d'absorption molaire, ce qui rend impossible l'estimation de sa teneur sans étalonnage.¹⁴³ La détection UV-visible correspond donc à une détection sélective. Pour les composés n'ayant pas de spectre d'absorption exploitable, il est possible de faire appel à la dérivation post-colonne des analytes.

Il existe différents types de spectrophotomètres UV-visible, les monochromatiques et les détecteurs à barrette de diodes, permettant un balayage de toutes les longueurs d'onde. Ce dernier permet non seulement d'obtenir un chromatogramme, mais il fournit également des renseignements spectraux pouvant servir à s'assurer de l'identité des composés séparés.

Le détecteur ELSD

Le détecteur à diffusion de lumière répond en fonction de la quantité détectée, ce qui peut être considéré comme une détection indépendante de la structure chimique. La réponse universelle de l'ELSD permet ainsi d'avoir une mesure rapide et fiable de la quantité et de la pureté d'un analyte sous certaines conditions.¹⁴⁶ Elle dépend de la détection de la diffusion de la lumière par les particules d'analytes formées par la nébulisation et l'évaporation de la phase mobile. Mais la réponse d'un composé n'est pas strictement indépendante de la structure, elle est affectée par des propriétés physico-chimiques comme la volatilité. Les composés volatils sont en effet évaporés avec la phase mobile et ne sont donc pas détectés. L'ELSD doit donc être considéré comme un détecteur universel uniquement pour les analytes moins volatils que la phase mobile. Cependant, d'autres facteurs sont importants à prendre en compte pour effectuer une quantification la plus juste possible comme la réponse non-linéaire de l'ELSD et la variation de la réponse avec la composition de la phase mobile. En effet la sensibilité et la linéarité de la réponse dépendent de la taille, de la forme et du nombre de particules formées pendant la nébulisation et l'évaporation. Tous les facteurs influençant ces paramètres affectent le taux de lumière diffusée et par conséquent le signal obtenu.

Le signal de l'ELSD est ainsi de type puissance avec une courte zone linéaire. C'est une conséquence de la concentration en analytes, influençant la taille des particules et donc la diffusion de la lumière. De plus, la réponse pour une quantité d'analytes donnée augmente avec la proportion de solvant organique dans la phase mobile, en effet l'augmentation de la proportion en solvant organique augmente l'efficacité du transport du nébuliseur. Bien que la taille des particules moyenne reste constante, un plus grand nombre de particules atteint la chambre de détection, ce qui augmente le signal. Pendant le gradient de la chromatographie, la composition de la phase mobile évolue constamment, ainsi la réponse de l'ELSD change également. Par conséquent, le chromatogramme montre une augmentation de la réponse pour des quantités équivalentes d'analytes. La réponse à travers le gradient peut augmenter jusqu'à plus de dix fois à cause de ce changement de phase mobile, ce qui peut entraîner des erreurs significatives dans l'estimation de la quantité et de la pureté par HPLC-ELSD. Tous les ELSD disponibles dans le commerce montrent ce comportement puisque rien ne peut contrôler la création des particules pendant la nébulisation et l'évaporation.

Une quantification précise avec un gradient requiert donc un étalonnage pour éliminer les effets de la réponse non linéaire en fonction de la concentration et de la variation de la réponse avec la composition de la phase mobile.

Le Spectromètre de Masse

La spectrométrie de masse permet d'accéder à la masse de l'analyte et parfois à celle de ses fragments, ce qui est une information capitale dans l'étude des produits naturels.

Comme tout spectromètre de masse, celui couplé à l'HPLC est constitué d'une source, d'un analyseur et d'un détecteur. La difficulté principale de ce couplage est de concilier le flux de l'HPLC avec le vide poussé du spectromètre de masse. Pour cela des sources d'ionisation adaptées ont été développées.

La source consiste à vaporiser les molécules et à les ioniser. Une source d'ionisation peut être utilisée en mode positif pour l'étude des ions positifs, ou en mode négatif pour étudier les ions négatifs. Plusieurs types de sources existent et sont utilisées en fonction du résultat recherché et des molécules analysées (ESI, APCI, FAB, MALDI...).

Dans le cas de l'ionisation par électrospray (ESI), l'éluant pénètre dans la source par un capillaire en sortie de colonne. Un champ électrique intense est appliqué à la sortie du capillaire provoquant la formation de gouttelettes chargées. Le solvant de celles-ci est ensuite évaporé par un flux d'azote, ce qui a pour conséquence de diminuer la taille des gouttelettes et entraîne des répulsions électrostatiques de plus en plus fortes, amenant à l'explosion des

gouttelettes jusqu'à obtenir des ions désolvatés. Une contre électrode et des optiques de transfert d'ions permettent alors de les diriger vers l'analyseur.

L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) est une extension de l'ESI. Dans ce cas, l'ionisation se fait en phase gazeuse, l'échantillon en solution est nébulisé en fines gouttelettes qui sont vaporisées dans un tube à haute température. Les ions sont produits par une décharge corona et sont ensuite dirigés vers l'analyseur.

L'analyseur sépare les ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Il existe différents types d'analyseur, à basse ou haute résolution, comme la trappe à ions, le quadripôle, le temps de vol (TOF)... Ces analyseurs peuvent être couplés entre eux pour réaliser des expériences de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). En général, un premier analyseur sépare les ions, une cellule de collision permet de fragmenter les ions, et un second analyseur sépare les ions fragments. Certains analyseurs, comme la trappe à ions, permettent de fragmenter les ions et d'analyser les fragments directement. Les analyseurs à haute résolution permettent d'accéder à la masse exacte des analytes, et ainsi à leur formule brute.

Enfin, le détecteur transforme les ions en signal électrique. Plus les ions sont nombreux, plus le courant est important. De plus, le détecteur amplifie le signal obtenu pour qu'il puisse être traité informatiquement. Les résultats sont présentés au moyen d'un graph appelé spectre de masse, sur lequel figurent les abondances des ions formés classés par ordre croissant de leur rapport m/z .

V.5.2. L'HPTLC

Ces dernières années, avec le retour de l'utilisation des produits naturels, les besoins d'outils adaptés pour le contrôle du matériel botanique sont de plus en plus importants. L'HPTLC (chromatographie sur couche mince haute performance) est alors apparue comme une technique polyvalente, rapide et peu coûteuse, particulièrement adaptée pour l'expertise de la qualité et de l'identité du matériel botanique.¹⁴⁷

La CCM peut être perçue comme une technique familière et obsolète par rapport à l'HPLC, mais il n'en est rien. La CCM a toujours été très utile pour l'étude des produits naturels et avec les améliorations technologiques mises au point récemment, elle est devenue une technique très précise.

L'HPTLC est basée sur le principe de la chromatographie planaire, la phase stationnaire est ici une plaque et non une colonne. La rétention ne s'exprime alors plus en temps mais en distance. Contrairement à l'HPLC où tous les modules sont reliés, l'HPTLC est constituée de plusieurs modules indépendants les uns des autres mais gérés par le même logiciel

informatique. La première étape est le dépôt, un module d'injection automatique dépose les différents *spots* sur la plaque. Ensuite le module de développement est une chambre dans laquelle les conditions d'humidité et de saturation en solvants sont contrôlées. De très nombreux systèmes de solvants peuvent être utilisés en fonction du type de composés à développer. La plaque est fixée dans la partie supérieure et est amenée automatiquement au contact du solvant dans la cuve lorsque les conditions sont atteintes. Une étape de dérivation peut être réalisée avant le développement mais elle s'effectue le plus souvent après, elle est couramment nommée la révélation. La révélation se fait par immersion rapide de la plaque dans le révélateur choisi. De nombreux révélateurs peuvent être utilisés, qu'ils soient universels ou spécifiques d'une famille de molécules en particulier. La détection en UV et/ou visible peut être réalisée après chaque étape dans le module de visualisation, pour un simple contrôle du travail ou pour réaliser l'acquisition des données. Des photos de la plaque peuvent alors être réalisées en lumière visible et à certaines longueurs d'onde UV. Enfin un module particulier appelé le densitomètre permet la quantification des composés développés grâce à l'acquisition des spectres UV de chaque tâche. Un densitogramme, similaire à un chromatogramme, est alors obtenu pour chaque piste développée à la longueur d'onde choisie et peut être traité tout comme un chromatogramme.

L'HPTLC possède plusieurs avantages, elle est visuelle, simple d'utilisation et de principe, plusieurs analyses peuvent être réalisées en parallèle, elle est rapide, flexible, les plaques ne sont pas réutilisées pour éviter les contaminations, la détection est multiple grâce au grand choix de révélateurs et c'est une technique peu consommatrice de solvant et peu coûteuse. Elle possède cependant des inconvénients, tout d'abord c'est un système ouvert, exposé aux effets de l'environnement, il est donc nécessaire de fixer rapidement les résultats par photographie et/ou densitomètre. De plus, la particularité des modules indépendants est certes plus souple mais nécessite la présence de l'opérateur pour chaque changement d'étape, le pouvoir de séparation quant à lui reste moins important que celui de l'HPLC, certains paramètres restent parfois difficiles à changer ou à contrôler et enfin les solvants utilisés sont peu éco-compatibles.

L'HPTLC est ainsi une technique très efficace, mais qui ne remplace pas l'HPLC, d'une part elles possèdent leurs propres avantages et inconvénients et d'autre part leurs objectifs sont assez différents. Ce sont des techniques complémentaires dans l'étude des produits naturels.

V.5.3. LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

La chromatographie en phase gazeuse est particulièrement adaptée à l'analyse des composés volatils et semi-volatils, thermiquement stables. La diversité des méthodes d'injection, de détection et le grand choix de colonnes permet une analyse de plus en plus poussée de mélanges très complexes.

Le chromatographe en phase gazeuse se compose de trois modules, l'injecteur, la colonne capillaire placée dans un four et le détecteur.

L'injection se fait généralement à l'état liquide, le rôle de l'injecteur est alors de porter l'échantillon à haute température afin de le vaporiser et de le conduire jusqu'en tête de colonne grâce au flux du gaz vecteur. Ce gaz inerte représente la phase mobile de la chromatographie gazeuse.

La colonne permet la séparation des composés grâce à leur interaction avec la phase stationnaire. La séparation dépend donc du type de phase stationnaire, de son épaisseur, du diamètre et de la longueur de la colonne. Celle-ci est placée dans une enceinte thermostatée et la température peut être programmée pour améliorer la qualité de la séparation. Les colonnes GC sont des colonnes capillaires de 10 à 100 m de long et de 100 à 530 μm de diamètre interne. Il existe différents types de phases stationnaires comme par exemple les polaires et les apolaires. Les phases stationnaires apolaires séparent les constituants principalement en fonction de leur volatilité, les phases stationnaires mi-polaires les séparent en fonction de leur volatilité et en fonction de leur polarité et enfin les phases polaires les séparent principalement selon leur polarité.

Le détecteur quant à lui permet de repérer les composés élués en émettant un signal électrique pour chaque composé. Il existe différents détecteurs, certains universels (FID...), d'autres plus sélectifs. La GC peut également être couplée pour permettre l'identification des composés, comme par exemple avec la spectrométrie de masse, l'infrarouge ou encore le nez humain. La GC-MS est la plus courante car elle permet d'identifier la plupart des composés grâce à la mise en place de banques de spectres universelles.

Cette identification par spectrométrie de masse peut être complétée par l'indice de rétention du composé. En effet le temps de rétention étant variable selon la nature de la colonne, la programmation de température, le débit du gaz vecteur..., le calcul de cet indice permet de s'affranchir de ces conditions chromatographiques. Il a été développé tout d'abord en isotherme, puis a été adapté pour tenir compte de la programmation de température.¹⁴⁸ Il s'agit d'injecter une série d'homologues de *n*-alcanes dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons analysés. Les temps de rétention augmentent linéairement avec le nombre

d'atomes de carbone (n) de l'alcane. La formule est basée sur les temps de rétention de deux alcanes à n et $n+1$ carbones encadrant le composé inconnu x sur le chromatogramme :

$$IR_x = 100n + 100[(tr_x - tr_n)/(tr_{(n+1)} - tr_n)]$$

Les indices de rétention ne dépendent ainsi que de la phase stationnaire et ont permis la construction de banques de données.

V.6. TECHNIQUES DE CARACTERISATION

La caractérisation structurale est principalement réalisée par des techniques spectroscopiques et optiques, comme la spectrométrie de masse, en particulier à haute résolution, qui permet d'accéder à la masse exacte du composé et donc à sa formule brute (V.5.1 p. 68), les spectroscopies UV et IR, qui permettent d'obtenir des informations sur les fonctions présentes dans la molécule, la mesure du pouvoir rotatoire, qui donne accès à la configuration absolue, la résonance magnétique nucléaire, qui donne accès à la structure complète... Plusieurs de ces techniques sont généralement utilisées conjointement pour identifier avec certitude les structures moléculaires.

V.6.1. LA RESONNANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

La RMN est une technique spectroscopique non destructive permettant d'élucider la structure moléculaire dans son ensemble, contrairement aux autres techniques spectroscopiques, qui ne fournissent que certaines informations sur la structure. Elle utilise les propriétés de résonance de certains noyaux lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique. En chimie des produits naturels, les noyaux les plus utilisés sont le proton ^1H et le carbone ^{13}C .

Cette technique nécessite généralement au préalable une bonne purification du composé afin de faciliter son identification.

Plusieurs séquences peuvent être utilisées, qu'elles soient mono- ou bidimensionnelles. Les monodimensionnelles, (^1H , ^{13}C , DEPT...) permettent d'obtenir des informations sur le nombre et le type d'hydrogènes et de carbones présents dans la molécule.

Les bidimensionnelles sont complémentaires, elles indiquent les couplages à travers les liaisons (effet scalaire) ou à travers l'espace (effet NOE). Les couplages peuvent être homonucléaires (proton-proton) ou hétéronucléaires (proton-carbone). Parmi les séquences les plus courantes :

- ✎ la séquence COSY permet de déterminer les couplages scalaires entre protons voisins,

- ✎ la séquence HSQC permet de déterminer les couplages scalaires entre proton et carbone directement liés,
- ✎ la séquence HMBC permet de déterminer les couplages scalaires hétéronucléaires à travers plusieurs liaisons, même en présence d'hétéroatomes ou de carbones quaternaires,
- ✎ les séquences NOESY et ROESY permettent de déterminer les couplages entre deux protons voisins dans l'espace, ce qui permet généralement d'identifier la configuration relative de la molécule,
- ✎ les séquences TOCSY et HSQC-TOCSY permettent de déterminer les couplages scalaires homonucléaires et hétéronucléaires respectivement, à travers plusieurs liaisons, ce qui permet de visualiser de longs enchainements sans hétéroatome ni carbone quaternaire, indispensables pour l'étude structurale des sucres par exemple.

Il est cependant souvent plus aisé de recourir également à d'autres techniques pour confirmer les structures.

V.6.2. LE POUVOIR ROTATOIRE

L'activité optique, ou *pouvoir rotatoire*, est la propriété que possède une structure chirale de provoquer une rotation angulaire du plan de polarisation d'une lumière monochromatique préalablement polarisée.

Pour une substance optiquement active en solution dans un solvant inactif, le pouvoir rotatoire est proportionnel à la concentration massique C de la solution, à la longueur l traversée et au pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_{\lambda,T}$ de la substance active dissoute. C'est la loi de *Biot* :

$$\alpha = [\alpha]_{\lambda,T} \cdot l \cdot C$$

Avec :

α : pouvoir rotatoire ou angle de rotation du plan de polarisation (deg)

l : épaisseur de substance active traversée (dm)

C : concentration de la substance dissoute ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)

$[\alpha]_{\lambda,T}$: pouvoir rotatoire spécifique ($^{\circ}\cdot\text{dm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^3$) avec $\lambda = 589,3 \text{ nm}$ et $T = 20^{\circ}\text{C}$

Le pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_{\lambda,T}$ (appelé aussi α_D) est une grandeur caractéristique de la substance étudiée, il est constant pour une longueur d'onde de la lumière incidente donnée et pour une température donnée. Les mesures sont donc toujours réalisées à 20°C et avec une longueur d'onde $\lambda = 589,3 \text{ nm}$ (raie D du Sodium).

Par convention α est mesuré *positivement dans le sens des aiguilles d'une montre* pour un observateur recevant le rayon lumineux. Les substances optiquement actives sont ainsi classées en deux catégories selon le signe de α .

Les composés *dextrogyres* (du latin *dexter* : droit) font tourner le plan de polarisation vers la droite (+) et les composés *lévogyres* (du latin *laevus* : gauche) font tourner le plan de polarisation vers la gauche (-).

Dans le cas d'un mélange de substances optiquement actives, le pouvoir rotatoire global est égal à la somme des pouvoirs rotatoires de chaque constituant du mélange.



TRAVAUX REALISES

CHAPITRE I - CARACTERISATION PHYTOCHIMIQUE DE *S. VIRGAUREA ALPESTRIS* : APPLICATION BUCCO-DENTAIRE

I.1. INTRODUCTION

Une étude préliminaire sur l'activité de *S. virgaurea* contre *C. albicans* a été réalisée et les résultats ont été brevetés en 2008.² Cette étude a montré que l'extrait aqueux des parties aériennes de *S. virgaurea* (*virgaurea* et *alpestris*) inhibait la conversion levure-hyphes de *C. albicans*, un des facteurs clés de virulence.^{9,10,149} Cet extrait aqueux induit un environnement défavorable pour *C. albicans* et ainsi inhibe la forme filamenteuse sans détruire la forme levure ni les bactéries de la microflore commensale.¹⁵⁰ En effet en cas de sécheresse buccale, il est important de conserver un biofilm oral équilibré. Cette activité particulière d'inhibition de la conversion levure-hyphes serait alors appropriée pour un soin quotidien type bain de bouche et pourrait permettre le développement d'une nouvelle gamme de produits d'hygiène bucco-dentaire.

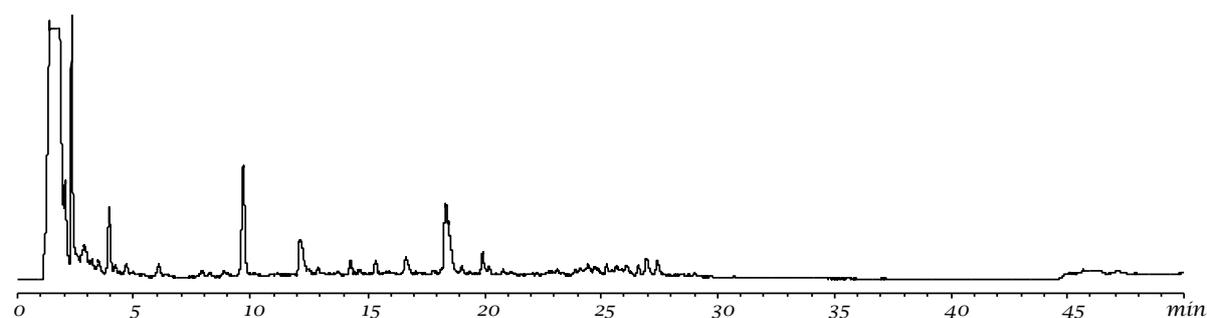
D'après les travaux antérieurs réalisés sur la sous-espèce *virgaurea*, il est probable que cette activité soit majoritairement induite par la famille des saponines, elles sont en effet connues pour posséder de nombreuses activités telles que des activités antimicrobiennes^{55,69} et sont présentes en grand nombre dans cette plante.^{47-49,57}

Ce travail de thèse a été mené avec pour objectif d'identifier les composés responsables de cette activité et pour avoir une meilleure connaissance de la composition de cette plante, qui pourrait rentrer prochainement dans la formulation d'un nouveau soin d'hygiène bucco-dentaire.

I.2. EXTRACTION

Les parties aériennes fleuries de la plante ont été broyées finement et ont été extraites deux fois à l'eau distillée. Afin d'obtenir un extrait proche de celui décrit dans le brevet de Madinier et Geribaldi,² l'eau a été choisie comme unique solvant d'extraction. Cependant, pour préserver la structure des actifs, le chauffage lors de l'extraction (type décoction ou infusion) a été supprimé et remplacé par une extraction à froid (5 °C) assistée par ultrasons. Cette méthode a ainsi permis de réaliser une extraction efficace tout en restant à froid.

L'extrait brut obtenu, de couleur brun foncé, représente environ 20 % de la masse de matière sèche après évaporation. Il a été analysé par HPLC-UV-ELSD en phase inverse (C18). Le chromatogramme obtenu a permis d'évaluer la complexité de l'extrait et la présence d'une trentaine de pics a été observée (Figure 27).



Colonne C18, 150 × 4,6 mm, 5 µm, gradient Eau/MeCN, 5 min à 15 % MeCN, 55 % MeCN en 30 min, 100 % MeCN en 5 min, puis 5 min à 60 % IPrOH

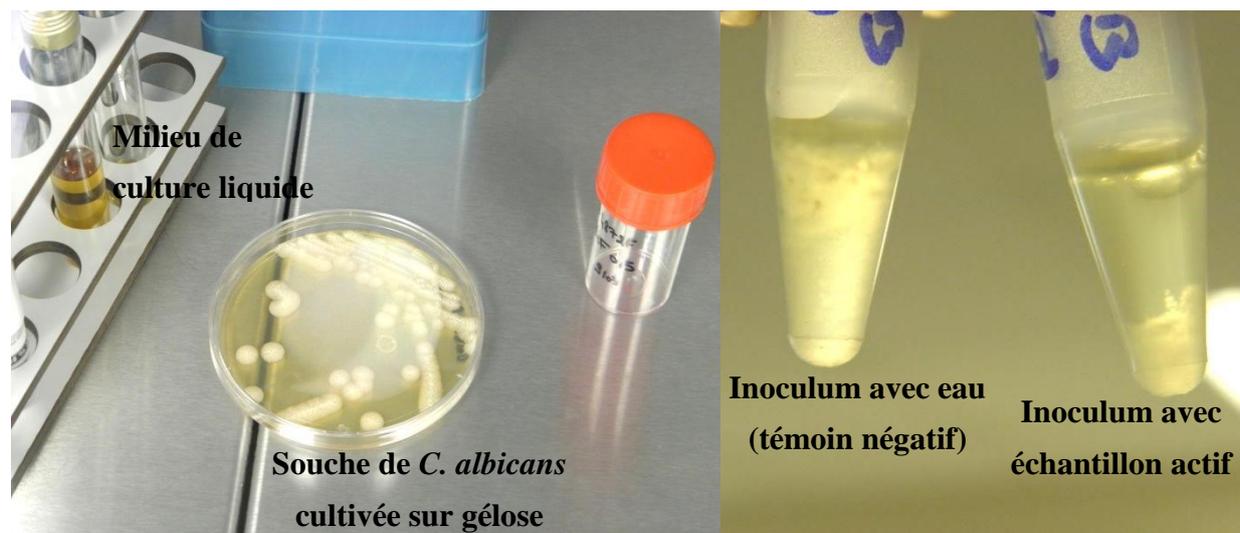
FIGURE 27 - CHROMATOGRAMME HPLC-ELSD DE L'EXTRAIT BRUT AQUEUX

De nombreux composés sont présents dans le volume mort, largement majoritaire. Par la suite, 5 pics majoritaires sont élués dans les 20 premières minutes, accompagnés de nombreux composés minoritaires, et enfin un ensemble de nombreux pics minoritaires est élué entre 20 et 30 min. Aucun composé n'est élué avec un pourcentage d'acétonitrile supérieur à 50 %. Ces résultats concordent avec le type d'extrait réalisé. En effet la forte polarité de l'eau empêche l'extraction des composés les plus hydrophobes.

Cet extrait brut a ensuite été testé sur *C. albicans* pour confirmer son activité.

I.3. ACTIVITE MICROBIOLOGIQUE DE L'EXTRAIT

Dans le but de réaliser les tests d'inhibition de la conversion levure-hyphe de *C. albicans*, la souche recommandée par la norme AFNOR pour les tests antimicrobiens a été cultivée à 37 °C en aérobie sur gélose pour dénombrement. A partir de cette culture, un inoculum de 1×10^6 cellules/ml a été réalisé dans un milieu de culture liquide. Cet inoculum a été incubé d'une part avec les différents échantillons, et d'autre part avec de l'eau dans le cas du témoin négatif, à 37 °C sous agitation continue (Figure 28).



a - Préparation de l'inoculum

b - Inoculum après 24 h à 37 °C

FIGURE 28 - REALISATION DES TESTS MICROBIOLOGIQUES

Le nombre total de cellules et le nombre d'hyphe ont été comptés à T = 0 et T = 4 h grâce à des cellules de comptage, sous microscope optique, de façon à obtenir un taux d'hyphe. Chaque test a été fait en double et trois expériences indépendantes ont été réalisées. A partir de ce taux, le pourcentage de croissance des hyphe a pu être calculé. Dans le cas d'un échantillon inactif, le pourcentage de croissance des hyphe doit être similaire au contrôle négatif ($\approx 0\%$) ou plus élevé (Figure 29 et Tableau 7). A l'inverse, dans le cas d'un échantillon actif, le pourcentage de croissance des hyphe doit être significativement moins important (Figure 30 et Tableau 7).

TABLEAU 7 - LEGENDE DES RESULTATS DES TESTS MICROBIOLOGIQUES

- 100 %	- 100 % à 0 %	0 %	> 0 %
Inhibition totale de croissance des hyphe	Inhibition partielle de croissance des hyphe	Pas d'inhibition de croissance des hyphe	Stimulation de croissance des hyphe
++	+	-	--

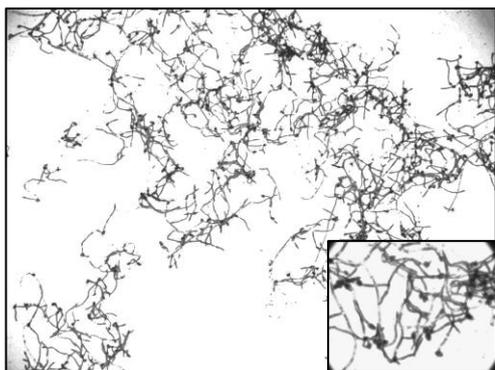


FIGURE 29 - *C. ALBICANS* DANS LE CAS D'UN CONTROLE NEGATIF

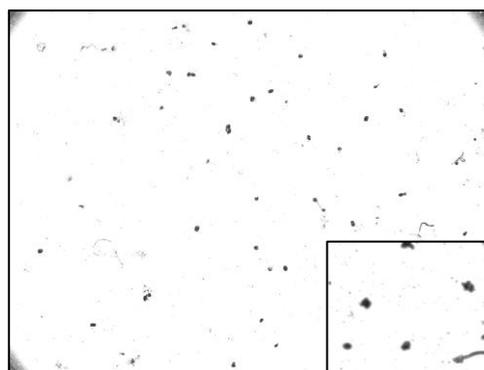


FIGURE 30 - *C. ALBICANS* EN CONTACT AVEC UN COMPOSE ACTIF (1 mM)

L'extrait brut a été testé à plusieurs concentrations (8 à 33 mg/ml) et a montré une inhibition significative de la conversion levure-hyphes à toutes les concentrations et en particulier à 33 mg/ml (Tableau 8). La concentration de 8 mg/ml donne une activité à la limite de la significativité, elle correspond à la concentration minimale inhibitrice de l'extrait.

Par ailleurs, l'extrait brut n'a pas montré d'inhibition de la croissance cellulaire, ni à 4 h ni à 24 h.

TABLEAU 8 - ACTIVITE DE L'EXTRAIT BRUT SUR *C. ALBICANS* A 4 H

Croissance des hyphes (%)	
Témoin négatif	0 -
8 mg/ml	-37 ± 28 * +
17 mg/ml	-40 ± 13 ** +
25 mg/ml	-42 ± 37 ** +
33 mg/ml	-64 ± 17 *** +

Les valeurs (exprimées avec ± Ecart Type) sont significativement différentes du témoin négatif quand * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$

Ces résultats confirment ceux de Chevalier *et al.*¹⁵⁰ qui observaient une forte réduction de la proportion d'hyphes chez *C. albicans* sans destruction des levures, lorsque celui-ci était en contact avec une décoction de *S. virgaurea* (*virgaurea* et *alpestris*).

A la lumière de ces résultats, l'identification des actifs responsables de cette activité a été initiée. Pour cela, la méthode du fractionnement bioguidé a été utilisée.

I.4. FRACTIONNEMENT

L'extrait brut a dans un premier temps été fractionné par chromatographie sous vide en phase inverse (C18) afin d'obtenir des fractions de composition plus simple. Un total de cinq systèmes de solvants de polarité décroissante a été utilisé, ce qui a permis de récupérer cinq fractions de polarités différentes (Figure 31). La première est un rinçage à l'eau, les trois suivantes sont constituées d'un mélange méthanol/eau avec des proportions de méthanol croissantes et enfin la dernière est uniquement constituée de méthanol. Les quantités précisées sur la Figure 31 correspondent aux masses obtenues après évaporation du solvant.

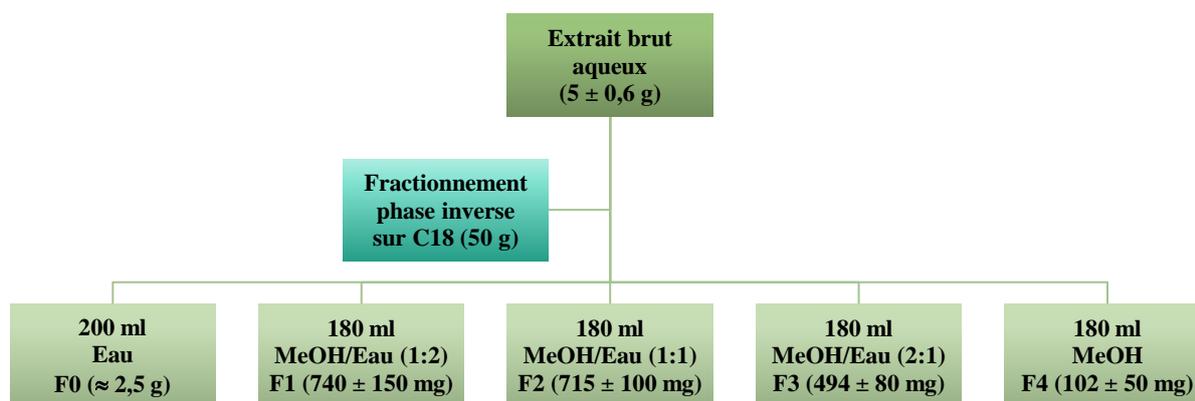


FIGURE 31 - FRACTIONNEMENT EN PHASE INVERSE DE L'EXTRAIT BRUT

Ces cinq fractions ont toutes été analysées par HPLC-UV-ELSD en phase inverse (C18), dans les mêmes conditions que l'extrait, afin d'évaluer la composition et la complexité de chaque fraction.

La fraction F0 éluée avec de l'eau est uniquement constituée des composés les plus polaires, non retenus par la colonne et présents dans le volume mort. Les fractions F1 et F2 sont constituées des composés présents entre 1 et 20 min, mis en évidence précédemment sur le chromatogramme de l'extrait. Enfin les fractions F3 et F4 sont formées des nombreux composés minoritaires entre 20 et 30 min observés précédemment.

Une large majorité des composés a pu être récupérée dans les différentes fractions, la phase C18 n'a en effet retenu qu'une très faible partie de l'extrait. Le fractionnement en phase inverse est tout à fait adapté aux extraits très polaires comme les extraits aqueux. En effet, ces derniers étant uniquement solubles dans l'eau, ils peuvent être déposés directement sur la phase par dépôt liquide, et les molécules composant ces extraits ne sont pas retenues de manière excessive sur la phase, le fractionnement est ainsi rapide et efficace.

Les quatre fractions F1, F2, F3 et F4 ont par la suite été testées sur *C. albicans* pour cibler les fractions actives et écarter celles qui ne possèdent aucune activité.

I.5. ACTIVITE MICROBIOLOGIQUE DES FRACTIONS

Chacune des quatre fractions a été testée sur *C. albicans* à 4, 8 et 17 mg/ml dans les mêmes conditions que précédemment et les résultats sont présentés dans le Tableau 9.

TABLEAU 9 - ACTIVITE DES FRACTIONS SUR *C. ALBICANS* A 4 H

	Croissance des hyphes (%)			
	F1	F2	F3	F4
Témoin négatif			0% -	
4 mg/ml	-18 ± 42 -	-7 ± 30 -	-32 ± 23 * +	-46 ± 32 ** +
8 mg/ml	-11 ± 55 -	-15 ± 15 -	-55 ± 20 ** +	-52 ± 19 *** +
17 mg/ml	-12 ± 49 -	-21 ± 28 -	-64 ± 30 *** +	-63 ± 20 *** +

Les valeurs (exprimées avec ± Ecart Type) sont significativement différentes du témoin négatif quand * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$

Les fractions F1 et F2 se sont montrées inactives aux concentrations testées. Elles n'inhibent pas significativement la forme filamenteuse de *C. albicans*, même avec les concentrations les plus importantes. A l'inverse, les fractions F3 et F4 ont montré une inhibition à toutes les concentrations testées. Malgré les importantes valeurs d'écart-types, dues à la variation naturelle de l'organisme vivant étudié, le test statistique a montré que toutes les valeurs sont significatives. La plus faible concentration testée, 4 mg/ml, donne des résultats à la limite de la significativité, elle correspond donc approximativement à la concentration minimale inhibitrice des fractions actives.

Par ailleurs aucune des fractions n'a montré d'inhibition de la croissance cellulaire, ni à 4 h ni à 24 h.

Les composés majoritairement présents dans l'extrait brut ne sont donc pas responsables de son activité. Celle-ci dépend des composés minoritaires présents entre 20 et 30 min sur le chromatogramme de la Figure 27. Cependant, les composés présents dans cette fraction ne sont probablement pas tous actifs de la même manière. Il est donc nécessaire de les isoler les uns des autres pour vérifier l'activité de chacun et pour déterminer leur structure.

Les fractions F3 et F4 possédant des composés communs, elles ont été rassemblées pour faciliter la purification de chacun d'entre eux. L'ensemble de ces deux fractions représente environ 10 % de l'extrait, soit approximativement 2 % de la masse de matière sèche.

I.6. ISOLEMENT

Les composés majoritaires des fractions F3 et F4 rassemblées ont été isolés par HPLC semi-préparative en phase inverse (C18). L'ELSD ayant la particularité de vaporiser la phase mobile pour réaliser la détection, les composés élués ne peuvent pas être recueillis à sa sortie comme dans le cas de l'UV. Le suivi chromatographique ne peut donc pas être réalisé par ELSD. Ainsi, plusieurs longueurs d'ondes UV ont été choisies afin de repérer au mieux chaque composé (Figure 32).

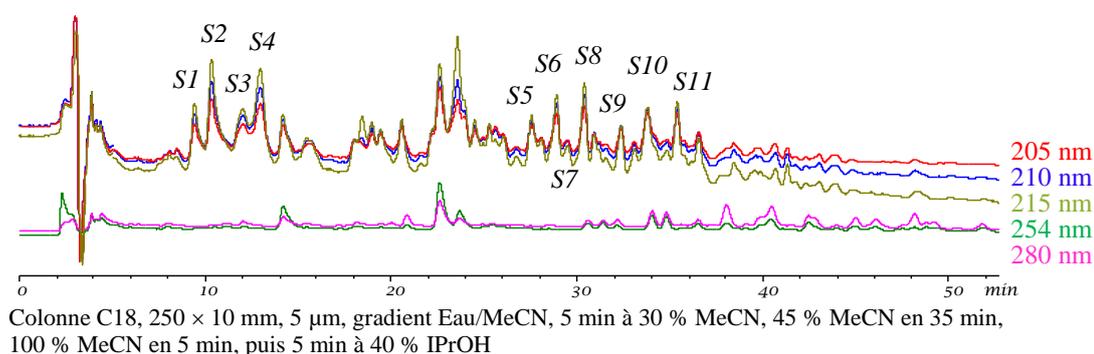


FIGURE 32 - CHROMATOGRAMME HPLC-UV DES FRACTIONS F3 ET F4 RASSEMBLEES

De nombreux composés très minoritaires et fortement co-élus entre eux n'ont pas pu être isolés en quantité suffisante pour réaliser une purification supplémentaire convenable. Ainsi les composés les plus minoritaires n'ont pas pu être identifiés. Cependant, un total de 11 composés a pu être isolé en quantité suffisante. Ils ont été nommés S1 à S11 et seront toujours identifiés comme tel par la suite.

Une purification supplémentaire a été systématiquement réalisée sur chacun de ces composés à l'aide d'une colonne légèrement différente de la C18 (RP-Fusion, 4,6 × 250 mm) et avec un gradient optimisé pour chaque composé, afin d'éliminer le maximum de composés minoritaires co-élus.

Les molécules purifiées ont par la suite été testées contre *C. albicans* et leur structure ont été identifiées.

I.7. IDENTIFICATION

Les 11 composés isolés des fractions F3 et F4 possèdent une faible absorbance en UV entre 200 et 220 nm environ et n'absorbent pas au-delà de 220 nm (Figure 32), ils possèdent donc peu de chromophores. De plus, les spectres de masse présentent plusieurs fragments dont les masses pourraient correspondre à des sucres et un fragment dont la masse pourrait correspondre à un triterpène (Figure 33). En effet, la perte d'un hexose de type glucose correspond à la perte d'une masse de 162, la perte d'un désoxyhexose à une masse de 146 et la perte d'un pentose correspond à une perte de 132. De plus les déshydratations sont caractérisées par une perte de 18.

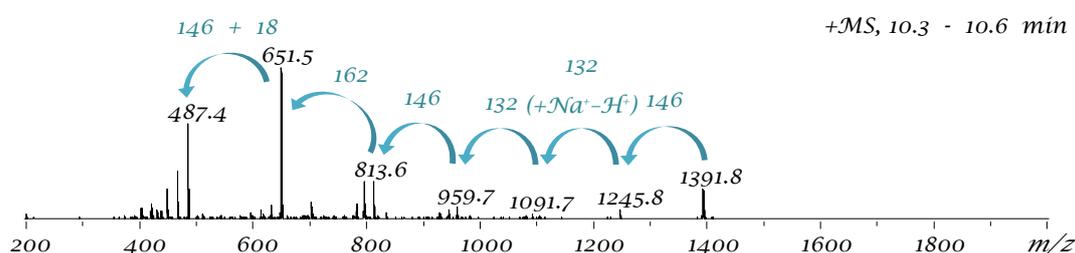


FIGURE 33 - SPECTRE DE MASSE (MODE POSITIF) DU SECOND PIC MAJORITAIRE (S2)

Il est donc probable que le composé S2 ainsi que tous les autres composés isolés appartiennent à la famille des saponines triterpéniques. Les sucres composant la partie osidique sont principalement des hexoses, désoxyhexoses et pentoses, tandis que le triterpène, d'une masse de 504 ($487 + 18 - 1$), correspond certainement à l'acide polygalacique, triterpène caractéristique de *S. virgaurea*.^{47,53}

Cependant les spectres de masse n'indiquent pas la nature, l'enchaînement et l'agencement des sucres, entre eux et avec le triterpène. De plus, les spectres ne sont pas toujours complets, les liaisons O-glycosidiques étant fragiles, certains fragments peuvent être difficiles à obtenir. Une identification précise de chaque composé, par RMN et spectrométrie de masse haute résolution est donc essentielle. D'autre part une étude des sucres est nécessaire afin de confirmer leur configuration absolue et leur configuration anomérique.

L'identification des 11 composés isolés a donc été réalisée. Les spectres RMN ont tous été réalisés dans la pyridine d_5 , à 300 K (sauf mention contraire), à l'aide d'un spectromètre 500 MHz (cas de S1, S2 et S6) ou 600 MHz, toujours muni d'une cryosonde. Dans ce paragraphe, une caractérisation complète de chaque composé nouvellement identifié est présentée,* suivie d'une présentation rapide des composés déjà identifiés dans la littérature.

*Les lettres s, d, t, q, m et l ont été utilisées comme abréviations pour singulet, doublet, triplet, quadruplet, mutiplet et large, respectivement. L'ensemble des spectres RMN sont rassemblés en partie expérimentale.

I.7.1. COMPOSE S1

Le composé *S1* se présente sous la forme d'une poudre amorphe blanc cassé (10 mg) pour lequel l'HRESI-MS (mode positif) a donné un ion moléculaire $[M + 2Na]^{2+}$ avec un m/z de 788,3438, ce qui correspond à la formule brute $C_{70}H_{114}O_{36}$, 1530,7092. La molécule comporte ainsi 14 insaturations.

Les spectres RMN 1H et ^{13}C du composé *S1* (Tableau 10 p. 99), accompagnés des spectres à deux dimensions, montrent tout d'abord la présence de 6 groupements méthyle sous forme de singulet à δ_H 0,97 ; 1,07 ; 1,16 ; 1,41 ; 1,56 ; 1,79 et δ_C 33,4 ; 24,8 ; 17,8 ; 15,4 ; 17,7 ; 27,4 (Figure 34).

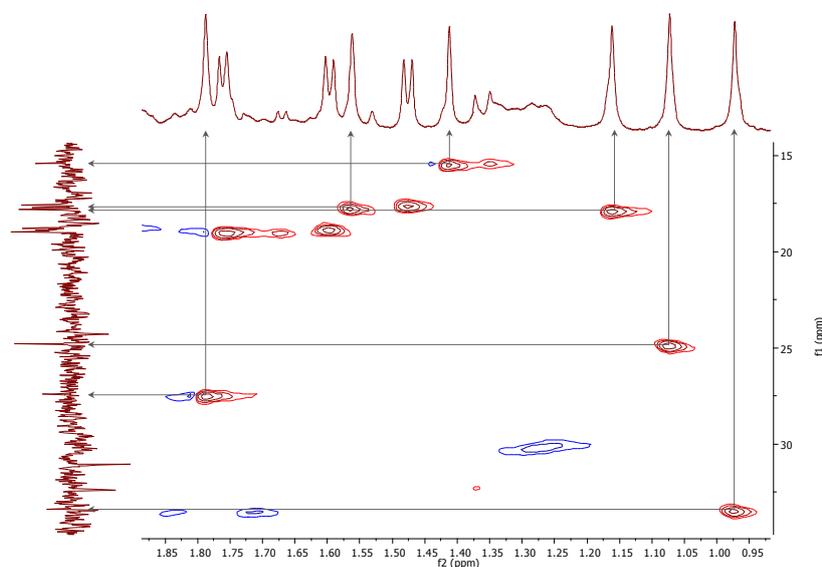


FIGURE 34 - SPECTRE RMN HSQC DU COMPOSE S1 (ZOOM F2 : 0,9-1,9 PPM ; F1 : 15-35 PPM)

De plus, un groupement éthylénique apparaît à δ_H 5,65 sous forme d'un pseudo triplet ($J = 3,7$ Hz) et à δ_C 123,1 (Figure 35), accompagné d'un carbone quaternaire sp^2 à δ_C 144,7. Par ailleurs, trois groupements H-C-OH sont présents à δ_H 4,33 et δ_C 83,4 ; δ_H 4,79 et δ_C 70,9 ; δ_H 5,25 et δ_C 74,2. Deux protons diastéréotopiques d'un groupement CH_2OH sont également présents à δ_H 3,76 ; 4,34 (d, $J = 10,7$ Hz) et δ_C 65,6. Enfin, un signal à δ_C 176,3 indique la présence d'un groupement ester.

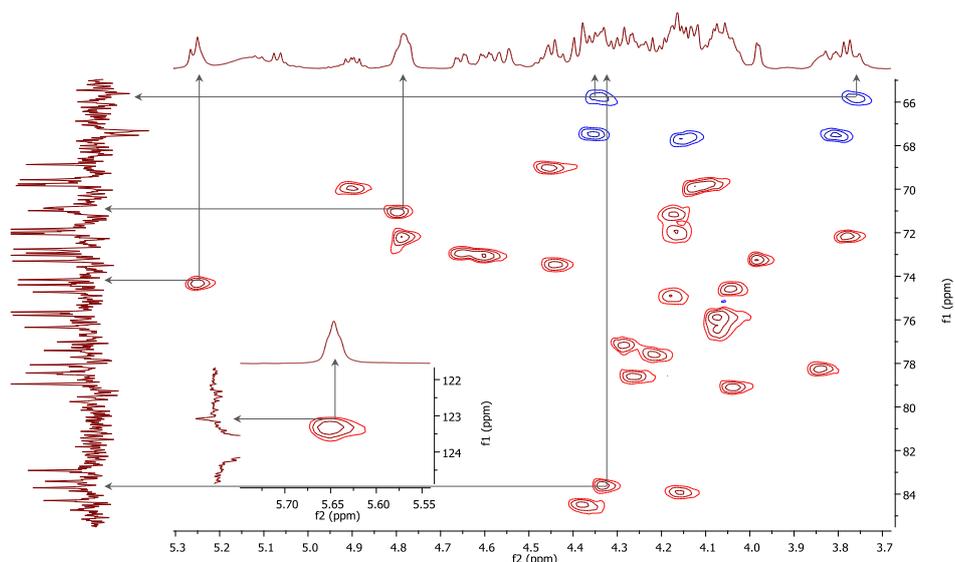


FIGURE 35 - SPECTRE RMN HSQC DU COMPOSE S1 (ZOOM F2 : 3,7-5,3 PPM ; F1 : 66-84 PPM)

Ces données permettent de définir la partie aglycone comme étant probablement l'acide polygalacique, un triterpène de type oléanolique (Figure 36).

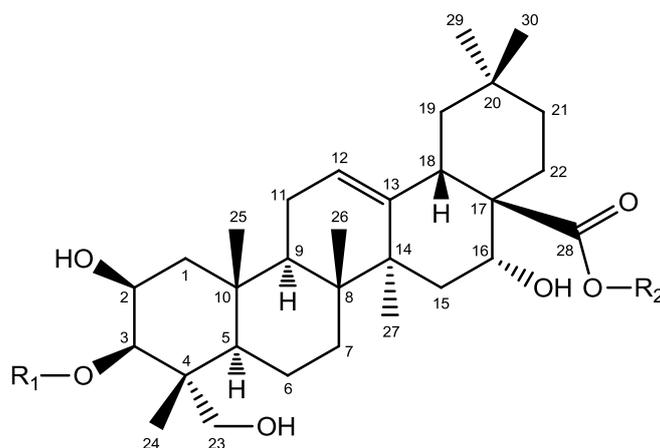


FIGURE 36 - STRUCTURE DE L'ACIDE POLYGALACIQUE

Cette conclusion est confirmée par les corrélations 3J du spectre HMBC. En effet, une corrélation est observée entre H-24 et C-23, ainsi qu'entre H-24 et C-3, C-4 et C-5 (Figure 37), ce qui permet d'établir une partie du premier cycle. De plus, des corrélations sont visibles entre H-25 et C-1, C-9 et C-10, ainsi qu'entre H-26 et C-7, C-8, C-9 et C-14, ce qui permet de compléter le premier et le second cycle. Les corrélations entre H-27 et C-8, C-13, C-14 et C-15 permettent quant à elles d'entrevoir les cycles 3 et 4. Enfin, les corrélations entre H-29 et C-19, C-20, C-21 et C-30, ainsi que les corrélations entre H-30 et C-19, C-20, C-21 et C-29 révèlent une partie du 5^e cycle.

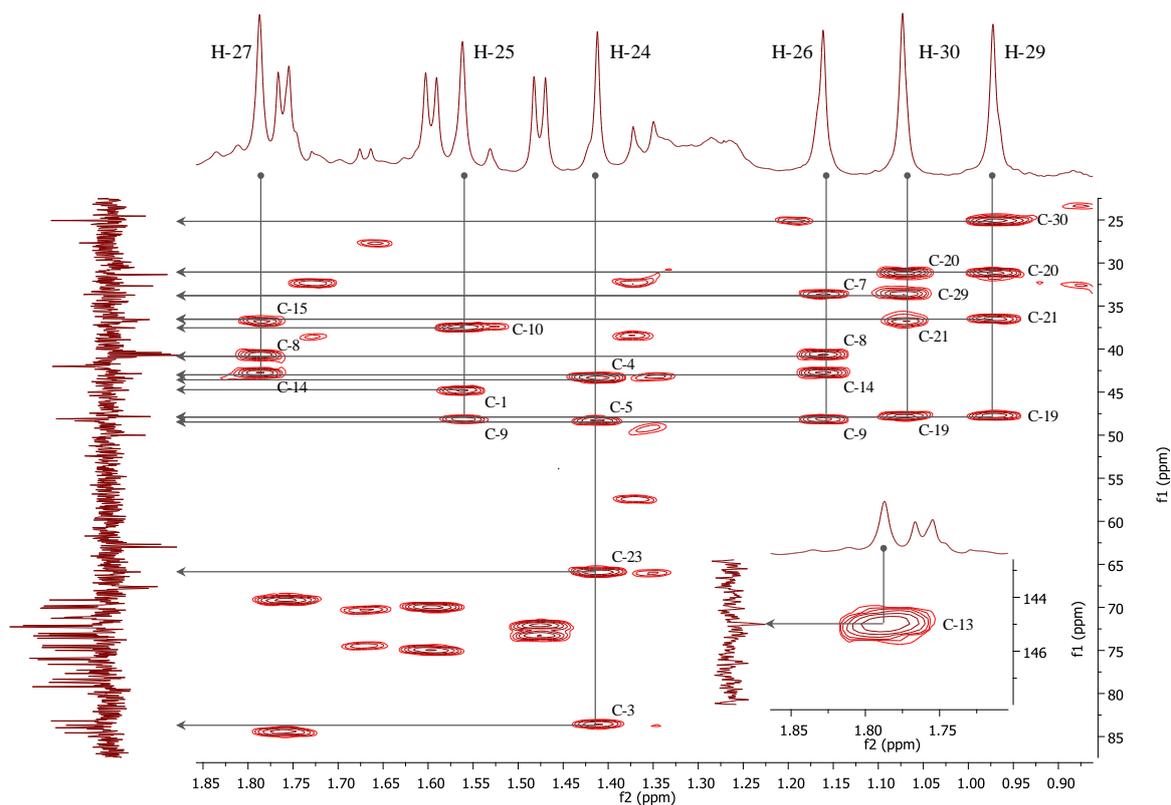


FIGURE 37 - SPECTRE RMN HMBC DU COMPOSE *SI* (ZOOM F2 : 0,9-1,9 PPM ; F1 : 20-90 PPM)

Par ailleurs, des corrélations sont visibles entre H-18 et la fonction éthylénique C-12 et C-13 (Figure 38), ainsi qu'entre H-18 et C-16, C-17, C-14 et la fonction ester C-28, ce qui complète le cycle 4. De plus, d'autres corrélations permettent de finaliser la structure comme celles entre H-22 et C-16, C-17, C-20 et C-28, ainsi que celles entre H-19 et C-18, C-20 et C-30 qui complètent le dernier cycle.

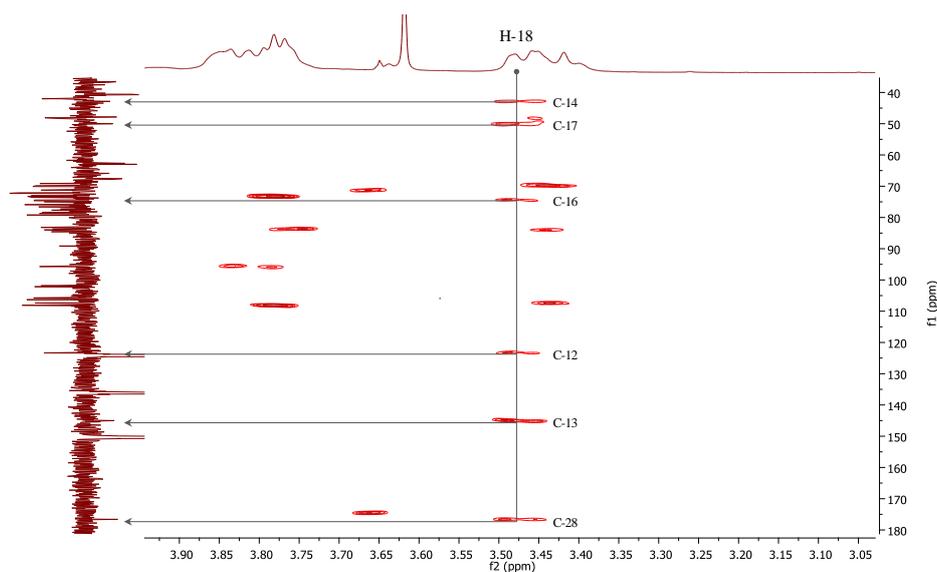


FIGURE 38 - SPECTRE RMN HMBC DU COMPOSE *SI* (ZOOM F2 : 3,0-3,9 PPM ; F1 : 40-180 PPM)

Enfin, les spectres COSY et ROESY ainsi que la comparaison avec la littérature^{47,48} ont permis de finaliser la structure comme étant bien l'acide polygalactique, di-substitué en C-3 et C-28.

Les spectres RMN ¹H et ¹³C du composé *SI* (Tableau 10 p. 99), accompagnés des spectres à deux dimensions, montrent également la présence de 7 signaux correspondant à 7 protons anomériques (Figure 39) à δ_H 5,07 (d ; J = 7,7 Hz), 5,11 (d ; J = 7,7 Hz), 5,14 (d ; J = 7,7 Hz), 5,26 (d ; J = 7,6 Hz), 6,18 (d ; J = 6,7 Hz), 6,24 (sl) et 6,35 (sl) corrélant sur le spectre HSQC avec 7 carbones anomériques, respectivement à δ_C 107,1 ; 107,8 ; 105,5 ; 106,1 ; 95,4 ; 101,9 et 101,6. Ces signaux indiquent la présence de 7 sucres dans la molécule, reliés au triterpène et liés entre eux par des liaisons *O*-glycosidiques.

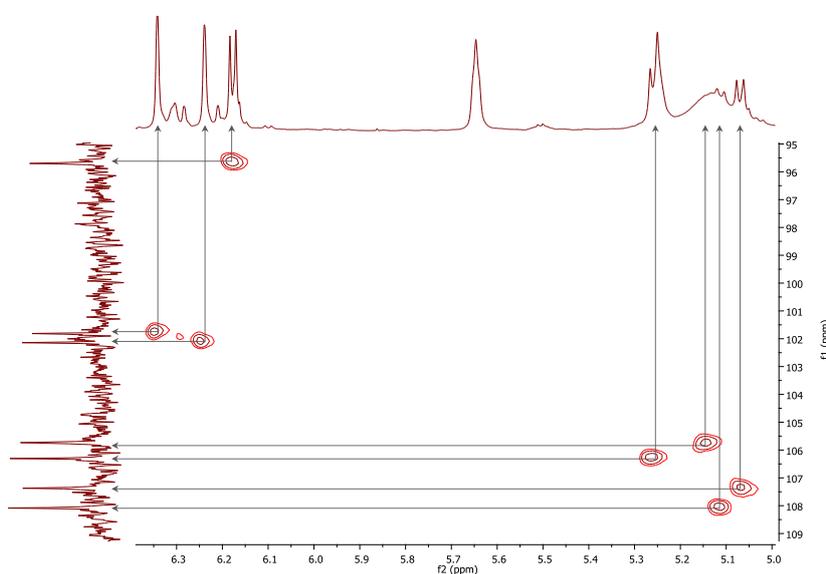


FIGURE 39 - SPECTRE RMN HSQC DU COMPOSE *SI* (ZOOM F2 : 5,0-6,4 PPM ; F1 : 95-109 PPM)

La totalité des attributions de chaque sucre a été réalisée grâce à une analyse complète des spectres deux dimensions, HSQC-TOCSY, COSY, HMBC et ROESY. L'HSQC-TOCSY en particulier, permet dans un premier temps de réaliser une attribution séquentielle pour chaque sucre. En effet, le proton anomérique H-1 par exemple, peut corrélérer avec tous les carbones de l'ose, ce qui permet d'identifier tous les signaux le composant, et ceci pour chacun des oses de la molécule. Par la suite les spectres COSY, HMBC et ROESY complètent la structure en identifiant l'ordre des signaux et la configuration relative.

Ainsi deux chaînes de 6 signaux correspondant aux signaux de deux glucoses (Glc et Glc') ont été observées (Figure 40). En effet, le proton H-1 à δ_H 5,14 corrèle avec les carbones C-1 à C-6 à δ_C 105,5 ; 88,9 ; 78,1 ; 74,4 ; 69,7 et 62,4. De même, le proton H-1 à δ_H 5,26 corrèle avec les carbones C-1 à C-6 à δ_C 106,1 ; 78,9 ; 78,4 ; 75,8 ; 71,8 et 62,7. Les spectres COSY

et HMBC ont permis de déterminer l'ordre précis des signaux, tandis que le spectre ROESY a permis de confirmer la configuration grâce à la corrélation entre H-1, H-3 et H-5, pour les deux sucres.

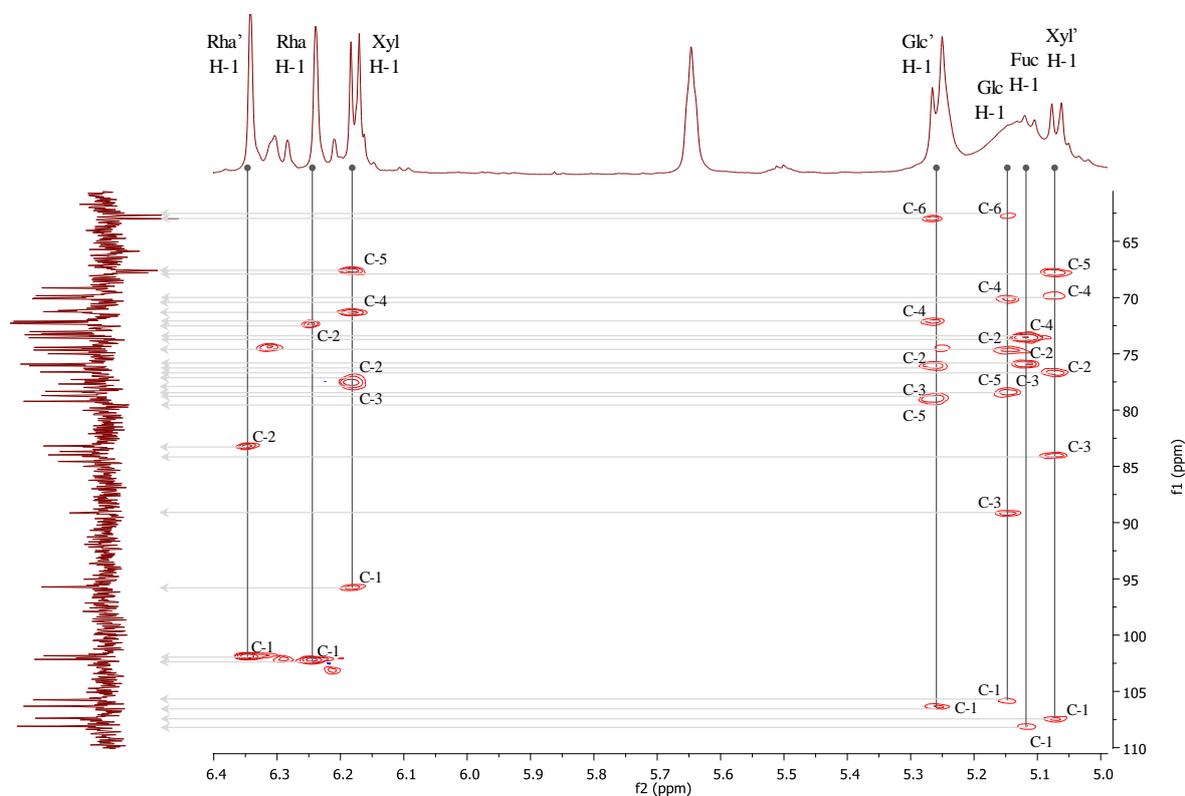


FIGURE 40 - SPECTRE RMN HSQC-TOCSY DU COMPOSE *SI* (ZOOM F2 : 5,0-6,4 PPM ; F1 : 60-110 PPM)

De plus, le spectre HSQC-TOCSY (Figure 40) a montré deux séquences de 5 signaux correspondant aux signaux de deux xyloses (Xyl et Xyl'). Le proton H-1 à δ_H 6,18 corrèle avec les carbones C-1 à C-5 à δ_C 95,4 ; 77,4 ; 77,0 ; 71,0 et 67,3. De même, le proton H-1 à δ_H 5,07 corrèle avec les carbones C-1 à C-5 à δ_C 107,1 ; 83,7 ; 76,3 ; 69,6 et 67,5. Après avoir identifié l'ordre des signaux, la configuration a été confirmée par ROESY grâce à la corrélation entre H-1, H-3 et H-5a, pour les deux xyloses.

Enfin, le spectre HSQC-TOCSY (Figure 40) a montré la présence de trois désoxyhexoses, deux rhamnosés et un fucose (Rha, Rha' et Fuc). Cependant dans ce cas, le proton H-1 ne peut pas corrélérer avec tous les carbones. Dans le cas des rhamnosés, le proton H-1 corrèle uniquement avec C-1 et C-2, il faut donc faire appel à un autre proton pour compléter la séquence tel que H-6, qui peut corrélérer avec C-3, C-4, C-5 et C-6 (Figure 41). Dans le cas du fucose, H-1 corrèle uniquement avec C-1, C-2, C-3 et C-4. Le proton H-6 permet de compléter la séquence en corrélant avec C-5 et C-6 (Figure 41). Les structures ont donc été confirmées par COSY, HMBC et ROESY, qui montrent, entre autres, des corrélations entre H-2 et H-3 pour les rhamnosés et une corrélation entre H-4 et H-5 pour le fucose.

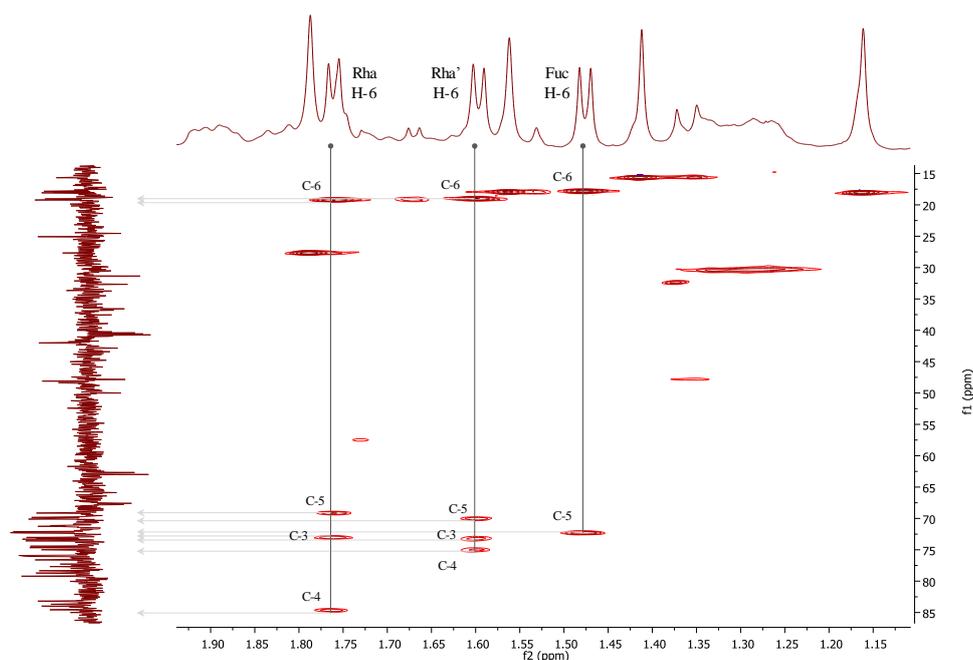


FIGURE 41 - SPECTRE RMN HSQC-TOCSY DU COMPOSE *SI* (ZOOM F2 : 1,1-1,9 PPM ; F1 : 15-85 PPM)

Les structures de chacun des 7 sucres ayant été établies, la configuration absolue ainsi que la configuration anomérique doivent à présent être examinées.

Dans le but d'obtenir la configuration absolue de chaque sucre, le composé *SI* a subi une hydrolyse acide afin de séparer les sucres du triterpène et de les obtenir sous forme de monomères. Cependant, les énantiomères sont difficilement identifiables car ils ne peuvent pas être séparés sur des colonnes chromatographiques classiques, aussi bien en HPLC qu'en GC. Une technique efficace pour séparer les deux énantiomères d'un sucre, outre l'utilisation de colonnes chirales, consiste à former un diastéréoisomère en faisant réagir l'ose avec un autre composé chiral de configuration connue. Ainsi, après cette hydrolyse, une réaction du mélange d'oses avec du chlorhydrate de méthyl-L-cystéine a été réalisée afin de former les dérivés 2-(polyhydroxyalkyl)-thiazolidine-4(*R*)-carboxylates de méthyle (Figure 42).^{151,152} Ces derniers ont par la suite été dérivés par du Triméthylsilylimidazole afin de pouvoir être analysés par GC-MS. Les différents standards correspondant aux sucres présents dans la molécule, sous leur forme D et sous leur forme L, ont subi le même traitement et ont également été analysés par GC-MS avec la même méthode, dans le but de comparer les temps de rétention de chacune des deux formes énantiomériques avec ceux des sucres de la molécule et ainsi identifier leur configuration absolue.

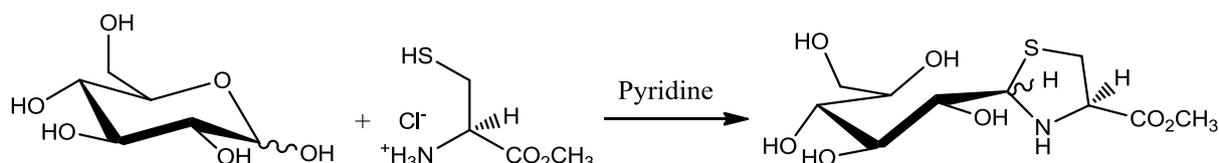


FIGURE 42 - REACTION DU GLUCOSE AVEC LE CHLORHYDRATE DE METHYL-L-CYSTEINE

Cette étude a ainsi permis d'identifier le glucose, le fucose et le xylose comme étant de forme D, et le rhamnose comme étant de forme L.

La configuration anomérique quant à elle, est plus facilement caractérisable, grâce au spectre RMN proton. En effet, les sucres peuvent être sous deux formes anomériques différentes, la forme α et la forme β . La forme est α si le groupement hydroxy anomérique et le groupement terminal sont de part et d'autre du cycle et β s'ils sont du même côté. Autrement dit, dans le cas des séries D, la forme est α si le groupement hydroxy anomérique est vers le bas et β s'il est vers le haut. Dans le cas des séries L, cette orientation est inversée.

Sur le spectre RMN du proton, la constante de couplage du proton anomérique reflète la position de ce dernier par rapport à H-2. S'ils sont tous deux en position axiale, la constante de couplage sera relativement importante, tandis que si l'un est en position axiale et l'autre en position équatoriale ou s'ils sont tous les deux en position équatoriale, la constante de couplage sera bien plus faible.

En effet les sucres sont la plupart du temps sous forme pyranose. Les pyranoses ont des conformations comparables à celles du cyclohexane, la conformation la plus stable dans la plupart des cas est la conformation « chaise ». Deux conformations « chaise » s'interconvertissent par simples rotations autour des liaisons interatomiques du cycle et, dans de nombreux cas, l'une de ces conformations prédomine parce qu'elle apporte plus de stabilité à la molécule. Il est possible de distinguer les conformations « chaises » 1C_4 et 4C_1 où C indique qu'il s'agit d'une conformation « chaise », et les chiffres indiquent la numérotation des carbones 1 et 4, en indice haut ou bas selon leur disposition dans la conformation « chaise » retenue. Par exemple, 1C_4 signifie que le carbone 1 est au-dessus du plan moyen de la molécule et le carbone 4 au-dessous.¹⁵³

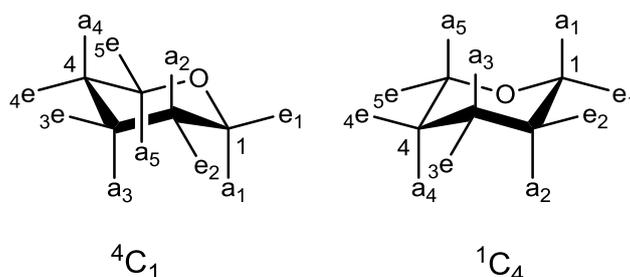


FIGURE 43 - CONFORMATIONS « CHAISE » 4C_1 ET 1C_4

Dans le cas des D-hexopyranoses, comme le D-glucose, le groupe hydroxyméthyle situé sur C-5 est le substituant le plus volumineux de la molécule. Pour éviter des interactions fortes entre ce groupe et les groupes OH qui substituent les autres carbones du cycle, la conformation 4C_1 est privilégiée, et le groupe CH_2OH est en position équatoriale. Les L-hexopyranoses qui ont le groupe hydroxyméthyle inversé par rapport aux D-hexopyranoses, selon la représentation de Haworth, ont plutôt une conformation 1C_4 .

L'analyse du spectre RMN proton a ainsi montré une constante de couplage ${}^3J_{\text{H-1,H-2}}$ de 6,7-7,7 Hz pour les deux glucoses, les deux xyloses ainsi que le fucose, ce qui indique une position axiale pour H-1 et H-2. Ces sucres étant tous de série D, ils adoptent une conformation 4C_1 , le proton anomérique axial est donc orienté vers le bas et le groupement hydroxy vers le haut. Les glucoses, xyloses et le fucose ont donc une orientation β . A l'inverse, la constante de couplage ${}^3J_{\text{H-1,H-2}}$ des rhamnoses est très faible puisque les doublets apparaissent sous forme de singulet large, ce qui indique une position équatoriale pour H-1 et H-2. Les rhamnoses étant de série L, ils adoptent une conformation 1C_4 , le proton anomérique équatorial est donc orienté vers le bas et le groupement hydroxy vers le haut. Les rhamnoses ont donc une orientation α . Ces résultats sont en accord avec la littérature dans le cas de saponines triterpéniques similaires.⁵²

Enfin, l'enchaînement des 7 sucres ainsi que les liaisons à la partie aglycone ont été établis par l'observation des corrélations HMBC et ROESY entre le proton anomérique et le couple proton/carbone de la position substituée du sucre précédent ou du triterpène (Figure 44 et Figure 45 p. 98).

Tout d'abord, le proton H-3 de l'acide polygalacique montre une corrélation 3J HMBC avec le C-1 du premier glucose, ce qui indique une liaison O-glycosidique entre le glucose et l'aglycone en position 3. Cette liaison est confirmée par une corrélation NOE entre le proton H-3 de l'acide polygalacique et le proton H-1 du glucose.

Ensuite, la corrélation 3J HMBC entre le proton anomérique du second glucose et le C-3 du premier glucose témoigne de la liaison entre le glucose' et le glucose en position 3. Cet enchainement est confirmé par une corrélation sur le spectre ROESY entre le proton H-1 du second glucose et le proton H-3 du premier glucose.

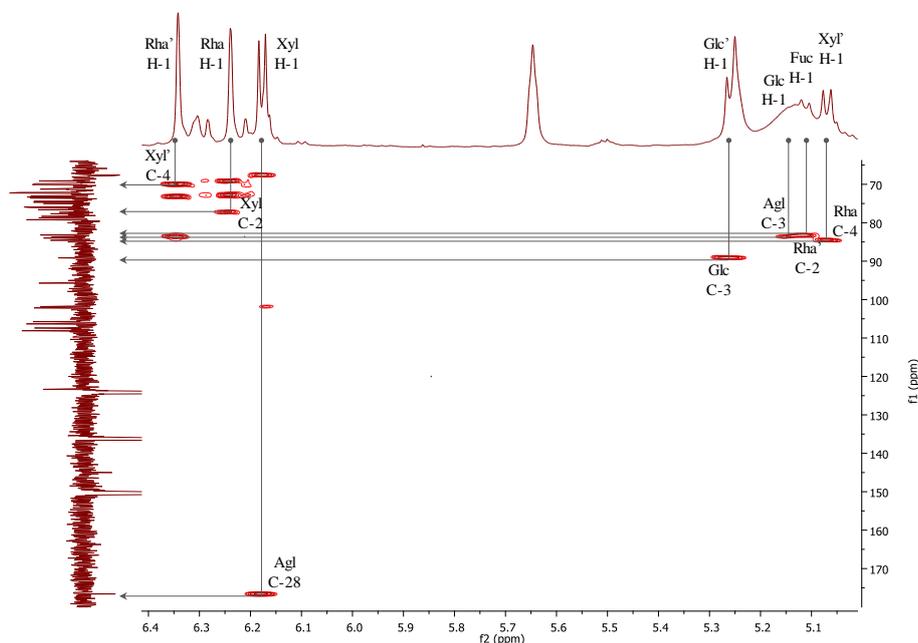


FIGURE 44 - SPECTRE RMN HMBC DU COMPOSE SI (ZOOM F2 : 5,0-6,4 PPM ; F1 : 65-180 PPM)

Par ailleurs, le proton anomérique du premier xylose montre une corrélation 3J HMBC avec le C-28 de la fonction ester du triterpène, ce qui définit une liaison *O*-glycosidique entre le xylose et l'aglycone en position 28.

De plus, la corrélation 3J HMBC entre le proton H-2 du premier xylose et le C-1 du premier rhamnose démontre la connexion entre le rhamnose et le xylose en position 2. Cette liaison est confirmée par la présence d'une corrélation sur le spectre ROESY entre le proton H-2 du xylose et le proton anomérique du rhamnose.

Le proton H-4 du rhamnose montre quant à lui une corrélation 3J HMBC avec le C-1 d'un second xylose. Le xylose' est donc relié à la position 4 du rhamnose. Une corrélation NOE entre le proton H-1 du second xylose et le proton H-4 du rhamnose confirme cette connexion.

Une corrélation 3J HMBC entre le proton anomérique d'un second rhamnose et le C-3 du xylose' est également observée, indiquant un enchainement entre le rhamnose' et le xylose', confirmé par une corrélation sur le spectre ROESY entre le proton anomérique du rhamnose et le proton H-3 du xylose'.

Enfin, la corrélation $^3J_{\text{HMBC}}$ entre le proton anomérique du fucose et le C-2 du second rhamnose établit la liaison entre le fucose et le rhamnose' en position 2. Cette liaison est confirmée par la présence d'une corrélation NOE entre le proton anomérique du fucose et le proton H-2 du rhamnose'.

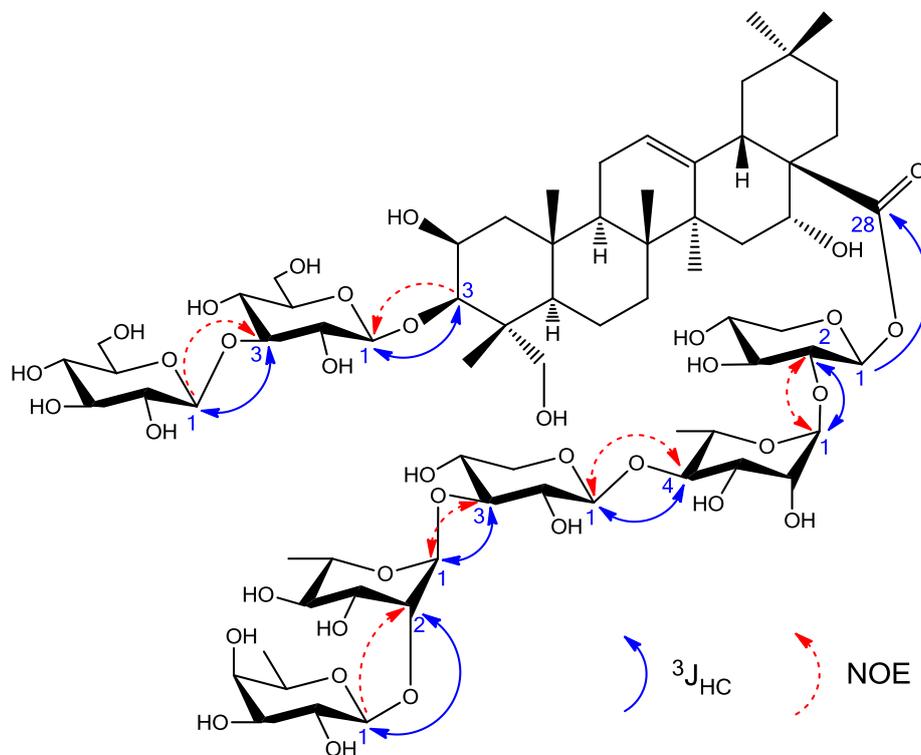


FIGURE 45 - PRINCIPALES CORRELATIONS $^3J_{\text{HC}}$ LONGUE DISTANCE DU SPECTRE HMBC ET NOE DU SPECTRE ROESY DU COMPOSE *SI*

Ainsi, le composé *SI* correspond à l'acide 3-*O*-(β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl)-28-*O*-(β -D-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl)-polygalacique.

Cette saponine triterpénique n'a encore jamais été identifiée auparavant et a donc été nommée la *Virgaureasaponine 4*.¹⁵⁴

TABLEAU 10 - ATTRIBUTION DES SIGNAUX RMN ¹³C ET ¹H (J EN Hz) DE S1 (PYRIDINE d₅, 500 MHz)

<i>Partie aglycone</i>			<i>Partie sucres</i>		
Position	δ_C	δ_H	Position	δ_C	δ_H
1	44,5	1,27 ; m 2,28 ; m	Glucose		
2	70,9	4,79 ; m	1	105,5	5,14 ; d (7,7)
3	83,4	4,33 ; m	2	74,4	4,04 ; tl (8,0)
4	43,2	-	3	88,9	4,13 ; tl (8,1)
5	48,1	1,81 ; m	4	69,7	4,12 ; tl (8,2)
6	18,5	1,63 ; m 1,89 ; m	5	78,1	3,83 ; m
7	33,4	1,70 ; m 1,82 ; m	6	62,4	4,27 ; dd (11,4 ; 3,5) 4,38 ; dd (11,4 ; 2,0)
8	40,5	-	Glucose'		
9	47,8	1,89 ; m	1	106,1	5,26 ; d (7,6)
10	37,3	-	2	75,8	4,08 ; tl (7,8)
11	24,3	2,09 ; m 2,18 ; m	3	78,4	4,04 ; tl (8,0)
12	123,1	5,65 ; tl (3,7)	4	71,8	4,16 ; tl (8,0)
13	144,7	-	5	78,9	4,03 ; m
14	42,6	-	6	62,7	4,30 ; dd (12,2 ; 6,2) 4,55 ; dd (12,2 ; 2,0)
15	36,5	1,92 ; m 2,28 ; m	Xylose		
16	74,2	5,25 ; sl	1	95,4	6,18 ; d (6,7)
17	49,7	-	2	77,0	4,28 ; tl (7,3)
18	41,7	3,47 ; dd (13,4 ; 4,0)	3	77,4	4,22 ; tl (7,7)
19	47,6	1,35 ; m 2,77 ; t (13,4)	4	71,0	4,17 ; m
20	31,1	-	5	67,3	3,82 ; dd (11,9 ; 9,0) 4,35 ; dd (11,9 ; 5,6)
21	36,3	1,31 ; m 2,43 ; m	Rhamnose		
22	32,4	2,21 ; m 2,41 ; m	1	101,9	6,24 ; sl
23	65,6	3,76 ; d (10,7) 4,34 ; d (10,7)	2	72,1	4,79 ; dl (3,0)
24	15,4	1,41 ; s	3	72,8	4,65 ; dd (9,1 ; 2,7)
25	17,7	1,56 ; s	4	84,3	4,36 ; tl (9,4)
26	17,8	1,16 ; s	5	68,9	4,42 ; dq (9,7 ; 6,0)
27	27,4	1,79 ; s	6	19,0	1,76 ; d (6,0)
28	176,3	-	Xylose'		
29	33,4	0,97 ; s	1	107,1	5,07 ; d (7,7)
30	24,8	1,07 ; s	2	76,3	4,07 ; dd (7,7 ; 9,4)
			3	83,7	4,15 ; tl (10,0)
			4	69,6	4,09 ; m
			5	67,5	3,43 ; tl (10,2) 4,14 ; dd (10,4 ; 5,4)
			Rhamnose'		
			1	101,6	6,35 ; sl
			2	82,9	4,78 ; dl (3,1)
			3	72,9	4,60 ; dd (9,2 ; 3,0)
			4	74,7	4,17 ; tl (9,2)
			5	69,8	4,90 ; dq (9,3 ; 6,0)
			6	18,8	1,59 ; d (6,0)
			Fucose		
			1	107,8	5,11 ; d (7,7)
			2	73,3	4,44 ; dd (9,5 ; 7,7)
			3	75,6	4,08 ; dd (9,5 ; 3,0)
			4	73,0	3,98 ; dl (2,7)
			5	72,0	3,77 ; ql (7,0)
			6	17,6	1,47 ; d (6,4)

I.7.2. COMPOSE S2

Le composé S2 se présente sous la forme d'une poudre amorphe blanc cassé (16 mg) pour lequel l'HRESI-MS (mode positif) a donné un ion moléculaire $[M + 2NH_4]^{2+}$ avec un m/z de 702,3619, ce qui correspond à la formule brute $C_{64}H_{104}O_{31}$, 1368,6561. La molécule comporte ainsi 13 insaturations.

Les spectres RMN 1H et ^{13}C du composé S2 (Tableau 11 p. 102), accompagnés des spectres à deux dimensions, indiquent que les signaux correspondant à la partie aglycone sont identiques à ceux du composé S1. Le composé S2 est donc lui aussi formé d'un acide polygalacique di-substitué en C-3 et C-28.

Ces mêmes spectres montrent également la présence de 6 signaux correspondant à 6 protons anomériques (Figure 46) à δ_H 5,09 (d ; J = 7,6 Hz), 5,13 (d ; J = 7,6 Hz), 5,16 (d ; J = 7,9 Hz), 6,19 (d ; J = 6,4 Hz), 6,24 (sl) et 6,33 (sl) corrélant sur le spectre HSQC avec 6 carbones anomériques, respectivement à δ_C 107,2 ; 108,0 ; 106,0 ; 95,6 ; 102,0 et 101,9. Ces signaux indiquent la présence de 6 sucres dans la molécule, reliés au triterpène et liés entre eux par des liaisons O-glycosidiques.

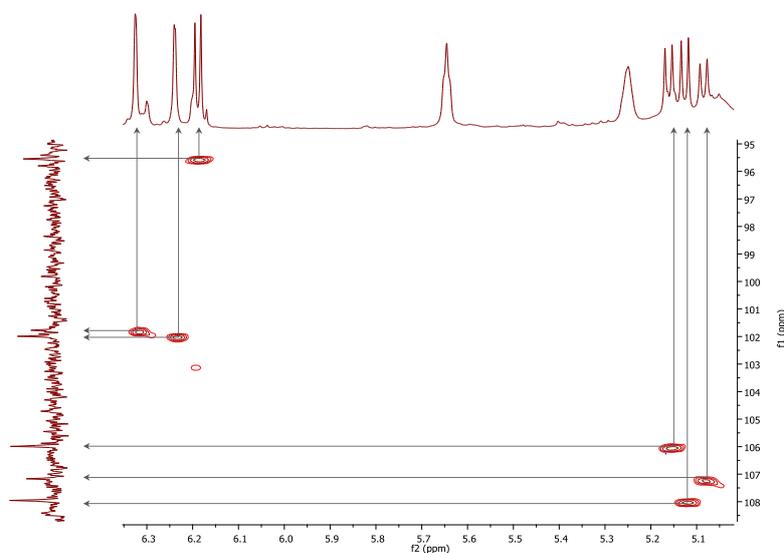


FIGURE 46 - SPECTRE RMN HSQC DU COMPOSE S2 (ZOOM F2 : 5,0-6,4 PPM ; F1 : 95-109 PPM)

Tous les signaux de la partie osidique sont identiques à ceux du composé S1, ils diffèrent cependant par la perte d'un sucre. En effet, seulement 6 sucres sont ici détectés et les signaux du glucose sont différents, en particulier la position 3. La valeur du signal C-3 passe de δ_C 88,9 lorsque la position est substituée dans le cas du composé S1, à δ_C 78,9 dans le cas du composé S2, ce qui indique une position 3 libre, et ainsi une perte du glucose' par rapport au composé S1.

L'étude de la configuration absolue et de la configuration anomérique a également été réalisée et les mêmes résultats que dans le cas du composé *S1* ont été obtenus. Le glucose, le fucose et les xylooses sont tous de forme β -D alors que les rhamnoses sont de forme α -L.

Enfin, l'enchaînement des 6 sucres ainsi que les liaisons à la partie aglycone ont été vérifiés par l'observation des corrélations HMBC et ROESY (Figure 47) tout comme pour le composé *S1*. Ainsi, le glucose a été identifié sur la position 3 de l'aglycone et un enchaînement de 5 sucres a été caractérisé sur la position 28 de l'aglycone. Tout comme pour le composé *S1*, le premier xylose est relié à la position 28 de l'aglycone, le premier rhamnose est connecté à la position 2 du xylose, le second xylose à la position 4 du rhamnose, le second rhamnose est lié à la position 3 du xylose' et enfin le fucose est relié à la position 2 du rhamnose'.

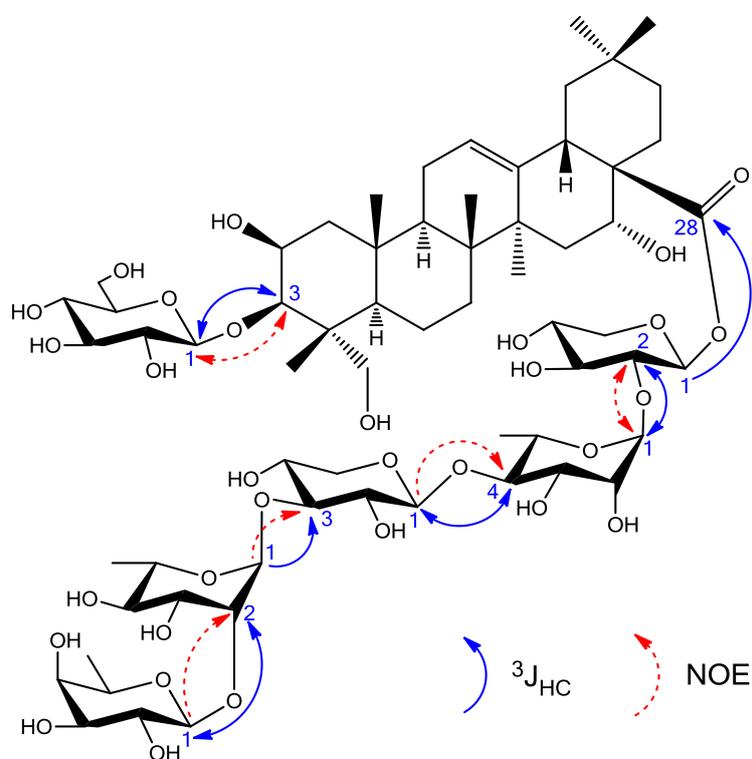


FIGURE 47 - PRINCIPALES CORRELATIONS $^3J_{HC}$ LONGUE DISTANCE DU SPECTRE HMBC ET NOE DU SPECTRE ROESY DU COMPOSE *S2*

Ainsi, le composé *S2* correspond à l'acide 3-*O*-(β -D-glucopyranosyl)-28-*O*-(β -D-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl)-polygalacique.

Cette saponine triterpénique n'a encore jamais été identifiée auparavant et a donc été nommée la *Virgaureasaponine 5*.¹⁵⁴

TABLEAU 11 - ATTRIBUTION DES SIGNAUX RMN ¹³C ET ¹H (J EN Hz) DE S2 (PYRIDINE d₅, 500 MHz)

<i>Partie aglycone</i>			<i>Partie sucres</i>		
Position	δ_C	δ_H	Position	δ_C	δ_H
1	44,5	1,29 ; m 2,32 ; m	Glucose		
2	70,8	4,82 ; m	1	106,0	5,16 ; d (7,9)
3	83,6	4,34 ; m	2	76,0	4,03 ; tl (8,3)
4	43,2	-	3	78,9	4,20 ; tl (8,9)
5	48,3	1,80 ; m	4	71,9	4,24 ; tl (9,2)
6	18,7	1,65 ; m 1,88 ; m	5	78,7	3,92 ; ddd (8,7 ; 5,0 ; 2,2)
7	33,6	1,70 ; m 1,82 ; m	6	62,9	4,36 ; dd (11,9 ; 5,2) 4,49 ; dd (11,9 ; 2,2)
8	40,5	-	Xylose		
9	47,9	1,89 ; m	1	95,6	6,19 ; d (6,4)
10	37,4	-	2	77,1	4,30 ; tl (7,3)
11	24,4	2,10 ; m 2,18 ; m	3	77,5	4,23 ; tl (9,2)
12	123,2	5,65 ; tl (3,5)	4	71,1	4,18 ; m
13	144,8	-	5	67,4	3,81 ; dd (11,7 ; 8,5) 4,36 ; dd (11,7 ; 5,2)
14	42,7	-	Rhamnose		
15	36,6	1,93 ; m 2,31 ; m	1	102,0	6,24 ; sl
16	74,3	5,26 ; sl	2	72,2	4,79 ; dl (3,3)
17	49,8	-	3	72,9	4,67 ; dd (9,2 ; 2,7)
18	41,9	3,48 ; dd (13,4 ; 3,4)	4	84,4	4,42 ; tl (9,2)
19	47,7	1,36 ; m 2,77 ; t (13,4)	5	69,0	4,46 ; dq (9,7 ; 5,9)
20	31,2	-	6	19,0	1,76 ; d (5,9)
21	36,4	1,33 ; m 2,43 ; m	Xylose'		
22	32,5	2,23 ; m 2,43 ; m	1	107,2	5,09 ; d (7,6)
23	66,3	3,76 ; d (10,7) 4,37 ; d (10,7)	2	76,3	4,08 ; tl (8,1)
24	15,5	1,43 ; s	3	84,1	4,16 ; tl (9,3)
25	17,7	1,56 ; s	4	69,7	4,11 ; m
26	17,8	1,17 ; s	5	67,6	3,43 ; tl (10,1) 4,16 ; dd (10,5 ; 5,6)
27	27,5	1,78 ; s	Rhamnose'		
28	176,4	-	1	101,9	6,33 ; sl
29	33,5	0,98 ; s	2	83,0	4,79 ; dl (3,2)
30	24,9	1,08 ; s	3	73,2	4,60 ; dd (9,2 ; 3,2)
			4	74,9	4,18 ; tl (9,2)
			5	69,9	4,91 ; dq (9,5 ; 6,1)
			6	18,8	1,61 ; d (6,1)
			Fucose		
			1	108,0	5,13 ; d (7,6)
			2	73,5	4,46 ; dd (9,5 ; 7,6)
			3	75,8	4,06 ; dd (9,5 ; 3,0)
			4	73,3	3,99 ; dl (3,1)
			5	72,1	3,78 ; m
			6	17,8	1,48 ; d (6,4)

I.7.3. COMPOSE S7

Le composé *S7* se présente sous la forme d'une poudre amorphe blanc cassé (1 mg) pour lequel l'HRESI-MS (mode positif) a donné un ion moléculaire $[M + Na]^+$ avec un m/z de 1341,6092, ce qui correspond à la formule brute $C_{63}H_{98}O_{29}$, 1318,6200. La molécule comporte ainsi 15 insaturations.

Les spectres RMN 1H et ^{13}C du composé *S7* (Tableau 12 p. 110), accompagnés des spectres à deux dimensions, montrent des signaux correspondant à la partie aglycone proches de ceux des composés *S1* et *S2*. Cependant certaines différences sont à noter au niveau du premier cycle. Les 6 groupements méthyle sont repérés à δ_H 0,95 ; 1,03 ; 1,20 ; 1,63 ; 1,79 ; 1,99 et δ_C 33,5 ; 24,9 ; 17,8 ; 17,5 ; 27,4 ; 14,7 (Figure 48). Des décalages sont ainsi observés par rapport aux composés précédents, en particulier le signal à δ_H 1,41 (H-24) du composé *S1* est ici observé à δ_H 1,99.

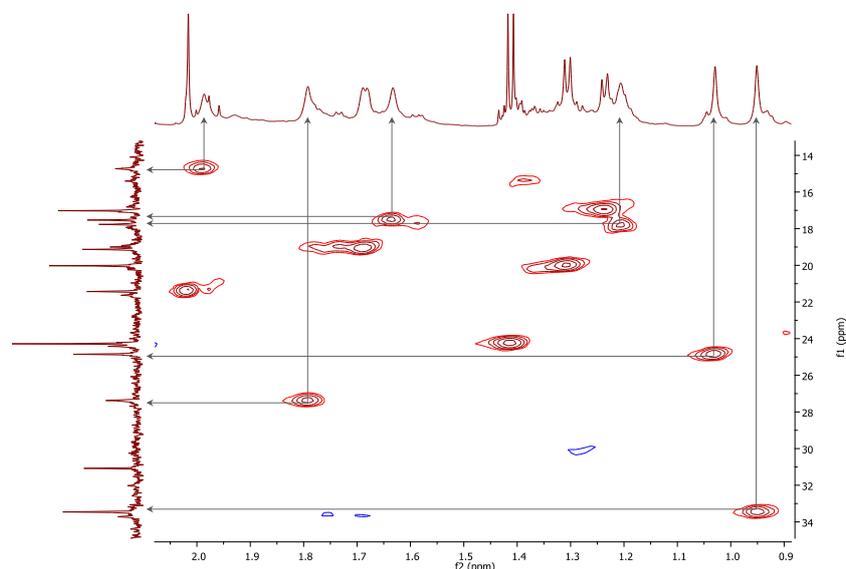


FIGURE 48 - SPECTRE RMN HSQC DU COMPOSE S7 (ZOOM F2 : 0,9-2,1 PPM ; F1 : 14-34 PPM)

Le groupement éthylénique apparaît toujours à δ_H 5,65 sous forme d'un pseudo triplet et à δ_C 122,6, accompagné du carbone quaternaire sp^2 à δ_C 145,0. De plus, le signal de la fonction ester est toujours présent à 176,4. En revanche, les trois groupements H-C-OH en position 3, 2 et 16 sont présents à δ_H 4,74 et δ_C 86,4 ; δ_H 4,83 et δ_C 70,8 ; δ_H 5,24 et δ_C 74,0 (Figure 49). Un décalage est ainsi noté au niveau de la position 3. De plus, les signaux correspondant aux deux protons diastéréotopiques du groupement CH_2OH sont absents.

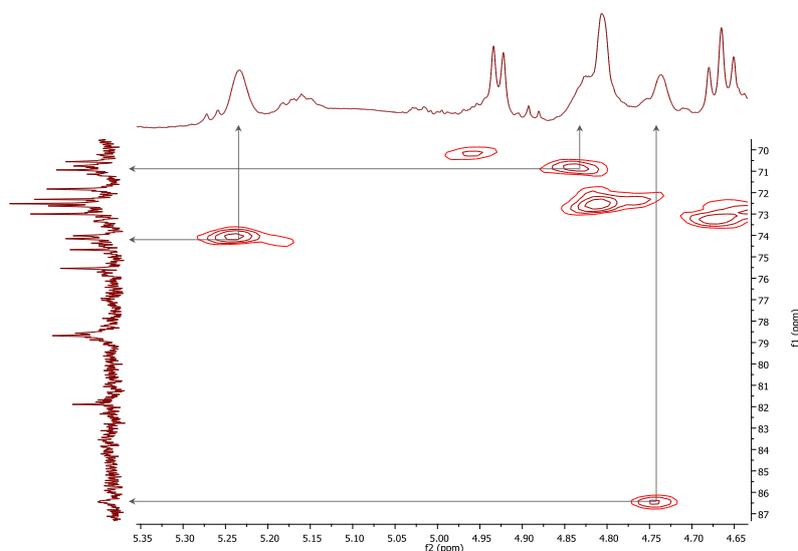


FIGURE 49 - SPECTRE RMN HSQC DU COMPOSE S7 (ZOOM F2 : 4,6-5,3 PPM ; F1 : 70-87 PPM)

De manière générale, les signaux correspondant aux cycles 2, 3, 4 et 5 sont identiques à ceux de l'acide polygalacique, mais les signaux des positions 1, 3, 4, 5, 6, 23 et 24 sont différents. Par exemple, les corrélations 3J HMBC entre H-29 et C-19, C-20, C-21 et C-30 sont toujours présentes aux mêmes valeurs que pour l'acide polygalacique, tandis que les corrélations entre H-24 et C-3, C-4 et C-5 sont situées dans une zone différente (Figure 50). Toutes ces données et la comparaison des valeurs avec la littérature, permettent de définir la partie aglycone comme étant l'acide zanhique,¹⁵⁵ un triterpène oléanolique différant de l'acide polygalacique uniquement au niveau de la position 23, où le groupement CH₂OH est remplacé par un acide carboxylique. Le signal du carbone de l'acide carboxylique, apparaissant théoriquement à δ_c 181,0 environ, n'est cependant pas visible sur le spectre carbone. Une trop faible concentration du composé empêche certainement l'observation de ce signal.

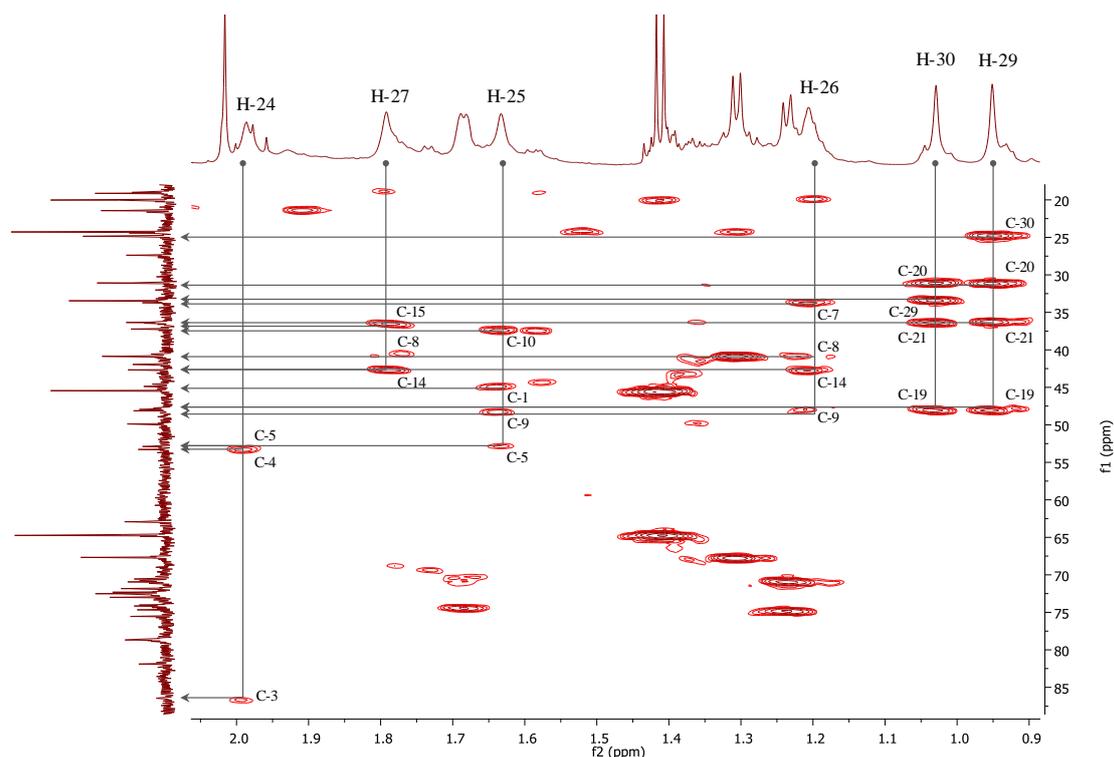


FIGURE 50 - SPECTRE RMN HMBC DU COMPOSE S7 (ZOOM F2 : 0,9-2,1 PPM ; F1 : 20-90 PPM)

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C du composé S7 (Tableau 12 p. 110), accompagnés des spectres à deux dimensions, montrent également la présence de 4 signaux correspondant à 4 protons anomériques (Figure 51) à δ_{H} 4,93 (d ; $J = 7,3$ Hz), 5,16 (d ; $J = 7,7$ Hz), 6,04 (d ; $J = 8,1$ Hz) et 6,35 (sl) corrélant sur le spectre HSQC avec 4 carbones anomériques, respectivement à δ_{C} 106,2 ; 105,5 ; 94,9 et 102,1. Ces signaux indiquent la présence de 4 sucres dans la molécule, reliés au triterpène et liés entre eux par des liaisons *O*-glycosidiques.

La totalité des attributions de chaque sucre a été réalisée grâce à une analyse complète des spectres deux dimensions, HSQC-TOCSY, COSY, HMBC et ROESY. L'HSQC-TOCSY en particulier a permis d'identifier une chaîne de 6 signaux correspondant aux signaux d'un glucose (Glc), une chaîne de 5 signaux correspondant aux signaux d'un xylose (Xyl) et enfin deux chaînes de 6 signaux correspondant aux signaux d'un fucose et d'un rhamnose (Fuc et Rha). Ces données ont été complétées par l'analyse des spectres COSY et HMBC pour déterminer l'ordre précis des signaux, ainsi que par l'analyse du spectre ROESY pour confirmer la configuration.

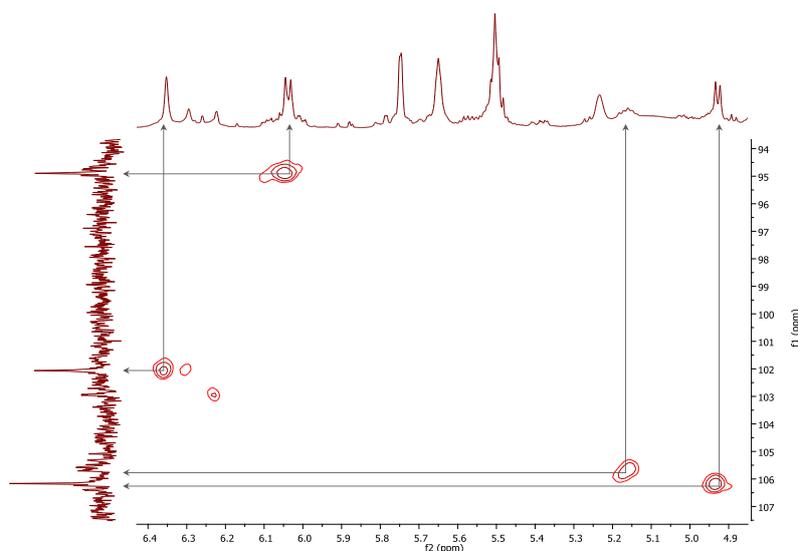


FIGURE 51 - SPECTRE RMN HSQC DU COMPOSE S7 (ZOOM F2 : 4,9-6,4 PPM ; F1 : 94-107 PPM)

L'étude de la configuration absolue et de la configuration anomérique a également été réalisée et les mêmes résultats que dans le cas des composés précédents ont été obtenus. Le glucose, le fucose et le xylose sont tous de forme β -D alors que le rhamnose est de forme α -L.

D'autre part, les spectres RMN ^1H et ^{13}C , accompagnés des spectres à deux dimensions, montrent également des signaux correspondant à deux méthyles secondaires (Figure 52) à δ_{H} 1,31 (d ; $J = 6,2$ Hz), δ_{C} 20,0 et δ_{H} 1,41 (d ; $J = 6,2$ Hz), δ_{C} 24,3, deux méthylènes à δ_{H} 2,56, 2,73, δ_{C} 40,9 et δ_{H} 2,66, 2,83, δ_{C} 45,4, deux protons portés par un carbone lié à un oxygène à δ_{H} 4,57, δ_{C} 64,7 et δ_{H} 5,50, δ_{C} 67,7 et enfin deux fonctions ester à δ_{C} 170,3 et 171,7, suggérant la présence d'un acide 3-hydroxybutyrique dimérique.

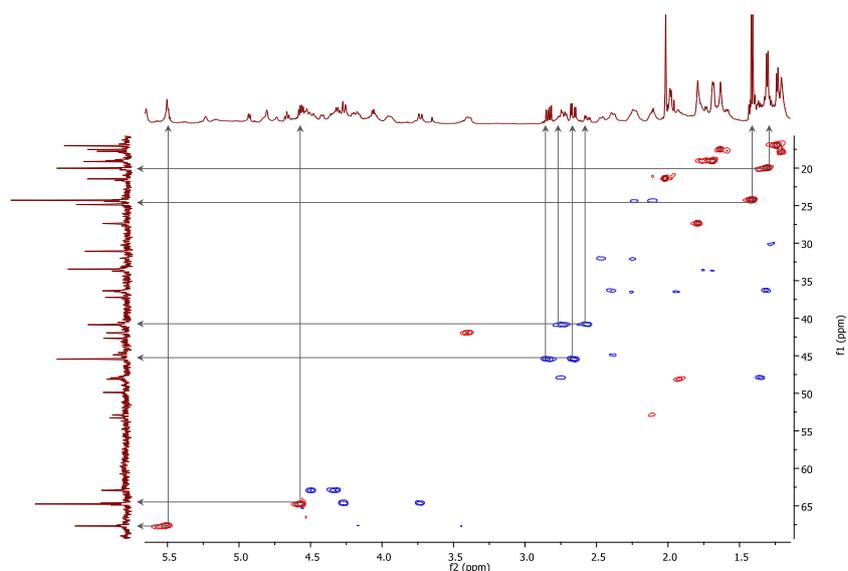


FIGURE 52 - SPECTRE RMN HSQC DU COMPOSE S7 (ZOOM F2 : 1,0-5,7 PPM ; F1 : 15-70 PPM)

Cette conclusion est confirmée par l'observation de corrélations 3J sur le spectre HMBC entre les protons en position 2 de cet acide hydroxybutyrique et les carbones en position 1, 3 et 4 (Figure 53), entre les protons en position 2' et les carbones en position 1', 3' et 4', mais également entre le proton en position 3' et la fonction ester 1', ainsi qu'entre le proton en position 3 et les deux fonctions ester 1 et 1'.

La configuration absolue de cette chaîne latérale n'a cependant pas pu être déterminée.

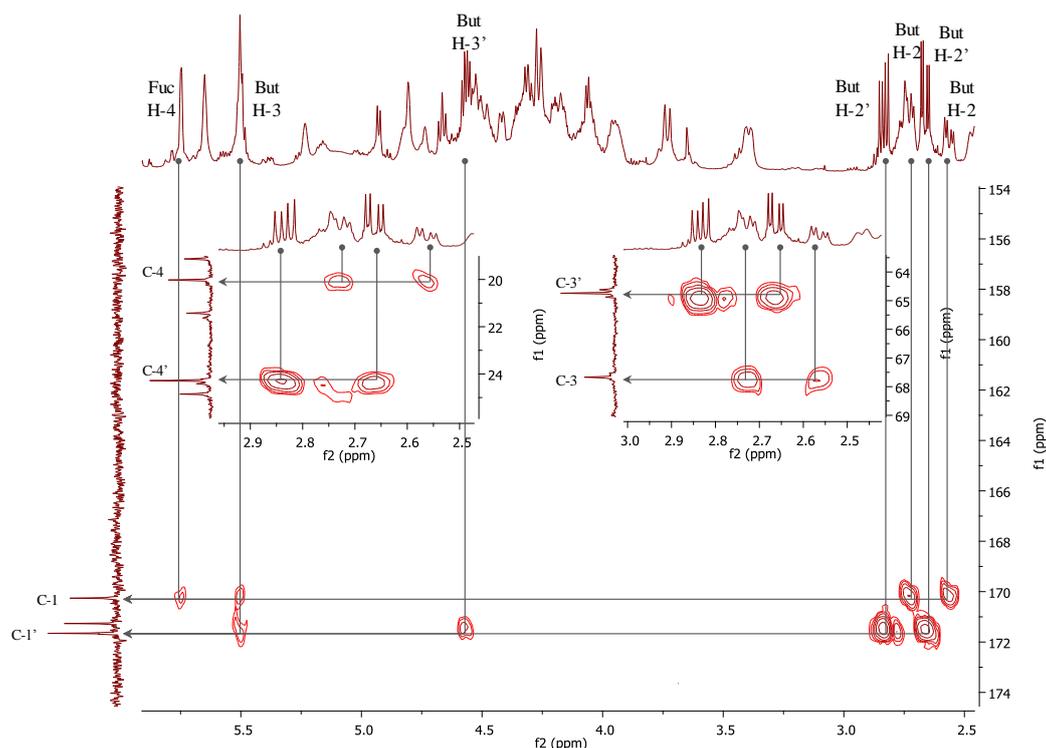


FIGURE 53 - SPECTRE RMN HMBC DU COMPOSE S7 (ZOOM F2 : 2,5-6,0 PPM ; F1 : 154-174 PPM)

De plus, les spectres RMN ^1H et ^{13}C , accompagnés des spectres à deux dimensions, montrent également la présence d'un groupement acétate. En effet, un singulet correspondant à un méthyle est observé à δ_{H} 2,02 ainsi qu'une corrélation longue distance entre ce signal et le carbone quaternaire d'une fonction ester à δ_{C} 171,3.

Enfin, l'enchaînement des 4 sucres, de la chaîne latérale et de l'acétate, ainsi que les liaisons à la partie aglycone ont été identifiés par l'observation des corrélations HMBC et ROESY (Figure 54).

Tout d'abord, le proton H-3 de l'acide polygalactique montre une corrélation NOE avec le proton anomérique du glucose, ce qui indique une liaison *O*-glycosidique entre le glucose et l'aglycone en position 3.

Par ailleurs, le proton anomérique du fucose montre une corrélation ^3J HMBC avec le C-28 de la fonction ester du triterpène, ce qui définit une liaison *O*-glycosidique entre le fucose et l'aglycone en position 28.

Ensuite, la corrélation ^3J HMBC entre le proton H-2 du fucose et le C-1 du rhamnose démontre la connexion entre le rhamnose et le fucose en position 2. Cette liaison est confirmée par la présence d'une corrélation sur le spectre ROESY entre le proton H-2 du fucose et le proton anomérique du rhamnose.

De plus, le proton anomérique du xylose montre quant à lui une corrélation 3J HMBC avec le C-3 du fucose. Le xylose est donc relié à la position 3 du fucose. Une corrélation NOE entre le proton H-1 du xylose et le proton H-3 du fucose confirme cette connexion.

Une autre corrélation longue distance est observée entre le proton H-4 du xylose et le carbone quaternaire de l'acétate. Ce groupement est donc porté par le xylose en position 4. Cette liaison est confirmée par le déblindage de 3 ppm subi par le C-4 du xylose.

Enfin, la corrélation 3J HMBC entre le proton H-4 du fucose et le C-1 de la chaîne 3-hydroxybutyrate démontre la connexion entre ce groupement et le fucose en position 4.

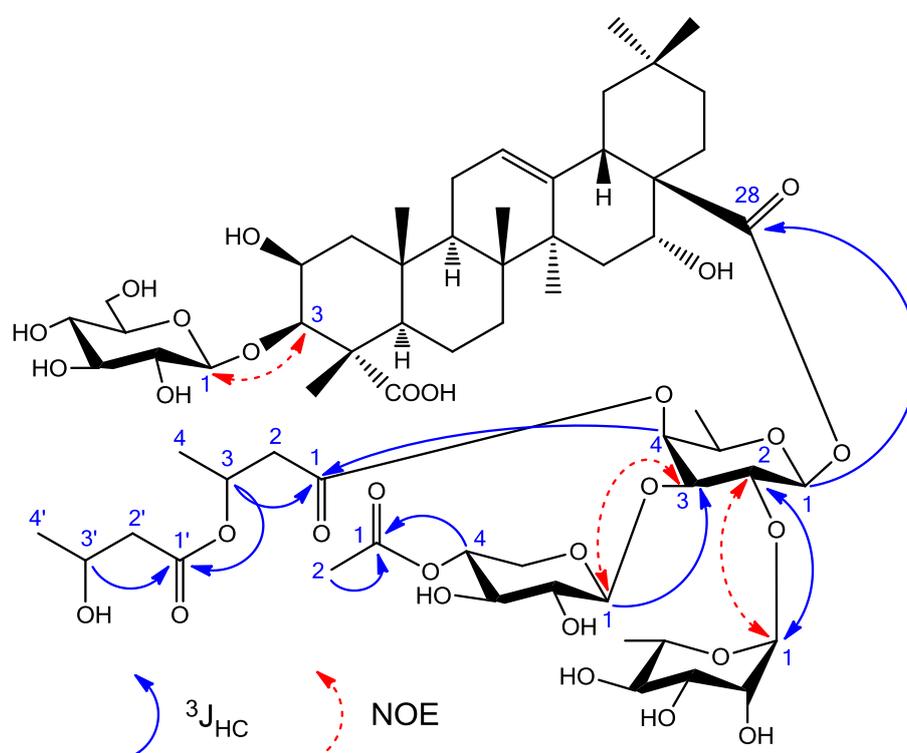


FIGURE 54 - PRINCIPALES CORRELATIONS $^3J_{HC}$ LONGUE DISTANCE DU SPECTRE HMBC ET NOE DU SPECTRE ROESY DU COMPOSE S7

Ainsi, le composé S7 correspond à l'acide 3-O-(β -D-glucopyranosyl)-28-O-(α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[4-O- β -D-acetylxylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[4-O-(3-(3-hydroxy-1-oxobutoxy)-1-oxobutyl)]- β -D-fucopyranosyl])-zanhique.

Cette saponine triterpénique n'a encore jamais été identifiée auparavant et a donc été nommée la *Virgaureasaponine 8*.

TABLEAU 12 - ATTRIBUTION DES SIGNAUX RMN ¹³C ET ¹H (J EN Hz) DE S7 (PYRIDINE d₅, 600 MHz)

<i>Partie aglycone</i>			<i>Partie sucres et esters</i>		
Position	δ _C	δ _H	Position	δ _C	δ _H
1	44,9	1,37 ; m 2,38 ; m	Glucose		
2	70,8	4,83 ; m	1	105,5	5,16 ; d (7,7)
3	86,4	4,74 ; d (3,0)	2	75,5	3,96 ; br t (8,1)
4	53,3	-	3	78,9	4,20 ; br t (8,7)
5	52,9	2,11 ; m	4	71,8	4,19 ; br t (9,2)
6	21,6	1,65 ; m 1,87 ; m	5	78,7	3,94 ; m
7	33,7	1,68 ; m 1,76 ; m	6	62,9	4,33 ; dd (11,7 ; 6,0) 4,50 ; dd (11,7 ; 2,0)
8	40,5	-	Fucose		
9	48,1	1,92 ; m	1	94,9	6,04 ; d (8,1)
10	37,2	-	2	73,3	4,66 ; br t (8,6)
11	24,4	2,10 ; m 2,23 ; m	3	81,9	4,42 ; dd (9,3 ; 2,7)
12	122,6	5,65 ; br t (3,5)	4	74,7	5,75 ; br d (2,7)
13	145,0	-	5	70,9	4,06 ; br q (6,3)
14	42,7	-	6	17,0	1,23 ; d (6,3)
15	36,5	1,94 ; m 2,25 ; m	Rhamnose		
16	74,0	5,24 ; br s	1	102,1	6,35 ; br s
17	49,9	-	2	72,5	4,81 ; m
18	41,9	3,40 ; dd (13,7 ; 3,7)	3	72,6	4,51 ; dd (9,2 ; 2,9)
19	48,0	1,35 ; m 2,75 ; m	4	74,2	4,28 ; br t (9,2)
20	31,1	-	5	70,6	4,54 ; m
21	36,4	1,31 ; m 2,40 ; m	6	19,1	1,69 ; d (5,9)
22	32,0	2,24 ; m 2,46 ; m	Xylose		
23	nd	-	1	106,2	4,93 ; d (7,3)
24	14,7	1,99 ; s	2	73,0	4,31 ; br t (8,2)
25	17,5	1,63 ; s	3	72,5	4,16 ; br t (8,5)
26	17,8	1,20 ; s	4	72,3	5,50 ; m
27	27,4	1,79 ; s	5	64,6	3,73 ; br t (11,0) 4,26 ; dd (11,0 ; 5,1)
28	176,4	-	Acétate		
29	33,5	0,95 ; s	1	171,3	-
30	24,9	1,03 ; s	2	21,4	2,02 ; s
			Hydroxybutyrate dimérique		
			1	170,3	-
			2	40,9	2,56 ; dd (15,7 ; 6,0) 2,73 ; dd (15,8 ; 6,7)
			3	67,7	5,50 ; q (6,4)
			4	20,0	1,31 ; d (6,2)
			1'	171,7	-
			2'	45,4	2,66 ; dd (14,8 ; 5,5) 2,83 ; dd (14,8 ; 7,7)
			3'	64,7	4,57 ; q (6,4)
			4'	24,3	1,41 ; d (6,2)

I.7.4. COMPOSE S8

Le composé *S8* se présente sous la forme d'une poudre amorphe blanc cassé (8 mg) pour lequel l'HRESI-MS (mode positif) a donné un ion moléculaire $[M + 2Na]^{2+}$ avec un m/z de 895,3859, ce qui correspond à la formule brute $C_{80}H_{128}O_{41}$, 1744,7934. La molécule comporte ainsi 17 insaturations.

Les spectres RMN 1H et ^{13}C du composé *S8* (Tableau 13 p. 116), accompagnés des spectres à deux dimensions, indiquent que les signaux correspondant à la partie aglycone sont identiques à ceux des composés *S1* et *S2*. Le composé *S8* est donc lui aussi formé d'un acide polygalactique di-substitué en C-3 et C-28.

Ces mêmes spectres montrent également la présence de 7 signaux correspondant à 7 protons anomériques (Figure 55) à δ_H 5,02 (d ; $J = 7,7$ Hz), 5,14 (d ; $J = 7,7$ Hz), 5,26 (d ; $J = 7,8$ Hz), 5,74 (d ; $J = 2,2$ Hz), 5,91 (sl), 6,00 (d ; $J = 8,1$ Hz) et 6,22 (sl) corrélant sur le spectre HSQC avec 6 carbones anomériques, respectivement à δ_C 107,3 ; 105,7 ; 106,2 ; 112,7 ; 102,6 ; 94,7 et 102,9. Ces signaux indiquent la présence de 7 sucres dans la molécule, reliés au triterpène et liés entre eux par des liaisons *O*-glycosidiques.

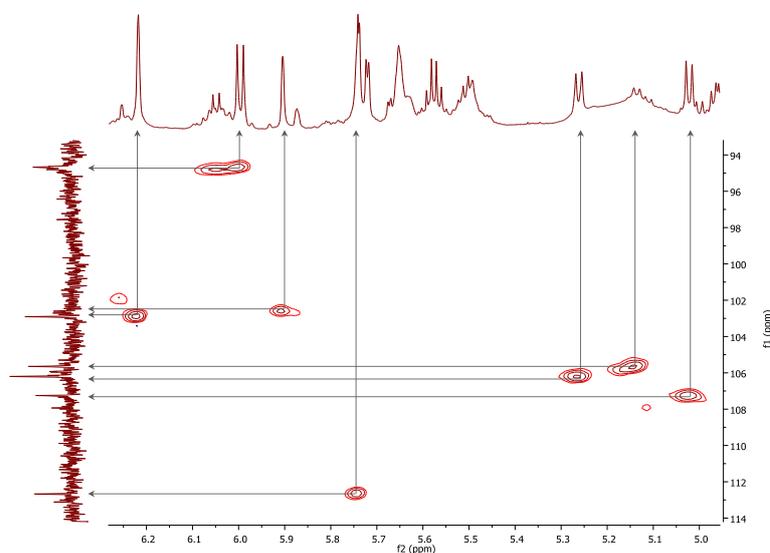


FIGURE 55 - SPECTRE RMN HSQC DU COMPOSE S8 (ZOOM F2 : 5,0-6,3 PPM ; F1 : 94-114 PPM)

La totalité des attributions de chaque sucre a été réalisée grâce à une analyse complète des spectres à deux dimensions, HSQC-TOCSY, COSY, HMBC et ROESY. Ainsi deux chaînes de 6 signaux correspondant aux signaux de deux glucoses (Glc et Glc') ont été observées sur le spectre HSQC-TOCSY (Figure 56). De plus, une chaîne de 5 signaux correspondant aux

signaux d'un xylose (Xyl) et trois chaînes de 6 signaux correspondant aux signaux d'un fucose et de deux rhamnoses (Fuc, Rha et Rha') ont également été observés. Enfin le spectre a également montré des signaux correspondant à un apiose (Api), un pentose modifié, présent sous forme furanose, caractérisé par un C-3 quaternaire, sur lequel est lié un CH₂OH (C-5). Ces données ont été complétées par l'analyse des spectres COSY et HMBC pour déterminer l'ordre précis des signaux, ainsi que par l'analyse du spectre ROESY pour confirmer la configuration.

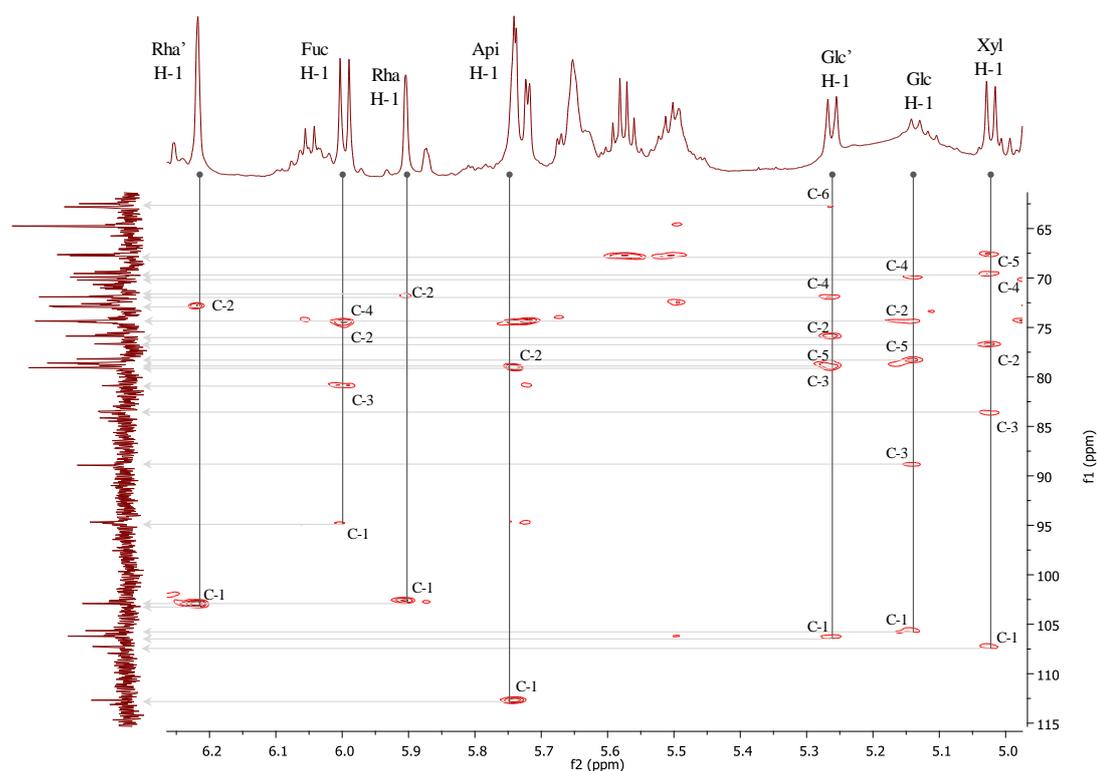


FIGURE 56 - SPECTRE RMN HSQC-TOCSY DU COMPOSE S8 (ZOOM F2 : 5,0-6,3 PPM ; F1 : 60-115 PPM)

L'étude de la configuration absolue et de la configuration anomérique a également été réalisée et les mêmes résultats que dans le cas des composés précédents ont été obtenus. Le glucose, le fucose et le xylose sont tous de forme β -D alors que le rhamnose est de forme α -L. De plus, le signal du proton anomérique de l'apirose sous forme de doublet ($J = 2,2$ Hz) indique une orientation en β de l'apirose sous sa forme furanique et l'étude de la configuration absolue a identifié l'apirose comme étant de forme D.

D'autre part, les spectres RMN ^1H et ^{13}C , accompagnés des spectres à deux dimensions, montrent également des signaux correspondant à un acide 3-hydroxybutyrique dimérique, tout comme pour le composé précédent, ainsi que des signaux correspondant à un groupement acétate.

Enfin, l'enchaînement des 7 sucres, de la chaîne latérale et de l'acétate, ainsi que les liaisons à la partie aglycone ont été identifiés par l'observation des corrélations HMBC et ROESY (Figure 57 et Figure 58).

Tout d'abord, le proton H-1 du premier glucose montre une corrélation ^3J HMBC avec le C-3 de l'acide polygalactique, ce qui indique une liaison *O*-glycosidique entre le glucose et l'aglycone en position 3. Cette liaison est confirmée par une corrélation NOE entre le proton H-1 du glucose et le proton H-3 de l'acide polygalactique.

Ensuite, la corrélation ^3J HMBC entre le proton anomérique du second glucose et le C-3 du premier glucose témoigne de la liaison entre le glucose' et le glucose en position 3. Cet enchaînement est confirmé par une corrélation sur le spectre ROESY entre le proton H-1 du second glucose et le proton H-3 du premier glucose.

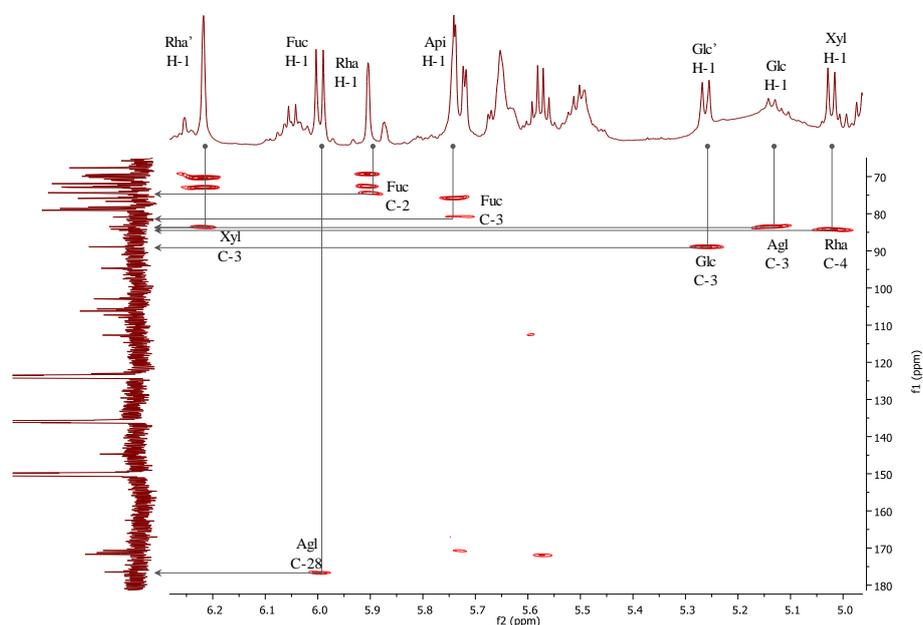


FIGURE 57 - SPECTRE RMN HMBC DU COMPOSÉ S8 (ZOOM F2 : 5,0-6,3 PPM ; F1 : 65-180 PPM)

Par ailleurs, le proton anomérique du fucose montre une corrélation 3J HMBC avec le C-28 de la fonction ester du triterpène, ce qui définit une liaison *O*-glycosidique entre le fucose et l'aglycone en position 28.

De plus, la corrélation 3J HMBC entre le proton H-2 du fucose et le C-1 du premier rhamnose démontre la connexion entre le rhamnose et le fucose en position 2. Cette liaison est confirmée par la présence d'une corrélation sur le spectre ROESY entre le proton H-2 du fucose et le proton anomérique du rhamnose.

Le proton H-4 du rhamnose montre quant à lui une corrélation 3J HMBC avec le C-1 du xylose. Le xylose est donc relié à la position 4 du rhamnose. Une corrélation NOE entre le proton H-1 du xylose et le proton H-4 du rhamnose confirme cette connexion.

Une corrélation 3J HMBC entre le proton anomérique d'un second rhamnose et le C-3 du xylose est également observée, indiquant un enchainement entre le rhamnose' et le xylose, confirmé par une corrélation sur le spectre ROESY entre le proton anomérique du rhamnose et le proton H-3 du xylose.

D'autre part, le proton anomérique de l'apiose montre corrélation 3J HMBC avec le C-3 du fucose. L'apiose est donc relié à la position 3 du fucose. Une corrélation NOE entre le proton H-1 de l'apiose et le proton H-3 du fucose confirme cette liaison.

Une autre corrélation longue distance est observée entre le proton H-5 de l'apiose et le carbone quaternaire de l'acétate. Ce groupement est donc porté par l'apiose en position 5. Cette liaison est confirmée par le déblindage de 2 ppm subi par le C-4 de l'apiose.

Enfin, la corrélation 3J HMBC entre le proton H-4 du fucose et le C-1 de la chaîne 3-hydroxybutyrate démontre la connexion entre ce groupement et le fucose en position 4.

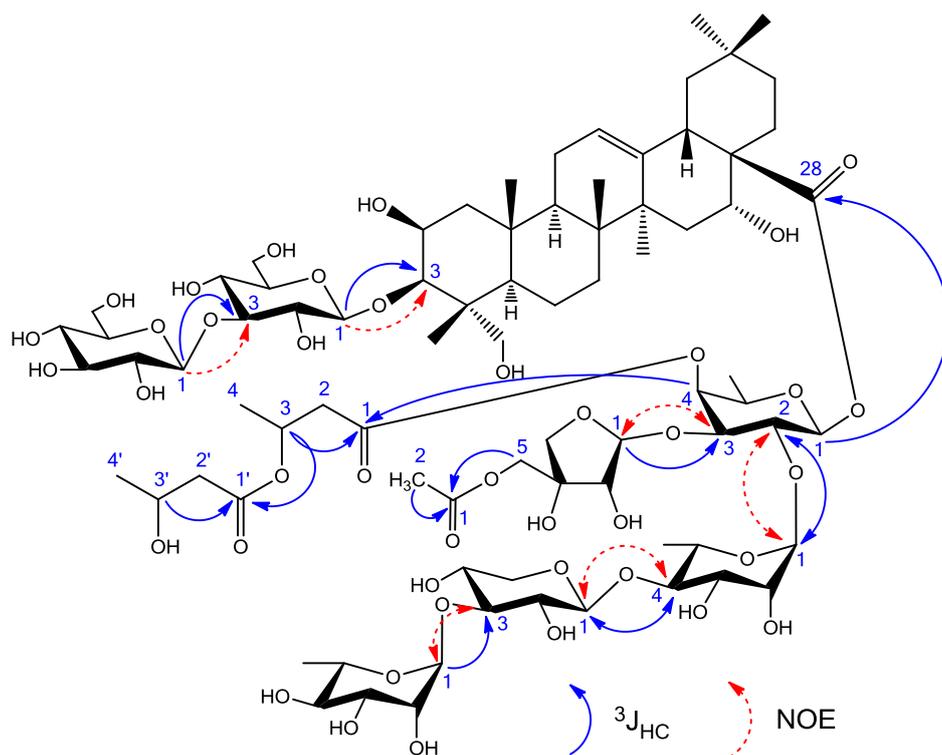


FIGURE 58 - PRINCIPALES CORRELATIONS $^3J_{HC}$ LONGUE DISTANCE DU SPECTRE HMBC ET NOE DU SPECTRE ROESY DU COMPOSE S8

Ainsi, le composé S8 correspond à l'acide 3-*O*-(β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl)-28-*O*-(α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[5-*O*- β -D-acetylapiofuranosyl-(1 \rightarrow 3)-[4-*O*-(3-(3-hydroxy-1-oxobutoxy)-1-oxobutyl)]- β -D-fucopyranosyl))-polygalacique.

Cette saponine triterpénique n'a encore jamais été identifiée auparavant et a donc été nommée la *Virgaureasaponine 7*.

TABLEAU 13 - ATTRIBUTION DES SIGNAUX RMN ¹³C ET ¹H (J EN HZ) DE S8 (PYRIDINE d₅, 600 MHz)

<i>Partie aglycone</i>			<i>Partie sucres et esters</i>		
Position	δ _C	δ _H	Position	δ _C	δ _H
1	44,7	1,28 ; m 2,32 ; m	Glucose		
2	70,8	4,81 ; m	1	105,7	5,14 ; d (7,7)
3	83,5	4,35 ; m	2	74,5	4,04 ; tl (8,0)
4	43,2	-	3	88,9	4,11 ; tl (8,0)
5	48,2	1,83 ; m	4	69,9	4,13 ; tl (8,1)
6	18,6	nd 1,89 ; m 1,71 ; m 1,88 ; m	5	78,2	3,84 ; m
7	33,6	-	6	62,5	4,25 ; dd (11,8 ; 3,5) 4,40 ; dd (11,8 ; 2,0)
8	40,6	1,89 ; m	Glucose'		
9	47,9	-	1	106,2	5,26 ; d (7,8)
10	37,4	2,09 ; m 2,21 ; m	2	75,9	4,08 ; tl (8,0)
11	24,4	5,65 ; tl (3,5)	3	79,1	4,05 ; tl (8,0)
12	123,0	-	4	71,9	4,20 ; tl (8,2)
13	144,7	-	5	78,6	4,27 ; m
14	42,7	1,94 ; m 2,27 ; m	6	62,8	4,32 ; dd (12,3 ; 6,2) 4,56 ; dd (12,3 ; 2,0)
15	36,6	5,25 ; sl	Fucose		
16	74,4	-	1	94,7	6,00 ; d (8,1)
17	49,8	3,40 ; dd (14,0 ; 3,8)	2	74,5	4,45 ; tl (8,3)
18	42,0	1,34 ; m 2,75 ; m	3	80,9	4,25 ; dd (9,2 ; 3,2)
19	47,8	-	4	74,3	5,72 ; dl (3,4)
20	31,1	3,75 ; d (11,0) 4,36 ; d (11,0)	5	70,7	4,01 ; ql (6,5)
21	36,3	1,37 ; s	6	16,8	1,21 ; d (6,3)
22	32,2	1,59 ; s	Rhamnose		
23	65,8	1,19 ; s	1	102,6	5,91 ; sl
24	15,4	1,79 ; s	2	71,8	4,70 ; m
25	17,9	-	3	72,9	4,62 ; dd (9,3 ; 2,9)
26	18,0	0,93 ; s	4	84,2	4,32 ; tl (9,4)
27	27,4	1,04 ; s	5	69,4	4,38 ; dq (9,9 ; 5,9)
28	176,5	-	6	18,9	1,73 ; d (5,9)
29	33,4	-	Xylose		
30	24,9	-	1	107,3	5,02 ; d (7,7)
			2	76,7	4,07 ; tl (8,4)
			3	83,6	4,22 ; tl (9,0)
			4	69,5	4,09 ; m
			5	67,7	3,45 ; tl (10,9) 4,18 ; dd (10,9 ; 5,3)
			Rhamnose'		
			1	102,9	6,22 ; sl
			2	72,8	4,80 ; dl (2,9)
			3	72,6	4,58 ; dd (9,2 ; 2,9)
			4	74,3	4,33 ; tl (9,2)
			5	70,2	4,96 ; dq (9,5 ; 6,2)
			6	19,0	1,68 ; d (6,2)
			Apiose		
			1	112,7	5,74 ; d (2,2)
			2	79,1	4,56 ; d (2,2)
			3	78,7	-
			4	75,7	4,37 ; d (9,6) 4,53 ; d (9,6)
			5	67,6	4,49 ; d (11,3) 4,64 ; d (11,3)
			Acétate		
			1	171,3	-
			2	21,0	2,00 ; s
			Hydroxybutyrate dimérique		
			1	170,7	-
			2	40,9	2,76 ; dd (15,8 ; 6,5) 2,96 ; dd (15,8 ; 6,7)
			3	67,7	5,58 ; q (6,4)
			4	20,2	1,37 ; d (6,3)
			1'	171,7	-
			2'	45,5	2,66 ; dd (14,8 ; 5,5) 2,84 ; dd (14,8 ; 7,6)
			3'	64,7	4,58 ; m
			4'	24,3	1,42 ; d (6,2)

I.7.5. COMPOSE S9

Le composé *S9* se présente sous la forme d'une poudre amorphe blanc cassé (6 mg) pour lequel l'HRESI-MS (mode positif) a donné un ion moléculaire $[M + Na]^+$ avec un m/z de 1605,7294, ce qui correspond à la formule brute $C_{74}H_{118}O_{36}$, 1582,7402. La molécule comporte ainsi 16 insaturations.

Les spectres RMN 1H et ^{13}C du composé *S9* (Tableau 14 p. 120), accompagnés des spectres à deux dimensions, indiquent que les signaux correspondant à la partie aglycone sont identiques à ceux des composés *S1*, *S2* et *S8*. Le composé *S9* est donc lui aussi formé d'un acide polygalactique di-substitué en C-3 et C-28.

Ces mêmes spectres montrent également la présence de 6 signaux correspondant à 6 protons anomériques (Figure 59) à δ_H 5,03 (d ; $J = 7,7$ Hz), 5,16 (d ; $J = 7,8$ Hz), 5,75 (d ; $J = 2,2$ Hz), 5,90 (sl), 6,00 (d ; $J = 8,1$ Hz) et 6,20 (sl) corrélant sur le spectre HSQC avec 6 carbones anomériques, respectivement à δ_C 107,3 ; 106,0 ; 112,7 ; 102,6 ; 94,6 et 103,0. Ces signaux indiquent la présence de 6 sucres dans la molécule, reliés au triterpène et liés entre eux par des liaisons *O*-glycosidiques. De plus, des signaux correspondant à un dimère acide 3-hydroxybutyrique et à un acétate sont également présents, tout comme dans le composé précédent.

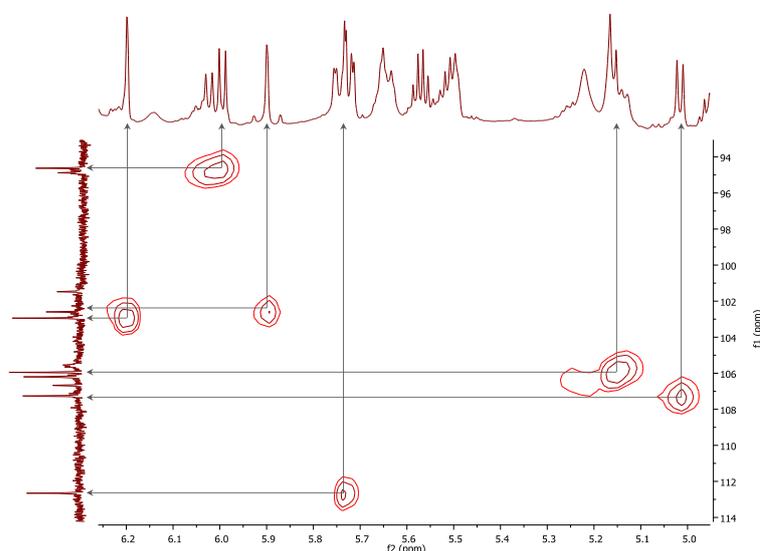


FIGURE 59 - SPECTRE RMN HSQC DU COMPOSE S9 (ZOOM F2 : 5,0-6,3 PPM ; F1 : 94-114 PPM)

Tous les signaux de la partie osidique et de la chaîne latérale sont identiques à ceux du composé S8, ils diffèrent cependant par la perte d'un sucre. En effet, seulement 6 sucres sont ici détectés et les signaux du glucose sont différents, en particulier la position 3. La valeur du signal C-3 passe de δ_C 88,9 lorsque la position est substituée dans le cas du composé S8, à δ_C 78,8 dans le cas du composé S9, ce qui indique une position 3 libre, et ainsi une perte du glucose' par rapport au composé S8.

L'étude de la configuration absolue et de la configuration anomérique a également été réalisée et les mêmes résultats que dans le cas des composés précédents ont été obtenus. Le glucose, le fucose, le xylose et l'apiose sont de forme β -D alors que les rhamnoses sont de forme α -L.

Enfin, l'enchaînement des 6 sucres, de la chaîne latérale et de l'acétate, ainsi que les liaisons à la partie aglycone ont été vérifiés par l'observation des corrélations HMBC et ROESY (Figure 60). Ainsi, le glucose a été identifié sur la position 3 de l'aglycone et un ensemble de 5 sucres a été caractérisé sur la position 28 de l'aglycone. Tout comme pour le composé S8, le fucose est relié à la position 28 de l'aglycone, le premier rhamnose est connecté à la position 2 du fucose, le xylose à la position 4 du rhamnose, le second rhamnose est lié à la position 3 du xylose et enfin l'apiose est relié à la position 3 du fucose. Par ailleurs, l'apiose est acétylé au niveau de la position 5 et la chaîne hydroxybutyrate est reliée à la position 4 du fucose.

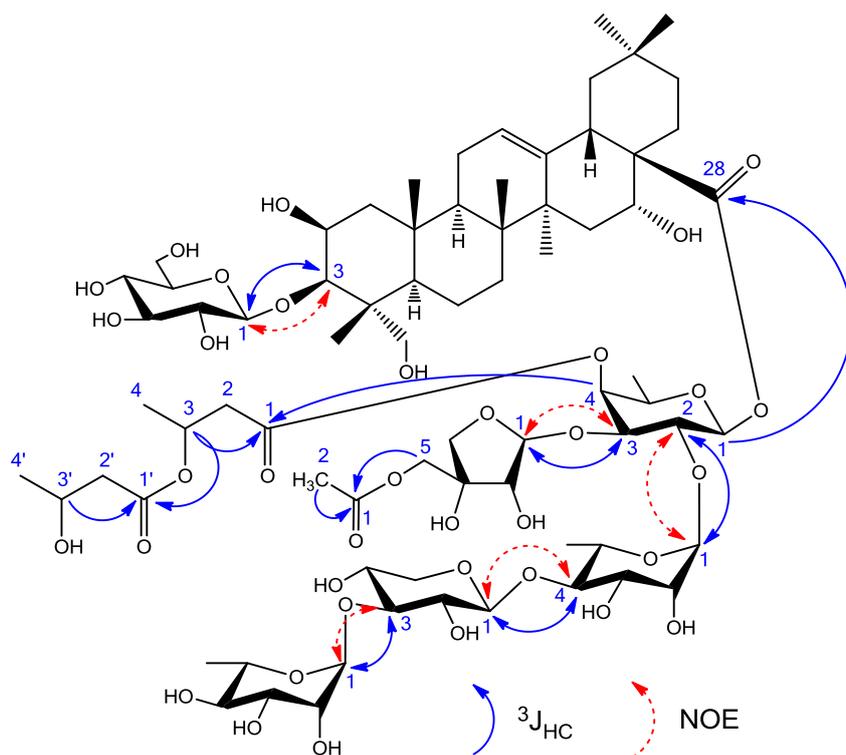


FIGURE 60 - PRINCIPALES CORRELATIONS $^3J_{HC}$ LONGUE DISTANCE DU SPECTRE HMBC ET NOE DU SPECTRE ROESY DU COMPOSE S9

Ainsi, le composé S9 correspond à l'acide 3-O-(β -D-glucopyranosyl)-28-O-(α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[5-O- β -D-acetylapiofuranosyl-(1 \rightarrow 3)-[4-O-(3-(3-hydroxy-1-oxobutoxy)-1-oxobutyl)]- β -D-fucopyranosyl])-polygalactique.

Cette saponine triterpénique n'a encore jamais été identifiée auparavant et a donc été nommée la *Virgaureasaponine 6*.¹⁵⁴

TABLEAU 14 - ATTRIBUTION DES SIGNAUX RMN ¹³C ET ¹H (J EN Hz) DE S9 (PYRIDINE d₅, 600 MHz)

<i>Partie aglycone</i>			<i>Partie sucres et esters</i>		
Position	δ _C	δ _H	Position	δ _C	δ _H
1	44,5	1,31 ; m 2,35 ; m	Glucose		
2	70,6	4,82 ; m	1	106,0	5,16 ; d (7,8)
3	83,7	4,34 ; m	2	75,7	4,05 ; tl (8,1)
4	43,1	-	3	78,8	4,22 ; tl (8,7)
5	48,3	1,80 ; m	4	71,8	4,24 ; tl (9,2)
6	18,6	1,66 ; nd 1,88 ; m	5	78,6	3,93 ; m
7	33,6	1,72 ; m 1,87 ; m	6	62,9	4,34 ; dd (11,7 ; 5,9) 4,49 ; dd (11,7 ; 2,0)
8	40,6	-	Fucose		
9	48,0	1,89 ; m	1	94,6	6,00 ; d (8,1)
10	37,4	-	2	74,5	4,45 ; tl (8,4)
11	24,4	2,10 ; m 2,22 ; m	3	80,9	4,25 ; dd (9,2 ; 3,2)
12	123,0	5,67 ; tl (3,5)	4	74,3	5,73 ; dl (3,2)
13	144,7	-	5	70,6	4,03 ; ql (6,3)
14	42,7	-	6	16,8	1,23 ; d (6,3)
15	36,6	1,95 ; m 2,25 ; m	Rhamnose		
16	74,3	5,23 ; sl	1	102,6	5,90 ; sl
17	49,8	-	2	71,8	4,71 ; m
18	41,9	3,40 ; dd (13,9 ; 3,7)	3	72,9	4,63 ; dd (9,2 ; 2,9)
19	47,9	1,34 ; m 2,75 ; m	4	84,2	4,32 ; tl (9,2)
20	31,1	-	5	69,3	4,38 ; dq (9,9 ; 5,9)
21	36,3	1,30 ; m 2,39 ; m	6	19,0	1,72 ; d (5,9)
22	32,2	2,23 ; m 2,43 ; m	Xylose		
23	66,4	3,75 ; d (11,0) 4,37 ; d (11,0)	1	107,3	5,03 ; d (7,7)
24	15,4	1,38 ; s	2	76,6	4,07 ; tl (8,4)
25	17,9	1,58 ; s	3	83,8	4,22 ; tl (9,0)
26	18,0	1,19 ; s	4	69,6	4,11 ; m
27	27,4	1,78 ; s	5	67,6	3,46 ; tl (11,0) 4,18 ; dd (11,0 ; 5,1)
28	176,4	-	Rhamnose'		
29	33,4	0,93 ; s	1	103,0	6,20 ; sl
30	24,9	1,04 ; s	2	72,6	4,81 ; dl (2,9)
			3	72,8	4,63 ; dd (9,2 ; 3,0)
			4	74,3	4,34 ; tl (9,2)
			5	70,2	4,95 ; dq (9,5 ; 6,2)
			6	18,9	1,68 ; d (6,2)
			Apiose		
			1	112,7	5,75 ; d (2,2)
			2	79,1	4,57 ; d (2,2)
			3	78,7	-
			4	75,8	4,36 ; d (9,6) 4,53 ; d (9,6)
			5	67,6	4,49 ; d (11,2) 4,63 ; d (11,2)
			Acétate		
			1	171,2	-
			2	21,0	2,02 ; s
			Hydroxybutyrate dimérique		
			1	170,6	-
			2	40,9	2,78 ; m 2,96 ; dd (15,8 ; 6,7)
			3	67,7	5,59 ; q (6,4)
			4	20,1	1,36 ; d (6,3)
			1'	171,7	-
			2'	45,5	2,68 ; dd (14,7 ; 5,5) 2,84 ; dd (14,7 ; 7,6)
			3'	64,7	4,58 ; m
			4'	24,3	1,42 ; d (6,2)

I.7.6. COMPOSÉS *S3*, *S4*, *S5*, *S6*, *S10* ET *S11*

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C des composés *S3*, *S4*, *S5*, *S6*, *S10* et *S11*, accompagnés des spectres à deux dimensions, indiquent que les signaux de la partie aglycone correspondent à ceux de l'acide polygalactique di-substitué en C-3 et C-28.

Dans le cas du composé *S3*, la présence de 6 sucres a été mise en évidence. Deux glucoses sont présents sur la position 3 de l'aglycone et une chaîne composée d'un fucose, d'un rhamnose, d'un xylose et d'un second rhamnose est liée au niveau de la position 28 de l'aglycone. Le second glucose est relié au niveau de la position 3 du premier glucose, le rhamnose est connecté au fucose au niveau de la position 2, le xylose est lié au rhamnose au niveau de la position 4 et le second rhamnose sur la position 3 du xylose. La comparaison de ces données avec la littérature a permis d'identifier *S3* comme étant la Virgaureasaponine 2.^{51,54,56,154}

Le composé *S4* possède 5 sucres, un glucose sur la position 3 de l'aglycone et une chaîne identique à celle du composé *S3* au niveau de la position 28 de l'aglycone. La comparaison de ces données avec la littérature a permis d'identifier *S4* comme étant la Virgaureasaponine 1.^{51,53,56,154}

Le composé *S5* est quant à lui constitué de deux glucoses sur la position 3 de l'aglycone, reliés entre eux au niveau de la position 3 du premier glucose, ainsi que d'un ensemble constitué d'un fucose, d'un dimère 3-hydroxybutyrate, d'un rhamnose, d'un xylose et d'un second rhamnose, connecté au niveau de la position 28 de l'aglycone. L'enchaînement de cet ensemble est identique à celui des composés précédents, avec en supplément le dimère relié au niveau de la position 4 du fucose. La comparaison de ces données avec la littérature a permis d'identifier *S5* comme étant la Virgaureasaponine E.^{28,51}

Les spectres RMN du composé *S6* ont montré la présence d'un seul glucose au niveau de la position 3 de l'aglycone. Ils ont également mis en évidence le même ensemble que celui du composé *S5* au niveau de la position 28 de l'aglycone. La comparaison de ces données avec la littérature a permis d'identifier *S6* comme étant la Virgaureasaponine C ou Solidagosaponine XVIII.^{28,48,51,56}

Le composé *S10* est formé de 6 sucres et d'un trimère hydroxybutyrate. Il possède deux glucoses sur la position 3 de l'aglycone, ainsi qu'un ensemble constitué d'un fucose, d'un trimère 3-hydroxybutyrate, d'un rhamnose, d'un xylose et d'un second rhamnose, connecté au niveau de la position 28 de l'aglycone. Les enchaînements sont identiques à ceux du composé *S5*, avec un trimère à la place du dimère relié au niveau de la position 4 du fucose. La

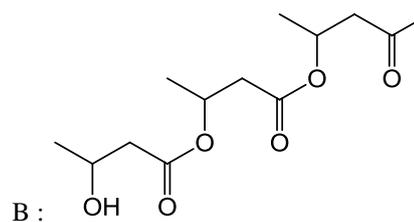
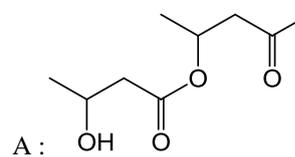
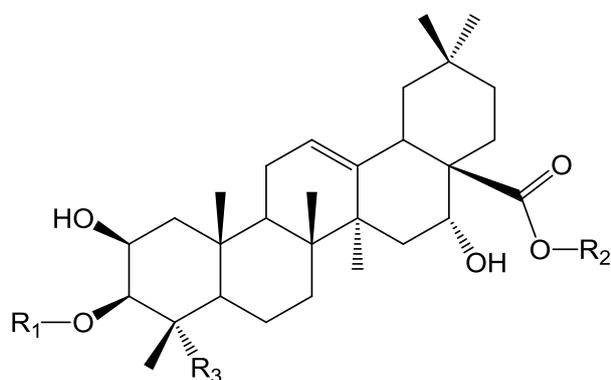
comparaison de ces données avec la littérature a permis d'identifier *S10* comme étant la Virgaureasaponine D ou Solidagosaponine XXVI.^{28,49,51,56}

Enfin, le composé *S11* possède 5 sucres, un glucose sur la position 3 de l'aglycone et un groupement identique à celui du composé *S10* au niveau de la position 28 de l'aglycone. La comparaison de ces données avec la littérature a permis d'identifier *S11* comme étant la Virgaureasaponine B ou Solidagosaponine XIV.^{28,48,51,56}

Toutes les saponines identifiées dans *S. virgaurea alpestris* lors de cette étude sont rassemblées dans le Tableau 15.

TABLEAU 15 - RESUME DES DIFFERENTS COMPOSES IDENTIFIES

N°	Masse	Formule brute associée	R1	R2	R3	Nom usuel
S1	1530,7092	C ₇₀ H ₁₁₄ O ₃₆	Glc-Glc	Xyl- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha- ² -Fuc	CH ₂ OH	Virgaureasaponine 4
S2	1368,6561	C ₆₄ H ₁₀₄ O ₃₁	Glc	Xyl- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha- ² -Fuc	CH ₂ OH	Virgaureasaponine 5
S3	1398,6	C ₆₅ H ₁₀₆ O ₃₂	Glc-Glc	Fuc- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	CH ₂ OH	Virgaureasaponine 2
S4	1236,6	C ₅₉ H ₉₆ O ₂₇	Glc	Fuc- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	CH ₂ OH	Virgaureasaponine 1
S5	1570,7397	C ₇₃ H ₁₁₈ O ₃₆	Glc-Glc	(Fuc- ⁴ -A)- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	CH ₂ OH	Virgaureasaponine E
S6	1408,7	C ₆₇ H ₁₀₈ O ₃₁	Glc	(Fuc- ⁴ -A)- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	CH ₂ OH	Solidagosaponine XVIII (Virgaureasaponine C)
S7	1318,6200	C ₆₃ H ₉₈ O ₂₉	Glc	((Fuc- ³ -Xyl- ⁴ -Ac)- ⁴ -A)- ² -Rha	COOH	Virgaureasaponine 8
S8	1744,7934	C ₈₀ H ₁₂₈ O ₄₁	Glc-Glc	((Fuc- ³ -Api- ⁵ -Ac)- ⁴ -A)- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	CH ₂ OH	Virgaureasaponine 7
S9	1582,7402	C ₇₄ H ₁₁₈ O ₃₆	Glc	((Fuc- ³ -Api- ⁵ -Ac)- ⁴ -A)- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	CH ₂ OH	Virgaureasaponine 6
S10	1656,7761	C ₇₇ H ₁₂₄ O ₃₈	Glc-Glc	(Fuc- ⁴ -B)- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	CH ₂ OH	Solidagosaponine XXVI (Virgaureasaponine D)
S11	1494,7246	C ₇₁ H ₁₁₄ O ₃₃	Glc	(Fuc- ⁴ -B)- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	CH ₂ OH	Solidagosaponine XIV (Virgaureasaponine B)



Glc : β -D-glucose, Xyl : β -D-xylose, Rha : α -L-rhamnose, Fuc : β -D-fucose, Api : β -D-apiose, Ac : acétate

Ainsi, une famille très complexe de saponines a été détectée dans l'extrait aqueux de *S. virgaurea alpestris*. Au sein de cette famille, onze composés ont pu être isolés et caractérisés. Dix d'entre eux possèdent un squelette aglycone de type acide polygalacique. Cet aglycone triterpénique est très commun chez *S. virgaurea*, c'est même le seul aglycone détecté jusqu'ici dans les saponines de cette plante.^{47,54} Il n'est cependant pas si courant dans la nature de manière générale. Il semble être uniquement caractéristique de l'ordre des Astérales, et principalement de la famille des Astéracées.^{52,96-99}

La Virgaureasaponine 8 (*S7*) est en revanche constituée d'un autre squelette, l'acide zanhique. C'est la première fois qu'un autre aglycone est identifié dans les saponines de *S. virgaurea*. L'acide zanhique diffère de l'acide polygalacique au niveau de la position 23, le groupement CH₂OH est remplacé par un acide carboxylique. Il est lui aussi peu courant, il a été identifié en particulier chez une Astéracée, *Aster ageratoides ovatus*,¹⁵⁵ ainsi que chez une Fabacée, *Medicago truncatula*.¹⁵⁶

Certaines Solidagosaponines et/ou Virgaureasaponines identifiées auparavant chez la sous-espèce *virgaurea* ont été retrouvées chez la sous-espèce *alpestris*. Les Virgaureasaponines 1 et 2 (*S4* et *S3*) en particulier, ont été les premières identifiées en 1987 par Hiller & al.^{53,54} Puis les Solidagosaponines XIV, XVIII et XXVI (*S11*, *S6* et *S10*) ont été caractérisées par l'équipe d'Inose & Miyase en 1992 et 1994 parmi de nombreuses autres Solidagosaponines.⁴⁷⁻⁴⁹ En 1995, l'équipe de Bader & Hiller a identifié ces trois mêmes saponines aux côtés d'une quatrième mais les a nommé Virgaureasaponines B, C, D et E (*S5*).^{28,51,56}

Cependant, malgré les très nombreuses saponines déjà identifiées chez la sous-espèce *virgaurea*, cinq saponines supplémentaires ont été caractérisées lors de cette étude. Les Virgaureasaponines 6 et 7 (*S9* et *S8*, respectivement) ont les structures les plus proches des Solidagosaponines connues. Elles possèdent en effet un ou deux glucoses sur la position 3 de l'aglycone ainsi qu'une chaîne sur la position 28 constituée d'un fucose, d'un rhamnose, d'un xylose et d'un second rhamnose, ramifiée au niveau du fucose par un apiose acétylé et un dimère 3-hydroxybutyrate, ce qui est particulièrement proche des Solidagosaponines XVIII et XX.⁴⁸ Leurs structures diffèrent cependant par la présence simultanée de l'apiose acétylé en position 3 du fucose et du dimère 3-hydroxybutyrate en position 4, ainsi que d'un glucose supplémentaire dans le cas de la Virgaureasaponine 7.

D'autre part, les Virgaureasaponines 4 et 5 (*S1* et *S2*) possèdent des structures plus simples mais plus originales que les deux précédentes. En effet, elles ne possèdent pas une chaîne fucose-²-rhamnose-⁴-xylose-³-rhamnose comme la plupart des saponines de *S. virgaurea* mais une chaîne xylose-²-rhamnose-⁴-xylose-³-rhamnose-²-fucose. Cet enchaînement n'avait encore jamais été détecté chez *S. virgaurea*.

Enfin, la Virgaureasaponine 8 (S7) est la plus originale des cinq nouvelles saponines. Comme expliqué précédemment, elle est constituée d'un aglycone différent des autres saponines, mais elle possède également un groupement osidique inhabituel chez *S. virgaurea*. Le groupement en position 28 de l'aglycone est constitué d'un fucose lié à un rhamnose en position 2, un xylose acétylé en position 3 et enfin un dimère 3-hydroxybutyrate en position 4. Cet enchainement n'avait encore jamais été détecté chez *S. virgaurea*.

Les Virgaureasaponines 4 et 5 possèdent uniquement un aglycone et des sucres, en revanche, les Virgaureasaponines 6, 7 et 8 possèdent également des chaînes hydroxybutyrate. Ce type de chaîne est très commun chez *S. virgaurea* mais il est très rare de rencontrer des saponines possédant ce genre de groupement, seule *S. virgaurea* et *Bellis perennis*, une autre Astéragée, en possèdent.⁵² D'autres expériences devront être réalisées pour déterminer la configuration absolue de ces chaînes.

Ainsi, malgré une grande diversité de saponines identifiées auparavant chez *S. virgaurea*, beaucoup n'ont pas été retrouvées chez la sous-espèce *alpestris* comme les saponines monodesmosidiques,⁴⁷ tridesmosidiques, possédant des sucres sur la position 16 de l'aglycone, ou encore celles comportant des arabinoses ou des chaînes latérales particulières.⁴⁸ En revanche, de nouvelles saponines majoritaires ont été identifiées. Mises à part les variabilités dues aux opérateurs, ces résultats peuvent être expliqués par deux hypothèses principales.

D'une part, le profil obtenu lors de ces travaux est potentiellement caractéristique de la sous-espèce *alpestris*. Les nouvelles saponines obtenues pourraient donc représenter des marqueurs taxonomiques différenciant la sous-espèce *alpestris* des autres sous-espèces.

D'autre part, ces variations peuvent être causées par une influence régionale. Il est ainsi possible que les sous-espèces *virgaurea* et *alpestris* des Alpes-Maritimes possèdent globalement le même profil en saponines, mais que ce dernier soit très différent de ceux de *S. virgaurea* d'autres régions du monde. Les nouvelles saponines obtenues représenteraient donc plutôt les marqueurs d'un chimiotype particulier.

Pour tenter de comprendre les mécanismes influençant principalement la biosynthèse de ces saponines et ainsi répondre à ces hypothèses, des expériences comparatives, aussi bien phytochimiques que génétiques doivent être réalisées. Il est difficile d'avoir accès à des plants de *S. virgaurea* de régions très éloignées, cependant, une étude comparative peut facilement être menée dans le département des Alpes-Maritimes afin de répondre en partie à ces interrogations. Ces travaux seront exposés dans le chapitre suivant.

Par ailleurs, les molécules purifiées ont été testées contre *C. albicans* pour vérifier l'activité inhibitrice de chacune d'elles.

I.8. ACTIVITE MICROBIOLOGIQUE DES COMPOSES PURIFIES

Parmi les 11 molécules purifiées, 9 ont pu être testées sur *C. albicans*, à des concentrations variant entre 0,5 et 1,1 mM selon la quantité disponible et la masse moléculaire du composé ciblé. Les résultats sont présentés dans le Tableau 16.

TABLEAU 16 - ACTIVITE DES COMPOSES PURS SUR *C. ALBICANS* A 4 H

Croissance des hyphes (%)		
Témoin négatif	0	-
S1 (0,9 mM)	-101 ± 7***	++
S2 (1,0 mM)	-104 ± 8***	++
S3 (0,5 mM)	14 ± 54	-
S4 (0,5 mM)	-106 ± 17***	++
S6 (1,0 mM)	-52 ± 31**	+
S8 (1,1 mM)	4 ± 36	-
S9 (0,9 mM)	-9 ± 54	-
S10 (1,1 mM)	-41 ± 11*	+
S11 (1,1 mM)	-21 ± 26	-

Les valeurs (exprimées avec ± Ecart Type) sont significativement différentes du témoin négatif quand * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$

Les composés *S3*, *S8*, *S9* et *S11* se sont montrés inactifs aux concentrations testées. Ils n'inhibent pas significativement la forme filamenteuse de *C. albicans* ni la croissance cellulaire. Les composés *S6* et *S10* se sont révélés partiellement actifs et enfin les composés *S1*, *S2* et *S4* ont quant à eux montré une forte inhibition de la conversion levure-hyphes aux concentrations testées. Ces 5 composés actifs ont également montré une inhibition partielle de la croissance cellulaire à 24 h, certainement due à une concentration trop importante lors des tests.

Ces résultats corroborent l'hypothèse de départ qui suspectait les saponines d'être les composés responsables de l'activité contre *C. albicans*. En effet, seules les fractions contenant des saponines se sont montrées actives et la majorité des saponines purifiées possède une activité inhibitrice envers la formation des hyphes de *C. albicans*.

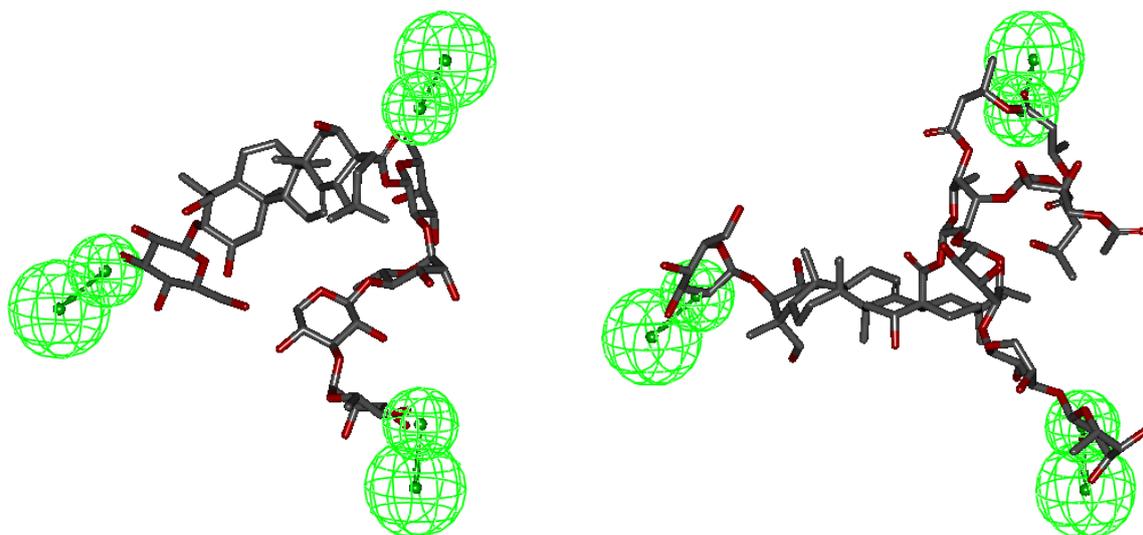
Cependant, toutes les saponines n'ont pas montré la même intensité d'activité et certaines se sont même révélées être inactives, il existe donc vraisemblablement une relation entre la structure et l'activité de ces saponines. Le triterpène étant toujours l'acide polygalactique, cette partie doit être importante pour l'apparition de l'activité, mais n'a apparemment pas d'influence sur la variation de l'activité. En revanche, la nature, le nombre et l'enchaînement des sucres et des groupements esters étant très variables d'une saponine à l'autre, il semble évident que cette partie possède une forte influence sur l'apparition ou l'absence d'activité. Ces résultats sont en concordance avec la littérature. En effet, plusieurs études mettent en évidence l'importance de la partie osidique des saponines dans l'activité biologique,^{56,93,107,157,158} ce qui témoigne d'un mécanisme d'activité bien plus complexe qu'un simple effet détergent non-spécifique sur les membranes biologiques.

En observant les différentes structures comparées à leur activité respective, il est difficile d'identifier un pharmacophore précis au sein des molécules. En comparant *S3* et *S4*, il semblerait que l'ajout d'un second glucose fasse disparaître l'activité, cependant, en comparant *S10* et *S11*, l'ajout d'un second glucose permet plutôt d'augmenter l'activité. Il est donc plus judicieux de considérer la molécule dans son ensemble et dans l'espace plutôt que d'étudier les différentes parties séparément. Le seul groupement qui semble interférer systématiquement avec l'activité est la chaîne hydroxybutyrate. En effet, tous les composés possédant cette chaîne sont inactifs ou moyennement actifs. Dans le cas de *S8* et *S9*, la présence de cette chaîne ainsi que de l'apiose acétylé engendre probablement un encombrement stérique trop important pour obtenir une quelconque activité.

Pour tenter de répondre à ces questions, un pharmacophore a été établi à l'aide du logiciel de modélisation CATALYST. Cet outil permet de repérer des fonctions chimiques (conservées parmi les molécules actives) qui sont potentiellement essentielles à leur activité. Les caractéristiques communes sont généralement du type donneurs et/ou accepteurs de liaison hydrogène et sites hydrophobes.

Cette approche n'a toutefois pas été probante dans ce cas. En effet, ces molécules se sont avérées trop complexes et surtout trop flexibles pour obtenir des résultats pertinents et prédictifs. L'hypothèse établie ne permet pas de discriminer les molécules inactives parmi la liste proposée. La Figure 61 illustre cette conclusion. Les saponines *S1* (active) et *S3* (inactive) sont alignées de manière semblable sur l'hypothèse, suggérant -de manière erronée- qu'elles sont toutes les 2 actives.

Ces approches de type pharmacophore ne sont donc apparemment pas adaptées à des molécules dont la flexibilité et le nombre de groupes fonctionnels sont très importants. Les saponines vont probablement au-delà des limites de ce modèle.



Les sphères vertes représentent des sites de donneur de liaison hydrogène et leur sphère de projection (qui indique la direction vers laquelle l'atome d'hydrogène pointe idéalement). Les atomes d'hydrogène ne sont pas représentés pour plus de clarté. Le code couleur des atomes est le suivant : C : gris ; O : rouge.

FIGURE 61 - ALIGNEMENT DES MOLECULES *SI* (A GAUCHE) ET *S9* (A DROITE) SUR L'HYPOTHESE ISSUE DE L'APPROCHE PHARMACOPHORE

I.9. CONCLUSION

Les saponines de la sous-espèce *virgaurea* avaient été étudiées dans le passé et de nombreuses structures avaient été identifiées. Cependant, cinq nouvelles saponines ont été caractérisées lors de cette étude sur la sous-espèce *alpestris*, aux côtés de six autres saponines déjà caractérisées auparavant. La plupart possèdent un squelette acide polygalactique, jusqu'ici caractéristique de *S. virgaurea*, mais l'une d'entre elle a présenté un aglycone acide zanhique, encore jamais identifié chez *S. virgaurea*.

Mais ces nouvelles molécules sont-elles des marqueurs taxonomiques de la sous-espèce *alpestris* ou des marqueurs d'un chimiotype régional ? Des études comparatives permettront de répondre partiellement à cette question.

De plus, d'anciennes études avaient été réalisées sur l'activité des saponines contre *C. albicans* mais l'inhibition des saponines envers la conversion levure-hyphe de *C. albicans* n'avait encore jamais été étudiée. L'extrait brut de *S. virgaurea alpestris* et la fraction enrichie en saponines ont montré une inhibition de la formation des hyphes sans inhiber la croissance cellulaire. Ce type d'extrait, ciblant un des facteurs clés de virulence sans détruire le micro-organisme serait tout à fait adapté dans un traitement bucco-dentaire type bain de bouche contre les candidoses et les problèmes de sècheresse buccale de manière générale.

Les tests sur les composés purifiés ont permis de confirmer la responsabilité des saponines dans cette activité inhibitrice. La plupart se sont montrées très actives ou moyennement actives mais d'autres n'ont pas présenté d'activité aux concentrations testées, en particulier celles possédant une chaîne hydroxybutyrate. Le calcul d'un pharmacophore, pour tenter d'identifier une éventuelle relation structure-activité, n'a pas donné de résultats prédictifs. Une étude de relation structure-activité à plus grande échelle permettra éventuellement d'obtenir davantage de résultats, mais le mécanisme d'activité de ces molécules très complexes et flexibles est probablement beaucoup plus subtil et va au-delà des modèles utilisés couramment.

CHAPITRE II - ETUDE DE LA VARIABILITE PHYTOCHIMIQUE DE *S. VIRGAUREA*

II.1. INTRODUCTION

S. virgaurea alpestris a été identifiée au 19^e siècle par les botanistes comme étant une sous-espèce de *S. virgaurea*.¹⁵⁹ Elle possède globalement les mêmes caractères morphologiques que la sous-espèce dominante *S. virgaurea virgaurea* tout en se différenciant sur certains points comme la taille, la ramification des inflorescences ou encore l'altitude à laquelle elle se développe. Mais ces deux sous-espèces sont-elles parfaitement dissociables ou sont-elles les formes extrêmes d'une population dont certains caractères varient en fonction des conditions environnementales ? Elles n'ont encore jamais fait l'objet d'études, aussi bien chimiotaxonomiques que génétiques, il est donc intéressant de tenter d'identifier et de comprendre les différences qu'il existe entre les populations d'*alpestris* et de *virgaurea*.

Par ailleurs, étant donné les résultats prometteurs du Chapitre I et de la publication de Chevalier & al., qui montre l'efficacité des extraits des deux sous-espèces en tant qu'inhibiteurs de la conversion levure-hyphe,¹⁵⁰ il est prévu que les deux types d'extraits soient utilisés conjointement comme actifs dans la composition d'un traitement contre *C. albicans*. Les deux sous-espèces pourraient donc être mises en culture dans les Alpes-Maritimes afin de pouvoir fournir suffisamment de plante sans surexploiter les zones sauvages. De ce fait, au-delà de l'aspect fondamental, une meilleure connaissance de la composition de ces plantes permettrait d'identifier les populations les plus productives, les plus actives et de contrôler la variabilité des actifs.

L'objectif premier de cette étude est donc de mettre au point des méthodes de quantification permettant d'évaluer simplement et rapidement la teneur en actifs totaux, afin de sélectionner éventuellement les populations les plus productives.

Le second objectif est d'étudier plus en détail la variabilité de ces actifs en fonctions de facteurs physiologiques, environnementaux et technologiques (mode de stockage, d'extraction...).

II.2. OPTIMISATION DE L'EXTRAIT

L'extrait le plus approprié pour la formulation du bain de bouche est, comme cela a pu être montré précédemment, un extrait de type aqueux ou hydro-alcoolique, suffisamment polaire pour extraire les saponines.¹²¹ Jusqu'ici, l'étude structurale des saponines avait été réalisée à partir d'un extrait aqueux pour respecter les conditions du brevet, mais il pose des inconvénients pour le travail sur un grand nombre de lots. D'une part, l'eau n'est pas toujours un solvant très efficace pour l'extraction des métabolites secondaires. En effet, ces derniers sont protégés dans les cellules de la plante et l'eau seule, contrairement aux solvants organiques, rompt difficilement ces cellules.¹³⁸ Même avec l'assistance de techniques telles que les ultrasons, un temps relativement long est nécessaire pour que l'eau puisse extraire suffisamment de quantité de composés solubles. De plus, l'eau est très difficile à éliminer, à cause de son point d'ébullition et de sa tension superficielle élevés.¹³⁸

Pour cette étude, un extrait facile et rapide à manipuler est pourtant requis. Il doit par ailleurs posséder un rendement et un profil en saponines le plus proche possible de l'extrait aqueux, pour conserver l'activité.

L'ajout d'une proportion d'un solvant alcoolique comme le méthanol semble être la meilleure solution pour faciliter la manipulation tout en conservant une polarité importante. L'utilisation des ultrasons et le temps d'extraction ont été maintenus, et plusieurs proportions de méthanol ont été testées (20, 30, 40 et 50 %). D'après le suivi HPLC-ELSD, il s'avère qu'avec 50 % de méthanol, les saponines les moins polaires sont largement privilégiées par rapport aux plus polaires, cela fausse donc le profil en saponines initial. Cependant, une proportion de 20 % de méthanol reste encore trop faible pour obtenir un extrait aisé à manipuler. Le meilleur compromis est donc l'ajout de 30 % de méthanol à l'eau. La filtration est ainsi plus rapide, le solvant est plus facilement éliminé et l'extrait est toujours soluble dans l'eau. De plus, il se trouve que cet ajout de méthanol facilite l'extraction des saponines qui se retrouvent ainsi en plus grande quantité dans l'extrait. L'eau n'extrayait en effet pas la totalité des saponines présentes dans la plante.

Une fois concentrés sous vide, les extraits sont repris dans une petite quantité d'eau, congelés à l'azote liquide et lyophilisés immédiatement. Ceci permet de se débarrasser des traces d'eau pour avoir une masse d'extrait la plus exacte et la plus répétable possible. A partir de cette masse, il est possible de calculer le rendement d'extraction par rapport à la masse de matière sèche, et le volume exact à rajouter pour obtenir une concentration constante de 100 mg/ml pour tous les échantillons. Enfin chaque lot est extrait trois fois afin d'évaluer la variation de la masse végétale et la répétabilité de l'extraction.

II.3. SELECTION DES POPULATIONS A ETUDIER

La récolte de toutes les populations de *S. virgaurea* a été réalisée en partenariat avec l'association Biophyto chaque année à partir de 2008 dans la vallée de la Tinée, au sein du parc national du Mercantour.

Trois zones de récoltes ont été sélectionnées pour chacune des deux sous-espèces étudiées (*virgaurea* et *alpestris*, Figure 62) :

- ✎ Isola 2000 (2200 m), Auron (1600 m) et St Dalmas le Selvage (1500 m) pour la sous-espèce *alpestris* ;
- ✎ Chastellar (1650 m), Auron (1600 m) et La Colmiane (1500 m) pour la sous-espèce *virgaurea*.

La partie récoltée correspond à la tige qui se développe au printemps et en été, sur laquelle se trouvent les feuilles supérieures et les sommités fleuries. Un échantillon de racines a également été récolté. Les fleurs grainant automatiquement après récolte, les fleurs et les graines ne pourront pas être étudiées séparément.

La récolte est principalement réalisée pendant la pleine floraison, c'est-à-dire de fin juillet à septembre. Des récoltes spécifiques pendant le développement de la hampe florale (début de floraison) et en fin de floraison ont également été effectuées.

Le mode de conservation de référence, adopté pour tous les échantillons récoltés, est le séchage naturel à l'obscurité et la conservation en sachet papier. Cependant, certains échantillons ont également été conservés congelés avant extraction et d'autres ont été extraits frais, immédiatement après récolte.

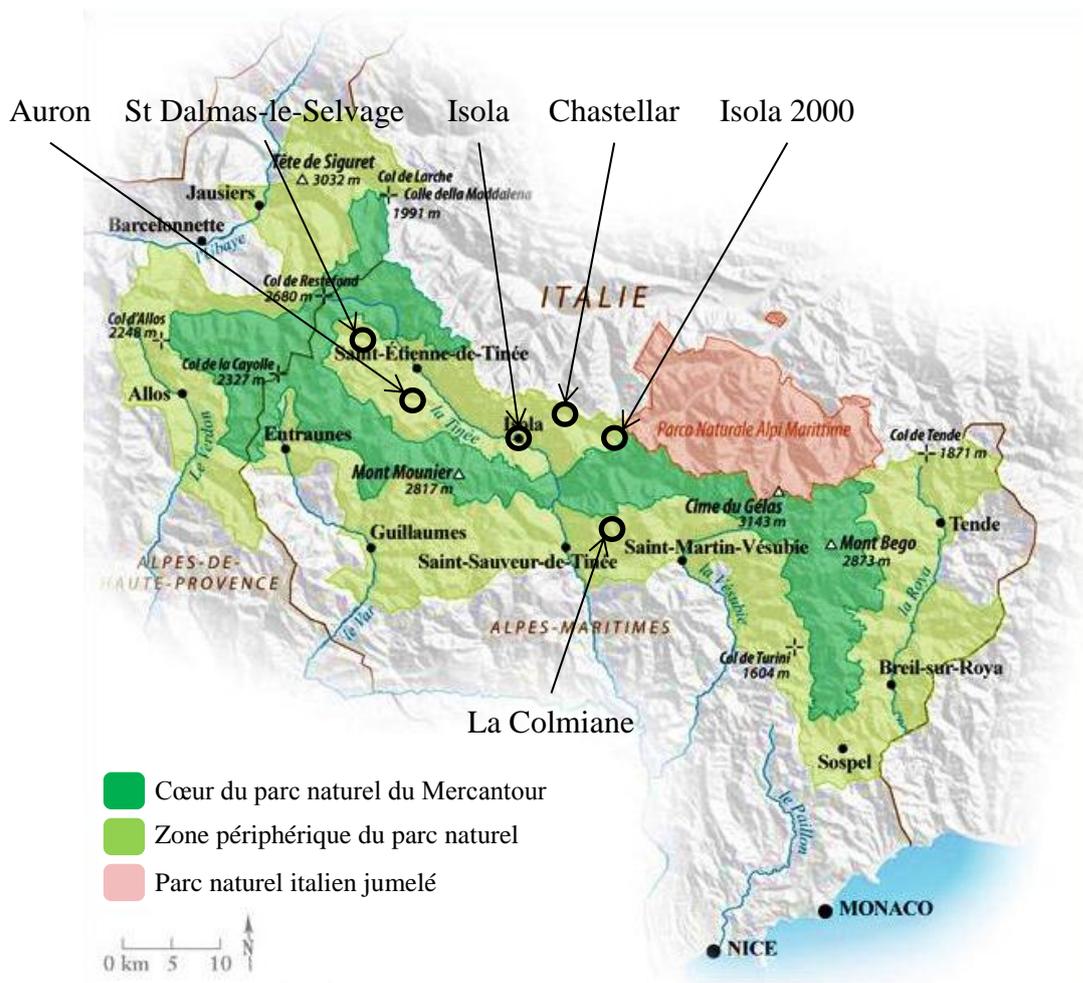


FIGURE 62 - CARTE DE LA ZONE DE RECOLTE DE *S. VIRGAUREA* (PARC NATUREL DU MERCANTOUR)¹⁶⁰

Par ailleurs, une étude spécifique de bouturage et d'acclimatation à différentes altitudes a également été mise en place par Biophyto. Ainsi, la sous-espèce *alpestris* d'Isola 2000 a été bouturée dans la même zone (parcelle expérimentale), à St Dalmas et à la pépinière d'Isola village (875 m). La sous-espèce *alpestris* d'Auron a été bouturée à la pépinière d'Isola village, et enfin la sous-espèce *virgaurea* de La Colmiane a été bouturée à St Dalmas et à la pépinière d'Isola village.

Il est ainsi possible de comparer les deux sous-espèces entre elles, mais également d'étudier la variabilité en fonction de la localisation géographique (type de terrain, altitude...), de l'année et de la période de récolte, en fonction de la partie de la plante étudiée et du mode de conservation choisi. L'étude d'acclimatation permettra quant à elle de vérifier la conservation des actifs après bouturage, pendant les premiers essais de culture, en particulier lorsque les boutures sont plantées dans des zones différentes de leur lieu de prélèvement.

II.4. MISE EN PLACE D'UNE METHODE DE DOSAGE DES SAPONINES TOTALES PAR HPLC-ELSD

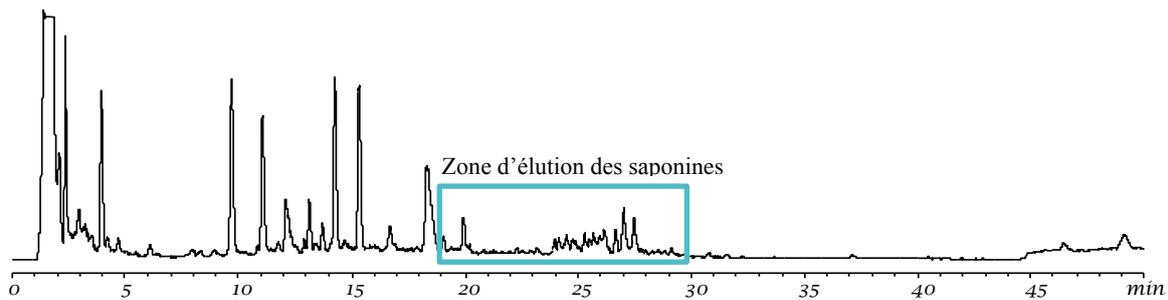
Une méthode de dosage des saponines totales par HPLC a été mise en place afin de pouvoir évaluer rapidement et facilement la teneur en actifs dans chaque population de plante.

Les saponines n'absorbant que faiblement en UV et n'ayant pas de spectre UV caractéristique (absorbance uniquement vers 200-220 nm), la quantification par UV n'est pas une technique adaptée. De plus, les saponines sont des composés minoritaires très difficiles à isoler et à purifier à cause d'une grande variété de structures qui co-éluent, même dans des conditions HPLC optimisées.¹²¹ L'isolement de chaque saponine en suffisamment grande quantité pour les utiliser comme étalon, pour un dosage en spectrométrie de masse par exemple, est donc très complexe et très long. Il n'y a pas non plus de saponines standards pures dans le commerce. Il est donc nécessaire de choisir un détecteur universel avec lequel les saponines répondent suffisamment. L'ELSD a donc été choisi pour réaliser ce dosage, c'est un détecteur considéré comme universel si certaines conditions sont respectées¹⁴⁶ (chapitre V.5.1 p. 68). En effet, l'étalon et les composés à doser doivent être moins volatils que la phase mobile, ils doivent éluer avec le même pourcentage en solvant organique, et enfin il faut prendre en compte la non-linéarité de la réponse de l'ELSD lors de la mise en place de la gamme étalon (fonction puissance).¹⁴⁶ Il est donc possible de doser un composé avec n'importe quel autre composé si les conditions ci-dessus sont respectées.

Or dans ce cas, c'est une famille entière qui doit être dosée, un standard pur n'aura donc pas le même intervalle de linéarité, la même limite de détection ni la même limite de quantification.

La fraction de saponines de *S. virgaurea* sans impuretés (préparation chapitre I.4 p. 85) a ainsi été choisie comme étalon externe pour le dosage des saponines totales. C'est en effet un ensemble de composés facile à obtenir, stable et non volatil.

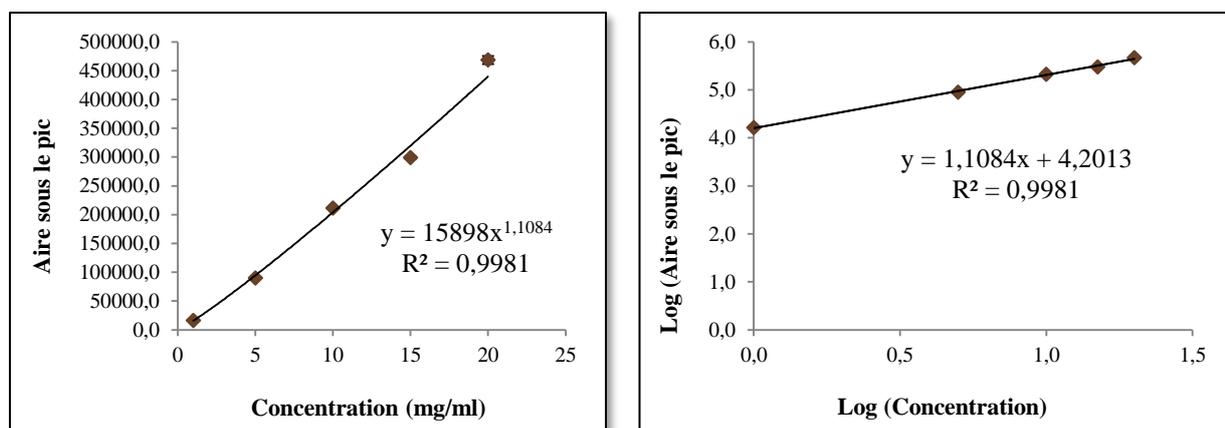
La méthode HPLC en phase inverse utilisée dans le Chapitre I a été conservée. Elle est en effet optimisée pour séparer l'ensemble des saponines des autres composés, tout en évitant les co-élutions (Figure 63). Le gradient commence avec 15 % d'acétonitrile pour se terminer à 55 % d'acétonitrile, le volume d'injection est de 20 µl et la concentration des solutions d'extraits bruts injectées est de 100 mg/ml. Les paramètres de l'ELSD ont été optimisés, permettant d'obtenir un signal convenable (évaporateur : 40 °C, débit d'azote : 1,5 l/min, gain : 4).



Colonne C18, 150 × 4,6 mm, 5 µm, gradient Eau/MeCN, 5 min à 15 % MeCN, 55 % MeCN en 30 min, 100 % MeCN en 5 min, puis 5 min à 60 % IPrOH

FIGURE 63 - CHROMATOGRAMME DE L'EXTRAIT BRUT EAU/MeOH 70:30

La gamme étalon a ensuite été réalisée avec des concentrations en saponines de 1 ; 5 ; 10 ; 15 et 20 mg/ml dans une solution d'eau/méthanol 70:30 (Figure 64).



a - Aire des pics de saponines en fonction de la concentration de la solution injectée

b - Log de l'aire des pics de saponines en fonction du Log de la concentration de la solution injectée

FIGURE 64 - GAMME ETALON POUR LE DOSAGE DES SAPONINES TOTALES PAR HPLC-ELSD

La gamme étalon ayant une forme de type puissance (Figure 64a), le log des aires en fonction du log des concentrations a été tracé dans le but d'obtenir une équation linéaire, plus simple à utiliser par la suite (Figure 64b). La teneur de l'extrait brut en saponines totales est ensuite déterminée grâce à l'aire de l'ensemble des saponines et enfin la teneur de la matière sèche en saponines totales est calculée grâce au rendement obtenu pour chaque extraction.

Validation de la méthode

Les composés majoritaires ont été isolés et identifiés par RMN comme étant des saponines dans le chapitre précédent. De plus, la fraction utilisée pour le dosage ainsi que plusieurs extraits ont été analysés par HPLC-MS afin de certifier la nature de l'ensemble des composés à doser. La fraction est donc bien composée d'une famille complexe de saponines. La comparaison des temps de rétention et des spectres UV a ensuite été utilisée pour le dosage des saponines dans chaque extrait.

La courbe d'étalonnage montre une linéarité supérieure à 0,99 ($R^2 = 0,9981$) dans l'intervalle choisi (Tableau 17). La limite de détection ($\text{Aire}_{\text{Signal}}/\text{Aire}_{\text{Bruit}} = 3$) est aux alentours de 4 μg et la limite de quantification ($\text{Aire}_{\text{Signal}}/\text{Aire}_{\text{Bruit}} = 10$) à environ 16 μg . La variation intra- et inter-jour pour les trois concentrations de standard est inférieure à 4,4 % et celle pour les trois extraits choisis est inférieure à 3,5 %. La méthode analytique développée a montré une exactitude proche de 100 % avec un recouvrement de 102 % pour l'échantillon d'*alpestris* d'Isola 2000. Enfin, la variabilité de la matière végétale et de l'extraction a également été évaluée pour toutes les populations. Pour cela, trois extractions indépendantes ont été réalisées pour chaque population. Le coefficient de variation (RSD%) diffère selon la population, mais dans le cas de l'échantillon d'*alpestris* d'Isola 2000 il s'élève à 4,65 %.

Ainsi cette méthode de quantification des saponines totales de *S. virgaurea* par HPLC-ELSD s'est avérée précise, répétable, sensible et spécifique.

**TABLEAU 17 - PARAMETRES DE VALIDATION DE LA METHODE DE QUANTIFICATION DES SAPONINES DE
S. VIRGAUREA PAR HPLC-ELSD**

Linéarité, limite de quantification et limite de détection					
Equation ^a	R²	Intervalle de linéarité		LOQ	LOD
$y = 1,1084x + 4,2013$	0,9981	20-400 µg		16 µg	4 µg
Précision et répétabilité (µg de saponines injectées, n=3)					
Echantillons	Intra-jour		Inter-jour		
	Moyenne ± Ecart type	RSD% ^b	Moyenne ± Ecart type	RSD% ^b	
Standard (100 µg)	95,22 ± 1,48	1,55	96,91 ± 2,05	2,12	
Standard (200µg)	202,11 ± 3,44	1,70	202,08 ± 3,41	1,69	
Standard (300 µg)	281,45 ± 7,66	2,72	285,77 ± 12,56	4,39	
Extrait <i>alpestris</i> Isola 2000, 2010	154,17 ± 4,55	2,95	155,46 ± 5,43	3,49	
Extrait <i>alpestris</i> Auron, 2010	221,39 ± 5,35	2,42	221,86 ± 5,77	2,60	
Extrait <i>virgaurea</i> La Colmiane, 2010	259,02 ± 7,13	2,75	260,07 ± 7,66	2,95	
Exactitude (µg de saponines injectées, n=3)					
Echantillon	Quantité initiale	Quantité ajoutée	Quantité mesurée	Recouvrement	RSD% ^b
Extrait <i>alpestris</i> Isola 2000, 2010	170,00	38,40	212,38 ± 0,63	101,91 ± 0,30	0,30
Variabilité de la matière végétale et de l'extraction (% saponines dans la matière sèche, n=3)					
Echantillon	Moyenne ± Ecart-type		RSD% ^b		
Extrait <i>alpestris</i> Isola 2000, 2010	2,69 ± 0,13 %		4,65 %		

^a $y = \log(\text{aire du pic}), x = \log(\text{concentration, mg/ml})$

^b $\text{RSD} (\%) = (\text{écart type/moyenne}) \times 100$

II.5. ETUDE DE LA VARIABILITE DE *S. VIRGAUREA* PAR DOSAGE DES SAPONINES TOTALES PAR HPLC-ELSD

Afin de pouvoir comparer les différentes populations entre elles, une analyse de la variance (ANOVA) avec un test de Fisher a été réalisée. L'ANOVA est un test statistique qui a pour but de comparer des échantillons entre eux, ce qui permet de vérifier que plusieurs échantillons sont issus d'une même population.¹⁶¹ Ainsi, le test rassemble les échantillons proches dans un même groupe et sépare les échantillons significativement différents.

L'analyse du Tableau 18 indique que le rendement en extrait brut varie entre $17,73 \pm 1,37$ % et $33,91 \pm 1,90$ % selon la population. Le taux de saponines dans la matière sèche varie quant à lui entre 0 et $4,36 \pm 0,52$ % selon la population considérée. L'ANOVA a permis de constituer 20 groupes significativement différents (A à T), ils sont classés dans le Tableau 18 des plus concentrés en saponines aux moins concentrés.

La quantité de saponines varie de manière relativement importante d'une population à l'autre. Cependant, ce tableau contient un grand nombre d'échantillons, il est donc difficile de mettre en évidence d'éventuelles causes de variation. Il est ainsi préférable de comparer uniquement certaines populations selon différents critères (sous-espèce, lieu, année, période de récolte...).

TABLEAU 18 - CLASSEMENT DES POPULATIONS PAR ANOVA - DOSAGE HPLC

Populations	Rendement par rapport à la masse de matière sèche (%)	Taux de saponines par rapport à la masse de matière sèche (%)	Groupes
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2011 bouturée à Isola 2000	29,96 ± 1,13	4,36 ± 0,52	A
<i>virgaurea</i> La Colmiane, 2009	24,42 ± 0,47	4,26 ± 0,24	AB
<i>Solidago</i> commercial "La maison des plantes"	17,73 ± 1,37	3,91 ± 0,48	BC
<i>virgaurea</i> La Colmiane, 2010	25,82 ± 1,83	3,76 ± 0,39	CD
<i>alpestris</i> Auron, 2009	27,49 ± 0,63	3,73 ± 0,14	CDE
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010 Fleurs/Graines	33,91 ± 1,90	3,63 ± 0,05	CDEF
<i>virgaurea</i> Chastellar, 2011	26,88 ± 0,56	3,55 ± 0,39	CDEFG
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2008	29,05 ± 2,39	3,55 ± 0,29	CDEFG
<i>alpestris</i> Isola 2000 Bas, 2011, pleine floraison	30,89 ± 0,19	3,43 ± 0,11	DEFGH
<i>virgaurea</i> Auron, 2008	26,31 ± 2,18	3,33 ± 0,22	EFGHI
<i>virgaurea</i> Chastellar, 2009 congelée	26,94 ± 0,57	3,31 ± 0,20	FGHI
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010 bouturée à Isola 2000	32,10 ± 0,23	3,26 ± 0,03	FGHIJ
<i>virgaurea</i> La Colmiane, 2010 bouturée à Isola village	20,10 ± 0,83	3,25 ± 0,43	FGHIJ
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010 Feuilles	33,74 ± 0,97	3,15 ± 0,21	GHIJK
<i>alpestris</i> Isola 2000, 08.2009	25,78 ± 1,20	3,04 ± 0,48	HIJKL
<i>virgaurea</i> La Colmiane, 2011	25,68 ± 0,45	3,00 ± 0,24	IJKLM
<i>alpestris</i> Isola 2000 Bas, 2011 début de floraison	28,48 ± 0,86	2,99 ± 0,14	IJKLM
<i>alpestris</i> Isola 2000 Bas, 2011 fin de floraison	29,32 ± 0,19	2,93 ± 0,21	IJKLM
<i>alpestris</i> Auron, 2010	23,08 ± 0,27	2,92 ± 0,08	IJKLM
<i>alpestris</i> Isola 2000, 07.2010	26,90 ± 1,64	2,88 ± 0,36	JKLMN
<i>alpestris</i> St Dalmas, 2011	23,74 ± 0,62	2,83 ± 0,27	KLMN
<i>alpestris</i> Isola 2000 Haut, 2011 pleine floraison	30,20 ± 0,79	2,78 ± 0,17	KLMNO
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2011 bouturée à St Dalmas	27,19 ± 0,14	2,73 ± 0,24	LMNO
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010	29,02 ± 1,27	2,69 ± 0,13	LMNO
<i>alpestris</i> + <i>virgaurea</i> Auron, 2011	24,51 ± 0,49	2,69 ± 0,26	LMNO
<i>alpestris</i> Auron, 2011 bouturée à Isola village	23,91 ± 0,95	2,68 ± 0,13	LMNO
<i>alpestris</i> Isola 2000 Haut, 2011 début de floraison	29,12 ± 0,45	2,66 ± 0,22	LMNOP
<i>alpestris</i> Isola 2000 Haut, 2011 fin de floraison	30,38 ± 0,65	2,60 ± 0,34	MNOPQ
<i>virgaurea</i> Chastellar, 2010	27,11 ± 0,66	2,60 ± 0,09	MNOPQ
<i>alpestris</i> Isola 2000 Hameau, 2011	30,69 ± 0,59	2,48 ± 0,17	NOPQR
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010 début de floraison	26,80 ± 0,48	2,40 ± 0,08	OPQRS
<i>virgaurea</i> La Colmiane, 2011 bouturée à St Dalmas	24,16 ± 0,42	2,39 ± 0,14	OPQRS
<i>alpestris</i> St Dalmas, 2008	23,49 ± 0,98	2,26 ± 0,02	PQRS
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2011 bouturée à Isola village	28,02 ± 0,81	2,22 ± 0,15	QRS
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2011	26,90 ± 1,69	2,22 ± 0,28	QRS
<i>virgaurea</i> La Colmiane, 2011 bouturée à Isola village	24,13 ± 1,00	2,18 ± 0,33	RS
<i>alpestris</i> Isola 2000, 09.2009	25,80 ± 0,31	2,15 ± 0,13	RS
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2011 frais	26,63 ± 0,62	2,01 ± 0,16	S
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2008 Rhizomes	25,45 ± 0,64	0,00 ± 0,00	T
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010 Tiges	22,17 ± 0,33	0,00 ± 0,00	T

II.5.1. LOCALISATION DES ACTIFS AU SEIN DE LA PLANTE

La localisation des saponines est la première étude à effectuer. En effet, les métabolites secondaires ne sont généralement pas présents de manière homogène dans la plante. Les saponines en particulier peuvent être stockées uniquement dans certains organes, variables selon la plante.⁸⁷ La Figure 65 indique le pourcentage de saponines (par rapport à la masse de matière sèche) dans les fleurs/graines, les tiges, les feuilles et les rhizomes d'*alpestris* d'Isola 2000.

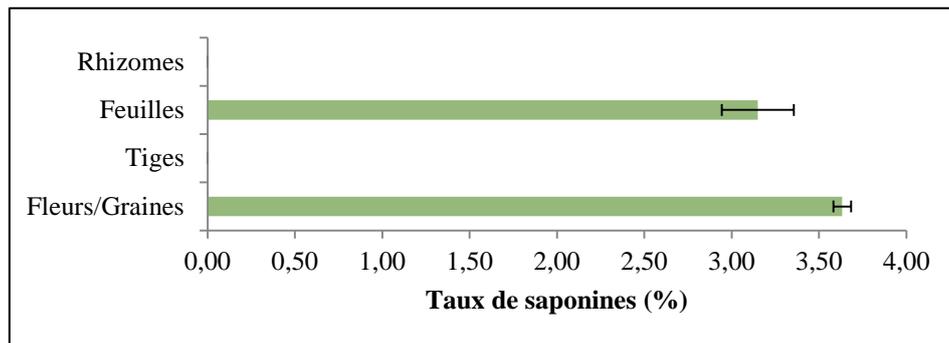


FIGURE 65 - QUANTITE DE SAPONINES TOTALES (%) SELON LA PARTIE DE LA PLANTE CIBLEE
CAS D'*ALPESTRIS* PROVENANT D'ISOLA 2000

D'après la Figure 65, les saponines sont présentes dans les fleurs/graines et les feuilles, mais absentes ou présentes à l'état de traces dans les tiges et les rhizomes. Ce résultat est en accord avec le rôle de phytoprotecteur des saponines.^{88,104} En effet, les saponines sont des phytoanticipines, ce sont des composés produits par la plante lors de son développement et stockés dans les organes de la plante les plus exposés. Ils sont activés et/ou libérés lors d'une attaque de pathogène ou une blessure des tissus, permettant ainsi à la plante de survivre. Dans le cas de *S. virgaurea*, les saponines sont stockées dans les fleurs/graines et dans les feuilles, organes les plus fragiles de la plante, certainement afin d'assurer la reproduction et la photosynthèse.

II.5.2. INFLUENCE DE LA PERIODE DE RECOLTE

La plante est généralement récoltée en pleine floraison mais il est possible d'observer des variations de métabolites secondaires selon le stade de développement d'une plante.⁸⁷ La période la plus adaptée pour la récolte de *S. virgaurea* doit donc être vérifiée. La Figure 66 présente l'étude réalisée en 2011 sur la sous-espèce *alpestris* provenant d'Isola 2000. Deux zones de récolte ont été définies, une zone basse (2150 m) et une zone haute (2250 m). De plus, trois stades de développement ont été choisis, en début de floraison lorsque la hampe florale est juste formée et les fleurs en bouton, en pleine floraison lorsque la hampe florale est bien développée et les fleurs ouvertes, et en fin de floraison lorsque les fleurs fanent et les graines apparaissent.

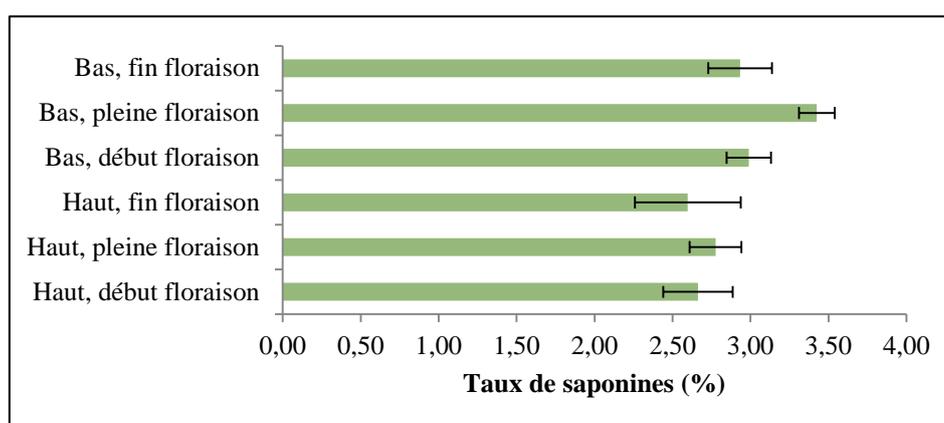


FIGURE 66 - QUANTITE DE SAPONINES TOTALES (%) SELON LA PERIODE DE RECOLTE

CAS D'ALPESTRIS PROVENANT D'ISOLA 2000 (ZONE HAUTE ET ZONE BASSE) RECOLTEE EN 2011

D'après la Figure 66, les saponines sont présentes en grande quantité dès la formation de la hampe florale. Cette teneur augmente avec le développement des fleurs et l'avancée de la floraison mais diminue en fin de floraison lorsque les fleurs fanent. Cette évolution est nettement visible dans le Tableau 18, en effet, pour chaque zone, l'échantillon récolté pendant la période de pleine floraison se situe dans un groupe séparé des deux autres. La quantité de saponines pendant la pleine floraison est donc significativement plus importante qu'en début et en fin de floraison. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus précédemment. En effet, les saponines étant majoritairement présentes dans les fleurs, il est normal que la teneur en saponines soit plus importante lorsque les fleurs sont totalement développées.

Afin de déterminer la période de récolte la plus adaptée, il faut également prendre en compte la masse végétale par pied selon le stade de développement. Elle est naturellement plus importante une fois la tige totalement développée.

Il est ainsi préférable de récolter la plante pendant la période de pleine floraison, qui s'étend de fin juillet à septembre, selon les conditions climatiques et l'altitude.

II.5.3. INFLUENCE DU MODE DE CONSERVATION

Le mode de conservation de référence est ici le séchage naturel à température ambiante à l'obscurité et la conservation en sachet papier. Cependant certains métabolites secondaires peuvent se dégrader si le mode de conservation de la plante n'est pas adapté. Certains échantillons ont donc été conservés congelés et d'autres ont été extraits à l'état frais directement après récolte. La Figure 67 présente les taux de saponines obtenus selon le mode de conservation choisi (séchage, congélation ou état frais).

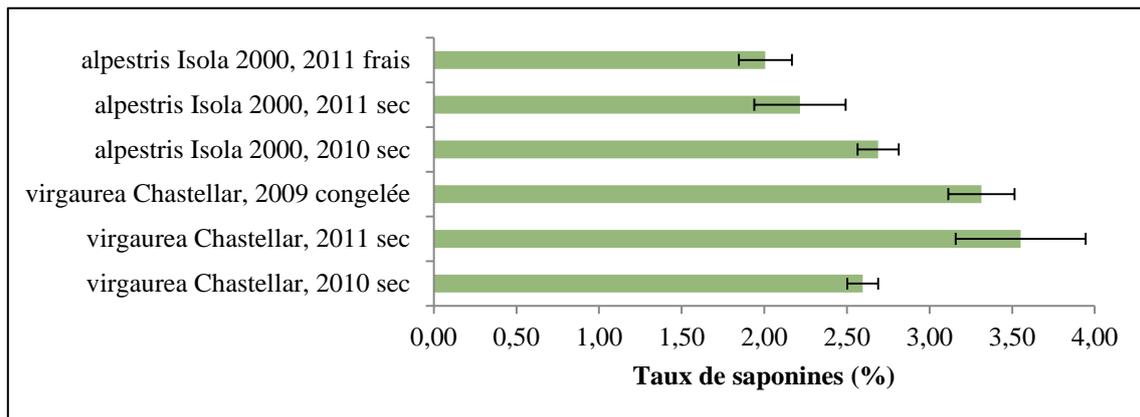


FIGURE 67 - QUANTITE DE SAPONINES TOTALES (%) SELON LE MODE DE CONSERVATION DE LA PLANTE

Le pourcentage de saponines est toujours calculé par rapport à la masse de matière sèche. Dans le cas de l'extraction à l'état frais et de l'extraction immédiatement après décongélation, la perte en eau a été calculée et un rapport a été appliqué aux valeurs de rendement afin d'obtenir des pourcentages comparables.

D'après la Figure 67, les taux de saponines d'*alpestris* récoltée en 2011, extrait à l'état frais d'une part, et extrait après séchage préalable d'autre part, ne sont pas significativement différents.

De plus, les taux de saponines de *virgaurea*, extrait après décongélation d'une part, et extrait après séchage préalable d'autre part, ne sont pas non plus significativement différents.

Le mode de conservation n'a donc pas d'influence sur le taux de saponines. Il est donc possible de choisir le plus pratique et le moins coûteux. De manière évidente, l'extraction à l'état frais laisse assez peu de liberté et le stockage par congélation est plutôt coûteux. En revanche, le stockage à l'état sec est un mode de stockage bien plus pratique, malgré la nécessité d'une zone de séchage adaptée (aération, obscurité, température ambiante...). En effet *S. virgaurea* sèche facilement et se conserve plusieurs années.

Le séchage naturel de la plante est donc le mode de conservation le plus adapté dans ce cas.

II.5.4. VARIABILITE SELON LA SOUS-ESPECE ET SA LOCALISATION GEOGRAPHIQUE

Les sous-espèces *alpestris* et *virgaurea* étant deux sous-espèces distinctes, il est possible que leurs taux de saponines soient différents. De plus, ces deux sous-espèces étant récoltées dans différentes zones, la variation éventuelle selon la localité géographique doit également être prise en compte. La Figure 68 indique le pourcentage de saponines, pour *virgaurea* récoltée à Chastellar, à Auron et La Colmiane, et pour *alpestris* récoltée à St Dalmas, Auron et Isola 2000.

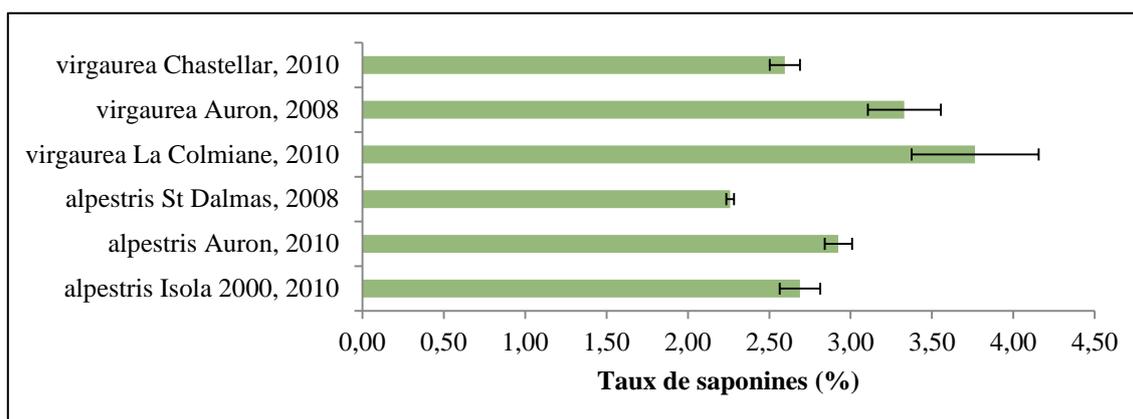


FIGURE 68 - QUANTITE DE SAPONINES TOTALES (%) SELON LA SOUS-ESPECE ET SA LOCALISATION GEOGRAPHIQUE

D'après la Figure 68, il n'est pas réellement possible de différencier les deux sous-espèces par leur taux de saponines. Certaines populations de *virgaurea* (Auron et La Colmiane) possèdent une quantité significativement plus importante de saponines par rapport à la plupart des populations d'*alpestris*, mais en observant le Tableau 18, on remarque que la majorité des groupes sont constitués d'un mélange de *virgaurea* et d'*alpestris*, les différences entre ces deux sous-espèces ne sont donc pas significatives.

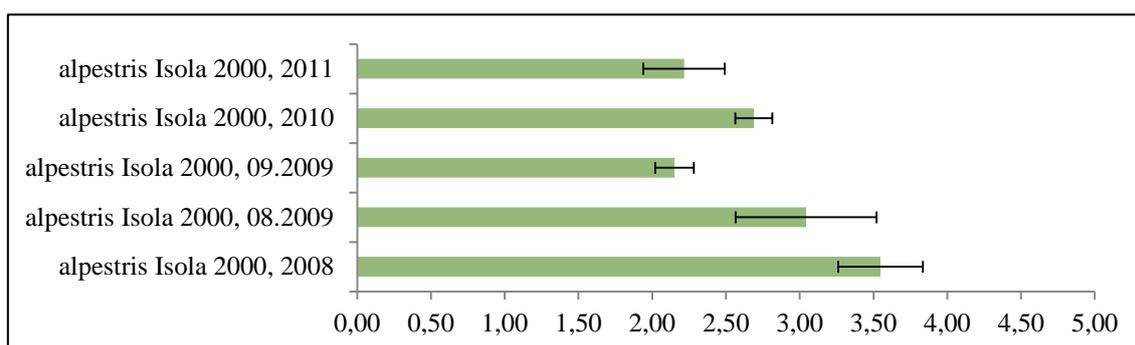
La localisation géographique n'a pas non plus de réelle influence sur la quantité de saponines totales. En effet, même si la Figure 68 indique une quantité importante de saponines pour *virgaurea* provenant de La Colmiane et provenant d'Auron, ainsi qu'une quantité de saponines assez faible pour *alpestris* provenant de St Dalmas, le Tableau 18 montre que ce n'est pas le cas chaque année, les différentes localisations géographiques étant réparties de manière homogène dans le tableau.

Le type de sous-espèce et la localisation géographique auraient donc relativement peu d'influence sur la quantité de saponine totales présentes dans la plante.

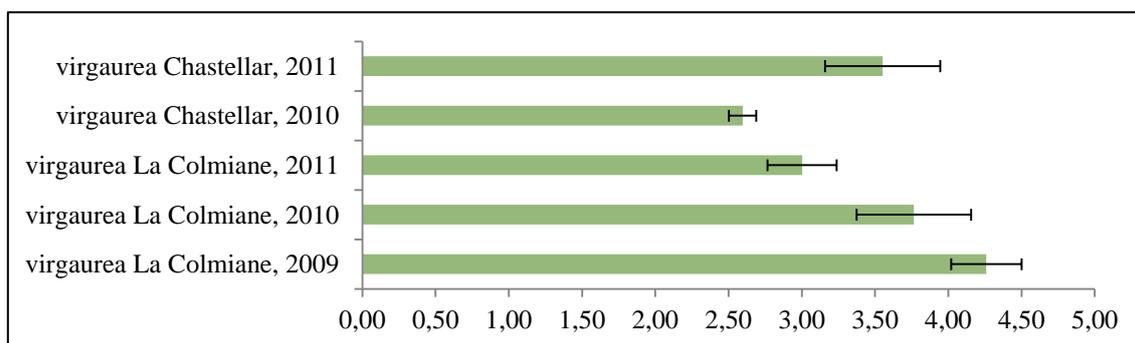
II.5.5. INFLUENCE DE L'ANNEE DE RECOLTE

Les taux de métabolites secondaires dans une plante peuvent varier de manière importante d'une année sur l'autre, en particulier à cause des conditions climatiques.

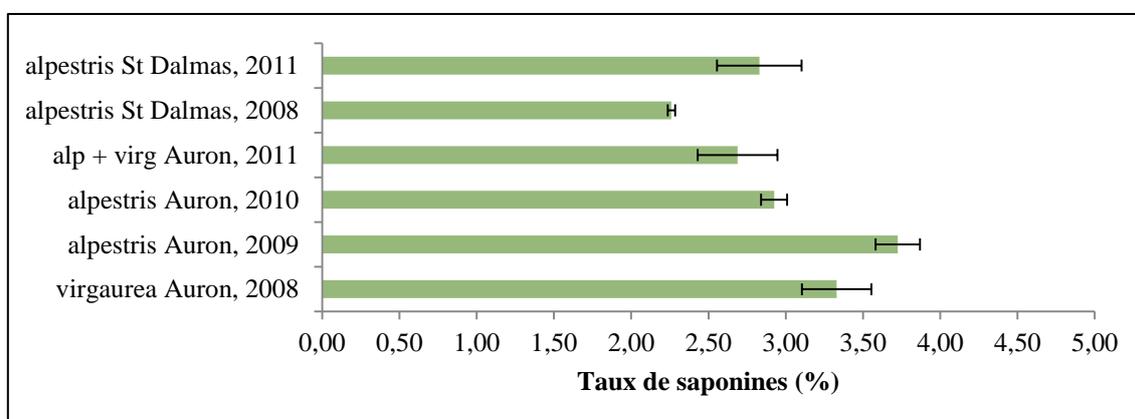
Le pourcentage de saponines, aussi bien de *virgaurea* que d'*alpestris*, doit donc être comparé sur plusieurs années (selon les populations disponibles). La Figure 69a indique le taux de saponines d'*alpestris* d'Isola 2000 de 2008 à 2011. La Figure 69b expose le taux de saponines de *virgaurea* de Chastellar et La Colmiane de 2009 à 2011. Enfin la Figure 69c présente le taux de saponines d'*alpestris* et de *virgaurea* d'Auron et St Dalmas de 2008 à 2011.



a - Cas d'*alpestris* d'Isola 2000



b - Cas de *virgaurea* de Chastellar et de La Colmiane



c - Cas d'*alpestris* et de *virgaurea* d'Auron et St Dalmas

FIGURE 69 - QUANTITE DE SAPONINES TOTALES (%) SELON L'ANNEE DE RECOLTE

Le taux de saponines varie d'une année sur l'autre pour chaque localisation, globalement entre $2,15 \pm 0,13$ % et $4,26 \pm 0,24$ %, ce qui confirme le peu d'influence de la sous-espèce ou de la localisation géographique sur la quantité de saponines totales par rapport à l'année de récolte. Ainsi, les paramètres influençant le plus le pourcentage de saponines totales sont probablement les conditions climatiques (quantité d'ensoleillement, de précipitations, écarts de températures...), très variables d'une année sur l'autre, ainsi que le taux de séchage de la plante, peu contrôlable lors d'un séchage/stockage traditionnel.

Afin de s'affranchir des variations de séchage, une comparaison des taux de saponines dans *l'extrait brut* a été réalisée (tableau des valeurs en Annexe 3). Les mêmes différences sont observées d'une année sur l'autre pour chaque localisation, les variations de séchage influencent donc peu le résultat final.

Les conditions climatiques sont donc bien le paramètre influençant le plus le pourcentage de saponines totales.

II.5.6. COMPARAISON AVEC UN ECHANTILLON COMMERCIAL

Dans le but de comparer la performance des échantillons « sauvages » récoltés dans la vallée de la Tinée par rapport aux produits commerciaux, un échantillon de *S. virgaurea* sec a été acheté dans une herboristerie et extrait de la même façon afin de comparer les profils en saponines.

Le dosage des saponines de cet échantillon commercial a donné un taux de saponines totales important de $3,91 \pm 0,48$ % malgré un faible rendement ($17,73 \pm 1,37$ %). Ce taux est assez élevé par rapport à la plupart des échantillons mais n'est pas significativement différent de 6 populations « sauvages » également riches en saponines (Groupes B et C).

Cependant le profil HPLC de cet échantillon s'est révélé différent des profils des échantillons sauvages, en particulier au niveau des saponines. Il est donc nécessaire d'étudier plus en détail cet échantillon, aussi bien au niveau phytochimique qu'en termes d'activité biologique avant de conclure sur sa qualité. Ces études seront exposées dans les paragraphes II.9.2.8 p. 187 et II.9.2.10 p. 191.

II.5.7. ETUDE D'ACCLIMATATION

Dans le but de procéder à une mise en culture de *S. virgaurea*, des essais de bouturage d'*alpestris* d'Isola 2000, *alpestris* d'Auron et *virgaurea* de la Colmiane ont été réalisés en 2009 par l'association Biophyto sur trois parcelles expérimentales (Isola 2000, St Dalmas et Isola village). La première récolte a pu être effectuée en 2010, mais seules *alpestris* d'Isola 2000 (bouturée à Isola 2000) et *virgaurea* de La Colmiane (bouturée à Isola village) ont fleuri cette année-là. Une deuxième récolte, cette fois-ci de tous les échantillons, a été réalisée en 2011. La Figure 70 montre les taux de saponines des différentes boutures récoltées en 2010 et en 2011.

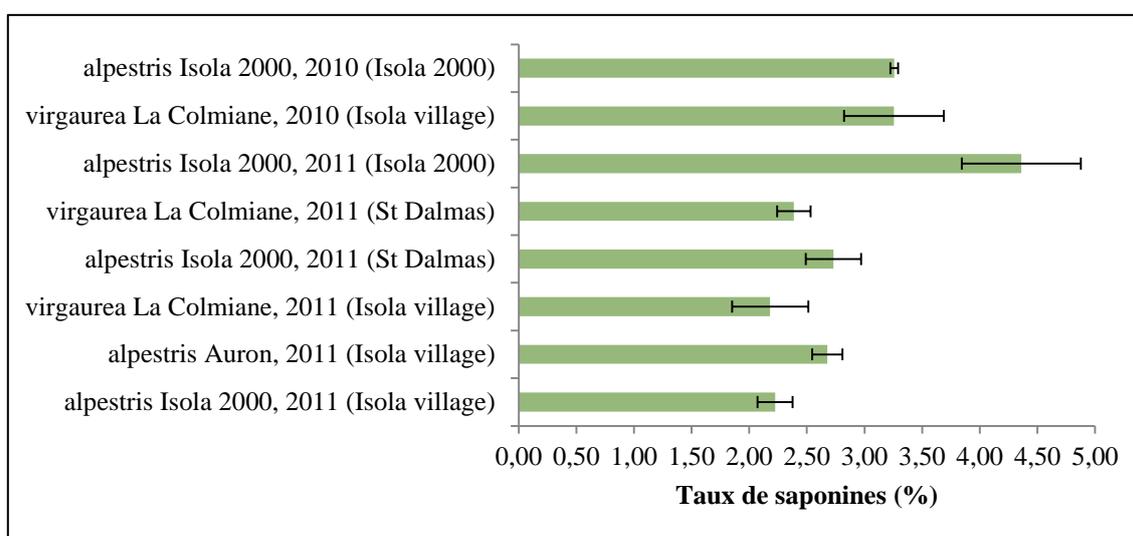


FIGURE 70 - QUANTITE DE SAPONINES TOTALES (%) SELON LE LIEU DE PRELEVEMENT DE LA BOUTURE ET LE LIEU DE BOUTURAGE

La sous-espèce *alpestris* d'Isola 2000 a été bouturée dans une parcelle expérimentale mise en place dans la même zone, dans le but d'observer l'influence du bouturage sur l'évolution des saponines totales sans changer les conditions environnementales. Elle a également été bouturée à St Dalmas dans le but d'observer l'influence du changement de sol, et à la pépinière d'Isola village (875 m) pour étudier l'influence d'un changement important d'altitude. Le même travail a été en partie effectué pour *alpestris* d'Auron et pour *virgaurea* de La Colmiane (étude du changement d'altitude et de sol).

En 2010, seules les boutures d'*alpestris* d'Isola 2000 et de *virgaurea* de La Colmiane ont fourni suffisamment de quantité de matière pour réaliser l'étude. La Figure 70 montre qu'elles ont conservé un taux de saponines élevé. Les boutures d'*alpestris* d'Isola 2000 possèdent même une quantité de saponines significativement supérieures à l'équivalent sauvage : $3,26 \pm 0,03$ % contre $2,69 \pm 0,13$ %.

En revanche les boutures de *virgaurea* de La Colmiane possèdent une quantité de saponines légèrement inférieures à l'équivalent sauvage : $3,25 \pm 0,43$ % contre $3,76 \pm 0,39$ %, mais conservent tout de même un taux important de saponines.

En 2011, tous les échantillons ont pu être récoltés. La sous-espèce *virgaurea* de La Colmiane bouturée à la pépinière a fourni moins de saponines en 2011 qu'en 2010. Ceci peut être dû à une variation naturelle ou à une réelle baisse causée par le changement d'altitude. A l'inverse, la sous-espèce *alpestris* d'Isola 2000 bouturée à Isola 2000 a fourni bien plus de saponines en 2011 qu'en 2010. Il sera nécessaire d'étudier la récolte de 2012 pour confirmer ces évolutions.

Globalement le bouturage à St Dalmas et à la pépinière a occasionné une production de saponines relativement basse mais qui reste dans la moyenne obtenue avec les populations sauvages.

La méthode de dosage mis en place par HPLC-ELSD a permis de calculer une teneur en saponines totales pour chaque échantillon de manière rapide et simple. En effet, le dosage a pu être réalisé directement après l'extraction et le séchage de l'échantillon. Seule la mise en place de la gamme étalon a nécessité un fractionnement en phase inverse afin de récupérer un mélange de saponines en suffisamment grande quantité pour réaliser une gamme étalon.

Cette méthode a par ailleurs été évaluée positivement en termes de spécificité, linéarité, limites de détection et de quantification, précision, répétabilité et exactitude.

Ce dosage a permis de comparer différentes populations de *S. virgaurea* au niveau de leur richesse en saponines totales, ce qui a entraîné une meilleure compréhension du comportement de la plante en fonction de différents facteurs. Les saponines sont uniquement présentes dans les fleurs/graines et les feuilles, ainsi les parties aériennes sont à privilégier lors de la récolte en laissant de côté les parties les plus ligneuses, tandis que les rhizomes peuvent être laissés en terre pour l'année d'après. La plante peut être récoltée dès le début du développement de la tige jusqu'à la fin de la floraison mais il a été montré que la période de pleine floraison est à privilégier. Le mode de conservation n'a pas d'influence sur la quantité de saponines totales, le séchage naturel à l'obscurité et à température ambiante a donc été privilégié. La plante peut ainsi se conserver plusieurs années dans un endroit sec sans perte d'actifs. La sous-espèce (*alpestris* ou *virgaurea*) et la localisation géographique n'ont apparemment pas une grande influence sur la quantité de saponines totales, ce qui évite une quelconque restriction pour la cueillette ou le choix de la zone de mise en culture. En revanche la variabilité est assez importante d'une année à l'autre, certainement à cause des conditions climatiques variables.

En ce qui concerne les premiers essais de mise en culture, les résultats ont montré un très bon comportement d'*alpestris* d'Isola 2000 bouturée dans la même zone, avec un accroissement important du taux de saponines totales, qui sera à confirmer avec les récoltes suivantes. Les autres populations, bouturées à St Dalmas et à la pépinière d'Isola 2000 (plus basse altitude), ont conservé un taux acceptable de saponines totales. Ces résultats seront à confirmer avec les récoltes suivantes mais si le taux de saponines se maintient à la pépinière, cela permettrait de réaliser des cultures à plus basse altitude et ainsi de réduire les coûts de production.

Cette méthode de dosage par HPLC est tout à fait adaptée pour ce type d'étude comparative. En revanche, elle possède certaines limites, en particulier si de nombreux lots doivent être analysés, par exemple dans le cadre du développement d'une filière de plantes médicinales. En effet chaque analyse dure près d'une heure et consomme un volume de solvant relativement important (environ 50-60 ml par analyse). Une autre technique d'analyse plus rapide et moins consommatrice de solvant pourrait ainsi être développée afin de répondre aux besoins futurs.

II.6. MISE EN PLACE D'UNE METHODE DE DOSAGE DES SAPONINES TOTALES PAR HPTLC

L'HPTLC est un outil efficace dans l'étude des produits naturels (Chapitre V.5.2 p. 72). De nombreuses études ont déjà montré que l'HPTLC est une technique simple, rapide et visuelle pour comparer des échantillons entre eux, en particulier dans le cas de criblage ou de contrôle de matières végétales.^{126,162,163} De plus, avec le développement de la détection par densitométrie, il est possible d'effectuer des dosages avec précision.

De plus en plus d'études utilisent l'HPTLC pour le dosage de saponines, cependant, les saponines étant une famille très complexe, ce type de dosage n'est jamais aisé. Certaines études réalisent ce genre de dosage dans des extraits contenant uniquement quelques saponines et très peu d'autres composés, ce qui permet de réaliser un dosage précis et relativement simple à mettre en œuvre.¹⁶⁴ En revanche, la plupart du temps, des préparations préalables sont nécessaires. Certains réalisent une pré-purification des saponines avant l'analyse HPTLC, par SPE par exemple,¹⁶⁵ d'autres effectuent une hydrolyse après extraction,¹⁶³ mais ces différentes manipulations peuvent s'avérer très longues et peuvent apporter de la variabilité si de nombreux échantillons doivent être analysés et comparés. Enfin certaines études utilisent l'HPTLC à deux dimensions (2D), ce qui est plus long et plus contraignant que l'HPTLC 1D.¹²¹

L'objectif ici est de développer une méthode de dosage des saponines dans un extrait complexe, plus rapide et moins consommatrice de solvant que celle développée par HPLC, afin de pouvoir comparer rapidement de nombreux échantillons. La technique de l'HPTLC a donc été choisie pour mettre en place ce dosage. Cependant, différents paramètres devront être optimisés afin d'obtenir la méthode la plus pratique et rapide possible tout en conservant une précision correcte.

Choix de la révélation

Comme expliqué précédemment, les saponines n'ont pas de spectre UV caractéristique et sont incolores, la quantification par spectroscopie UV-visible n'est donc pas une technique adaptée (Figure 71a). Il est donc nécessaire d'utiliser une révélation adaptée à ces structures après le développement. Les réactifs les plus adaptés sont généralement à base d'acide sulfurique,¹⁴⁷ en particulier le réactif à l'anisaldéhyde sulfurique, qui est souvent utilisé pour la révélation des saponines.^{123,165} Après révélation, les saponines de *S. virgaurea* sont de couleur brune en lumière visible et de couleur rouge en lumière UV à 366 nm (Figure 71b).

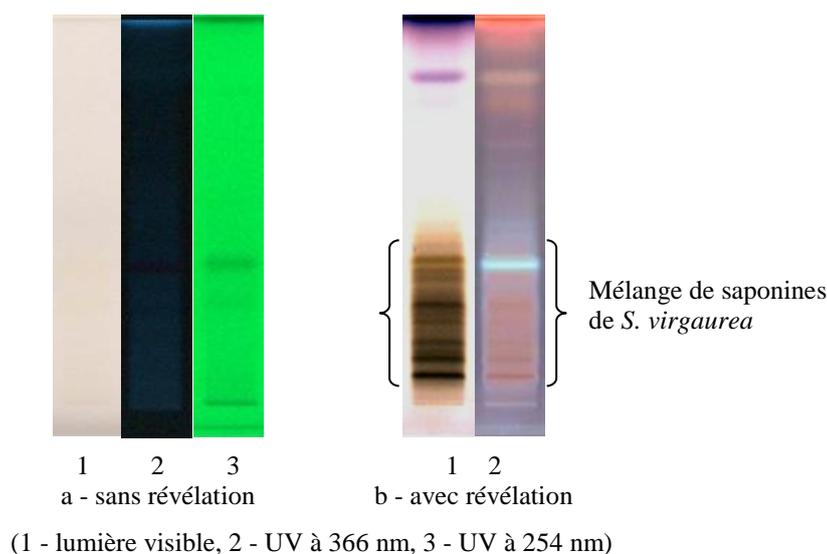


FIGURE 71 - ANALYSE HPTLC D'UN MÉLANGE DE SAPONINES DE *S. VIRGAUREA* AVEC REVELATION (A) ET SANS REVELATION (B) A L'ANISALDEHYDE SULFURIQUE

Choix de la phase stationnaire et de la phase mobile

Différents types de phases stationnaires peuvent être utilisés en HPTLC.¹⁴⁷ La plus courante est la silice (phase normale) mais il existe également de nombreuses phases greffées plus ou moins polaires (RP-8, -18, Amino, Cyano, Diol...). En fonction de la phase stationnaire utilisée et des composés cibles à analyser, la phase mobile la plus adaptée doit être choisie. Un grand nombre de solvants peut être utilisé et des mélanges en différentes proportions peuvent être réalisés, ce qui entraîne un nombre important de possibilités pour la phase mobile. Des mélanges de base adaptés à chaque famille de composés ont ainsi été élaborés dans la littérature.¹⁴⁷

Des essais ont été réalisés afin de comparer la phase inverse et la phase normale et ainsi choisir la plus efficace pour l'analyse de l'extrait méthanol/eau de *S. virgaurea*.

Un essai en phase inverse a été effectué avec une plaque RP-18 et une phase mobile constituée d'un mélange méthanol/eau 60:40, adapté à la migration des saponines. La résolution s'est avérée peu satisfaisante (Figure 72a), les composés les plus polaires (zone noire) en très grande quantité dans l'extrait empêchent une bonne migration. De plus le développement, en raison d'une proportion importante en eau, s'est avéré très long (1 h 40). L'analyse en phase inverse n'est donc pas la meilleure solution dans ce cas. La phase mobile pourrait être adaptée pour améliorer la résolution et réduire le temps d'analyse, mais la migration des composés majoritaires reste problématique. Il est possible que la phase normale soit plus adaptée.

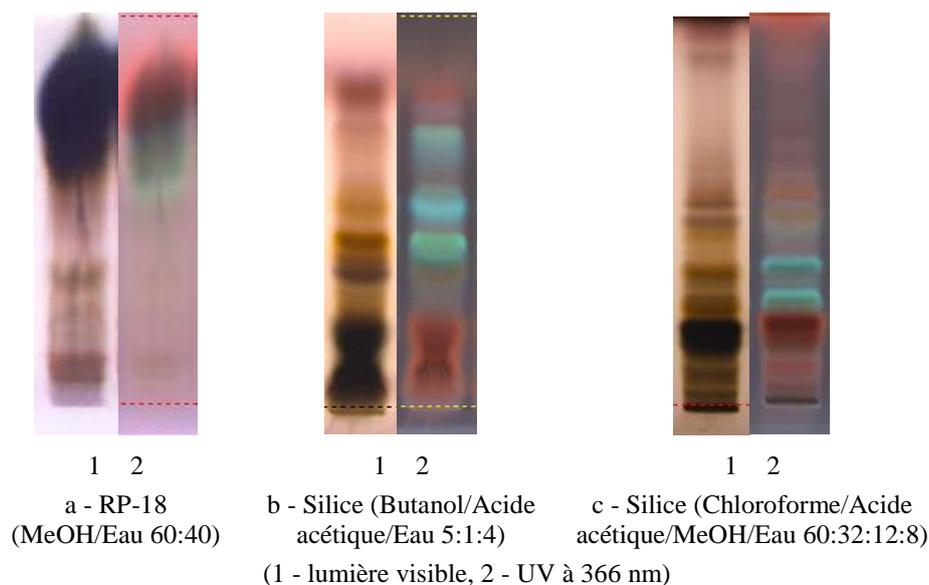


FIGURE 72 - CHOIX DE LA PHASE STATIONNAIRE ET DE LA PHASE MOBILE : RESULTATS DES DIFFERENTS ESSAIS

Le premier essai en phase normale a été effectué avec une plaque silice et une phase mobile constituée d'un mélange butanol/acide acétique/eau 5:1:4, développé dans la littérature pour l'analyse des saponines.^{147,166} Les composés les plus polaires, gênant dans l'essai précédent, ne migrent pas ou peu (Figure 72b), il est donc préférable de conserver cette phase normale, mais la résolution est là encore peu satisfaisante. La phase mobile n'est pas adaptée à ce type d'analyse.

Le second essai en phase normale a été effectué avec une plaque silice et une phase mobile constituée d'un mélange chloroforme/acide acétique/méthanol/eau 60:32:12:8, également développé dans la littérature pour l'analyse des saponines.^{147,166} La résolution est dans ce cas bien meilleure (Figure 72c), les taches sont fines, horizontales et relativement bien résolues. De plus le développement est beaucoup plus rapide que dans les essais précédents (30 min). Ce système de solvant sera donc conservé pour la suite des analyses.

Mise en place d'une pré-dérivation

Dans le but de détecter avec précision les taches correspondant aux saponines dans l'extrait, une fraction composée uniquement de saponines a été analysée.

L'analyse de cette fraction concentrée (Figure 73a) a montré que les saponines sont très nombreuses et réparties sur grande partie de la piste (R_f 0,05 à 0,4). Elles co-éluent ainsi avec les composés majoritaires de l'extrait (R_f 0,15 ; 0,2 ; 0,25 ; 0,32...). De plus, étant des composés minoritaires dans l'extrait brut, elles sont pratiquement invisibles (Figure 73b), même à forte concentration (100 mg/ml). Il est donc impossible de les doser ainsi.

L'objectif est donc ici de réduire la variabilité des structures et de séparer les taches correspondant aux saponines de celles correspondant aux différents composés majoritaires.

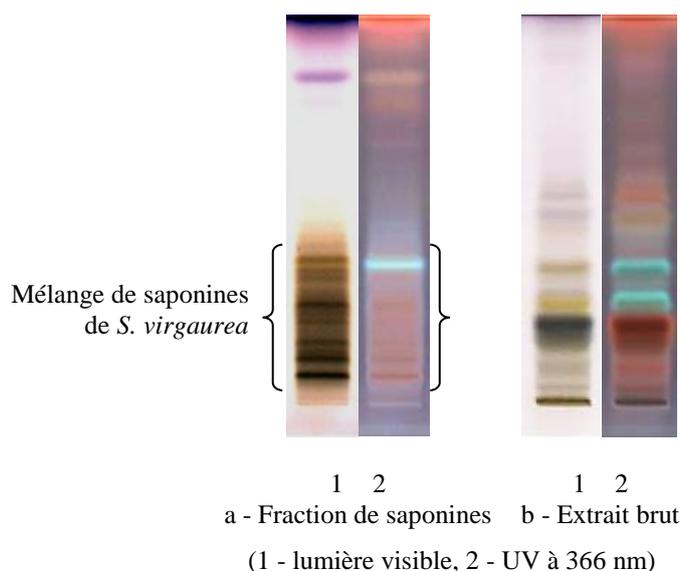


FIGURE 73 - ANALYSE D'UNE FRACTION DE SAPONINES TOTALES DE *S. VIRGAUREA*

Les saponines doivent leur grande variabilité structurale et leur polarité élevée principalement à la partie osidique, l'hydrolyse de cette partie permettrait certainement d'atteindre les objectifs.

L'hydrolyse est couramment utilisée pour faciliter l'analyse et le dosage des saponines,¹⁶³ elle est réalisée avant l'analyse, généralement par ajout à l'extrait d'un certain volume d'acide chlorhydrique dilué, chauffage pendant plusieurs heures et extraction liquide-liquide. Cependant, une hydrolyse ajoute une étape longue à l'extraction, ce qui peut s'avérer très lourd et peu reproductible dans le cas d'une comparaison de nombreux échantillons. Les extraits doivent pouvoir être analysés rapidement, sans être modifiés au préalable.

La solution la plus rapide, répétable et efficace serait donc une hydrolyse *in situ*, directement sur la plaque HPTLC, juste après le dépôt de l'extrait brut.

Plusieurs essais ont été réalisés afin de déterminer la méthode d'hydrolyse *in situ* la plus efficace.

L'acide chlorhydrique a tout d'abord été déposé directement sur la plaque grâce au déposeur automatique. Dans un premier essai, un volume de 4 µl d'acide 2 N a été déposé sur chaque extrait suivi d'un chauffage de la plaque à 105 °C pendant 15 min (Figure 74a). Dans un second essai, un volume de 8 µl d'acide 5 N a été déposé sur chaque extrait suivi d'un chauffage de la plaque à 105 °C pendant 30 min (Figure 74b). Ces deux essais n'ont donné que peu de résultats (légère apparition de taches gris pâle à 0,4 et 0,6) et une légère dégradation de la plaque a même été constatée. Le dépôt d'acide sur la plaque n'est donc pas la solution la plus efficace dans ce cas.

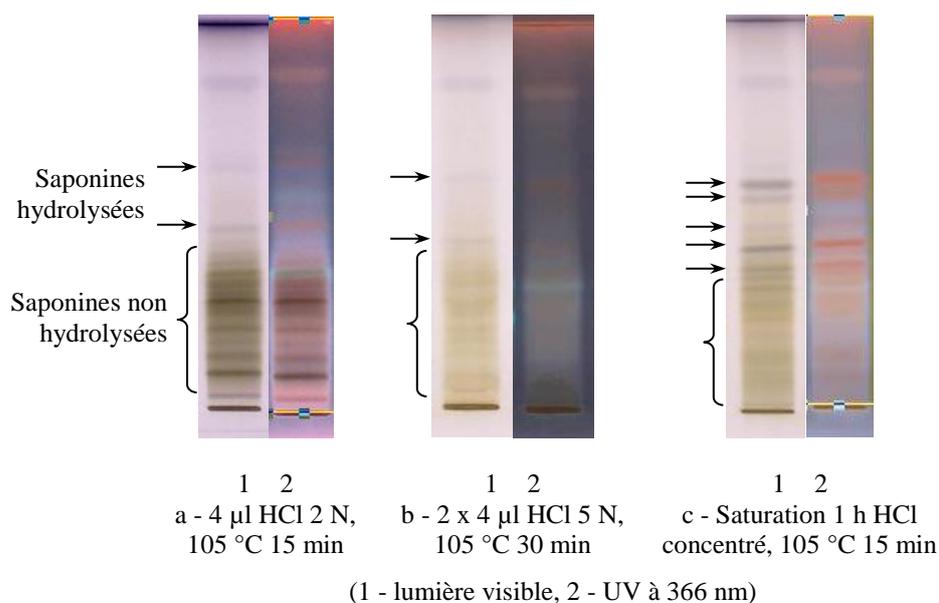


FIGURE 74 - ESSAIS D'HYDROLYSE ACIDE *IN SITU*

Un troisième essai a donc été réalisé en saturant une double cuve pour HPTLC de vapeurs d'acide chlorhydrique concentré (37 %). Un volume de 25 mL d'acide chlorhydrique concentré a été déposé dans la cuve de saturation et la plaque a été déposée dans la cuve de migration une fois celle-ci saturée en vapeur d'acide. La plaque a été maintenue pendant 1 h au contact des vapeurs puis chauffée pendant 15 min à 105 °C. Les résultats pour ce troisième essai sont bien meilleurs que dans le cas du dépôt direct (Figure 74c). Les nombreuses taches brunes correspondant aux saponines ont en partie disparu pour laisser place à une tache brune correspondant aux sucres (R_f 0) et cinq taches majoritaires à 0,39 ; 0,43 ; 0,49 ; 0,56 et 0,59, grises en lumière visible et rouges en lumière UV à 366 nm. Ces cinq taches pourraient donc être facilement utilisées pour le dosage des saponines puisque bien moins nombreuses qu'avant hydrolyse et présentes dans une zone comportant moins d'interférences. Cependant l'hydrolyse ne semble toujours pas être totale, un temps de contact plus long doit être choisi. Une étude de cinétique a été réalisée avec des temps d'hydrolyse de 1, 2, 4 et 6 h. La quantité de saponines hydrolysées n'augmente plus significativement à partir de 4 h, par ailleurs les taches rouges visibles à 366 nm au niveau des saponines non hydrolysées ont disparu, elles sont uniquement présentes au niveau des R_f correspondant aux saponines hydrolysées. Les essais suivants ont donc été réalisés avec un temps d'hydrolyse de 4 h et un temps de chauffage de 30 min. Les résultats sont visibles sur la Figure 75 (mélange de saponines) et sur la Figure 76 (extrait brut).

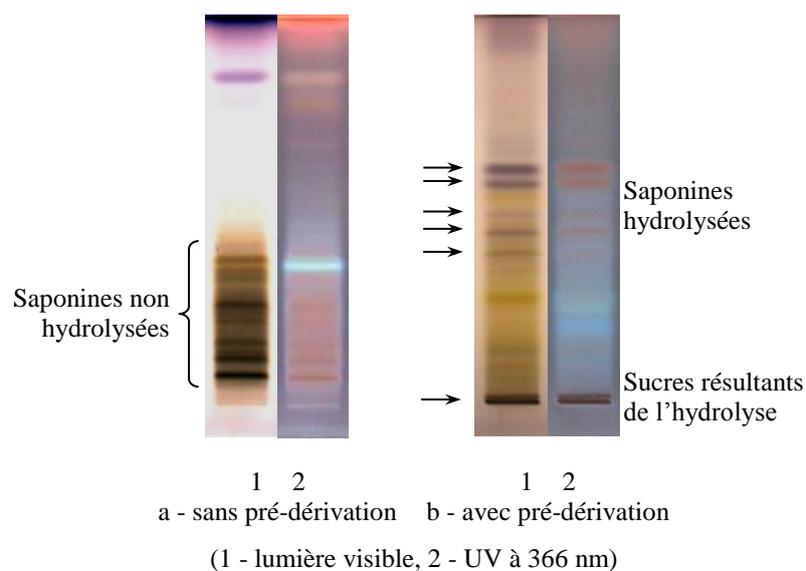


FIGURE 75 - ANALYSE HPTLC D'UN MELANGE DE SAPONINES SANS PRE-DERIVATION (A) ET AVEC PRE-DERIVATION (B) A L'ACIDE CHLORHYDRIQUE

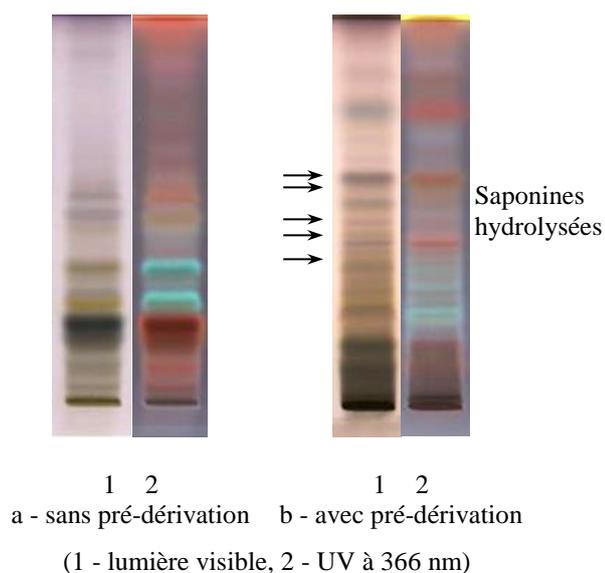


FIGURE 76 - ANALYSE HPTLC D'UN EXTRAIT BRUT SANS PRE-DERIVATION (A) ET AVEC PRE-DERIVATION (B) A L'ACIDE CHLORHYDRIQUE

Choix du standard

Les standards de saponines sont rares, chers et peu adaptés, leur réponse est en effet très différente selon la structure. L'aescine par exemple, un mélange de saponines provenant du marronnier d'Inde, ou encore l'acide glycyrrhizique, provenant de la réglisse, répondent beaucoup plus que le mélange de saponines de *S. virgaurea*, aussi bien en visible qu'en UV. Il est ainsi préférable d'utiliser directement les saponines étudiées (Figure 77). Cependant, leur

faible quantité dans l'extrait et leur grande diversité rendent leur purification très longue et complexe. Un mélange de saponines sans impureté a donc été choisi pour réaliser le dosage, tout comme dans l'étude précédente. La gamme étalon a été réalisée avec des concentrations en saponines de 1 ; 5 ; 10 ; 15 et 20 mg/ml dans un mélange eau/méthanol 70:30 (Figure 78). Les deux études pourront ainsi être comparées.

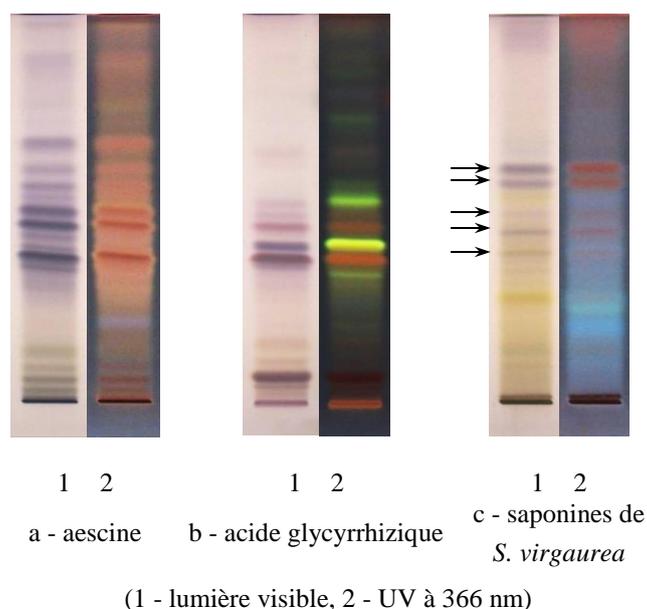
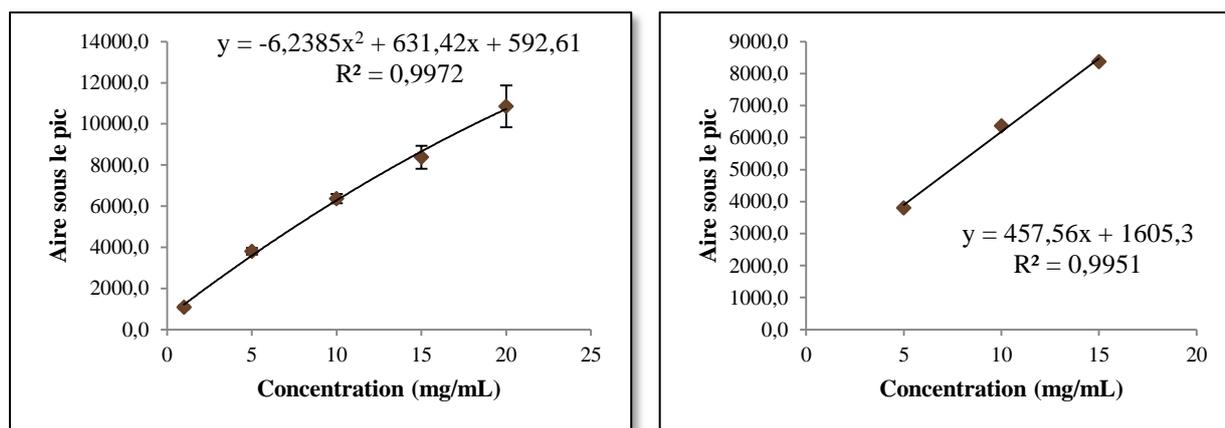


FIGURE 77 - COMPARAISON ENTRE L'AESCEINE, L'ACIDE GLYCYRRHIZIQUE ET LES SAPONINES DE *S. VIRGAUREA* APRES HYDROLYSE ACIDE (CONCENTRATIONS IDENTIQUES)

La gamme étalon ayant une forme de type polynomial (Figure 78a), une zone linéaire a été choisie dans le but d'obtenir une équation plus simple à utiliser par la suite (Figure 78b). Après analyse de l'extrait brut, l'aire totale des cinq taches sélectionnées permet de déterminer la teneur de l'extrait brut en saponines totales. La teneur de la matière sèche en saponines totales est ensuite calculée grâce au rendement obtenu pour chaque extraction.

Le volume de dépôt choisi pour une bonne visibilité est de 2 µl et la concentration des solutions d'extraits bruts est de 100 mg/ml, tout comme dans l'étude précédente.



a - Aire des pics de saponines en fonction de la concentration de la solution injectée

b - Zone linéaire choisie pour la quantification

FIGURE 78 - GAMME ETALON POUR LE DOSAGE DES SAPONINES TOTALES PAR HPTLC

Validation de la méthode

Les composés majoritaires ont été isolés et identifiés par RMN comme étant des saponines dans le chapitre précédent. De plus, tout comme dans l'étude précédente, la fraction utilisée pour le dosage ainsi que plusieurs extraits ont été analysés en HPLC-MS afin de certifier la nature de l'ensemble des composés à doser. La fraction est donc bien composée d'une famille complexe de saponines. La comparaison des R_f et des couleurs des taches en lumière visible et en UV à 366 nm a ensuite été utilisée pour le dosage des saponines dans chaque extrait.

La courbe d'étalonnage montre une bonne linéarité ($R^2 = 0,9951$) dans l'intervalle choisi (Tableau 17). La limite de détection ($Aire_{Signal}/Aire_{Bruit} = 3$) est aux alentours de 2 μg et la limite de quantification ($Aire_{Signal}/Aire_{Bruit} = 10$) à environ 10 μg . La variation intra- et inter-jour pour les trois concentrations de standard est inférieure à 4,25 % et celle pour les trois extraits choisis est inférieure à 5,60 %. La méthode analytique développée a montré une bonne exactitude avec un recouvrement de 97 % pour l'échantillon d'*alpestris* d'Isola 2000. Enfin, la variabilité de la matière végétale et de l'extraction a également été évaluée pour toutes les populations. Pour cela, trois extractions indépendantes ont été réalisées pour chaque population. Le coefficient de variation (RSD%) diffère selon la population, mais dans le cas de l'échantillon d'*alpestris* d'Isola 2000 il s'élève à 13,68 %.

Ainsi cette méthode de quantification des saponines totales de *S. virgaurea* par HPTLC s'est avérée précise, répétable, sensible et spécifique.

**TABLEAU 19 - PARAMETRES DE VALIDATION DE LA METHODE DE QUANTIFICATION DES SAPONINES DE
S. VIRGAUREA PAR HPTLC**

Linéarité, limite de quantification et limite de détection					
Equation	R²	Intervalle de linéarité		LOQ	LOD
$y = 457,56x + 1605,3$	0,9951	10-30 µg		10 µg	2 µg
Précision et répétabilité (µg de saponines déposées, n=3)					
Echantillons	Intra-jour		Inter-jour		
	Moyenne ± Ecart type	RSD%^a	Moyenne ± Ecart type	RSD%^a	
Standard (10 µg)	8,47 ± 0,16	1,86	9,60 ± 0,41	4,24	
Standard (20µg)	21,09 ± 0,63	2,99	20,81 ± 0,75	3,59	
Standard (30 µg)	28,85 ± 0,85	2,95	28,98 ± 1,12	3,87	
Extrait <i>alpestris</i> Isola 2000, 2010	14,64 ± 0,64	4,39	16,72 ± 0,72	4,28	
Extrait <i>alpestris</i> Auron, 2010	21,34 ± 1,16	5,43	22,53 ± 0,67	2,95	
Extrait <i>virgaurea</i> La Colmiane, 2010	25,70 ± 0,73	2,83	26,30 ± 1,47	5,60	
Exactitude (µg de saponines déposées, n=3)					
Echantillon	Quantité initiale	Quantité ajoutée	Quantité mesurée	Recouvrement	RSD%^a
Extrait <i>alpestris</i> Isola 2000, 2010	17,00	3,84	20,22 ± 0,4	97,02 ± 1,90 %	1,96 %
Variabilité de la matière végétale et de l'extraction ((% saponines dans la matière sèche, n=3)					
Echantillon	Moyenne ± Ecart-type		RSD%^a		
Extrait <i>alpestris</i> Isola 2000, 2010	2,09 ± 0,29 %		13,68 %		

^a RSD (%) = (écart type/moyenne) × 100

II.7. COMPARAISON DES DEUX METHODES

Une analyse de la variance (ANOVA) avec un test de Fisher a été réalisée tout comme dans l'étude précédente, afin de pouvoir comparer les différentes populations entre elles. Les résultats sont exposés dans le Tableau 20. Les deux études utilisant les mêmes extraits, les rendements sont rigoureusement les mêmes que dans le paragraphe précédent. Le taux de saponines dans la matière sèche varie quant à lui entre 0 et $3,81 \pm 0,51$ % selon la population considérée. L'ANOVA a permis de constituer 18 groupes significativement différents (A à R), ils sont classés dans le Tableau 20 des plus concentrés en saponines aux moins concentrés.

Les valeurs des concentrations en saponines obtenues par HPTLC sont moins élevées que celles obtenues par HPLC. En effet, le rapport moyen *Réponse HPLC/Réponse HPTLC* est de $1,46 \pm 0,34$ (Tableau 21). L'hypothèse la plus probable pouvant expliquer cette différence serait une sous-estimation de la concentration en saponines totales en HPTLC à cause de l'étape supplémentaire d'hydrolyse qui n'est pas effectuée en HPLC. En effet, même si la gamme étalon a subi rigoureusement le même traitement, il se peut que l'hydrolyse ait été légèrement moins efficace sur les extraits bruts (effet de matrice, nombreux autres composés hydrolysés...). Cependant les valeurs restent tout à fait acceptables, étant donné que l'objectif du développement de cette méthode est la comparaison de populations entre elles ou par rapport à une population de référence et non pas la détermination de la concentration exacte en saponines.

De plus, les valeurs d'écart-type obtenues par HPTLC sont plus importantes que celles obtenues par HPLC (Tableau 20 et Tableau 21). Ainsi, les coefficients de variation (RSD%) sont plus importants dans le cas de l'HPTLC. Les groupes sont donc légèrement différents des groupes formés avec la méthode en HPLC, ils sont moins nombreux car il y a moins de différences significatives entre les échantillons.

Cependant le classement des échantillons est, à quelques exceptions près, globalement similaire. A titre d'exemple, la bouture *d'alpestris* d'Isola 2000 reste la plus concentrée en saponines. De plus, les *virgaurea* de La Colmiane de 2009 et 2010, les fleurs/graines *d'alpestris* d'Isola 2000 et l'*alpestris* d'Isola 2000 de 2008 restent les plus concentrés juste après la bouture *d'alpestris*. Quant à l'*alpestris* d'Isola 2000 de 2011 récolté frais et aux *virgaurea* de La Colmiane de 2011 bouturée à Isola village et à St Dalmas, ils font toujours partie des échantillons les moins concentrés. Cette méthode de dosage par HPTLC n'a pas non plus détecté de saponines dans les tiges ni dans les rhizomes (Figure 79).

TABLEAU 20 - CLASSEMENT DES POPULATIONS PAR ANOVA – DOSAGE HPTLC

Populations	Rendement/masse de matière sèche (%)	Taux de saponines/masse de matière sèche (%)	Groupes
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2011 bouturée à Isola 2000	29,96 ± 1,13	3,81 ± 0,51	A
<i>alpestris</i> Isola 2000 Bas, 2011, pleine floraison	30,89 ± 0,19	3,13 ± 0,34	B
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2008	29,05 ± 2,39	3,04 ± 0,09	BC
<i>virgaurea</i> La Colmiane, 2010	25,82 ± 1,83	2,98 ± 0,19	BCD
<i>virgaurea</i> La Colmiane, 2009	24,42 ± 0,47	2,92 ± 0,58	BCD
<i>virgaurea</i> Auron, 2008	26,31 ± 2,18	2,76 ± 0,08	BCDE
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010 Fleurs/Graines	33,91 ± 1,90	2,68 ± 0,26	BCDE
<i>virgaurea</i> Chastellar, 2009 congelée	26,94 ± 0,57	2,67 ± 0,29	BCDE
<i>alpestris</i> Isola 2000 Bas, 2011 début floraison	28,48 ± 0,86	2,61 ± 0,34	BCDEF
<i>alpestris</i> Auron, 2009	27,49 ± 0,63	2,58 ± 0,59	CDEFG
<i>alpestris</i> Isola 2000, 08.2009	25,78 ± 1,20	2,53 ± 0,11	DEFGH
<i>alpestris</i> Isola 2000 Haut, 2011 pleine floraison	30,20 ± 0,79	2,34 ± 0,11	EFGHI
<i>alpestris</i> Isola 2000 Haut, 2011 début floraison	29,12 ± 0,45	2,17 ± 0,14	FGHIJ
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010 bouturée à Isola 2000	32,10 ± 0,23	2,16 ± 0,14	FGHIJ
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010	29,02 ± 1,27	2,09 ± 0,29	GHIJK
<i>alpestris</i> St Dalmas, 2008	23,49 ± 0,98	2,09 ± 0,19	HIJK
<i>alpestris</i> Isola 2000 Haut, 2011 fin floraison	30,38 ± 0,65	2,01 ± 0,29	IJKL
<i>alpestris</i> Auron, 2010	23,08 ± 0,27	1,99 ± 0,34	IJKLM
<i>alpestris</i> St Dalmas, 2011	23,74 ± 0,62	1,94 ± 0,08	IJKLM
<i>alpestris</i> Isola 2000 Bas, 2011 fin floraison	29,32 ± 0,19	1,93 ± 0,36	IJKLMN
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010 Feuilles	33,74 ± 0,97	1,86 ± 0,18	IJKLMNO
<i>alpestris</i> Isola 2000, 07.2010	26,90 ± 1,64	1,85 ± 0,24	IJKLMNO
<i>virgaurea</i> Chastellar, 2011	26,88 ± 0,56	1,83 ± 0,15	IJKLMNOP
<i>virgaurea</i> La Colmiane, 2011	25,68 ± 0,45	1,77 ± 0,25	JKLMNOP
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010 début floraison	26,80 ± 0,48	1,76 ± 0,17	JKLMNOP
<i>alpestris</i> + <i>virgaurea</i> Auron, 2011	24,51 ± 0,49	1,75 ± 0,40	JKLMNOPQ
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2009	25,80 ± 0,31	1,70 ± 0,13	JKLMNOPQ
<i>virgaurea</i> La Colmiane, 2010 bouturée à Isola village	20,10 ± 0,83	1,66 ± 0,32	KLMNOPQ
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2011 bouturée à St Dalmas	27,19 ± 0,14	1,64 ± 0,37	KLMNOPQ
<i>alpestris</i> Isola 2000 Hameau, 2011	30,69 ± 0,59	1,62 ± 0,33	KLMNOPQ
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2011	26,90 ± 1,69	1,60 ± 0,47	KLMNOPQ
<i>virgaurea</i> Chastellar, 2010	27,11 ± 0,66	1,58 ± 0,36	LMNOPQ
<i>alpestris</i> Auron, 2011 bouturée à Isola village	23,91 ± 0,95	1,50 ± 0,45	MNOPQ
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2011 bouturée à Isola village	28,02 ± 0,81	1,44 ± 0,55	NOPQ
<i>virgaurea</i> La Colmiane, 2011 bouturée à Isola village	24,13 ± 1,00	1,42 ± 0,29	OPQ
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2011 frais	26,63 ± 0,62	1,28 ± 0,13	PQ
<i>virgaurea</i> La Colmiane, 2011 bouturée à St Dalmas	24,16 ± 0,42	1,26 ± 0,17	Q
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010 Tiges	22,17 ± 0,33	0,00 ± 0,00	R
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2008 Rhizomes	25,45 ± 0,64	0,00 ± 0,00	R
<i>Solidago</i> commercial "La maison des plantes"	17,73 ± 1,37	0,00 ± 0,00	R

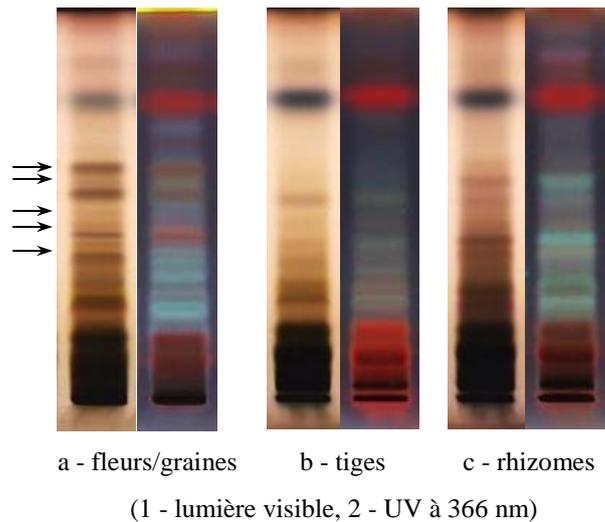


FIGURE 79 - LOCALISATION DES ACTIFS AU SEIN DE LA PLANTE

A titre d'illustration, l'étude plus particulière de la variabilité des saponines en fonction de la sous-espèce et de sa localisation géographique est présentée dans la Figure 80. Les deux méthodes de dosage sont ainsi comparées sur un même graphique.

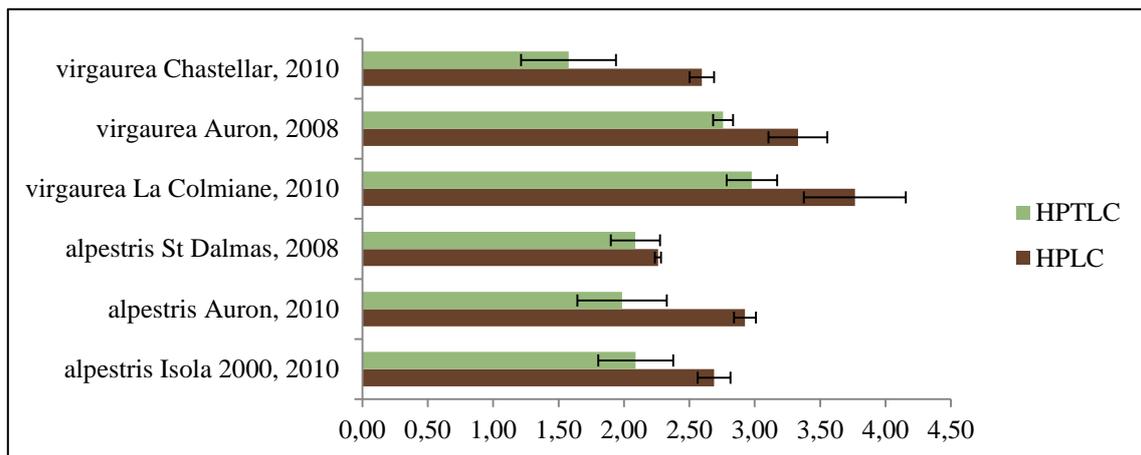


FIGURE 80 - QUANTITE DE SAPONINES TOTALES (%) SELON LA SOUS-ESPECE ET SA LOCALISATION GEOGRAPHIQUE, PAR HPLC ET PAR HPTLC

Les valeurs obtenues avec l'HPTLC sont effectivement moins importantes que celles obtenues par HPLC mais les mêmes différences entre les populations sont globalement observées. Les deux méthodes indiquent que les populations de *virgaurea* d'Auron de 2008 et de La Colmiane de 2010 possèdent significativement plus de saponines que les autres populations. Enfin les barres d'erreur sont en effet plus grandes dans le cas de l'HPTLC, même si ce n'est pas toujours le cas.

En revanche une différence importante est à noter entre l'HPLC et l'HPTLC dans le cas de l'échantillon commercial de *S. virgaurea* (Figure 81).

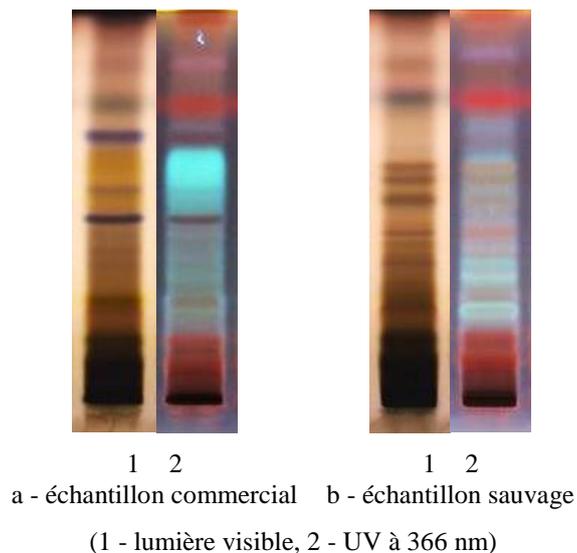


FIGURE 81 - *SOLIDAGO* COMMERCIAL (A GAUCHE) ET *S. VIRGAUREA ALPESTRIS* D'ISOLA 2000 (A DROITE)

L'HPLC a détecté la présence d'une quantité importante de composés dans la fenêtre de temps d'éluion des saponines mais avec des temps de rétention différents des saponines habituellement rencontrées dans les échantillons sauvages. L'UV et la spectrométrie de masse ont confirmé l'appartenance de ces composés à la classe des saponines, mais l'HPTLC n'a détecté aucune tache correspondant aux cinq taches de référence. En revanche, deux taches bleu intense en visible et rouge foncé en UV à 366 nm, inexistantes dans tous les échantillons sauvages, apparaissent dans cet échantillon commercial. Il est possible que ces taches correspondent à des saponines de structures différentes, elles ne peuvent cependant pas être dosées par HPTLC avec cette méthode. Ceci étant, l'HPTLC est ici une méthode très visuelle pour la détection de différences structurales. D'éventuelles adultérations peuvent donc être facilement repérées.

TABLEAU 21 - COMPARAISON DES PERFORMANCES : HPLC vs HPTLC

Paramètres	HPLC	HPTLC
Equation	$y = 15898x^{1,1084}$	$y = -6,2385x^2 + 631,42x + 592,61$
Intervalle de linéarité	20-400 µg ($y = 1,1084x + 4,2013$) ^a	10-30 µg ($y = 457,56x + 1605,3$)
Coefficient de corrélation	0,9981	0,9951
LOD	4 µg	2 µg
LOQ	16 µg	10 µg
Précision intra-jour (standard 10 mg/ml)	1,70 %	2,99 %
Précision inter-jour (standard 10 mg/ml)	1,69 %	3,59 %
Répétabilité intra-jour (<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010)	2,95 %	4,39 %
Répétabilité inter-jour (<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010)	3,49 %	4,28 %
Exactitude (<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010)	101,91 ± 0,30 %	97,02 ± 1,90 %
Moyenne de tous les taux de saponines	2,82 ± 0,87 %	2,00 ± 0,87 %
Réponse moyenne HPLC/HPTLC		1,46 ± 0,34
Ecart type moyen	0,21 ± 0,13 %	0,25 ± 0,16 %
Coefficient de variation moyen (RSD%)	7,17 ± 4,13 %	12,85 ± 8,81 %
Consommation en solvant pour 120 analyses	6,60 l	0,32 l
Durée de 120 analyses	110 h	20-24 h

^a $y = \log(\text{aire du pic})$, $x = \log(\text{concentration, mg/ml})$

^b $\text{RSD\%} = (\text{écart type/moyenne}) \times 100$

La comparaison des deux méthodes ne s'arrête cependant pas à leur performance en termes de précision. D'autres paramètres importants doivent être pris en compte lors de la mise en place d'une méthode de comparaison de nombreux échantillons comme la consommation de solvants. En effet, la conjoncture actuelle (problèmes environnementaux, législation de plus en plus sévère...) impose l'utilisation de techniques les plus écologiques possible. Le Tableau 21 indique la consommation de solvants des deux techniques pour l'ensemble des échantillons analysés. La différence est importante puisque l'HPLC a consommé plus de 20 fois plus de solvant que l'HPTLC. L'HPTLC est donc une technique plus « verte » que l'HPLC, même si ce résultat peut être contrebalancé par l'utilisation, dans ce cas, de solvants plus toxiques qu'en HPLC, et par l'élimination des plaques à chaque utilisation.

D'autre part, le Tableau 21 indique que l'HPTLC est beaucoup plus rapide que l'HPLC, 20-24 h contre 110 h. En effet l'HPTLC permet d'analyser plusieurs échantillons en même temps (une quinzaine généralement) et pour chaque plaque, le temps d'analyse est relativement court. Il prend en compte le temps de dépôt des échantillons (ici environ 30-40 min), le temps de saturation de la cuve et de contrôle de l'humidité (environ 30 min), le temps de développement de la plaque (ici environ 30 min), le temps de révélation (5-10 min) et la

réalisation des prises de vue et des données de densitométrie, ce qui fait dans ce cas environ 1 h 45 - 2 h en prenant en compte des temps morts inévitables. Il faut bien évidemment rajouter à ce temps le temps d'hydrolyse (4 h de saturation et 30 min de chauffage) mais l'avantage de ce type de technique est que plusieurs plaques peuvent être traitées en même temps, ainsi, un temps théorique de 48 h d'analyse pour tous les échantillons peut être réduit à 24 h en réalisant plusieurs plaques en même temps (4 plaques par jour). En HPLC, dans ce cas, 15 échantillons s'analysent en 14 h incompressibles (55 min par échantillon) et ainsi 120 échantillons s'analysent en 110 h, ce qui est beaucoup plus long. Cependant ce gain de temps peut être contrebalancé par la présence indispensable de l'analyste tout au long de l'analyse en HPTLC. En effet, les étapes étant nombreuses et pouvant être réalisées simultanément avec plusieurs plaques, l'analyste doit être présent pour chaque changement d'étape. En HPLC à l'inverse, grâce au passeur d'échantillon et à une réserve suffisante en solvant, 100 analyses peuvent être réalisées à la suite sans intervention, de jour comme de nuit. L'HPTLC est donc beaucoup plus rapide mais demande plus d'intervention.

Enfin, les plaques étant jetées après chaque analyse en HPTLC, il existe moins de problèmes de contamination qu'en HPLC. Cependant il peut y avoir des problèmes de migration, ce qui peut interférer avec le dosage.

L'HPTLC est donc une technique très intéressante pour la comparaison de nombreux échantillons. C'est une technique légèrement moins précise que l'HPLC car elle comporte plus d'étape donc plus de risques d'apporter des imprécisions mais elle a l'avantage d'être plus rapide et plus visuelle puisque plusieurs échantillons peuvent être comparés sur la même plaque et elle permet de consommer moins de solvant.

Les dosages des saponines totales mis en place ont permis une meilleure compréhension du comportement de la plante en termes de production de saponines et pourront être très utiles pour un futur contrôle lors de la production du bain de bouche. Cependant les saponines possèdent des activités différentes selon leur structure, certaines sont très actives et d'autres beaucoup moins. Même si l'activité est due à l'ensemble des saponines, il serait intéressant de doser les saponines majoritaires déjà identifiées et testées précédemment afin de comparer les profils et éventuellement sélectionner les plus riches en saponines très actives. En effet une faible quantité de saponines totales pourrait être contrebalancée par une forte proportion en saponines actives. Par ailleurs, au-delà de l'aspect économique, la comparaison de ces profils pourrait être très utile pour une étude chimiotaxonomique, associée à des études de génétique des populations, afin d'aller plus loin dans la compréhension des populations de *S. virgaurea*.

II.8. MISE EN PLACE D'UNE METHODE DE DOSAGE DES SAPONINES MAJORITAIRES PAR HPLC-ELSD

Dans le but de doser les saponines majoritaires (actives et non-actives) séparément, une nouvelle méthode de dosage doit être mise en place. En effet la méthode de dosage avec le mélange de saponines ne peut plus être utilisée pour des composés purs (plus faibles quantités à doser).

Un standard doit donc être utilisé. Cependant, comme expliqué en II.4 p. 135, il n'existe pas de saponine pure dans le commerce, de plus, les saponines sont des composés minoritaires très difficiles à isoler et à purifier à cause d'une grande variété de structures proches qui co-éluent. L'isolement des saponines en suffisamment grande quantité pour les utiliser comme étalon est donc très complexe et très long. L'avantage de l'ELSD est la possibilité d'utiliser un composé de structure différente pour le dosage. C'est en effet un détecteur considéré comme universel si certaines conditions sont respectées.^{146,167} Il est en particulier nécessaire de choisir un standard non volatil et éluant à un pourcentage en phase organique proche de celui des composés à doser car la réponse de l'ELSD augmente avec le pourcentage en phase organique. Cette augmentation est d'autant plus importante lorsque le pourcentage en phase organique dépasse les 50 % (allure exponentielle).

Le premier essai de dosage a été réalisé avec de l'acide oléanolique. C'est un acide triterpénique de structure proche de l'acide polygalacique, disponible dans le commerce. Cependant, ce composé élué avec un pourcentage en phase organique important (proche de 100 % d'acétonitrile), alors que les saponines éluent entre 35 et 45 %. La réponse de l'acide oléanolique est donc bien trop importante par rapport à la réponse des saponines et ainsi sous-estime fortement la quantité de chaque saponine.

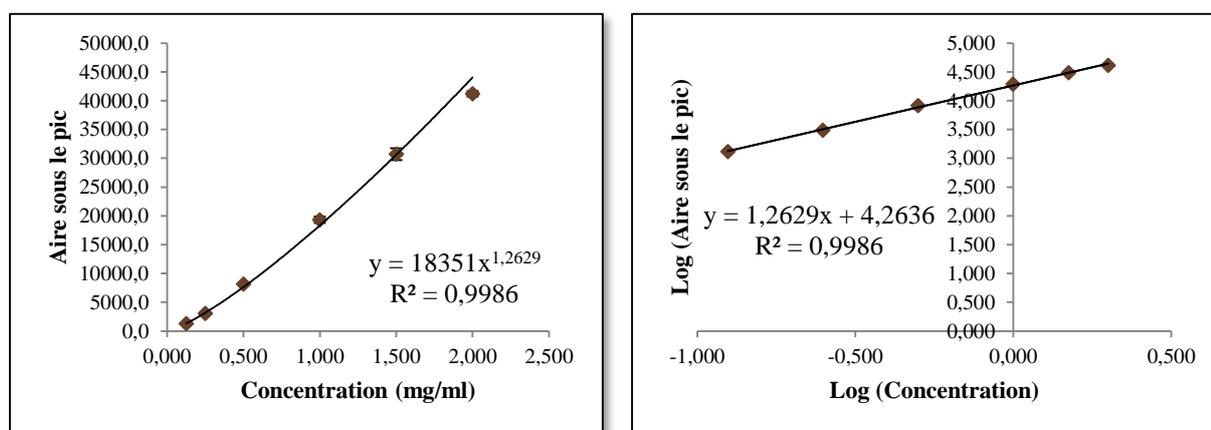
Un standard éluant dans la zone d'éluion des saponines ou un peu avant serait donc préférable. En effet la différence de réponse de l'ELSD entre 0 et 50 % d'acétonitrile est assez faible.

Le second essai de dosage a donc été réalisé avec de la rutine. C'est un flavonoïde glycosylé très courant, disponible dans le commerce. Ce composé élué avec un pourcentage de 25 % d'acétonitrile, un peu avant les saponines. Le dosage des saponines *en équivalent rutine* va donc naturellement surestimer la quantité de saponines, mais de manière négligeable. En effet l'objectif ici est de réaliser une comparaison des profils des différentes populations de *S. virgaurea* et non de déterminer la concentration exacte de chaque saponine.

La rutine a ainsi été choisie comme étalon externe pour le dosage des saponines majoritaires. C'est en effet un composé facile à obtenir, stable et non volatil.

La méthode HPLC optimisée en II.4 p. 135 a été conservée. Elle permet de séparer l'ensemble des saponines des autres composés, tout en évitant les co-élutions. De plus la colonne analytique, le gradient, le volume d'injection, la concentration des solutions d'extraits bruts et les paramètres de l'ELSD ont également été conservés.

La gamme étalon a ensuite été réalisée avec des concentrations en rutine de 0,125 ; 0,250 ; 0,500 ; 1,00 ; 1,50 et 2,00 mg/ml dans une solution de méthanol/eau 50:50 (Figure 82).



a - Aire du pic de rutine en fonction de la concentration de la solution injectée

b - Log de l'aire du pic de rutine en fonction du Log de la concentration de la solution injectée

FIGURE 82 - GAMME ETALON POUR LE DOSAGE DES SAPONINES MAJORITAIRES PAR HPLC-ELSD

La gamme étalon ayant une forme de type puissance (Figure 82a), le log des aires en fonction du log des concentrations a été tracé dans le but d'obtenir une équation linéaire plus simple à utiliser par la suite (Figure 82b). La quantité de chaque saponine majoritaire dans l'extract brut est ensuite déterminée grâce à son aire et enfin le pourcentage des saponines dans la matière sèche est calculé grâce au rendement obtenu pour chaque extraction.

Validation de la méthode

Tous les composés dosés dans cette méthode ont été isolés et identifiés par RMN comme étant des saponines dans le chapitre précédent. De plus, plusieurs extraits ont été analysés en HPLC-MS afin de certifier la nature de l'ensemble des composés à doser. La comparaison des temps de rétention et des spectres UV a ensuite été utilisée pour le dosage des différentes saponines dans chaque extrait.

La courbe d'étalonnage montre une bonne linéarité ($R^2 = 0,9986$) dans l'intervalle choisi (Tableau 22). La limite de détection ($Aire_{Signal}/Aire_{Bruit} = 3$) est aux alentours de 0,8 µg et la limite de quantification ($Aire_{Signal}/Aire_{Bruit} = 10$) à environ 2,5 µg. La variation intra- et inter-jour pour les trois concentrations de standard est inférieure à 5 % et celle pour les six saponines des trois extraits choisis est inférieure à 8 %. Enfin, la variabilité de la matière végétale et de l'extraction a également été évaluée pour toutes les populations. Pour cela, trois extractions indépendantes ont été réalisées pour chaque population. Le coefficient de variation (RSD%) diffère selon la population, mais dans le cas des six saponines de l'échantillon d'*alpestris* d'Isola 2000 il s'élève à 1,96 ; 2,58 ; 4,57 ; 2,15 ; 1,35 et 1,89 % pour les six saponines *S1*, *S2*, *S8*, *S9*, *S10* et *S11*, respectivement (saponines actives en gras et soulignées).

Ainsi cette méthode de quantification des saponines de *S. virgaurea* en équivalent rutine par HPLC-ELSD s'est avérée précise, répétable, sensible et spécifique.

**TABLEAU 22 - PARAMETRES DE VALIDATION DE LA METHODE DE QUANTIFICATION DES SAPONINES DE
S. VIRGAUREA EN EQUIVALENT ROUTINE PAR HPLC-ELSD**

Linéarité, limite de quantification et limite de détection				
Equation^a	R²	Intervalle de linéarité	LOQ	LOD
$y = 457,56x + 1605,3$	0,9986	2,5-40 µg	2,5 µg	0,8 µg
Précision et répétabilité (µg de saponines injectées, n=3)				
Echantillons	Intra-jour		Inter-jour	
	Moyenne ± Ecart type	RSD%^b	Moyenne ± Ecart type	RSD%^b
Standard (10 µg)	10,55 ± 0,22 µg	2,05 %	10,60 ± 0,32 µg	3,04 %
Standard (20µg)	20,66 ± 0,57 µg	2,78 %	20,91 ± 0,59 µg	2,82 %
Standard (30 µg)	30,56 ± 0,88 µg	2,87 %	29,88 ± 1,45 µg	4,85 %
Extrait <i>alpestris</i> Isola 2000, 2010				
<u>S1</u>	17,12 ± 0,55 µg	3,24 %	16,96 ± 0,35 µg	2,08 %
<u>S2</u>	8,32 ± 0,52 µg	6,22 %	8,31 ± 0,51 µg	6,18 %
S8	8,34 ± 0,33 µg	3,94 %	8,59 ± 0,61 µg	7,12 %
<u>S9</u>	5,83 ± 0,25 µg	4,33 %	5,94 ± 0,47 µg	7,88 %
S10	10,28 ± 0,38 µg	3,74 %	10,52 ± 0,28 µg	2,64 %
S11	8,42 ± 0,38 µg	4,55 %	8,53 ± 0,48 µg	5,63 %
Extrait <i>alpestris</i> Auron, 2010				
<u>S1</u>	7,07 ± 0,47 µg	6,65 %	7,41 ± 0,37 µg	4,96 %
<u>S2</u>	tr	-	tr	-
S8	18,73 ± 1,26 µg	6,70 %	18,34 ± 0,84 µg	4,60 %
<u>S9</u>	20,07 ± 0,76 µg	3,78 %	20,14 ± 0,79 µg	3,91 %
S10	14,99 ± 0,25 µg	1,68 %	15,18 ± 0,69 µg	4,53 %
S11	11,31 ± 0,69 µg	6,06 %	11,53 ± 0,38 µg	3,28 %
Extrait <i>virgaurea</i> La Colmiane, 2010				
<u>S1</u>	21,24 ± 0,26 µg	1,20 %	21,34 ± 0,78 µg	3,66 %
<u>S2</u>	10,68 ± 0,74 µg	6,94 %	10,96 ± 0,62 µg	5,63 %
S8	18,71 ± 0,31 µg	1,65 %	18,64 ± 0,52 µg	2,80 %
<u>S9</u>	16,41 ± 0,57 µg	3,47 %	16,52 ± 0,52 µg	3,12 %
S10	16,56 ± 0,81 µg	4,92 %	16,65 ± 0,32 µg	1,91 %
S11	16,60 ± 0,47 µg	2,81 %	16,42 ± 0,28 µg	1,72 %
Variabilité de la matière végétale et de l'extraction (% saponines dans la matière sèche, n=3)				
Echantillon	Moyenne ± Ecart-type		RSD%^b	
Extrait <i>alpestris</i> Isola 2000, 2010				
<u>S1</u>	0,25 ± 0,005 %		1,96 %	
<u>S2</u>	0,11 ± 0,003 %		2,58 %	
S8	0,13 ± 0,006 %		4,57 %	
<u>S9</u>	0,12 ± 0,003 %		2,15 %	
S10	0,18 ± 0,002 %		1,35 %	
S11	0,15 ± 0,003 %		1,89 %	

^a y = log (aire du pic), x = log (concentration, mg/ml)

^b RSD (%) = (écart type/moyenne) × 100

II.9. ETUDE DE LA VARIABILITE DE *S. VIRGAUREA* PAR DOSAGE DES SAPONINES MAJORITAIRES

II.9.1. SELECTION DES SAPONINES A DOSER

Les saponines présentes dans l'extrait de *S. virgaurea* sont très nombreuses et possèdent toutes des structures très proches. La plupart sont en très faible quantité et co-éluent fortement, même avec des conditions HPLC optimisées, elles sont donc extrêmement difficiles à isoler, à caractériser et à doser. Cependant, plusieurs saponines ont été isolées et caractérisées dans le chapitre précédent (*S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11*).

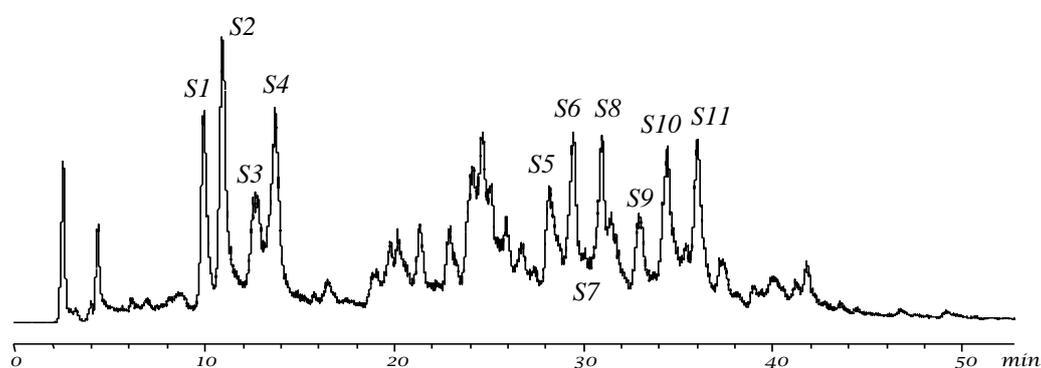


FIGURE 83 - CHROMATOGRAMME DE LA FRACTION DE SAPONINES

Les saponines *S3, S4* et *S7* sont dans la plupart des extraits à l'état de traces, elles ne pourront donc pas être dosées. De plus, *S5* et *S6* co-éluent avec d'autres saponines minoritaires, elles ne pourront donc pas non plus être dosées. La comparaison visuelle rapide des profils des différentes populations a par ailleurs montré que *S3, S4, S5* et *S6* varient peu d'une population à l'autre, leur dosage n'aurait donc pas d'influence dans la comparaison des différentes populations. En revanche, *S1, S2, S8, S9, S10* et *S11* sont majoritaires et suffisamment séparées des autres saponines pour être dosées.

Ces six saponines ont donc été choisies pour être dosées afin d'établir pour chaque population un profil en saponines caractéristique et ainsi effectuer une étude comparative des différentes populations.

Dans le chapitre précédent, les tests d'inhibition de la conversion levure-hyphes de *C. albicans* ont montré que les saponines *S1* et *S2* possédaient une forte activité inhibitrice, *S10* une activité inhibitrice moyenne alors que *S8, S9* et *S11* n'étaient pas actives aux concentrations testées. Les comparaisons se feront donc en fonction de ces données.

II.9.2. ANALYSE DES RESULTATS

Une analyse de la variance (ANOVA) avec un test de Fisher a été réalisée tout comme dans les études précédentes, afin de pouvoir comparer les différentes populations entre elles, mais cette fois-ci simultanément sur chacune des six saponines sélectionnées. Les résultats sont exposés dans le Tableau 23 (saponines actives soulignées).

Pour chacune des six saponines, les populations non-significativement différentes ont été rassemblées dans un même groupe. Le taux de *S1* varie de 0 à 0,54 % selon la population considérée et celui de *S2* entre 0 et 0,19 %. De plus, le taux de *S8* varie entre 0 et 0,33 %, celui de *S9* de 0 à 0,40 %, celui de *S10* de 0 à 0,32 % et enfin le taux de *S11* varie entre 0 et 0,25 %.

L'ANOVA a permis de constituer 13 groupes différents pour *S1* (A à M), 15 groupes pour *S2* (A à O), 14 groupes pour *S8* (A à N), 20 groupes pour *S9* (A à T), 21 groupes pour *S10* (A à U) et 19 groupes pour *S11* (A à S).

La quantité de saponines varie de manière relativement importante d'une population à l'autre et cela pour les six saponines sélectionnées. Cependant, ce tableau est très complexe, il contient un grand nombre de valeurs, il est donc difficile de mettre en évidence d'éventuels facteurs de variation ainsi que d'éventuels regroupements de populations similaires. Il est ainsi nécessaire d'appliquer des traitements statistiques à cette matrice comme la Classification Ascendante Hiérarchique et l'Analyse en Composantes Principales, deux traitements complémentaires qui permettent de réduire la dimension des données et avoir une meilleure visibilité des résultats. Ces traitements permettent de dégager des tendances en prenant en compte les 6 saponines simultanément.

Les profils en saponines seront par la suite comparés selon différents facteurs (sous-espèce, lieu, année, période de récolte...) afin de déterminer d'éventuelles causes de variation.

TABLEAU 23 - CLASSEMENT DES POPULATIONS PAR ANOVA POUR 6 SAPONINES DIFFERENTES – DOSAGE HPLC

Code	Populations	Saponine 1	Saponine 2	Saponine 8	Saponine 9	Saponine 10	Saponine 11
A	<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010	0,25 HI	0,11 HIJK	0,13 JK	0,12 MNOP	0,18 KLMN	0,15 DEF
B	<i>alpestris</i> Isola 2000, 2009	0,25 HI	0,09 KLM	0,09 LM	0,08 RS	0,16 MNOP	0,10 KLMNOP
C	<i>alpestris</i> Auron, 2010	0,04 L	0,00 O	0,24 B	0,26 B	0,20 HIJK	0,13 HI
D	<i>alpestris</i> Auron, 2009	0,05 L	0,00 O	0,33 A	0,40 A	0,29 B	0,16 CDEF
E	<i>virgaurea</i> La Colmiane, 2010	0,29 EF	0,13 CDEFG	0,23 B	0,22 CD	0,24 DEF	0,20 B
F	<i>virgaurea</i> La Colmiane, 2009	0,28 FGH	0,12 DEFGH	0,23 BC	0,21 DEF	0,32 A	0,25 A
G	<i>virgaurea</i> Auron, 2008	0,04 L	0,00 O	0,21 CD	0,22 CD	0,24 DE	0,20 B
H	<i>alpestris</i> St Dalmas, 2008	0,03 LM	0,00 O	0,20 D	0,20 EF	0,16 OPQ	0,10 LMNOP
I	<i>alpestris</i> Isola 2000, 2008	0,35 CD	0,14 C	0,15 FGHI	0,15 HIJKL	0,26 CD	0,20 B
J	<i>alpestris</i> Isola 2000, 2009	0,32 DE	0,12 DEFGH	0,14 HIJ	0,13 LMNO	0,22 FGHI	0,16 CDEF
K	<i>alpestris</i> Isola 2000, 2011	0,19 K	0,09 KLM	0,10 LM	0,08 RS	0,11 T	0,08 QR
L	<i>alpestris</i> Isola 2000 Hameau, 2011	0,34 CD	0,13 CD	0,09 LM	0,10 PQR	0,15 OPQ	0,11 IJKLMNO
M	<i>alpestris</i> + <i>virgaurea</i> Auron, 2011	0,04 L	0,00 O	0,24 B	0,23 C	0,19 JKL	0,12 HIJKL
N	<i>alpestris</i> St Dalmas, 2011	0,05 L	0,00 O	0,20 D	0,21 CDE	0,23 EFG	0,16 CDEF
O	<i>virgaurea</i> La Colmiane, 2011	0,25 GHI	0,10 JKLM	0,15 FGHI	0,16 HIJK	0,23 EFG	0,17 CD
P	<i>virgaurea</i> Chastellar, 2010	0,23 IJ	0,10 IJKL	0,17 EF	0,19 FG	0,15 OPQ	0,09 NOPQ
Q	<i>virgaurea</i> Chastellar, 2011	0,27 FGH	0,12 FGHI	0,25 B	0,27 B	0,18 KLM	0,11 HIJKLMN
R	<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010 Fleurs/Graines	0,36 C	0,12 DEFGH	0,16 FGH	0,16 HIJ	0,28 BC	0,20 B
S	<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010 Tiges	0,00 M	0,00 O	0,00 N	0,00 T	0,00 U	0,00 S
T	<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010 Feuilles	0,34 CD	0,18 A	0,10 KL	0,14 JKL	0,13 QRST	0,17 CDE
U	<i>alpestris</i> Isola 2000, 2008 Rhizomes	0,00 M	0,00 O	0,00 N	0,00 T	0,00 U	0,00 S
V	<i>virgaurea</i> La Colmiane, 2010 bouturée à Isola village	0,25 HI	0,11 GHIJ	0,16 FGHI	0,17 GH	0,20 IJK	0,15 EF
W	<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010 bouturée à Isola 2000	0,40 B	0,16 B	0,10 KL	0,13 LMN	0,20 IJK	0,15 EF

X	<i>alpestris</i> Isola 2000, 2011 bouturée à Isola village	0,25	GHI	0,09	LM	0,09	LM	0,09	RS	0,12	ST	0,07	R
Y	<i>alpestris</i> Auron, 2011 bouturée à Isola village	0,06	L	0,00	O	0,18	DE	0,20	EF	0,16	NOP	0,12	HIJ
Z	<i>virgaurea</i> La Colmiane, 2011 bouturée à Isola village	0,06	L	0,03	N	0,11	KL	0,09	RS	0,14	PQR	0,09	PQR
A2	<i>alpestris</i> Isola 2000, 2011 bouturée à St Dalmas	0,26	GHI	0,10	JKLM	0,13	JK	0,10	PQR	0,15	PQR	0,10	MNOP
B2	<i>virgaurea</i> La Colmiane, 2011 bouturée à St Dalmas	0,05	L	0,03	N	0,17	EFG	0,15	IJKL	0,14	PQRS	0,10	NOPQ
C2	<i>alpestris</i> Isola 2000, 2011 bouturée à Isola 2000	0,54	A	0,19	A	0,19	DE	0,17	GHI	0,24	DEF	0,17	C
D2	<i>alpestris</i> Isola 2000 Haut, 2011 début floraison	0,29	FG	0,13	DEFG	0,10	LM	0,10	PQR	0,16	OPQ	0,13	GHI
E2	<i>alpestris</i> Isola 2000 Haut, 2011 pleine floraison	0,25	HI	0,13	CDEFG	0,11	KL	0,11	NOPQ	0,16	MNOP	0,12	HIJKLM
F2	<i>alpestris</i> Isola 2000 Haut, 2011 fin floraison	0,26	GHI	0,11	FGHIJ	0,10	KL	0,11	NOPQ	0,16	OPQ	0,09	OPQ
G2	<i>alpestris</i> Isola 2000 Bas, 2011 début floraison	0,25	GHI	0,13	CDEF	0,14	HIJ	0,13	LMN	0,18	KLM	0,14	FG
H2	<i>alpestris</i> Isola 2000 Bas, 2011 pleine floraison	0,36	C	0,13	CDE	0,14	GHIJ	0,13	LMN	0,22	EFGH	0,20	B
I2	<i>alpestris</i> Isola 2000 Bas, 2011 fin floraison	0,25	GHI	0,12	EFGHI	0,14	IJ	0,14	KLM	0,17	LMNO	0,12	HIJK
J2	<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010 début floraison	0,20	JK	0,10	IJKL	0,08	M	0,07	S	0,12	RST	0,10	JKLMNOP
K2	<i>alpestris</i> Isola 2000, 07/2010	0,17	K	0,08	M	0,12	JK	0,11	OPQ	0,20	IJK	0,15	DEF
L2	<i>Solidago</i> commercial "La maison des plantes"	0,00	M	0,00	O	0,00	N	0,00	T	0,00	U	0,00	S
N2	<i>virgaurea</i> Chastellar, 2009 congelée	0,17	K	0,09	LM	0,20	D	0,23	C	0,21	GHIJ	0,13	GH
O2	<i>alpestris</i> Isola 2000, 2011 frais	0,20	JK	0,09	KLM	0,09	LM	0,10	QR	0,13	QRST	0,09	OPQR

II.9.2.1. CLASSIFICATION ASCENDANTE HIERARCHIQUE (CAH)

La classification ascendante hiérarchique (CAH) est une méthode de classification itérative. C'est le premier traitement statistique appliqué. L'objectif est de constituer des classes regroupant les objets les plus semblables. La constitution des classes se fait par un algorithme agglomératif. Une matrice de distance entre les objets est calculée, les objets les plus proches sont regroupés et une nouvelle matrice de distance est calculée. Le processus est répété jusqu'à ce que tous les objets ne forment qu'une classe. Le résultat se présente sous la forme d'un dendrogramme dont chaque nœud représente une classe. L'interprétation se fait en déterminant un niveau de partitionnement, c'est à dire la distance définissant le nombre de classes considéré comme représentatif. La longueur des branches est proportionnelle aux distances calculées et représente la similarité entre les classes, plus les branches sont longues moins les classes sont similaires. Le dendrogramme obtenu à l'aide du logiciel XLStat est présenté dans la Figure 84, les codes des échantillons sont donnés dans le Tableau 23.

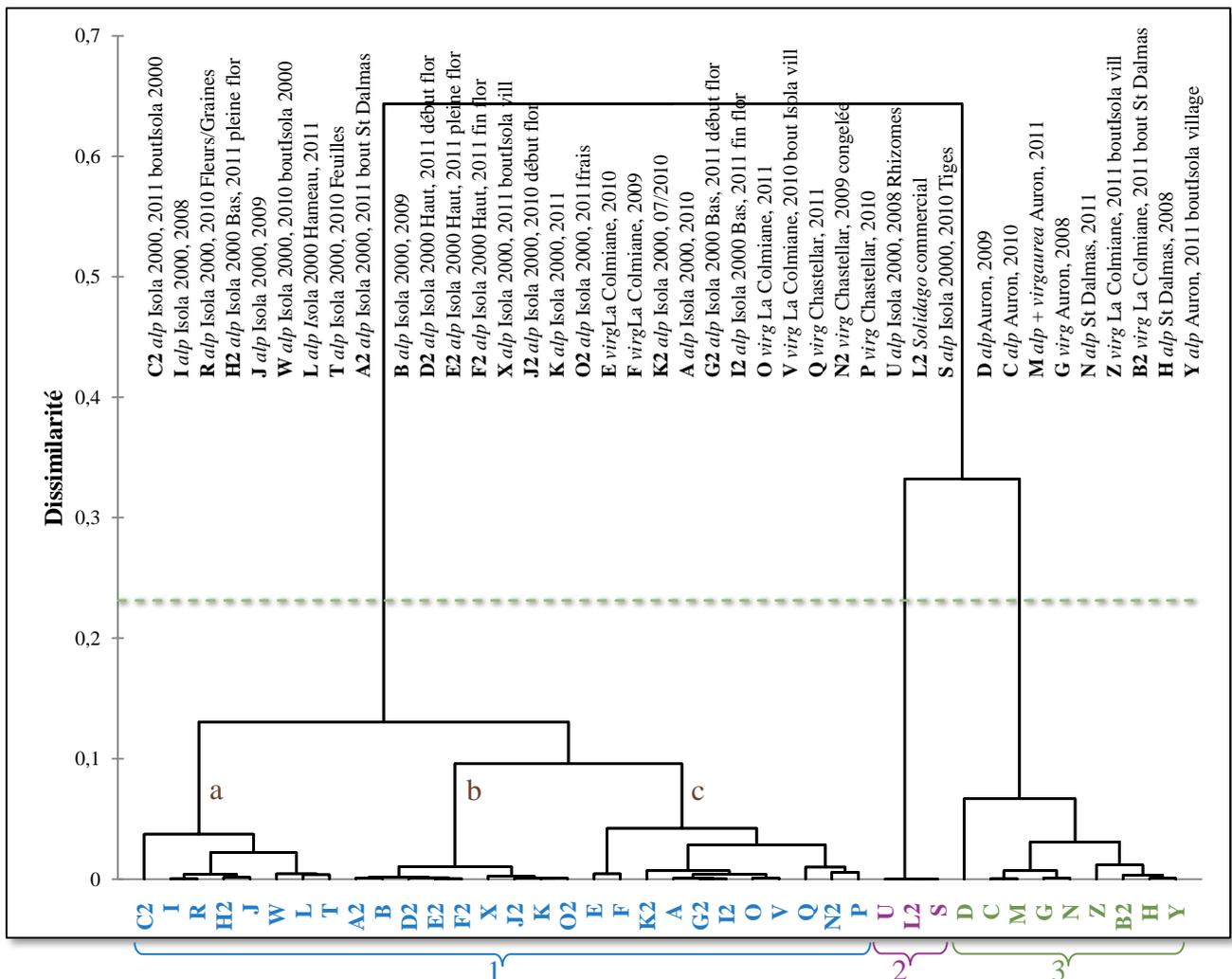


FIGURE 84 - DENDROGRAMME RESULTANT DE LA CAH APPLIQUEE A LA MATRICE INITIALE

Le niveau de partitionnement le plus significatif a été calculé à 0,23, ce qui permet de définir trois classes.

La première classe est la classe principale, elle contient 28 échantillons. Elle est principalement composée de populations d'*alpestris* d'Isola 2000, de *virgaurea* de La Colmiane et de *virgaurea* de Chastellar. Elle peut cependant être divisée en 3 sous-classes (1a, 1b et 1c) si le niveau de partitionnement est abaissé à 0,08. Les sous-classes 1a et 1b sont uniquement composées de populations d'*alpestris* d'Isola 2000 tandis que la sous-classe 1c est principalement constituée de populations de *virgaurea* de La Colmiane et de *virgaurea* de Chastellar.

La seconde classe contient seulement 3 échantillons, les tiges, les rhizomes et l'échantillon commercial.

Enfin la troisième classe est constituée de 9 échantillons, principalement des populations d'*alpestris* de St Dalmas et des populations d'*alpestris* et *virgaurea* d'Auron.

La CAH permet d'obtenir des informations sur les différences éventuelles existantes entre les échantillons, cependant elle n'explique pas pourquoi les échantillons sont différents. Il n'est donc pas possible d'identifier les classes les plus riches en saponines actives par exemple. Afin d'approfondir l'étude de la matrice et d'expliquer les observations obtenues avec la CAH, un second traitement statistique a été utilisé, l'analyse en composante principale.

II.9.2.2. ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES (ACP)

L'analyse en composantes principales (ACP) est une méthode descriptive multidimensionnelle. C'est le second traitement statistique appliqué. L'objectif est de réduire le nombre de variables en perdant le moins d'informations possible. Pour cela, les données sont projetées dans un espace de dimension plus faible que celui de la matrice initiale. Les variables à faible variance, c'est-à-dire celles qui apportent le moins d'informations sont tout d'abord éliminées, tandis que les variables à forte variance sont conservées. Les nouvelles variables appelées composantes principales ou facteurs sont une combinaison linéaire de variables originales, elles sont orthogonales entre elles et sont classées en fonction du pourcentage de variance qu'elles expliquent. L'ACP permet entre autre de visualiser la répartition des objets et des variables dans le nouvel espace formé par les composantes principales. Les deux graphiques obtenus à l'aide du logiciel XLStat permettent de déterminer la corrélation entre les échantillons et les variables (les saponines). La Figure 85 représente les graphiques des objets et des variables obtenus par ACP sur la matrice d'origine selon les deux premières composantes principales qui expliquent 93,42 % de la variance totale.

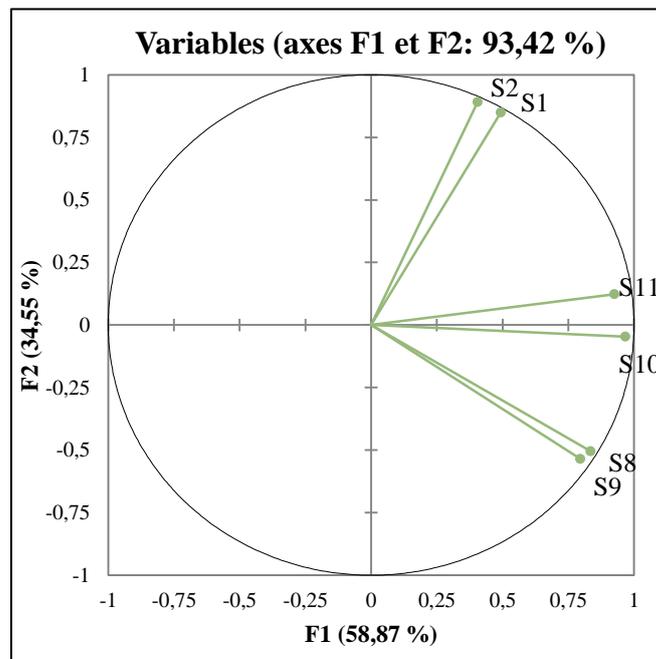
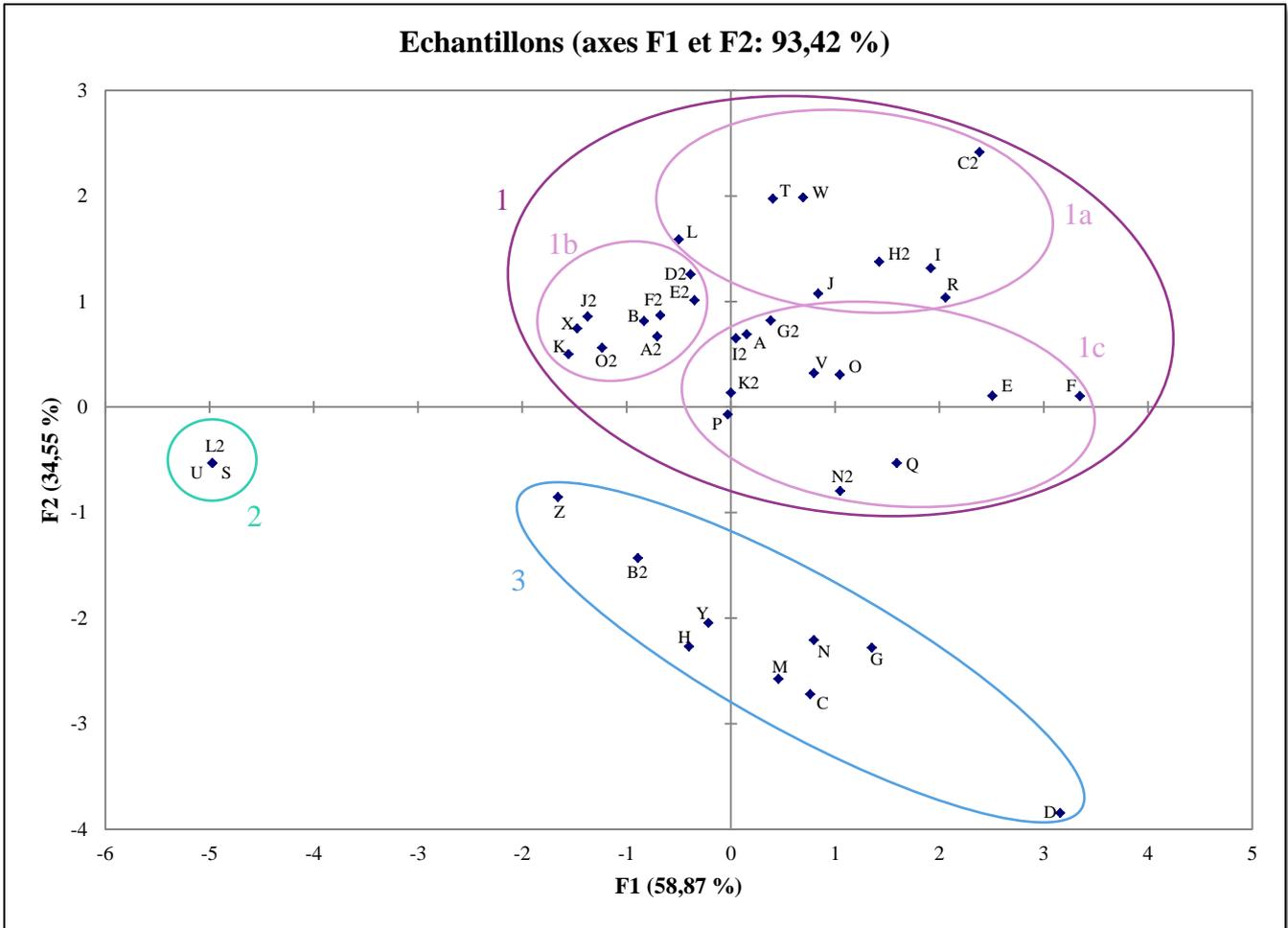


FIGURE 85 - REPRESENTATION GRAPHIQUE RESULTANT DE L'ACP APPLIQUEE A LA MATRICE INITIALE

Les trois classes principales ainsi que les trois sous-classes obtenues précédemment par CAH ont été identifiées sur la Figure 85. Elles sont toutes parfaitement bien séparées sur le graphique des échantillons, les deux traitements sont donc en accord l'un avec l'autre.

En comparant le graphique des échantillons et celui des variables, il est possible d'expliquer les différences existantes entre ces différentes classes. En effet, plus un échantillon corrèle avec une variable, plus ils vont être proches dans une même zone du graphique. A l'inverse plus un échantillon est loin d'une variable, moins ils sont corrélés. Ici les six variables correspondent aux six saponines dosées. Un échantillon contenant en majorité la saponine *S1* par exemple, sera situé dans la même zone du graphique que la variable *S1*.

La première classe contient 28 échantillons. Elle est principalement composée de populations d'*alpestris* d'Isola 2000, de *virgaurea* de La Colmiane et de *virgaurea* de Chastellar. Elle est divisée en 3 sous-classes (1a, 1b et 1c). D'après la Figure 85, la première classe se situe entre -2 et 4 sur la première composante (F1) et entre -1 et 3 sur la seconde composante (F2). C'est ainsi la classe qui corrèle le plus avec *S1* et *S2*. Elle corrèle également avec *S5* et *S6* et assez peu avec *S3* et *S4*.

Au sein de cette classe, la sous-classe 1a corrèle encore plus fortement avec *S1* et *S2*, elle possède donc une proportion en ces deux saponines plus importante. La sous-classe 1b se situe dans des valeurs négatives sur la première composante (F1), elle possède donc une proportion assez faible en chacune des saponines, même si elle est principalement caractérisée par *S1* et *S2*. Enfin la sous-classe 1c corrèle plus fortement avec *S5* et *S6*, elle possède donc une proportion en ces deux saponines plus importante.

La seconde classe est composée de trois populations, les tiges et les rhizomes d'*alpestris* ainsi que l'échantillon commercial de *S. virgaurea*. D'après la Figure 85, elle se trouve à l'opposé de toutes les variables (valeurs fortement négatives sur les deux composantes), elle ne corrèle donc avec aucune de ces variables. Ces trois populations ne possèdent donc pas ou très peu des 6 saponines dosées.

Enfin la troisième classe est constituée de 9 échantillons, principalement des populations d'*alpestris* de St Dalmas et des populations d'*alpestris* et *virgaurea* d'Auron. D'après la Figure 85, elle se situe entre -2 et 3 sur la première composante (F1) et dans des valeurs négatives sur la seconde composante (F2). C'est ainsi la classe qui corrèle le plus avec *S3* et *S4*. Elle corrèle également faiblement avec *S5* et *S6*, en revanche elle ne corrèle pas ou très peu avec *S1* et *S2*. Les populations appartenant à la classe trois possèdent donc en majorité *S3* et *S4* mais ne possèdent pas ou très peu de *S1* et *S2*. Au sein de cette classe l'échantillon D se détache des autres populations. Il corrèle encore plus fortement avec *S3* et *S4*, il possède donc

globalement le même profil que les autres populations de la classe mais avec une proportion en S3 et S4 plus importante.

Ce traitement statistique a permis de dégager certaines tendances. Les populations d'*alpestris* d'Isola 2000, de *virgaurea* de La Colmiane et de *virgaurea* de Chastellar seraient caractérisées principalement par S1 et S2, les populations d'*alpestris* de St Dalmas et les populations d'*alpestris* et *virgaurea* d'Auron seraient principalement caractérisées par S3 et S4 et enfin les tiges et les rhizomes d'*alpestris* ainsi que l'échantillon commercial de *S. virgaurea* ne possèderaient aucune des 6 saponines.

Ces tendances doivent cependant être confirmées par une analyse détaillée du Tableau 23. Une comparaison de certaines populations selon différents critères (sous-espèce, lieu, année, période de récolte...) doit donc être réalisée.

II.9.2.3. LOCALISATION DES ACTIFS AU SEIN DE LA PLANTE

L'étude précédente sur la localisation des actifs totaux dans la plante a mis en évidence une répartition non homogène des saponines totales dans la plante. Seules les feuilles et les fleurs/graines contiennent des saponines. Cependant il est possible que les saponines ne soient pas toutes réparties de la même manière selon l'organe considéré.

La Figure 86 indique ainsi le pourcentage de chaque saponine (par rapport à la masse de matière sèche) dans les fleurs/graines, les tiges, les feuilles et les rhizomes d'*alpestris* d'Isola 2000.

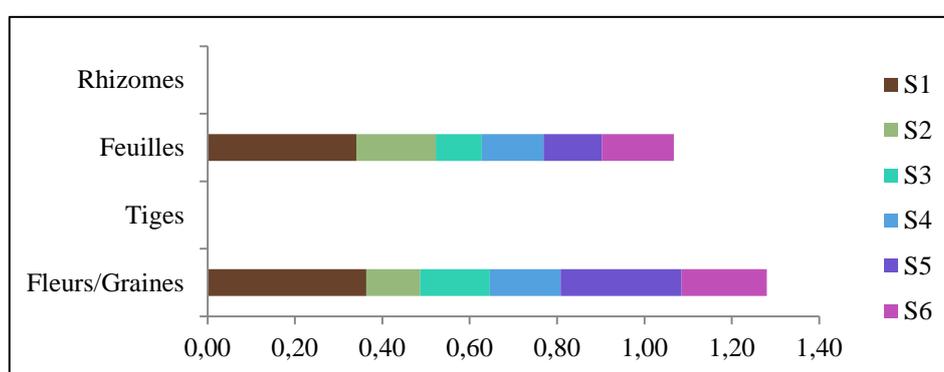


FIGURE 86 - COMPARAISON DES PROFILS SELON LA PARTIE DE LA PLANTE CIBLEE

CAS D'*ALPESTRIS* PROVENANT D'ISOLA 2000

D'après la Figure 86, les six saponines sont présentes aussi bien dans les feuilles que dans les fleurs/graines, ce qui confirme les résultats de l'ACP (Figure 85) qui avait rassemblé ces deux populations dans la classe 1 et dans la même sous-classe 1a. Il est à noter que les feuilles contiennent légèrement plus de S2 par rapport aux fleurs, et à l'inverse moins des autres saponines, en particulier de S5.

Cependant les saponines S2 et S5 étant toutes les deux des saponines actives, les parties aériennes pourront être utilisées entières sans préférence particulière pour les feuilles ou les fleurs/graines.

II.9.2.4. INFLUENCE DE LA PERIODE DE RECOLTE

L'étude des saponines totales a montré qu'elles sont présentes en assez grande quantité dès la formation de la hampe florale. Cette teneur augmente de manière significative avec le développement des fleurs et diminue en fin de floraison lorsque les fleurs fanent. Par ailleurs, en plus de ces différences quantitatives, des différences de profil pourraient être observées selon la période de récolte.

La Figure 87 présente ainsi l'étude réalisée en 2011 sur la sous-espèce *alpestris* provenant d'Isola 2000. Deux zones de récolte (2150 m et 2250 m) et trois stades de développement ont été choisis, en début de floraison lorsque la hampe florale est juste formée et les fleurs en bouton, en pleine floraison lorsque la hampe florale est bien développée et les fleurs ouvertes, et en fin de floraison lorsque les fleurs fanent et les graines apparaissent.

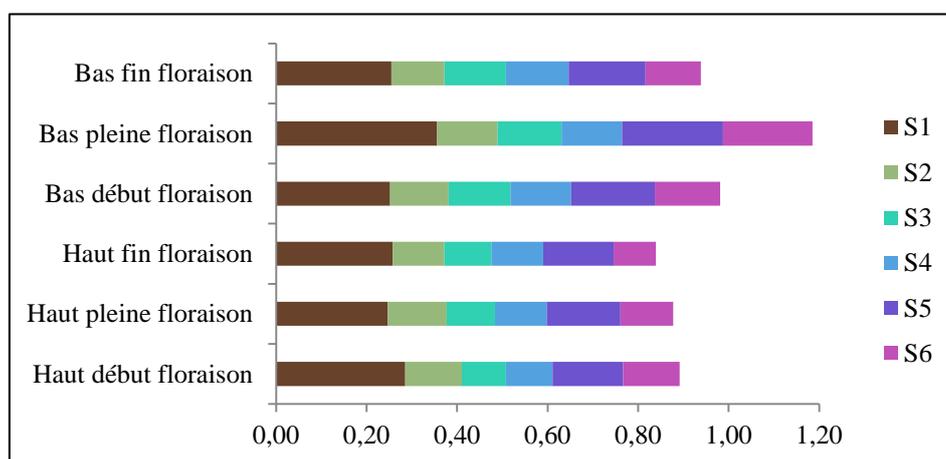


FIGURE 87 - COMPARAISON DES PROFILS SELON LA PERIODE DE RECOLTE

CAS D'*ALPESTRIS* PROVENANT D'ISOLA 2000 (ZONE HAUTE ET ZONE BASSE) RECOLTEE EN 2011

D'après la Figure 87, les échantillons provenant de la zone basse se comportent légèrement différemment des échantillons provenant de la zone haute. Ils sont ainsi dans des sous-classes différentes des échantillons de la zone haute en ACP (Figure 85). Cependant ces différences ne sont probablement pas représentatives, ils sont tous regroupés dans la classe 1, le profil en saponines reste donc relativement homogène pendant le développement de la plante.

La période de récolte la plus adaptée reste ainsi la pleine floraison, avec une concentration en saponines et une masse végétale par pied plus élevées.

II.9.2.5. INFLUENCE DU MODE DE CONSERVATION

L'étude des saponines totales n'a pas montré d'influence du mode de conservation sur la quantité globale de saponines. Cependant le profil en saponines pourrait être modifié selon le mode de conservation de la plante.

La Figure 88 présente ainsi les taux de chacune des six saponines obtenus selon le mode de conservation choisi (séchage, congélation ou état frais).

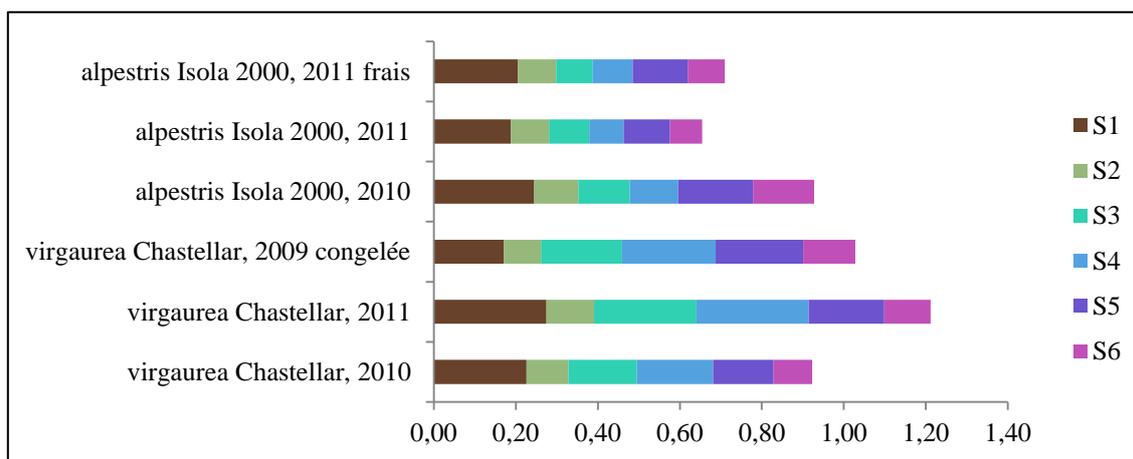


FIGURE 88 - COMPARAISON DES PROFILS SELON LE MODE CONSERVATION

D'après la Figure 88, le mode de conservation n'a pas de réelle influence sur le profil en saponines, ce qui confirme les résultats de l'ACP (Figure 85). En effet l'échantillon d'*alpestris* d'Isola 2000 extrait frais en 2011 et celui conservé à l'état sec avant extraction sont regroupés dans la même sous-classe 1b. De même, l'échantillon de *virgaurea* de Chastellar conservé congelé et ceux conservés à l'état sec sont regroupés dans la sous-classe 1c.

Toutes les saponines majoritaires restant stables après séchage, le séchage naturel de la plante reste le mode de conservation le plus adapté dans ce cas.

II.9.2.6. VARIABILITE SELON LA SOUS-ESPECE ET SA LOCALISATION GEOGRAPHIQUE

L'étude des saponines totales a montré que le type de sous-espèce et la localisation géographique avaient peu d'influence sur la quantité de saponine totales présentes dans la plante, en particulier par rapport à la variation annuelle. En revanche, il est possible que les profils en saponines soient différents d'une sous-espèce à l'autre. De plus, ces deux sous-espèces étant récoltées dans différents lieux (différentes altitudes), la variation éventuelle selon la localité géographique doit également être prise en compte.

La Figure 89 indique ainsi le pourcentage de chaque saponine, pour *virgaurea* récoltée à Chastellar, à Auron et La Colmiane, et pour *alpestris* récoltée à St Dalmas, Auron et Isola 2000.

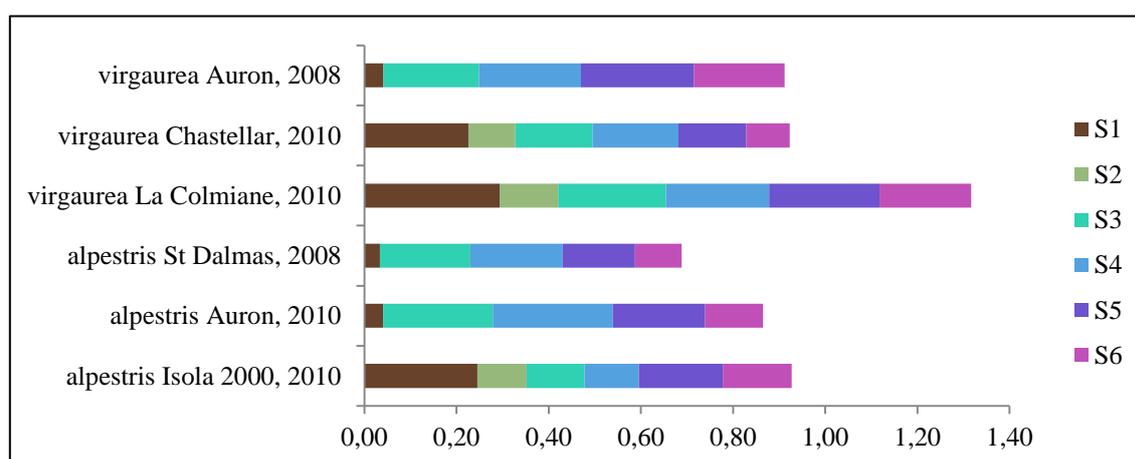


FIGURE 89 - COMPARAISON DES PROFILS SELON LA SOUS-ESPECE ET SA LOCALISATION GEOGRAPHIQUE

D'après la Figure 89, les populations d'*alpestris* provenant de St Dalmas et les populations d'*alpestris* et de *virgaurea* provenant d'Auron possèdent le même type de profil. De même, les populations d'*alpestris* provenant d'Isola 2000 et les populations de *virgaurea* provenant de Chastellar et de La Colmiane possèdent un profil commun, différent du premier. La sous-espèce n'a donc pas d'influence sur le profil en saponines.

En revanche, la localisation géographique semble être un facteur de variation important. En effet, deux zones géographiques apparaissent à la lumière de ces résultats. Une région à l'ouest de la Tinée, englobant St Dalmas et Auron, ainsi qu'une région à l'est de la Tinée, englobant Isola 2000, Chastellar et La Colmiane. Les populations de l'est possèdent le profil de référence observé jusqu'à maintenant chez *alpestris* d'Isola 2000, avec une majorité de S1

et la présence des 5 autres saponines dans des proportions relativement homogènes, alors que les populations de l'ouest arborent un profil différent, composé de très peu de S1 et S2 (quantités souvent inférieures à la limite de détection) mais davantage de S3 et S4.

Ces résultats confirment ceux obtenus par ACP (Figure 85) qui identifie deux grandes classes distinctes (1 et 3). L'une caractérisée principalement par S1 et S2 et composée uniquement de populations provenant d'Isola 2000, Chastellar et La Colmiane, l'autre caractérisée principalement par S3 et S4 et composée presque exclusivement de populations d'Auron et de St Dalmas.

Cette différence de profil peut s'expliquer soit par des altitudes différentes, soit par des types de terrains différents. D'après les informations géographiques disponibles (II.3 p. 133), l'altitude n'a pas d'influence dans ce cas puisque La Colmiane se trouve à la même altitude que St Dalmas, Auron pratiquement à la même altitude que Chastellar, et Isola 2000 à une altitude bien plus importante que toutes les autres stations de récoltes.

En revanche, la Figure 90 indique que les terrains sont très différents entre l'est et l'ouest de la Tinée. En effet, les zones de récolte d'Auron et de St Dalmas sont situées sur des « Terres noires », formations marno-calcaires du Jurassique supérieur¹⁶⁸ (en bleu), générant un sol plutôt argileux, tandis que les zones de récoltes d'Isola 2000, Chastellar et La Colmiane sont situées sur l'ancien socle cristallin de la chaîne Hercynienne, constitué de granite et de roches métamorphiques comme le gneiss et le micaschiste (en rouge à croix blanches), générant un sol plutôt siliceux presque sableux.

Cette différence de sol permettrait d'expliquer l'inégalité de profil existant entre les populations. Cette donnée est importante pour la future mise en culture de la plante. En effet, S1 et S2 étant les plus actives parmi les six saponines majoritaires sélectionnées, il serait préférable de choisir les populations contenant en majorité ces deux saponines. Les zones de culture devront donc être situées de préférence sur le socle cristallin ancien.

Il reste cependant à vérifier plusieurs points comme l'homogénéité des profils d'une année sur l'autre et le comportement des boutures réalisées, en particulier à plus basse altitude (<1000 m).

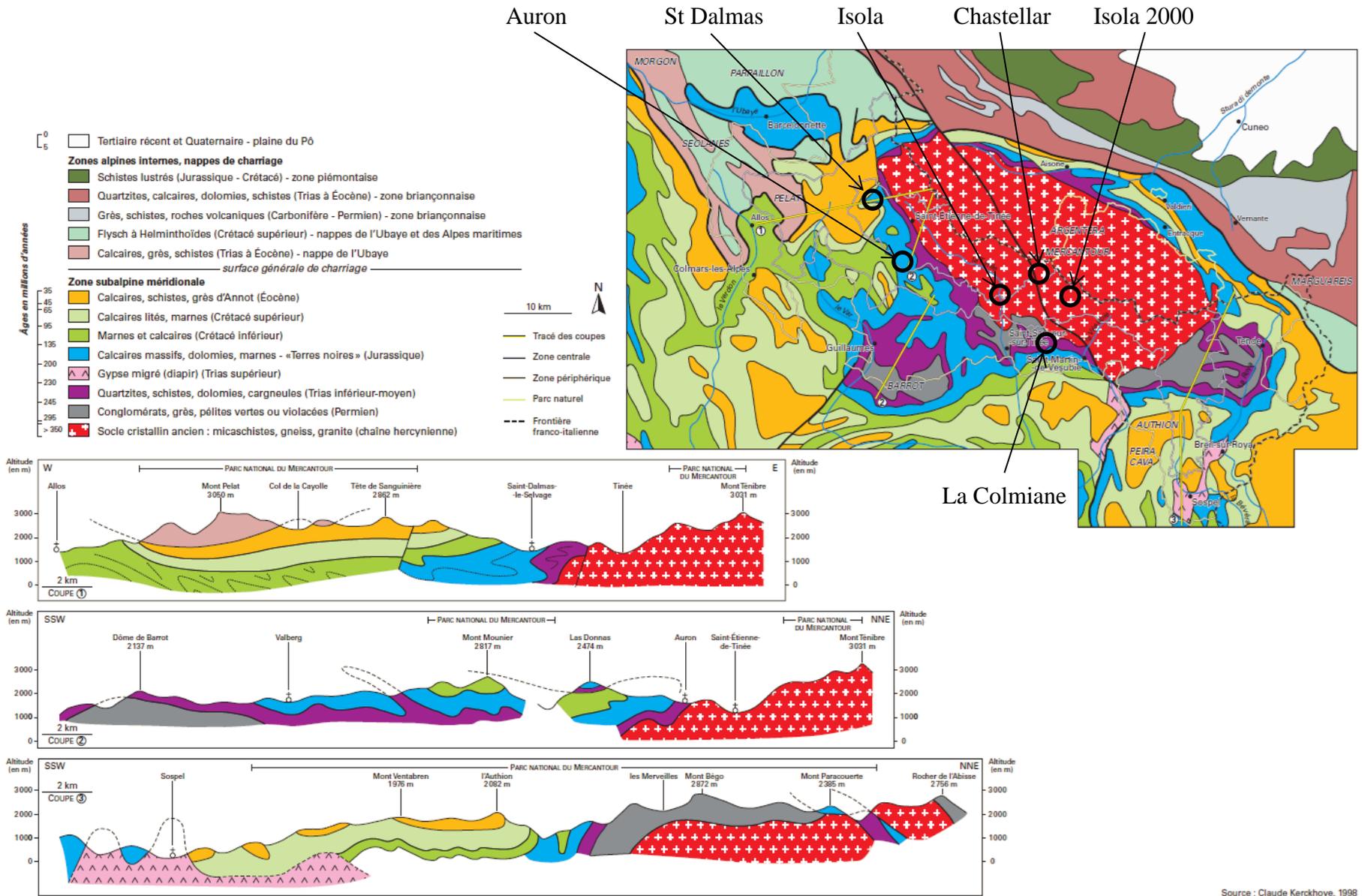


FIGURE 90 - GEOLOGIE DU MASSIF DU MERCANTOUR¹⁶⁹

Source : Claude Kerckhove, 1998

II.9.2.7. INFLUENCE DE L'ANNEE DE RECOLTE

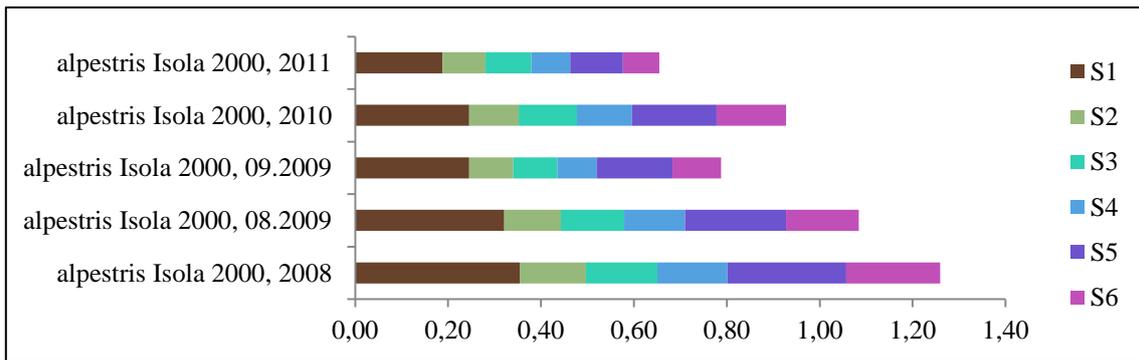
L'étude des saponines totales a montré que le taux de saponines variait fortement d'une année sur l'autre et ceci pour toutes les zones de récolte d'*alpestris* et de *virgaurea*. Par ailleurs, le profil en saponines pourrait également varier d'une année sur l'autre. Il doit donc être comparé sur plusieurs années (selon les populations disponibles).

La Figure 91a indique ainsi le taux de saponines d'*alpestris* d'Isola 2000 de 2008 à 2011. La Figure 91b expose le taux de saponines de *virgaurea* de Chastellar et La Colmiane de 2009 à 2011. Enfin la Figure 91c présente le taux de saponines d'*alpestris* et de *virgaurea* d'Auron et St Dalmas de 2008 à 2011.

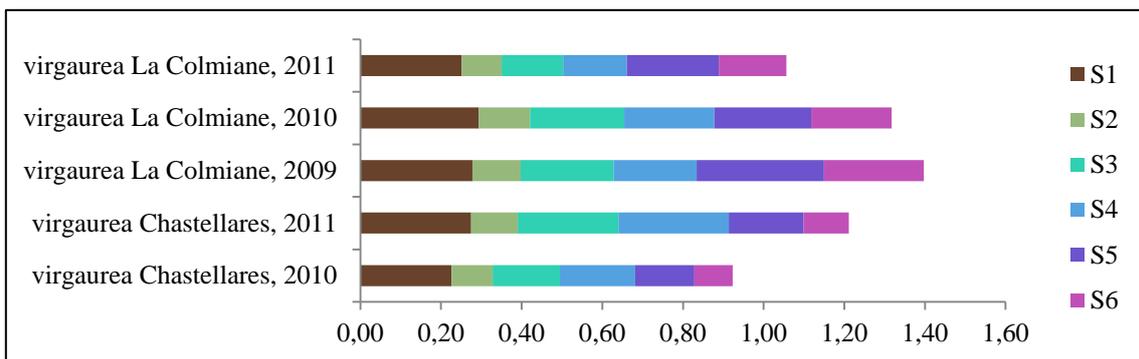
D'après la Figure 91, il est clair que le profil en saponines ne varie pas ou très peu d'une année sur l'autre. Seules les proportions totales changent comme observé en II.5.5 p. 145.

Dans le cas d'*alpestris* d'Isola 2000 et de *virgaurea* de La Colmiane et de Chastellar, S1 reste toujours majoritaire et les six saponines sont toutes présentes. A l'inverse dans le cas d'*alpestris* et *virgaurea* d'Auron et de St Dalmas, S1 est en faible quantité et S2 est présente uniquement à l'état de trace et ceci pour chaque année testée.

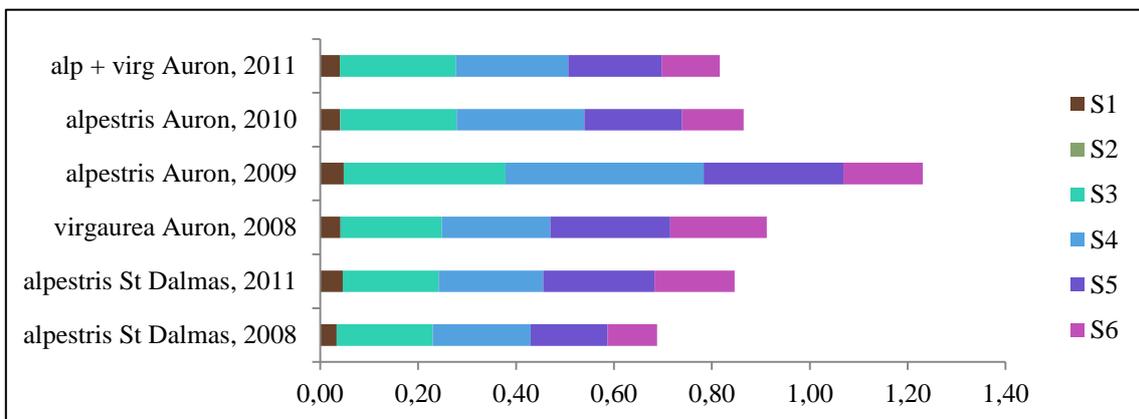
Le profil en saponines est donc bien caractéristique de la zone de récolte et ne varie pas en fonction des conditions climatiques, il pourra donc être contrôlé plus facilement lors de la culture.



a - Cas d'*alpestris* d'Isola 2000



b - Cas de *virgaurea* de Chastellar et La Colmiane



c - Cas d'*alpestris* et de *virgaurea* d'Auron et St Dalmas

FIGURE 91 - COMPARAISON DES PROFILS SELON L'ANNEE DE RECOLTE

II.9.2.8. COMPARAISON AVEC UN ECHANTILLON COMMERCIAL

L'étude des saponines totales a montré un taux relativement important de saponines dans l'échantillon acheté dans le commerce. Cependant, le profil HPLC est très différent de ceux des échantillons « sauvages » (Figure 92 et Figure 93). Les saponines sont en plus grande quantité dans l'échantillon commercial mais ne sont pas les mêmes que dans les échantillons sauvages. Aucune des six saponines majoritaires n'a été retrouvée dans l'échantillon commercial, ce qui confirme les résultats de l'ACP (Figure 85).

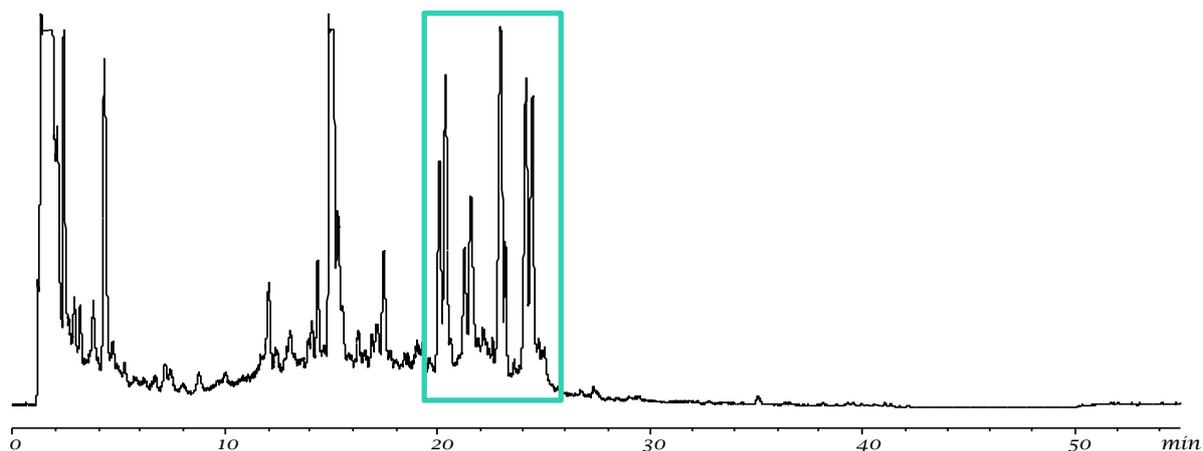


FIGURE 92 - CHROMATOGRAMME HPLC-ELSD DE L'EXTRAIT BRUT DE L'ECHANTILLON COMMERCIAL

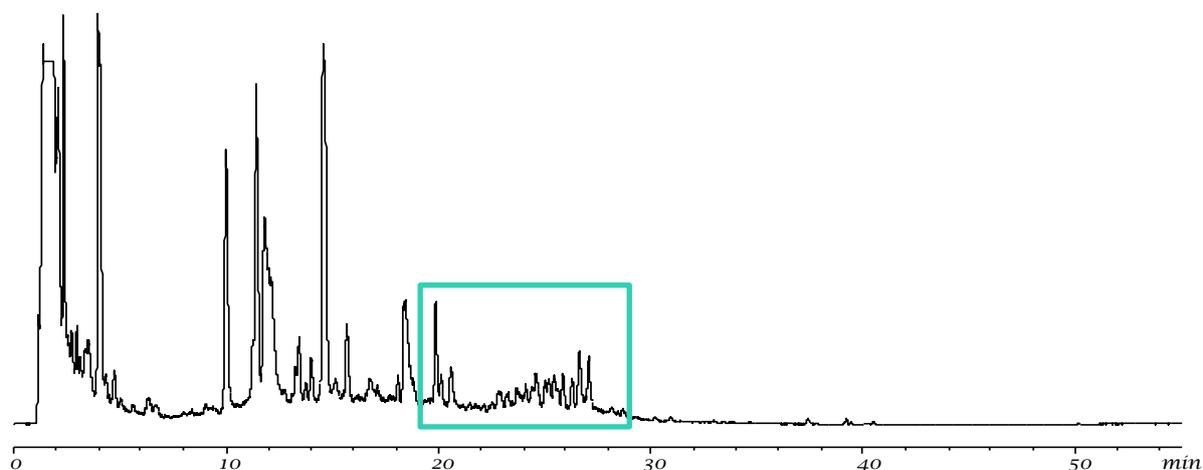


FIGURE 93 - CHROMATOGRAMME HPLC-ELSD DE L'EXTRAIT BRUT D'ALPESTRIS D'ISOLA 2000 (2010)

Afin de vérifier rapidement l'identité de ces saponines, l'échantillon a été analysé par HPLC-MS. Les pertes des sucres sont facilement observées grâce à la fragilité des liaisons O-glycosidiques, jusqu'à obtenir la masse moléculaire de l'aglycone. L'acide polygalactique, aglycone caractéristique des saponines de *S. virgaurea*, possède une masse de 504.⁴⁷ Dans le cas de l'échantillon commercial, l'aglycone possède une masse de 488 ce qui pourrait correspondre, entre autre, à la bayogénine, aglycone caractéristique chez *S. gigantea* et *S. canadensis*.^{85,86}

Il est donc possible que cet échantillon, vendu broyé sous le nom de *S. virgaurea* en herboristerie, soit en réalité du *S. canadensis* ou du *S. gigantea*. En effet, ces espèces voisines étant plus grandes et plus productives, il peut arriver, pour des raisons économiques, que *S. virgaurea*, la véritable Verge d'Or, soit adultérée ou même substituée par ces dernières. Cependant, les saponines contenues dans ces espèces étant différentes, il est possible que leurs activités biologiques soient différentes.

Ces résultats mettent en évidence l'importance de la traçabilité des matières premières. Ainsi, la mise en place d'une filière avec une culture dans les Alpes-Maritimes et un contrôle soigné des échantillons permettrait l'obtention de matières premières de qualité. Cette famille de saponines pourrait ainsi être choisie comme marqueur de qualité de *S. virgaurea*.

Dans l'objectif de cultiver *S. virgaurea* dans les Alpes-Maritimes, des cultures expérimentales ont été mises en place à différentes altitudes et sur différents terrains et le comportement des plantes bouturées a été analysé.

II.9.2.9. ETUDE D'ACCLIMATATION

Dans le but de procéder à une mise en culture de *S. virgaurea*, des essais de bouturage ont été réalisés en 2009 par Biophyto sur trois parcelles expérimentales (Isola 2000, St Dalmas et Isola village), comme expliqué en II.5 p. 139. La première récolte a pu être effectuée en 2010, mais seules *alpestris* d'Isola 2000 (bouturée à Isola 2000) et *virgaurea* de La Colmiane (bouturée à Isola village) ont fleuri cette année-là. Une deuxième récolte, cette fois-ci de tous les échantillons, a été réalisée en 2011.

L'étude des saponines totales sur ces boutures a montré que les taux de saponines en 2010 ont peu évolué. En revanche, en 2011, le taux de saponines d'*alpestris* d'Isola 2000 bouturée dans la même zone a fortement augmenté et les boutures de St Dalmas et de la pépinière ont fourni un taux relativement bas de saponines. Par ailleurs, les profils en saponines ont pu évoluer en fonction des changements de sol et d'altitude. La Figure 94 montre ainsi les profils en saponines des différentes boutures récoltées en 2010 et en 2011.

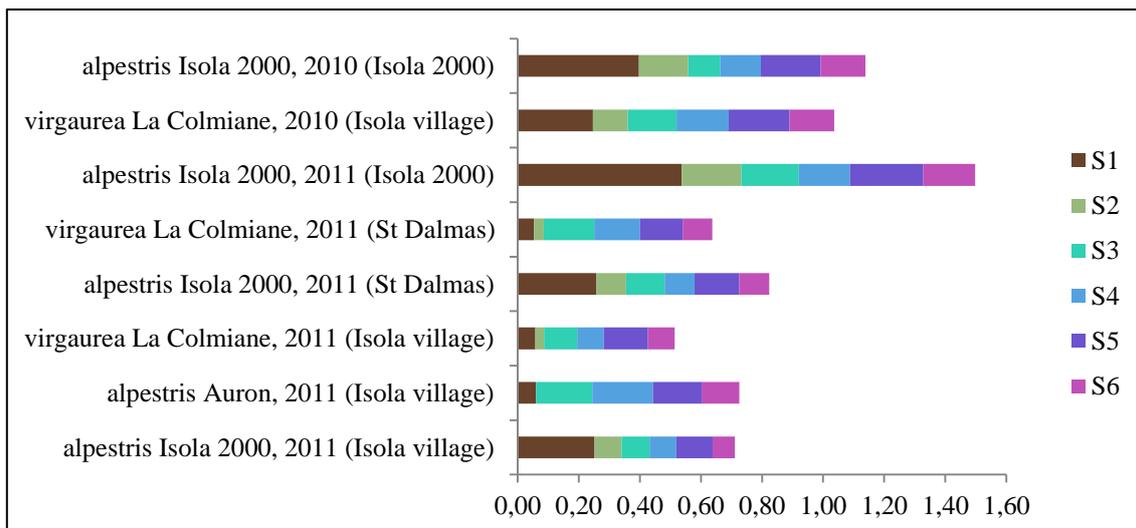


FIGURE 94 - COMPARAISON DES PROFILS SELON LE LIEU DE PRELEVEMENT DE LA BOUTURE ET LE LIEU DE BOUTURAGE

La sous-espèce *alpestris* d'Isola 2000 a été bouturée dans une parcelle expérimentale mise en place dans la même zone, dans le but d'observer l'influence du bouturage sur l'évolution du profil en saponines sans changer les conditions environnementales. Elle a également été bouturée à St Dalmas dans le but d'observer l'influence du changement de sol, et à la pépinière d'Isola village (875 m) pour étudier l'influence d'un changement important d'altitude. Le même travail a été en partie effectué pour *alpestris* d'Auron et pour *virgaurea* de La Colmiane (étude du changement d'altitude et de sol).

En 2010, seules les boutures d'*alpestris* d'Isola 2000 et de *virgaurea* de La Colmiane ont fourni suffisamment de quantité de matière pour réaliser l'étude. La Figure 94 montre qu'elles ont conservé le profil des populations sauvages correspondantes.

En 2011, tous les échantillons ont pu être récoltés. La sous-espèce *alpestris* d'Isola 2000 bouturée dans la même zone possède une forte quantité de S1, bien plus importante que les autres populations, ce qui peut expliquer en partie le taux important de saponines totales détecté dans l'étude précédente. Ces résultats confirment ceux de l'ACP (Figure 85), en effet d'après le graphique, cet échantillon est celui qui corrèle le plus avec la variable S1. La saponine S1 étant l'une des plus actives, cette parcelle expérimentale devra être développée si cette évolution se confirme en 2012.

Les profils en saponines des populations d'*alpestris* d'Auron et d'Isola 2000 bouturée à la pépinière et bouturée à St Dalmas n'ont pas été modifiés par le changement de sol ou le changement d'altitude, malgré le faible taux de saponines totales. Ce comportement sera à confirmer avec la récolte de 2012.

En revanche les profils des populations de *virgaurea* de La Colmiane bouturées à la pépinière et à St Dalmas sont très différents de ceux des populations sauvages de La Colmiane. La quantité de S1 et S2 a fortement diminué dans les deux cas. De ce fait, les profils se rapprochent fortement de ceux des populations sauvages d'Auron et St Dalmas. Ces résultats confirment ceux obtenus par ACP (Figure 85) qui regroupe ces deux populations avec tous les échantillons d'Auron et de St Dalmas. Les boutures de *virgaurea* auraient donc été influencées par le changement de sol et/ou le changement d'altitude. Ce comportement sera à confirmer avec la récolte de 2012.

Les modifications des populations de *virgaurea* n'ayant pas été instantanées (profils inchangés en 2010) il est possible que les populations d'*alpestris* soient également modifiées dans l'avenir. Les récoltes de 2012 permettront donc certainement d'apporter plus de réponses quant au comportement de *S. virgaurea* quant à la biosynthèse des saponines.

II.9.2.10. COMPARAISON DES ACTIVITES BIOLOGIQUES

Les extraits bruts des principales populations ont été testés pour leur activité inhibitrice de la conversion levure-hyphes de *C. albicans* (Tableau 24).

TABLEAU 24 - ACTIVITE INHIBITRICE DE DIFFERENTS EXTRAITS BRUTS SUR *C. ALBICANS* A 4 H

Populations (33 mg/ml)	% d'inhibition	Taux de saponines (%)
Témoin négatif	0 -	0
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010	-83,6 ± 6,5 ++	2,69 ± 0,13
<i>alpestris</i> Auron, 2010	-84,4 ± 6,4 ++	2,92 ± 0,08
<i>virgaurea</i> La Colmiane, 2010	-73,5 ± 11,3 ++	3,76 ± 0,39
<i>alpestris</i> St Dalmas, 2011	-76,3 ± 10,3 ++	2,83 ± 0,27
<i>virgaurea</i> Chastellar, 2010	-80,3 ± 9,6 ++	2,60 ± 0,09
<i>alpestris</i> Isola 2000, tiges	-6,5 ± 38,7 -	0
<i>alpestris</i> Isola 2000, rhizomes	-38,9 ± 19,7 +	0
<i>S. virgaurea</i> commercial	-58,8 ± 29,6 +	3,91 ± 0,48

D'après le Tableau 24, l'extrait de tige ne comportant pas de saponines n'est effectivement pas actif. En revanche, l'extrait de rhizomes possède une légère activité, des saponines sont peut-être présentes mais co-éluées avec d'autres composés, ou d'autres composés présents dans les rhizomes possèdent peut-être le même type d'activité. Cependant, les rhizomes permettant à la plante de se redévelopper chaque printemps, il n'y a pas d'intérêt à les récolter avec les parties aériennes.

En ce qui concerne les différents extraits de *virgaurea* et d'*alpestris* provenant de différentes zones de récolte, peu de différences significatives d'activité ont été observées. Ils possèdent tous une forte activité à la concentration testée. Les écart-types étant relativement importants, à cause de la variation du comportement de *C. albicans*, il est difficile de pouvoir corrélérer les tests d'activité avec les résultats de dosage.

Cependant, le fait que tous les extraits possèdent une forte activité quelle que soit la zone de récolte permet d'étendre la zone de culture et évite de la restreindre au socle cristallin.

II.9.2.11. ETUDE DE GENETIQUE DES POPULATIONS

L'étude de la variabilité chimique de *S. virgaurea* a permis de mettre en évidence des différences entre les populations, aussi bien quantitatives que qualitatives au niveau de la composition en saponines, selon différents paramètres environnementaux. En revanche aucune différence n'est apparue entre la sous-espèce *alpestris* et la sous-espèce *virgaurea*. Il n'est donc pas possible, d'un point de vue chimiotaxonomique, de conclure sur l'existence de deux sous-espèces distinctes, mais plutôt sur l'apparition de différents chimiotypes en fonction des conditions environnementales.

Une étude de génétique des populations a ainsi été réalisée par l'INRA de Montpellier dans le but de comprendre les relations existant entre les différentes populations de *S. virgaurea*.

Pour mettre en place cette étude, six populations ont été sélectionnées, cinq d'entre elles correspondent aux populations étudiées (Tableau 25) et la sixième a été récoltée à une altitude plus basse et dans une zone relativement éloignée, dans le but de comparer les populations d'altitudes à une population extérieure à l'étude.

TABLEAU 25 - POPULATIONS SELECTIONNEES POUR L'ETUDE DE GENETIQUE DES POPULATIONS

Population	Taxon	Altitude (m)	Nb d'Individus
Bouyon	<i>virgaurea</i>	650	14
La Colmiane	<i>virgaurea</i>	1500	17
Auron	<i>virgaurea & alpestris</i>	1600	17
Chastellar	<i>virgaurea & alpestris</i>	1650	17
Isola 2000 (Zone 1)	<i>alpestris</i>	2000	17
Isola 2000 (Zone 2)	<i>alpestris</i>	2150	16

Pour chaque population, une quinzaine d'individus a été récoltée afin d'évaluer la variation intra-population.

L'ensemble des résultats des 98 échantillons a été soumis à un traitement statistique dans le but d'améliorer la visibilité et la compréhension des résultats. La Figure 95 représente le graphique obtenu par ACP sur la matrice d'origine selon les deux premières composantes principales qui expliquent 46,75 % de la variance totale.

D'après ce graphique, aucune classe ne peut être mise en évidence. Les échantillons sont répartis de manière relativement homogène. Les différentes populations et en particulier les deux sous-espèces ne peuvent donc pas être différenciées d'un point de vue génétique. Cependant ce graphique n'explique qu'une partie de la variance totale, ces résultats doivent donc être confirmés par d'autres traitements statistiques.

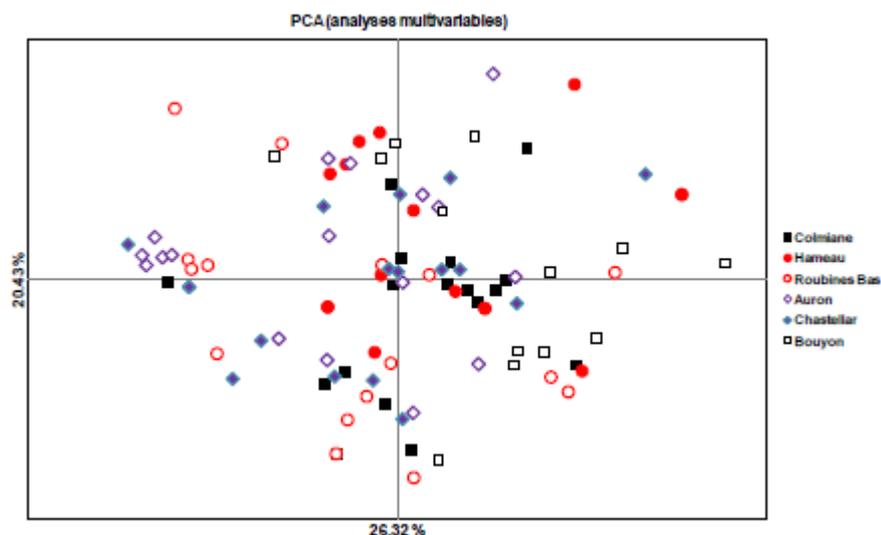


FIGURE 95 - REPRESENTATION GRAPHIQUE RESULTANT DE L'ACP APPLIQUEE AUX RESULTATS BRUTS

Pour compléter ces résultats, le Tableau 26 compare les populations entre elles et la Figure 96 schématise les distances existant entre les différentes populations.

TABLEAU 26 - COMPARAISON DES POPULATIONS UNE A UNE

	La Colmiane	Bouyon	Auron	Chastellar	Isola 2000 Zone 1
Bouyon	0,0509***				
Auron	0,0394**	0,0644***			
Chastellar	0,0246	0,0703***	0,0109		
Isola 2000 Zone 1	0,0285**	0,0523***	0,0537***	0,0271**	
Isola 2000 Zone 2	0,0234**	0,0601***	0,0232	0,0086	0,0456***

*Les valeurs moyennes sont significativement différentes

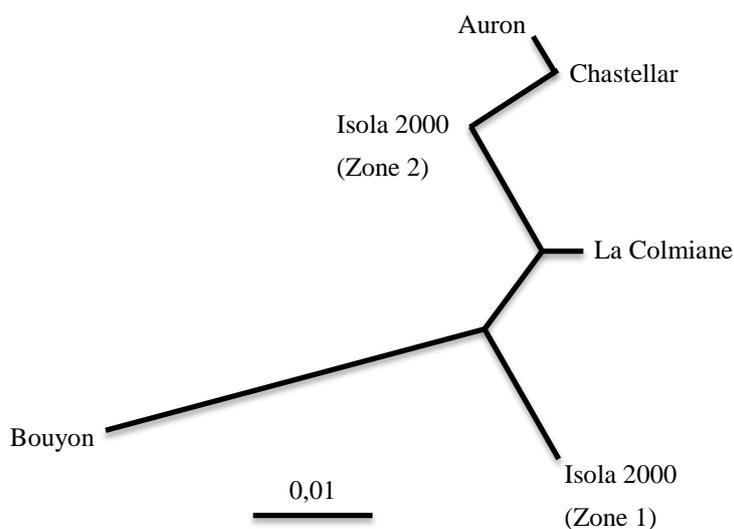


FIGURE 96 - REPRESENTATION DE LA VARIATION INTERGROUPE

D'après ces résultats, il est possible de différencier certaines populations de manière significative. La population Bouyon est par exemple la population la plus éloignée. Ces résultats sont en accord avec les zones de récoltes, Bouyon est en effet la zone de récolte à basse altitude, extérieure à la zone d'étude dans la vallée de la Tinée, il est donc normal qu'elle soit légèrement plus éloignée génétiquement des autres populations.

Cependant, les différences entre toutes les populations n'excèdent pas 7 %. Elles sont donc toutes très proches les unes des autres. De plus, les populations d'*alpestris* ne se différencient pas des populations de *virgaurea*.

Les différences phénotypiques existant entre *virgaurea* et *alpestris* sont donc probablement davantage dues à l'influence environnementale et non pas à des potentialités génétiques différentes (Figure 97). En effet les changements d'environnement peuvent fortement influencer le phénotype si les interactions sont importantes.

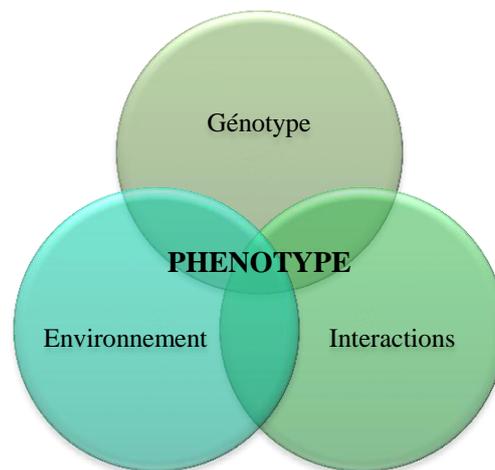


FIGURE 97 - RELATION LIANT LE PHENOTYPE AU GENOTYPE ET A L'ENVIRONNEMENT

Ces résultats devront être confirmés par une étude plus large, englobant plus d'échantillons, des zones de récoltes plus éloignées et davantage de marqueurs. Cependant cette étude a permis d'avoir une première idée sur les différences existant entre les populations de la vallée de la Tinée.

II.10. CONCLUSION

Dans le but de mettre en culture *S. virgaurea* dans les Alpes-Maritimes, une meilleure connaissance du comportement phytochimique de la plante était nécessaire.

Ainsi, une étude comparative centrée sur la famille des saponines a été réalisée sur plusieurs populations de la vallée de la Tinée. Les deux sous-espèces *virgaurea* et *alpestris* ont pu être comparées, ainsi que différentes zones/altitudes de récolte, différentes années de récolte, périodes de récolte dans une même année, différents modes de stockage et différentes parties de la plante. Les premiers essais de bouturage en culture expérimentale ont également été étudiés.

Afin de réaliser cette étude, une méthode de dosage des saponines totales par HPLC-ELSD a été développée et validée. La famille des saponines, isolée des autres composés par fractionnement, a été utilisée comme étalon. L'extraction et les conditions d'analyse ont été optimisées de façon à pouvoir doser rapidement les saponines, directement dans l'extrait brut, sans préparation d'échantillon supplémentaire qui prend davantage de temps et peut être source de variabilité.

Cette étude comparative a permis de mettre en évidence certains facteurs de variation. Le taux de saponines totales varie ainsi principalement en fonction de la partie de la plante considérée et en fonction de l'année de récolte (conditions climatiques). En revanche, les autres facteurs influencent apparemment peu le taux de saponines totales.

Une autre méthode de dosage a également été mise en place par HPTLC et les deux méthodes ont été comparées. L'HPLC est une technique précise et adaptée à ce genre d'étude comparative, mais les analyses sont relativement longues et consommatrices de solvant. En revanche, l'HPTLC s'est avérée légèrement moins précise mais c'est une technique rapide, visuelle et moins consommatrice de solvant. L'HPTLC serait de ce fait plus adaptée à l'étude de nombreux échantillons, lors de la mise en place d'une filière par exemple.

Pour aller plus loin dans l'étude comparative de la famille des saponines, une troisième méthode de dosage a été développée, par HPLC-ELSD en équivalent routine, dans le but de doser toutes les saponines majoritaires séparément et ainsi observer d'éventuelles différences dans le profil de cette famille.

Cette étude comparative a permis de mettre en évidence d'autres facteurs de variation. Le profil varie ainsi principalement selon la localisation géographique et en particulier selon le type de sol. En revanche, le type de sous-espèce, l'année de récolte, la période de récolte ou le mode de conservation n'ont pas d'influence sur le profil.

L'étude d'acclimatation a permis de mettre en évidence des changements progressifs de comportement des boutures selon le lieu de bouturage. Les récoltes de 2012 permettront de confirmer ces évolutions.

Les extraits sont cependant tous actifs quelle que soit la zone de récolte ce qui permettra d'étendre la zone de culture sans se limiter à la vallée de la Tinée et au Parc du Mercantour.

Aucune différence phytochimique n'ayant été observée entre la sous-espèce *virgaurea* et la sous-espèce *alpestris*, une étude de génétique des populations a été réalisée dans le but de vérifier l'existence d'une réelle différence génétique entre ces deux sous-espèces. Cette étude n'a montré aucune différence génétique entre *virgaurea* et *alpestris*. Les différences phénotypiques existant entre ces deux sous-espèces sont donc probablement davantage dues à l'influence environnementale et non pas à des potentialités génétiques différentes.

CHAPITRE III - CARACTERISATION PHYTOCHIMIQUE DE *S. VIRGAUREA ALPESTRIS* : VALORISATION DANS LE DOMAINE PHARMACEUTIQUE ET COSMETIQUE

III.1. INTRODUCTION

Les métabolites secondaires de *S. virgaurea* ont été étudiés à partir du début des années 80. Comme décrit dans le chapitre III.3.3 p. 27, plusieurs familles de métabolites secondaires ont été identifiées comme des flavonoïdes, des composés phénoliques, des mono-, sesqui- et diterpènes, des saponines ou encore des polyacétylènes.^{26,39,44,45,49,59} Les extraits bruts aussi bien que les composés purs ont montré diverses activités (antioxydantes, antimicrobiennes...) ^{23,34,40,42,55} ce qui témoigne d'un fort potentiel de valorisation de cette plante, aussi bien dans le domaine pharmaceutique qu'en cosmétique, compléments alimentaires... L'utilisation de *S. virgaurea* dans le traitement des candidoses d'une part, ainsi que dans d'autres produits permettrait la création d'une véritable filière dans les Alpes-Maritimes avec une mise en culture de la plante.

Par ailleurs, dans le cadre du développement du traitement bucco-dentaire, la composition de l'extrait polaire des cultivars de *S. virgaurea* des Alpes-Maritimes doit être identifiée. En effet, cet extrait sera utilisé brut sans purification particulière des saponines dans la formule du bain de bouche, il est donc nécessaire d'avoir une bonne connaissance de la composition de cet extrait.

L'objectif de ces travaux est donc d'identifier et de tester biologiquement le maximum de composés dans l'extrait polaire, mais également d'étudier les composés les plus hydrophobes, pouvant être extraits après épuisement de la plante en composés hydrophiles, dans le but de valoriser la matière végétale dans son ensemble.

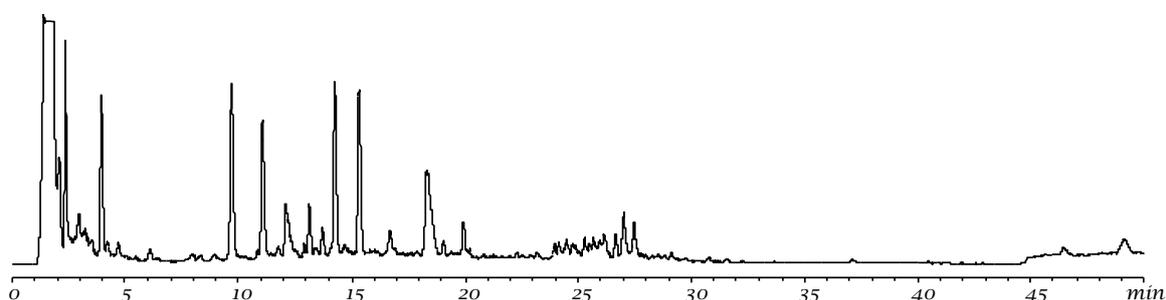
Plusieurs tests biologiques ont pu être réalisés. Les extraits, fractions et certains composés purifiés ont pu être évalués pour une activité cytotoxique, sur différentes lignées de cellules cancéreuses, pour une valorisation dans le domaine pharmaceutique. Ils ont également été testés contre certains micro-organismes, dans le but de trouver de nouveaux conservateurs/antibiotiques. L'activité inhibitrice de la tyrosinase, une enzyme catalysant la production de mélanine, a également été testée, pour une valorisation dans le domaine cosmétique (blanchiment de la peau, correcteur de taches brunes). Enfin, l'activité antioxydante des extraits a été évaluée pour une éventuelle valorisation dans le domaine cosmétique ou compléments alimentaires.

III.2. ETUDE DES COMPOSES HYDROPHILES

III.2.1. EXTRACTION

Les parties aériennes fleuries de la plante ont été broyées finement et ont été extraites deux fois par macération assistée par ultrasons à 5 °C avec un mélange eau/méthanol 50:50 pendant 2 × 3 h.

L'extrait brut obtenu, de couleur brun foncé, représente environ 25 % de la masse de matière sèche après évaporation. Il a été analysé par HPLC-UV-ELSD en phase inverse (C18) Le chromatogramme obtenu a permis de visualiser la complexité de cet extrait et de le comparer à l'extrait aqueux (Figure 98).



Colonne C18, 150 × 4,6 mm, 5 µm, gradient Eau/MeCN, 5 min à 15 % MeCN, 55 % MeCN en 30 min, 100 % MeCN en 5 min, puis 5 min à 60 % IPrOH

FIGURE 98 - CHROMATOGRAMME DE L'EXTRAIT BRUT EAU/MeOH 50:50

La composition chimique de cet extrait est très proche de celle de l'extrait aqueux, les composés éluant dans le volume mort sont toujours majoritaires mais tous les autres composés sont en proportion bien plus importante. De plus un autre pic majoritaire est apparu à 11 min. L'ajout d'une proportion de méthanol dans l'eau facilite ainsi l'extraction de nombreux composés, potentiellement valorisables.

Dans le but de déterminer la composition de cet extrait et les valorisations pouvant être mises en place, différents tests biologiques ont été effectués, suivis d'un isolement et d'une identification de chacun des composés majoritaires.

III.2.2. TESTS BIOLOGIQUES PRELIMINAIRES

III.2.2.1. CYTOTOXICITE

Les tests de cytotoxicité *in vitro* ont été réalisés sur trois lignées de cellules cancéreuses humaines. L'A549 est un carcinome* du poumon non-à-petites cellules résistant aux stimuli pro-apoptotiques* et pro-autophagiques*.¹⁷⁰ L'U373 est un glioblastome* résistant aux stimuli pro-apoptotiques mais sensibles aux stimuli pro-autophagiques.^{171,172} La SKMEL-28 est un mélanome* résistant aux stimuli pro-apoptotiques.^{173,174}

La croissance des cellules cancéreuses a été déterminée grâce au test colorimétrique au MTT. Les tests ont été réalisés dans le DMSO (concentration maximale 100 µg/ml) et la lecture de la concentration inhibant 50 % de la croissance cellulaire (IC₅₀) a été effectuée à 72 h.

Aucune activité cytotoxique n'a été détectée sur l'extrait brut aux concentrations testées. Cependant, cet extrait comportant de nombreux composés minoritaires, il est possible que certains composés soient actifs mais en trop faible proportion pour que l'activité soit détectée avant fractionnement. Les fractions seront donc tout de même testées pour l'activité cytotoxique.

III.2.2.2. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

Les tests antimicrobiens *in vitro* ont été réalisés contre trois types de micro-organismes différents, sélectionnés pour leur tendance à se développer facilement sur les denrées alimentaires, les produits cosmétiques ou autres matières organiques utilisées au quotidien par l'homme. *Aspergillus niger* est un champignon filamenteux omniprésent dans l'environnement et se développant facilement sur les matières organiques. *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie gram-négative de type bacille, également omniprésente dans l'environnement, responsable de nombreuses infections et très résistant aux antibiotiques. Enfin, *Staphylococcus aureus* est une bactérie gram-positif de type coque, ubiquitaire et commensale de l'homme mais qui peut s'avérer extrêmement pathogène dans certaines conditions.

Les tests ont été réalisés avec une concentration de 4 mg/ml pour les extraits, 2 mg/ml pour les fractions et 500 µg/ml pour les composés purs, dans le DMSO ou une solution éthanol/eau 60:40. La lecture a été réalisée à 24, 48 et 72 h.

Aucune activité antimicrobienne n'a été détectée sur l'extrait brut aux concentrations testées. Ceci est en accord avec les études précédentes, qui proposent d'utiliser l'extrait brut dans un bain de bouche spécifique, inhibant uniquement la forme filamenteuse de *C. albicans* sans détruire la flore buccale (aucune activité contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis*).¹⁵⁰ Cependant, tout comme précédemment, il est possible que certains composés soient actifs mais en trop faible proportion pour que l'activité soit détectée avant fractionnement. Les fractions seront donc tout de même testées pour l'activité antimicrobienne.

III.2.2.3. ACTIVITE ANTIOXYDANTE

Deux types de tests ont été réalisés, d'une part le dosage de l'activité anti-radicalaire grâce au radical DPPH, d'autre part le dosage des phénols totaux grâce au réactif de Folin-Ciocalteu.

La méthode du Folin-Ciocalteu est basée sur la réduction du réactif phosphotungstique-phosphomolybdate en milieu légèrement basique par les ions phénolates. Une coloration bleue se forme en présence de phénols. Ce chromophore présente un maximum d'absorption à 750 nm, la mesure de l'absorbance de la solution à 750 nm est donc réalisée. C'est une méthode de dosage global des phénols, l'acide gallique est utilisé comme référence pour exprimer les résultats. Ils peuvent être comparés aux résultats d'extraits commercialisés pour leur pouvoir antioxydant, comme l'extrait de romarin titré en acide carnosique (50%), l'extrait de romarin titré en acide rosmarinique (20%) ou encore l'extrait de pépins de pamplemousse.

A la concentration de 1 mg/ml, l'extrait brut possède une concentration en phénols totaux de $41,81 \pm 1,83 \mu\text{g/ml}$, ce qui est environ deux fois moins que les extraits de romarins enrichis (85,45 et 86,32 $\mu\text{g/ml}$) mais beaucoup plus que l'extrait de pépins de pamplemousse (45,18 $\mu\text{g/ml}$ à la concentration de 20 mg/ml). L'extrait possède donc des polyphénols en grande quantité et un potentiel antioxydant intéressant.

La méthode du DPPH est basée sur la potentialité d'une molécule à céder ses atomes d'hydrogènes et/ou ses électrons au radical coloré 1,1-diphényl-2-picrylhydrazil. Lorsque ce radical est réduit, son absorbance diminue, il passe en effet du violet ou jaune. La mesure de la disparition du radical se fait donc par spectrophotométrie à 515 nm.

L'IC₅₀ de l'extrait brut a été mesurée et une valeur de 0,175 $\mu\text{g/ml}$ a été obtenue. L'extrait possède donc un potentiel antioxydant intéressant.

III.2.2.4. ACTIVITE ANTI-TYROSINASE

La tyrosinase est une enzyme catalysant, entre autre, la production de mélanine. L'inhibition de cette enzyme empêche ainsi la pigmentation de la peau. Cette activité peut être exploitée en cosmétique pour corriger les taches brunes sur la peau.

Les tests anti-tyrosinase *in vitro* ont été réalisés dans le DMSO à 1, 10 et 100 $\mu\text{g/ml}$.

Aucune activité anti-tyrosinase n'a été détectée sur l'extrait brut aux concentrations testées. Cependant, tout comme précédemment, il est possible que certains composés soient actifs mais en trop faible quantité pour que l'activité soit détectée avant fractionnement. Les fractions seront donc tout de même testées pour l'activité anti-tyrosinase.

III.2.3. FRACTIONNEMENT

L'extrait brut a dans un premier temps été fractionné par chromatographie sous vide en phase inverse (C18) afin d'obtenir des fractions de composition plus simple. Le même protocole que dans le chapitre I a été adopté. Un total de cinq systèmes de solvants de polarité décroissante a été utilisé, ce qui a permis de récupérer cinq fractions de polarités différentes.

Ces cinq fractions ont toutes été analysées par HPLC-UV-ELSD en phase inverse (C18), dans les mêmes conditions que l'extrait, afin d'évaluer la composition et la complexité de chaque fraction (Figure 99).

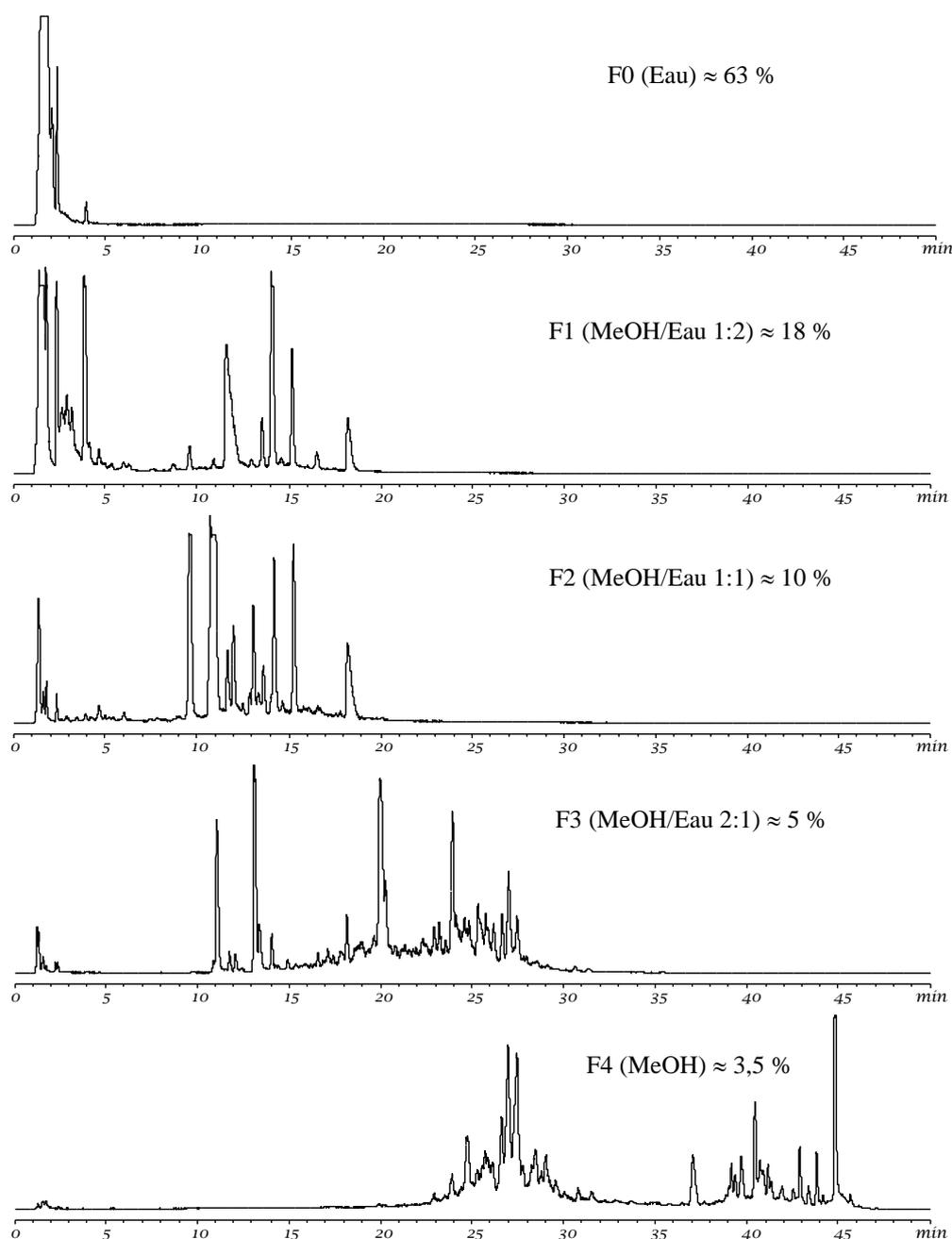


FIGURE 99 - CHROMATOGRAMMES DES FRACTIONS F1 A F4 PROVENANT DE L'EXTRAIT BRUT EAU/MeOH 50:50

Des résultats similaires à ceux obtenus pour le fractionnement de l'extrait aqueux ont été observés ici. La fraction F0 éluée avec de l'eau est uniquement constituée des composés présents dans le volume mort. Les fractions F1 et F2 sont constituées des composés majoritaires présents entre 1 et 20 min. Ces composés polaires, absorbant de manière importante vers 254-280 nm, sont probablement les composés phénoliques détectés grâce au test de Folin-Ciocalteu. Enfin les fractions F3 et F4 sont formées des nombreux composés minoritaires entre 20 et 30 min, identifiés précédemment comme étant une famille de saponines.

Les différentes fractions ont par la suite été testées pour les différentes activités sélectionnées précédemment.

III.2.4. TESTS BIOLOGIQUES DES FRACTIONS

III.2.4.1. CYTOTOXICITE

Les tests de cytotoxicité *in vitro* ont été réalisés dans les mêmes conditions que précédemment. Chacune des cinq fractions ont été testées contre les trois lignées de cellules cancéreuses. Les résultats sont présentés dans le Tableau 27.

TABLEAU 27 - VALEURS D'IC₅₀ (µg/ml) POUR L'INHIBITION DE LA CROISSANCE CELLULAIRE *IN VITRO* DE DIFFERENTES LIGNEES CANCEREUSES PAR LES FRACTIONS F0 A F4

	F0	F1	F2	F3	F4
A549	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
U373	> 100	> 100	> 100	12 ± 3	28 ± 4
SKMEL28	> 100	> 100	> 100	> 100	85 ± 8

Les fractions F0, F1 et F2 n'ont pas montré d'activité inhibitrice contre ces trois lignées cancéreuses aux concentrations testées (limite maximum fixée à 100 µg/ml). En revanche, la fraction F3 possède une IC₅₀ de 12 ± 3 µg/ml contre U373 et la fraction F4 une IC₅₀ de 28 ± 4 µg contre U373 et une IC₅₀ de 85 ± 8 µg contre SKMEL28.

Les composés des fractions F3 et F4 devront donc être testés en priorité.

III.2.4.2. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

Les tests antimicrobiens *in vitro* ont été réalisés dans les mêmes conditions que précédemment. Chacune des cinq fractions ont été testées contre les trois micro-organismes. Les résultats sont présentés dans le Tableau 28.

TABLEAU 28 - POURCENTAGE D'INHIBITION DES MICRO-ORGANISMES PAR LES FRACTIONS F0 A F4 A 72 H

	F0	F1	F2	F3	F4
<i>Aspergillus niger</i>	<0	<0	<0	20	<0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<0	<0	<0	<0	<0
<i>Staphylococcus aureus</i>	<0	<0	<0	35	<0

Aucune des cinq fractions n'a montré d'activité probante. Seule F3 a montré une légère activité contre *A. niger* et *S. aureus*.

La valorisation de *S. virgaurea* en tant que conservateur n'est donc probablement pas envisageable.

III.2.4.3. ACTIVITE ANTI-TYROSINASE

Les tests anti-tyrosinase *in vitro* ont été réalisés dans les mêmes conditions que précédemment. Chacune des cinq fractions ont été testées et les résultats ont été rassemblés dans le Tableau 29.

TABLEAU 29 - POURCENTAGE D'ACTIVITE DE LA TYROSINASE AVEC LES FRACTIONS F0 A F4

	F0	F1	F2	F3	F4
Pourcentage d'activité (%)	>100	67	78	94	98

Les fractions F0, F2, F3 et F4 n'ont pas montré d'activité significative inhibitrice de la tyrosinase. Cependant la fraction F1 inhibe plus de 30 % de l'activité de la tyrosinase. Les composés de cette fraction devront donc être testés en priorité.

III.2.5. ETUDE DE LA FRACTION F0

La fraction F0, possédant uniquement des composés éluant dans le volume mort, a été analysée par RMN afin d'évaluer le type de structure majoritaire (Figure 100).

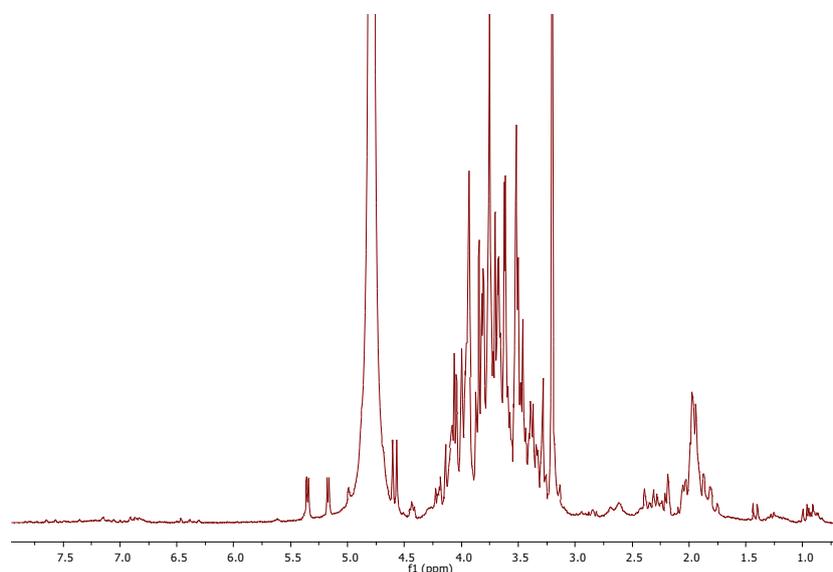


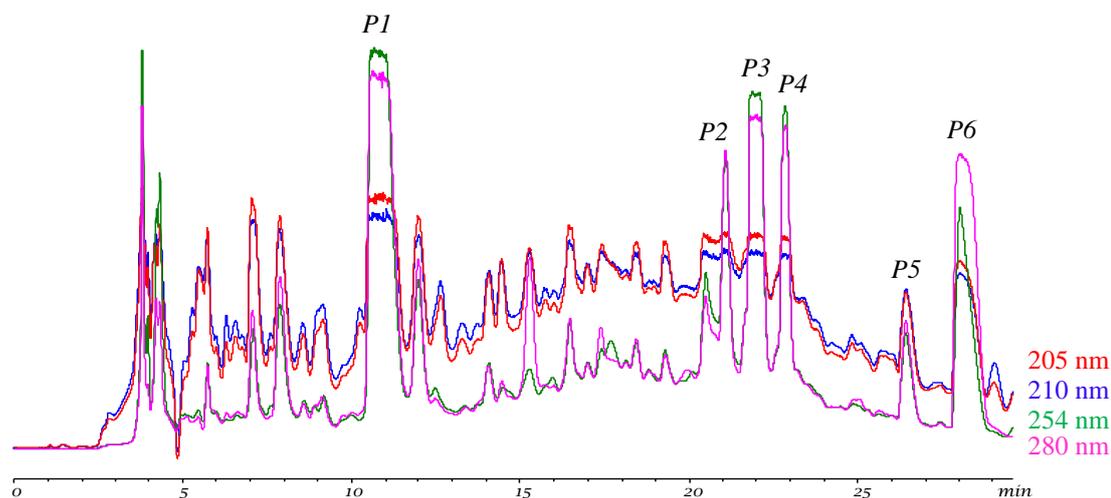
FIGURE 100 - SPECTRE RMN ¹H DE LA FRACTION F0 (D₂O, 200 MHz)

L'analyse RMN montre clairement une forte majorité de sucres dans cette fraction. En effet des signaux caractéristiques des protons anomériques sous forme de doublet sont visibles entre 4,5 et 5,5 ppm, des protons des CH₃ terminaux (dans le cas de désoxyhexoses) sous forme de doublet entre 1 et 2 ppm et enfin tous les autres protons de l'ose entre 3 et 4,5 ppm.

Cette fraction ne présentant pas d'activité biologique particulière, son étude n'a pas été poursuivie. Cependant, cette fraction étant majoritaire dans l'extrait, il serait judicieux de la valoriser dans d'autres domaines. Ces sucres étant certainement sous forme de polysaccharides, ils pourraient être valorisés en tant que biopolymères ou source d'énergie renouvelable si des quantités importantes sont produites.^{175,176}

III.2.6. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES COMPOSES DE LA FRACTION F1

Les composés majoritaires de la fraction F1 ont été isolés par HPLC semi-préparative en phase inverse (C18). Le suivi chromatographique ne pouvant pas être réalisé par ELSD, plusieurs longueurs d'ondes UV ont été choisies afin de repérer au mieux chaque composé (Figure 101).



Colonne C18, 250 × 10 mm, 5 µm, gradient Eau/MeCN, 5 min à 15 % MeCN, 50 % MeCN en 30 min, 100 % MeCN en 5 min, puis 5 min à 40 % IPrOH

FIGURE 101 - CHROMATOGRAMME DE LA FRACTION F1

Des composés très minoritaires et fortement co-élués entre eux n'ont pas pu être identifiés. Cependant, un total de 6 composés a pu être purifié en quantité suffisante. Ils ont été nommés P1 à P6 et seront toujours identifiés comme tel par la suite.

Les spectres RMN ont été réalisés dans le DMSO ou le méthanol deutéré, à 300 K, à l'aide d'un spectromètre 500 MHz. Dans ce paragraphe, une caractérisation complète de chaque composé nouvellement identifié est présentée (P2, P5 et P6),* suivie d'une présentation rapide des composés déjà identifiés dans la littérature.

*les lettres *s*, *d*, *t*, *q*, *m* et *l* ont été utilisées comme abréviations pour singulet, doublet, triplet, quadruplet, mutiplet et large, respectivement.

III.2.6.1. COMPOSE P2

Le composé *P2* se présente sous la forme d'une poudre amorphe ocre (19,8 mg) pour lequel l'HRESI-MS (mode négatif) a donné un ion moléculaire $[M - H]^-$ avec un m/z de 323,0765, ce qui correspond à la formule brute $C_{15}H_{16}O_8$, 324,0843. La molécule comporte ainsi 8 insaturations.

Les spectres RMN 1H et ^{13}C du composé *P2* (Tableau 30), accompagnés des spectres à deux dimensions, montrent tout d'abord la présence de signaux à δ_H 7,98 (2H, dd, $J = 1,3$ et 8,3 Hz), δ_H 7,53 (2H, tl, $J = 7,7$ Hz), δ_H 7,66 (1H, tl, $J = 7,4$ Hz) et δ_C 129,8, correspondant à un cycle aromatique monosubstitué en position 1' (Figure 102 et Figure 106).

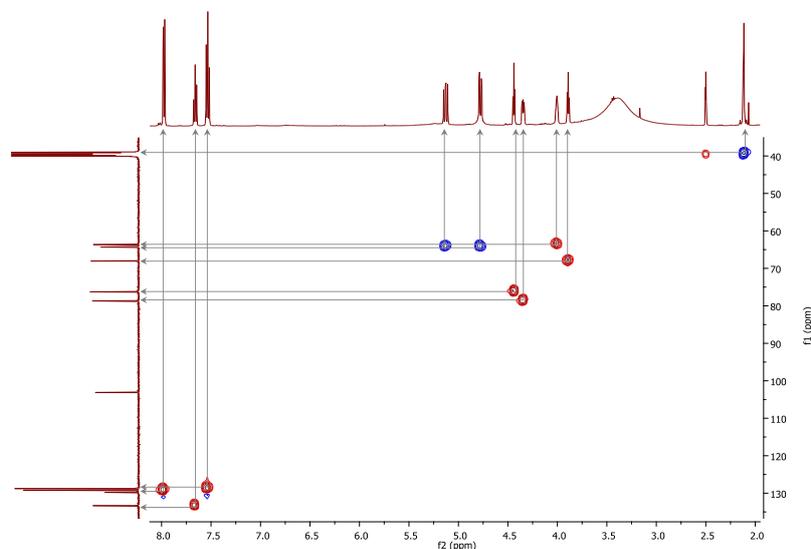


FIGURE 102 - SPECTRE RMN HSQC DU COMPOSE P2

De plus, ils suggèrent la présence d'une fonction acide carboxylique à δ_C 168,9, d'une fonction ester à δ_C 165,7 et d'un groupe oxyméthylène à δ_H 4,78 (1H, dd, $J = 2,8$ et 12,0 Hz), δ_H 5,13 (1H, dd, $J = 8,4$ et 12,0 Hz) et δ_C 64,3 (Figure 102).

Enfin, des signaux correspondant à un cycle 6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane portant deux groupements hydroxy en position 2 et 3 sont observés à δ_H 2,11 (2H, m), 3,89 (1H, tl, $J = 4,9$ Hz), 4,00 (1H, td, $J = 2,5$ et 6,0 Hz), 4,34 (1H, ddd, $J = 2,8$; 4,2 et 8,4 Hz), 4,44 (1H, tl, $J = 4,4$ Hz) et δ_C 103,1 (Figure 102).

La totalité des attributions a été réalisée grâce à une analyse complète des spectres deux dimensions COSY, HMBC et ROESY (Figure 106). Ainsi, une corrélation longue distance 3J HMBC a été observée entre le proton H-2'/H-6' du cycle benzénique et le carbone de la fonction ester numéroté C-7' (Figure 103), ce qui indique une liaison entre la fonction ester et le cycle benzénique au niveau de la position 1'.



FIGURE 103 - SPECTRE RMN HMBC DU COMPOSE P2 (ZOOM F2 : 7,5-8,0 PPM ; F1 : 125-170 PPM)

De plus, des corrélations longues distances ont été observées entre les protons H-9 et le C-7' de la fonction ester, ainsi qu'entre les protons H-9 et les carbones C-1 et C-7 (Figure 104), ce qui indique un enchainement entre l'ester, l'oxyméthylène et le cycle 6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane au niveau de la position 7.

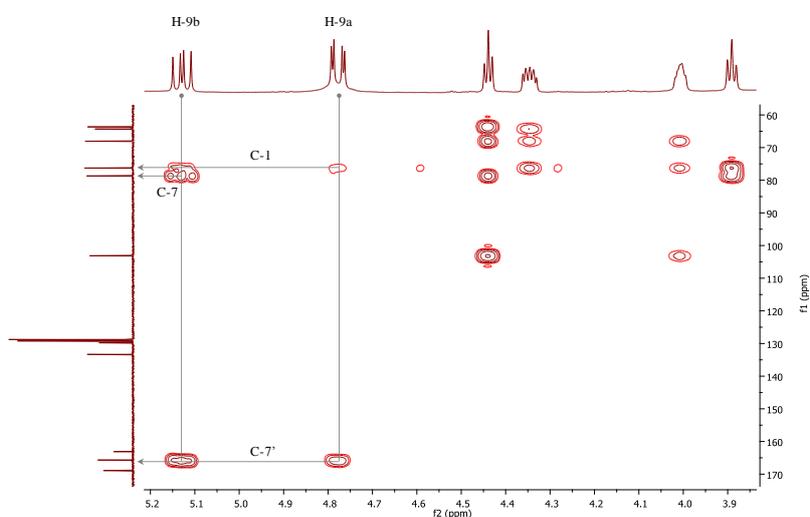


FIGURE 104 - SPECTRE RMN HMBC DU COMPOSE P2 (ZOOM F2 : 3,9-5,2 PPM ; F1 : 60-170 PPM)

Enfin, la fonction acide carboxylique a pu être placée sur la position 5 grâce à la corrélation entre les protons H-4 et le carbone de l'acide carboxylique numéroté C-10 (Figure 105).

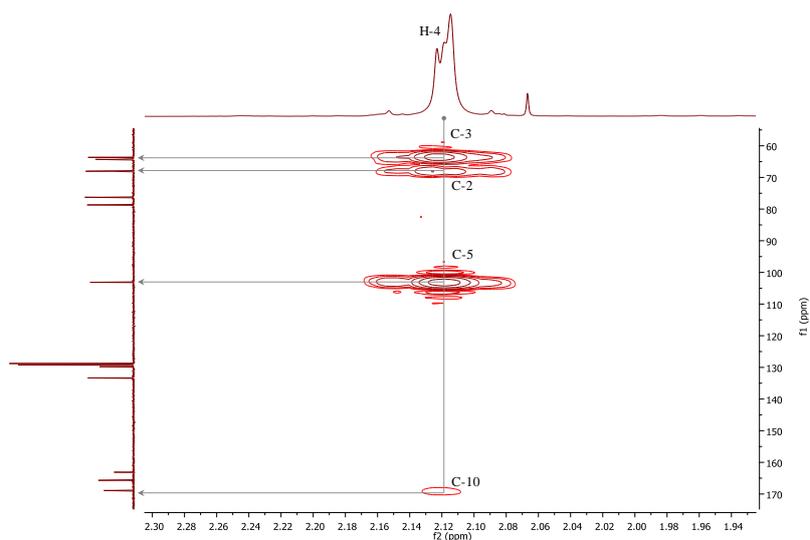


FIGURE 105 - SPECTRE RMN HMBC DU COMPOSE *P2* (ZOOM F2 : 2,0-2,3 PPM ; F1 : 60-170 PPM)

La configuration relative a été déterminée grâce aux constantes de couplage homonucléaires 3J et au spectre RMN ROESY. Les constantes de couplage sont proches de celles de la littérature,¹⁷⁷ ce qui indique que H-2 est positionné en axial, H-1 et H-3 positionnés en équatorial et H-7 positionné vers l'arrière. Cette configuration est confirmée par la corrélation ROESY entre H-2 et H-4a (Figure 106). En revanche la configuration absolue n'a pas pu être déterminée.

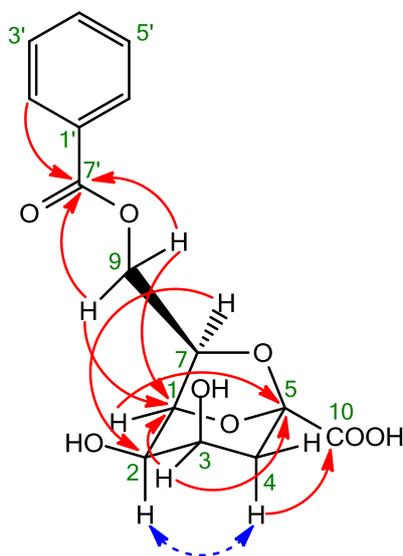


FIGURE 106 - PRINCIPALES CORRELATIONS $^3J_{HC}$ LONGUE DISTANCE DU SPECTRE HMBC ET NOE DU SPECTRE ROESY DU COMPOSE *P2*

Ainsi, le composé *P2* correspond à l'acide 7-((benzoyloxy)méthyl)-2,3-dihydroxy-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane-5-carboxylique. Cet acide octulosonique n'a encore jamais été identifié auparavant.

TABLEAU 30 - ATTRIBUTION DES SIGNAUX RMN ¹³C ET ¹H (J EN Hz) DE P2 (DMSO D₆, 500 MHz)

N°	δ _C	δ _H	N°	δ _C	δ _H
1	76,3	4,44 ; tl (4,4)	1'	129,8	-
2	68,0	3,89 ; tl (4,9)	2'	129,2	7,98 ; dd (1,3 ; 8,3)
3	63,7	4,00 ; td (2,5 ; 6,0)	3'	128,8	7,53 ; tl 7,7
4	39,2	2,11 ; m	4'	133,3	7,66 ; t 7,4
5	103,1	-	5'	128,8	7,53 ; tl 7,7
7	78,7	4,34 ; ddd (2,8 ; 4,2 ; 8,4)	6'	129,2	7,98 ; dd (1,3 ; 8,3)
9	64,3	4,78 ; dd (2,8 ; 12,0) 5,13 ; dd (8,4 ; 12,0)	7'	165,7	-
10	168,9	-			

III.2.6.2. COMPOSE P5

Le composé *P5* se présente sous la forme d'une poudre amorphe ocre (3,0 mg) pour lequel l'HRESI-MS (mode négatif) a donné un ion moléculaire $[M - H]^-$ avec un m/z de 365,0871, ce qui correspond à la formule brute $C_{17}H_{18}O_9$, 366,0949. La molécule comporte ainsi 9 insaturations.

Les spectres RMN 1H et ^{13}C du composé *P5* (Tableau 31), accompagnés des spectres à deux dimensions, montrent tout d'abord la présence de signaux à δ_H 7,61 (2H, dd, $J = 1,5$ et 7,6 Hz), δ_H 7,38 (2H, d, $J = 7,5$ Hz), δ_C 134,5 et δ_C 129,1, correspondant à un cycle benzénique disubstitué en position 1' et 4' (Figure 107 et Figure 110).

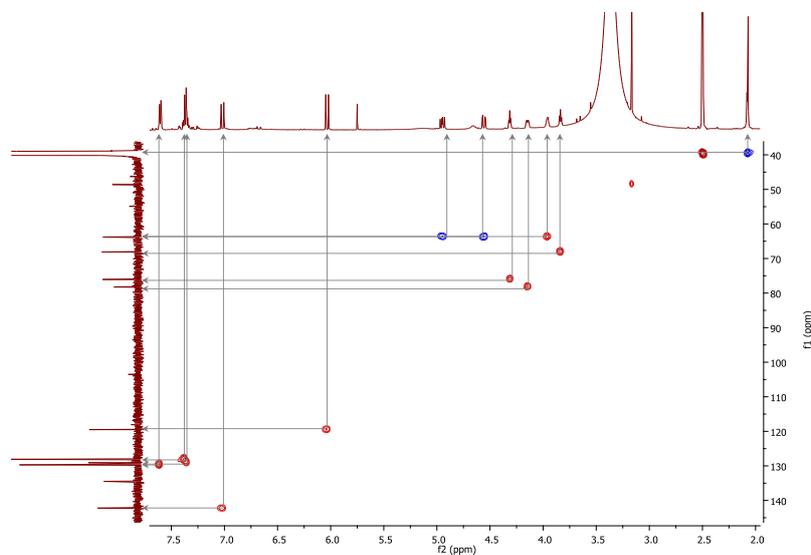


FIGURE 107 - SPECTRE RMN HSQC DU COMPOSE P5

De plus, ils suggèrent la présence d'une paire de protons oléfiniques orientés en (*E*) à δ_H 7,02 (1H, d, $J = 12,7$ Hz) et δ_H 6,03 (1H, d, $J = 12,7$ Hz), d'une fonction acide carboxylique à δ_C 169,2, d'une fonction ester à δ_C 165,6 et d'un groupe oxyméthylène à δ_H 4,56 (1H, dd, $J = 2,5$ et 12,1 Hz), δ_H 4,95 (1H, dd, $J = 8,5$ et 12,1 Hz) et δ_C 63,8 (Figure 107).

Enfin, des signaux correspondant à un cycle 6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane portant deux groupements hydroxy en position 2 et 3 sont observés, tout comme pour le composé précédent, à δ_H 2,07 (2H, m), 3,84 (1H, tl, $J = 5,0$ Hz), 3,96 (1H, td, $J = 3,0$ et 5,0 Hz), 4,15 (1H, ddd, $J = 2,2 ; 4,2 ; 8,5$ Hz), 4,31 (1H, tl, $J = 4,3$ Hz) et δ_C 103,5 (Figure 107).

La totalité des attributions a été réalisée grâce à une analyse complète des spectres deux dimensions COSY, HMBC et ROESY (Figure 110). Ainsi, une corrélation longue distance 3J HMBC a été observée entre le proton H-7' de la double liaison et le carbone C-2'/C-6' du cycle benzénique (Figure 108), ce qui indique un enchaînement entre la double liaison et le cycle benzénique au niveau de la position 1'.

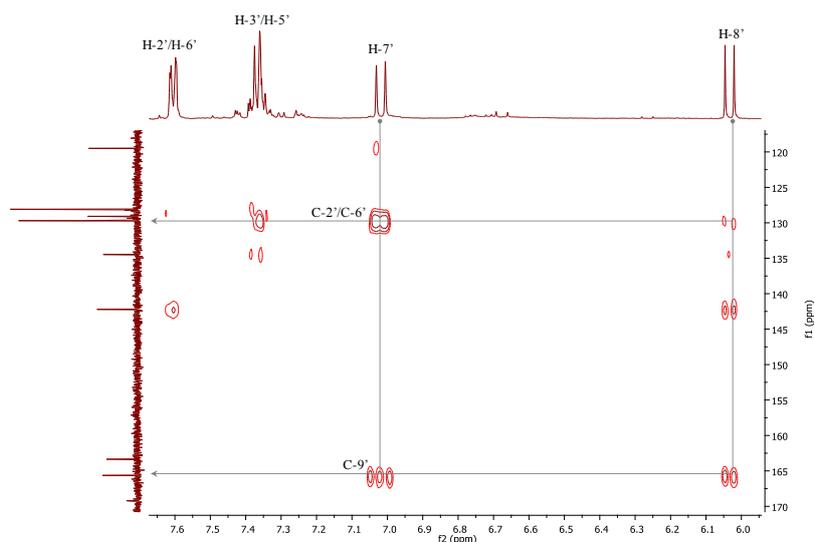


FIGURE 108 - SPECTRE RMN HMBC DU COMPOSE P5 (ZOOM F2 : 6,0-7,6 PPM ; F1 : 120-170 PPM)

De plus, des corrélations longues distances ont été observées entre les protons H-7' et H-8' de la double liaison et le C-9' de la fonction ester (Figure 108), entre les protons H-9 et le C-9' de la fonction ester (Figure 109), ainsi qu'entre le proton H-9b et les carbones C-1 et C-7, ce qui indique un enchainement entre la double liaison, l'ester, l'oxyméthylène et le cycle 6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane au niveau de la position 7.

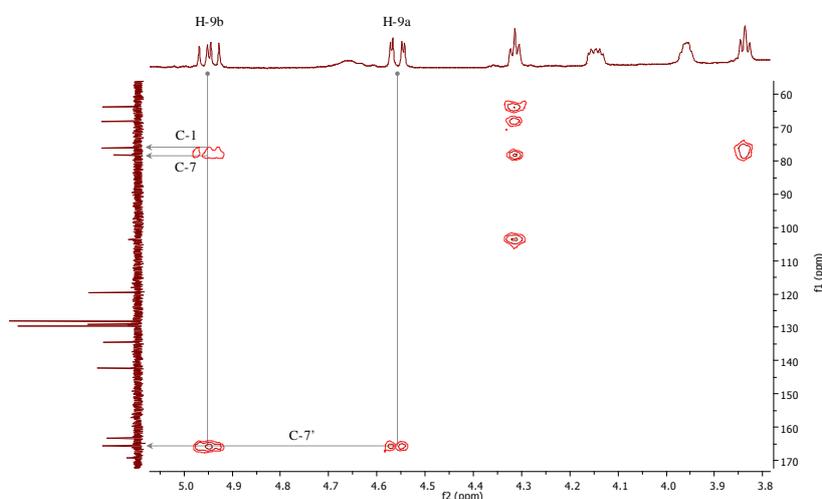


FIGURE 109 - SPECTRE RMN HMBC DU COMPOSE P5 (ZOOM F2 : 3,8-5,0 PPM ; F1 : 60-170 PPM)

Enfin, la fonction acide carboxylique a pu être placée sur la position 5 grâce à la comparaison des déplacements chimiques avec le composé précédent et la littérature,¹⁷⁷ la corrélation entre H-4 et l'acide carboxylique n'apparaissant pas.

La configuration relative a été déterminée grâce aux constantes de couplage homonucléaires 3J et au spectre RMN ROESY. Les constantes de couplage sont proches de celles du composé précédent et de la littérature,¹⁷⁷ ce qui indique que H-2 est positionné en axial, H-1 et H-3

positionnés en équatorial et H-7 positionné vers l'arrière. Cette configuration est confirmée par la corrélation ROESY entre H-2 et H-4a (Figure 110). En revanche la configuration absolue n'a pas pu être déterminée.

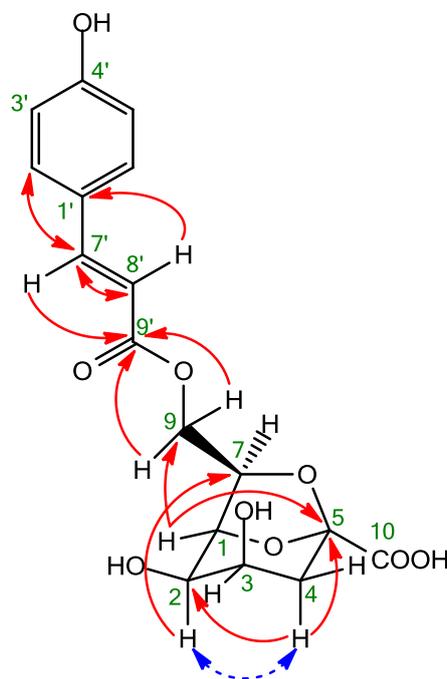


FIGURE 110 - PRINCIPALES CORRELATIONS $^3J_{HC}$ LONGUE DISTANCE DU SPECTRE HMBC ET NOE DU SPECTRE ROESY DU COMPOSE P5

Ainsi, le composé *P5* correspond à l'acide (*E*)-2,3-dihydroxy-7-(((3-(4-hydroxyphényl)acryloyl)oxy)méthyl)-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane-5-carboxylique. Cet acide octulosonique n'a encore jamais été identifié auparavant.

TABLEAU 31 - ATTRIBUTION DES SIGNAUX RMN ^{13}C ET 1H (J EN HZ) DE P5 (DMSO D_6 , 500 MHz)

N°	δ_C	δ_H	N°	δ_C	δ_H
1	76,1	4,31 ; tl (4,3)	1'	134,5	-
2	68,1	3,84 ; tl (5,0)	2'	129,7	7,61 ; dd (1,5 ; 7,6)
3	63,7	3,96 ; td (3,0 ; 5,0)	3'	128,1	7,38 ; d (7,5)
4	39,4	2,07 ; m	4'	129,1	-
5	103,5	-	5'	128,1	7,38 ; d (7,5)
7	78,2	4,15 ; ddd (2,2 ; 4,2 ; 8,5)	6'	129,7	7,61 ; dd (1,5 ; 7,6)
		4,56 ; dd (2,5 ; 12,1)	7'	142,2	7,02 ; d (12,7)
9	63,8	4,95 ; dd (8,5 ; 12,1)	8'	119,5	6,03 ; d (12,7)
10	169,2	-	9'	165,6	-

III.2.6.3. COMPOSE P6

Le composé *P6* se présente sous la forme d'une poudre amorphe ocre (5,0 mg) pour lequel l'HRESI-MS (mode négatif) a donné un ion moléculaire $[M - H]^-$ avec un m/z de 365,0871, ce qui correspond à la formule brute $C_{17}H_{18}O_9$, 366,0949. La molécule comporte ainsi 9 insaturations.

Les spectres RMN 1H et ^{13}C du composé *P6* (Tableau 32), accompagnés des spectres à deux dimensions, montrent tout d'abord la présence de signaux à δ_H 7,73 (2H, dd, $J = 2,0$ et 7,5 Hz), δ_H 7,42 (2H, m), δ_H 7,43 (1H, m) et δ_C 134,0, correspondant à un cycle benzénique monosubstitué en position 1' (Figure 111 et Figure 112).

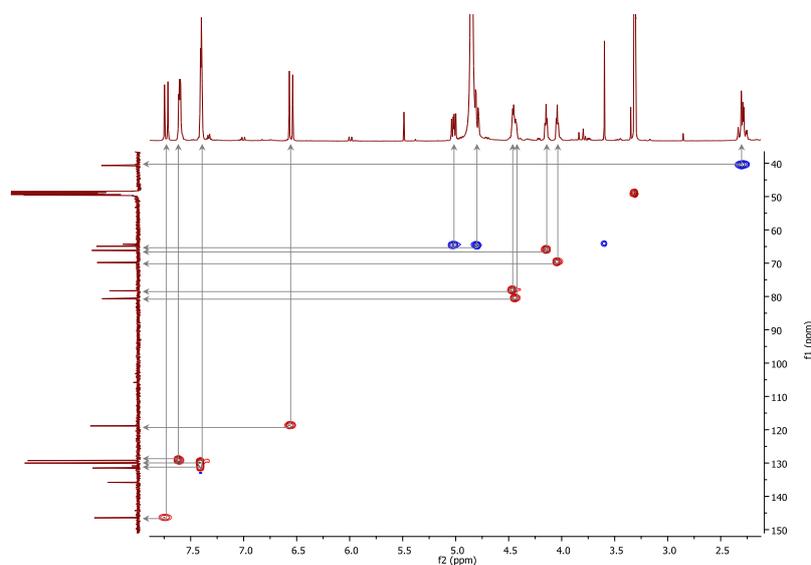


FIGURE 111 - SPECTRE RMN HSQC DU COMPOSE P6

De plus, ils indiquent que la partie liée à ce cycle benzénique au niveau de la position 1' est identique à celle du composé *P5*. L'analyse complète des spectres deux dimensions COSY, HMBC et ROESY a confirmé cette conclusion (Figure 112). L'étude de la configuration relative a également été réalisée et les mêmes résultats que dans le cas des composés précédents ont été obtenus.

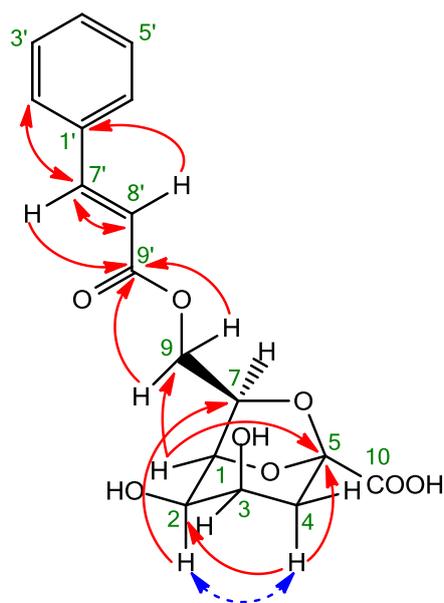


FIGURE 112 - PRINCIPALES CORRELATIONS $^3J_{HC}$ LONGUE DISTANCE DU SPECTRE HMBC ET NOE DU SPECTRE ROESY DU COMPOSE P6

Ainsi, le composé P6 correspond à l'acide (*E*)-7-((cinnamoyloxy)méthyl)-2,3-dihydroxy-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane-5-carboxylique. Cet acide octulosonique n'a encore jamais été identifié auparavant.

TABLEAU 32 - ATTRIBUTION DES SIGNAUX RMN ^{13}C ET 1H (J EN HZ) DE P6 (DMSO D_6 , 500 MHz)

N°	δ_C	δ_H	N°	δ_C	δ_H
1	76,2	4,39 ; tl (4,3)	1'	134,0	-
2	68,0	3,87 ; tl (5,0)	2'	128,4	7,73 ; dd (2,0 ; 7,5)
3	63,7	3,99 ; td (3,0 ; 5,0)	3'	128,9	7,42 ; m
4	39,2	2,10 ; m	4'	130,5	7,43 ; m
5	103,2	-	5'	128,9	7,42 ; m
7	78,6	4,26 ; ddd (2,2 ; 4,2 ; 8,5)	6'	128,4	7,73 ; dd (2,0 ; 7,5)
9	63,8	4,63 ; dd (2,4 ; 12,2)	7'	144,5	7,66 ; d (16,0)
		5,01 ; dd (8,7 ; 12,2)	8'	118,1	6,68 ; d (16,0)
10	169,0	-	9'	166,2	-

Les acides octulosoniques sont des composés rares. Certains ont été identifiés chez *Erigeron breviscapus*¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ et chez *Conyza canadensis*¹⁷⁷ (Vergerette du Canada), deux plantes de la famille des Astéracées, tout comme *S. virgaurea*. Ils ont présenté une activité inhibitrice envers la sécrétion de catécholamines.

Les acides octulosoniques nouvellement identifiés ont été testés pour l'activité cytotoxique, l'activité antimicrobienne et l'activité anti-tyrosinase mais n'ont pas montré d'activité significative aux concentrations testées. Il sera intéressant de les tester pour d'autres activités comme l'inhibition de la sécrétion de catécholamines.

III.2.6.4. COMPOSES *P1*, *P3* ET *P4*

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C du composé *P1* indiquent des signaux correspondant à un groupement acide quinique lié à un groupement acide caféique au niveau de la position 5, ce qui correspond à l'acide chlorogénique (Figure 113). L'acide chlorogénique est un acide phénolique courant dans la nature, il avait déjà été identifié chez *S. virgaurea*.^{39,44} Il possède entre autre une forte activité antioxydante^{181,182} et une activité anticancéreuse.¹⁸³

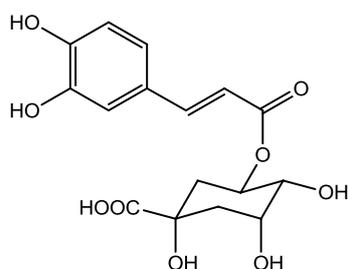


FIGURE 113 - STRUCTURE DE L'ACIDE CHLOROGENIQUE

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C du composé *P3* indiquent des signaux correspondant à un groupement acide quinique lié à deux groupements acide caféique au niveau de la position 3 et de la position 5, ce qui correspond à l'acide 3,5-di-*O*-cafféoylquinique (Figure 114).¹⁸⁴

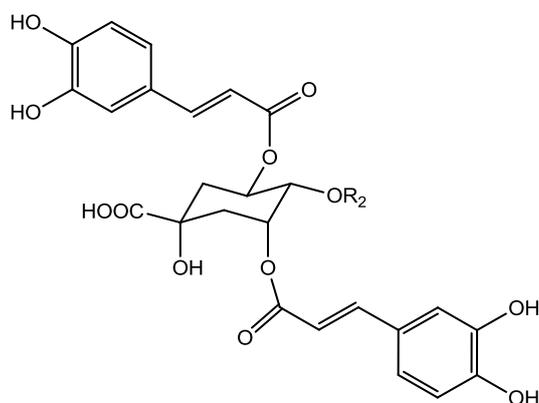


FIGURE 114 - STRUCTURE DE L'ACIDE 3,5-DI-*O*-CAFFEOYLQUINIQUE

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C du composé *P4* indiquent des signaux correspondant à un groupement acide quinique lié à deux groupements acide caféique au niveau de la position 3 et de la position 4, ce qui correspond à l'acide 3,4-di-*O*-caféoylquinique (Figure 115).¹⁸⁴

Ces deux acides sont également courants dans la nature cependant seul l'acide 3,5-di-*O*-caféoylquinique avait déjà été identifié chez *S. virgaurea*.³⁹ Ces deux acides, dérivés de l'acide chlorogénique, sont également des composés actifs, particulièrement antioxydants.^{185,186}

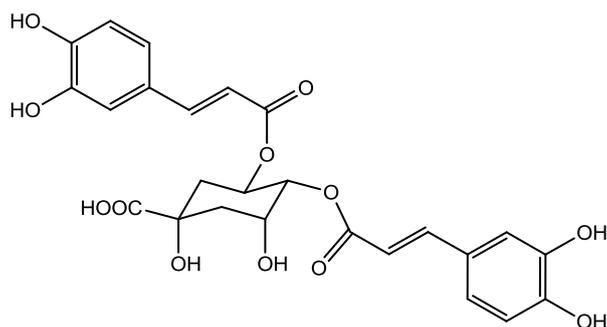


FIGURE 115 - STRUCTURE DE L'ACIDE 3,4-DI-*O*-CAFEOYLQUINIQUE

III.2.7. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES COMPOSES DE LA FRACTION F2

Les composés majoritaires de la fraction F2 ont été isolés par HPLC semi-préparative en phase inverse (C18). Le suivi chromatographique ne pouvant pas être réalisé par ELSD, plusieurs longueurs d'ondes UV ont été choisies afin de repérer au mieux chaque composé (Figure 116).

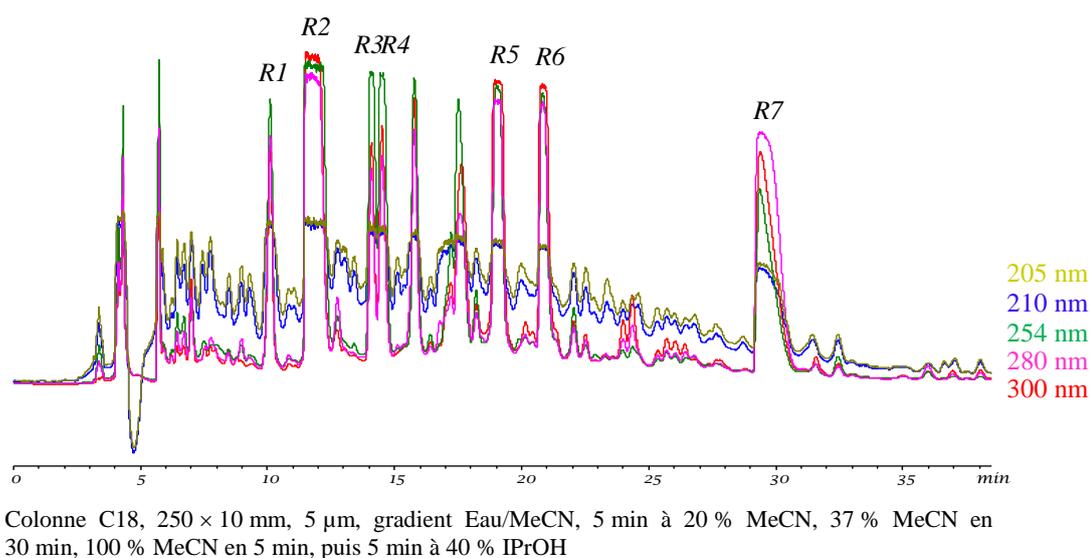


FIGURE 116 - CHROMATOGRAMME DE LA FRACTION F2

Des composés très minoritaires et fortement co-élués entre eux n'ont pas pu être isolés en quantité suffisante. Ainsi les composés les plus minoritaires n'ont pas pu être identifiés. Cependant, un total de 7 composés a pu être isolé en quantité suffisante. Ils ont été nommés *R1* à *R7* et seront toujours identifiés comme tel par la suite.

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C du composé *R1* indiquent des signaux correspondant à deux cycles benzéniques reliés entre eux par une fonction ester et un oxyméthylène. Le cycle directement relié à l'oxyméthylène est également lié à un glucose par une liaison *O*-glycosidique au niveau de la position 2. De plus, le cycle relié directement à la fonction ester est également lié à un méthoxy en position 2, à un glucose par une liaison *O*-glycosidique au niveau de la position 3 et à un hydroxy en position 6. Cette structure correspond au léiocarposide (Figure 117).^{60,61} Le léiocarposide est un composé très rare dans la nature, il a uniquement été identifié chez *S. virgaurea* et *S. decurrens*.⁸⁰ et a montré une activité diurétique *in vivo*, ainsi qu'anti-inflammatoire et analgésique.^{40,42} Lors de ces travaux il a été testé pour l'activité cytotoxique et l'activité anti-tyrosinase mais n'a pas montré d'activité significative aux concentrations testées. Il sera intéressant de le tester pour d'autres activités.

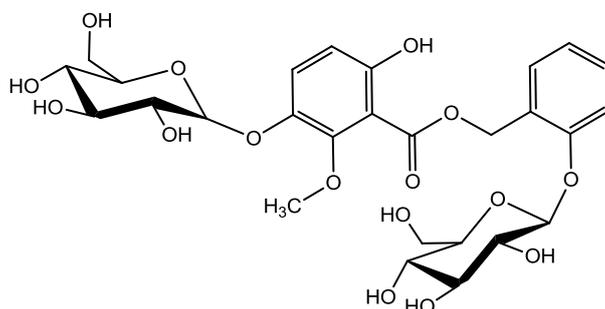


FIGURE 117 - STRUCTURE DU LÉIOCARPOSIDE

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C du composé *R2* indiquent des signaux correspondant à un squelette flavonol, avec une cétone en position 4 sur l'hétérocycle central, des groupements hydroxy en position 5, 7, 2' et 3' (quercétine), ainsi qu'un rutinose (α -L-rhamnose-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucose) lié en position 3 par une liaison *O*-glycosidique. Cette structure correspond à la rutine (Figure 118). La rutine est un flavonoïde très courant dans la nature, en tant que pigment jaune, possédant une activité antioxydante.^{187,188} Ce composé avait déjà été identifié chez *S. virgaurea*.¹⁸⁹

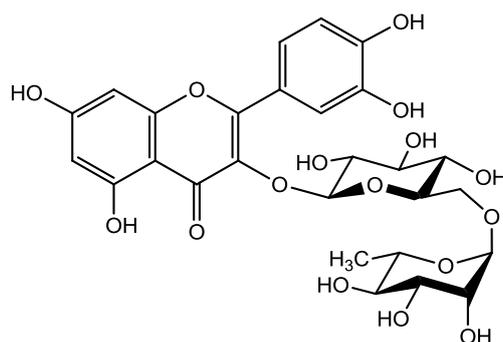


FIGURE 118 - STRUCTURE DE LA RUTINE

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C des composés *R3* et *R4* indiquent des signaux correspondant à un squelette quercétine tout comme le composé précédent, lié en position 3 à un glucose dans le cas de *S3* et à un galactose dans le cas de *R4*. Ils correspondent donc à la quercétine 3-*O*-glucoside (isoquercitrine) et la quercétine 3-*O*-galactoside (hypéroside), respectivement (Figure 119 et Figure 120). Ces métabolites secondaires courants n'avaient encore jamais été identifiés chez *S. virgaurea* auparavant. Lors d'études antérieures, l'hypéroside a montré une activité antivirale¹⁹⁰ et l'isoquercitrine a montré une activité anti-inflammatoire.¹⁹¹

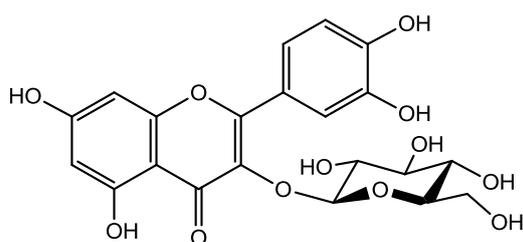


FIGURE 119 - STRUCTURE DE LA QUERCETINE 3-*O*-GLUCOSIDE

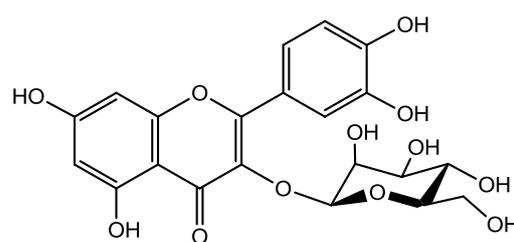


FIGURE 120 - STRUCTURE DE QUERCETINE 3-*O*-GALACTOSIDE

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C des composés *R5* et *R6* indiquent des signaux correspondant à l'acide 3,5-di-*O*-caféoylquinique et à l'acide 3,4-di-*O*-caféoylquinique, identifiés précédemment dans la fraction F1.

Enfin les spectres RMN ^1H et ^{13}C du composé *R7* indiquent des signaux correspondant au composé *P6* nouvellement identifié dans la fraction précédente (acide (*E*)-7-((cinnamoyloxy)méthyl)-2,3-dihydroxy-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane-5-carboxylique).

Les fractions F1 et F2 sont constituées de nombreux composés actifs, particulièrement antioxydants, en proportion importante dans la plante. Elles pourraient donc être valorisables dans le domaine cosmétique, pharmaceutique ou des compléments alimentaires.

Par ailleurs, trois composés nouveaux et trois autres composés jamais encore identifiés chez *S. virgaurea* ont été déterminés lors de ces travaux, ce qui confirme la nécessité d'une étude complète des cultivars de *S. virgaurea* des Alpes-Maritimes.

Il sera cependant nécessaire de réaliser davantage de tests sur les différents composés isolés.

III.2.8. ETUDE DES FRACTIONS F3 ET F4

Les fractions F3 et F4 obtenues à partir de cet extrait sont rigoureusement identiques à celles obtenues à partir de l'extrait aqueux. Elles sont donc constituées en majorité des 11 saponines identifiées dans le Chapitre I, les Virgaureasaponines 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, B, C, D et E.

Les Virgaureasaponines 4 et C ont été testées contre 6 lignées de cellules cancéreuses, deux carcinomes (du sein MCF-7 et du poumon A-549), deux gliomes (U373 et Hs683) et deux mélanomes (SKMEL-28 et B16F10). Les tests de cytotoxicité *in vitro* ont été réalisés dans les mêmes conditions que précédemment. Les résultats sont présentés dans le Tableau 33.

TABLEAU 33 - VALEURS D'IC₅₀ (μM) POUR L'INHIBITION DE LA CROISSANCE CELLULAIRE *IN VITRO* DE DIFFERENTES LIGNEES CANCEREUSES PAR LES VIRGAUREASAPONINES 4 ET C

	Virgaureasaponine 4	Virgaureasaponine C
MCF-7	21	25
A549	19	19
U373	17	19
Hs683	18	19
SKMEL-28	21	18
B16F10	16	3

La Virgaureasaponine 4, nouvellement identifiée lors de ces travaux de thèse, ainsi que la Virgaureasaponine C, déjà identifiée et testée contre certaines lignées cancéreuses auparavant,⁵¹ ont montré une activité contre toutes les lignées cancéreuses testées. La Virgaureasaponine C étant particulièrement active contre le mélanome B16F10 avec une IC₅₀ de seulement 3 μM.

Ces deux saponines ayant montré une bonne activité cytotoxique, toutes les saponines identifiées devront être testées. Certaines saponines pourraient ainsi éventuellement être valorisées en tant qu'anti-cancéreux. Cependant, avant d'envisager une application pour ces molécules, leur mécanisme d'action et leur toxicité devront être identifiés.

Les saponines possédant souvent de nombreuses activités,^{87,88} d'autres tests pourront également être réalisés.

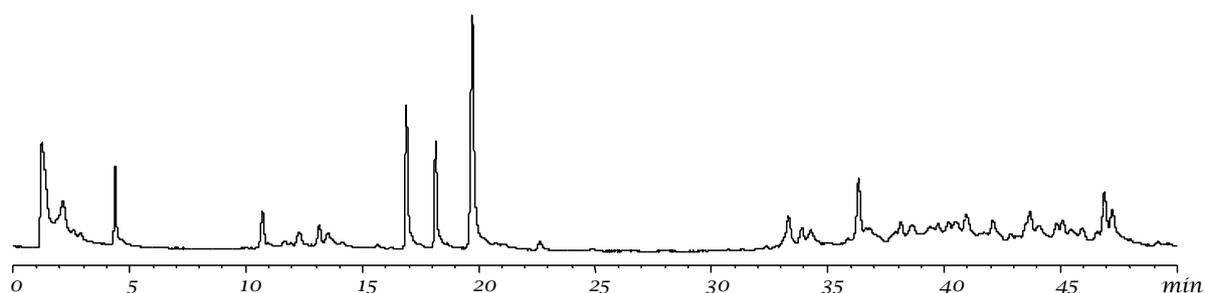
III.3. ETUDE DES COMPOSES HYDROPHOBES

III.3.1. L'EXTRAIT AU DICHLOROMETHANE

III.3.1.1. EXTRACTION

Les parties aériennes fleuries de la plante ont été broyées finement et ont été extraites deux fois par macération à température ambiante avec du dichlorométhane.

L'extrait brut ainsi obtenu, de couleur vert foncé, représente environ 3 % de la masse de matière sèche. Il a été analysé par HPLC-UV-ELSD en phase inverse (C18). Le chromatogramme obtenu a permis de visualiser la complexité de cet extrait (Figure 121).



Colonne C18, 150 × 4,6 mm, 5 µm, gradient Eau/MeCN, 5 min à 50 % MeCN, 100 % MeCN en 10 min, 20 % MeCN et 80 % IPrOH en 20 min, puis 5 min à 80 % IPrOH

FIGURE 121 - CHROMATOGRAMME HPLC-ELSD DE L'EXTRAIT BRUT AU DICHLOROMETHANE

Le rendement est ici beaucoup moins important que dans le cas des extraits plus polaires, les composés hydrophobes sont donc très minoritaires dans la plante.

Quelques composés minoritaires éluent pendant le gradient eau/acétonitrile, puis trois composés majoritaires éluent à environ 100 % d'acétonitrile. Enfin un ensemble complexe de composés minoritaires très apolaires éluent à partir de 50 % d'isopropanol.

Dans le but de déterminer la composition de cet extrait et les valorisations pouvant être mises en place, différents tests biologiques ont été effectués, suivis d'un isolement et d'une identification de certains composés.

III.3.1.2. TESTS BIOLOGIQUES PRELIMINAIRES

III.3.1.2.1. CYTOTOXICITE

Les tests de cytotoxicité *in vitro* ont été réalisés dans les mêmes conditions que précédemment, cependant sept lignées ont été testées ici. Le gliome U373 utilisé précédemment, ainsi que les gliomes Hs683, T98G et U251, le mélanome SKMEL28 ainsi que le mélanome murin B16F10 et enfin la lignée de cancer de la prostate PC3. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 34.

TABLEAU 34 - VALEURS D'IC₅₀ (µg/ml) POUR L'INHIBITION DE LA CROISSANCE CELLULAIRE *IN VITRO* DE DIFFERENTES LIGNEES CANCEREUSES PAR L'EXTRAIT BRUT

	Extrait brut
B16F10	28 ± 2
SKMEL28	59 ± 3
PC3	60 ± 3
Hs683	76 ± 1
T98G	75 ± 2
U251	37 ± 1
U373	68 ± 1

L'extrait brut s'est révélé actif contre toutes les lignées cancéreuses, en particulier contre le mélanome murin B16F10 et le gliome U251, où les valeurs d'IC₅₀ sont les plus basses.

L'extrait devra donc être fractionné pour tenter d'identifier les actifs.

III.3.1.2.2. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

Les tests antimicrobiens *in vitro* ont été réalisés dans les mêmes conditions que précédemment. L'extrait brut au dichlorométhane n'a pas montré d'activité contre *P. aeruginosa* et *S. aureus*, en revanche, une inhibition d'environ 40 % a été observée contre *A. niger*.

L'extrait devra donc être fractionné pour tenter d'identifier les actifs. Cependant aucun autre test antimicrobien n'a pu être réalisé pendant la durée de ces travaux. Les fractions et composés purs obtenus ci-après devront donc être testés ultérieurement.

III.3.1.2.3. ACTIVITE ANTIOXYDANTE

Les deux types de tests ont été réalisés (DPPH et Folin-Ciocalteu), dans les mêmes conditions que précédemment.

Dans le cas du Folin-Ciocalteu, toujours à la concentration de 1 mg/ml, l'extrait brut possède une concentration en phénols totaux de 21,71 ± 0,58 µg/ml, ce qui est plus faible que dans le

cas de l'extrait polaire, mais ce résultat reste plus important que celui de l'extrait de pépins de pamplemousse. L'extrait possède donc lui des phénols et un potentiel antioxydant intéressant mais moins que l'extrait polaire.

Dans le cas du DPPH, l'IC₅₀ de l'extrait brut a été mesurée et une valeur de 0,140 µg/ml a été obtenue. Cette valeur est légèrement inférieure à celle de l'extrait polaire, ce qui indique un pouvoir anti-radicalaire tout aussi intéressant.

III.3.1.2.4. ACTIVITE ANTI-TYROSINASE

Les tests anti-tyrosinase *in vitro* ont été réalisés dans les mêmes conditions que précédemment.

Aucune activité anti-tyrosinase n'a été détectée sur cet extrait brut aux concentrations testées. Cependant, tout comme précédemment, il est possible que certains composés soient actifs mais en trop faible quantité pour que l'activité soit détectée avant fractionnement. Les fractions seront donc tout de même testées pour l'activité anti-tyrosinase.

III.3.1.3. FRACTIONNEMENT

L'extrait brut a dans un premier temps été fractionné par chromatographie sous vide en phase normale (Silice) afin d'obtenir des fractions de composition plus simple. Un total de six systèmes de solvants de polarité croissante a été utilisé, ce qui a permis de récupérer six fractions (Figure 122). La première est éluée avec 100 % d'éther de pétrole, les trois suivantes sont constituées d'un mélange Ether de pétrole/Ether diéthylique avec des proportions d'éther diéthylique croissantes, la cinquième est uniquement constituée d'éther diéthylique et enfin la dernière est un rinçage au méthanol.

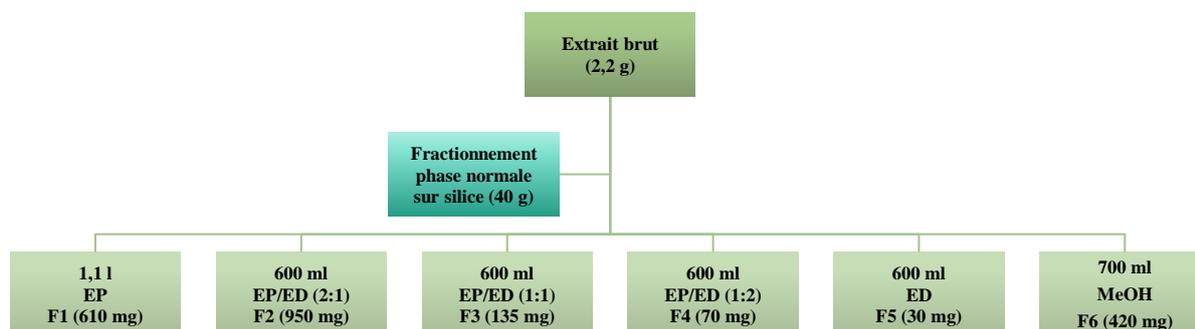


FIGURE 122 - FRACTIONNEMENT EN PHASE NORMALE DE L'EXTRAIT BRUT

Les cinq fractions F2 à F6 ont été analysées par HPLC-UV-ELSD en phase inverse (C18), dans les mêmes conditions que l'extrait, afin d'évaluer leur composition et leur complexité (Figure 123).

La fraction F1, éluée avec de l'éther de pétrole, est uniquement constituée des composés les moins polaires, qui seraient trop retenus par la colonne HPLC C18, elle n'a donc pas été analysée. La fraction F2 est constituée des trois composés majoritaires, d'un composé minoritaire éluant à 11 min, et de l'ensemble de composés minoritaires éluant à partir de 30 min. Elle est trop complexe pour être directement purifiée par HPLC, elle doit donc être à nouveau fractionnée. Les autres fractions F3, F4, F5 et F6 sont constituées des composés minoritaires entre 11 et 20 min et de certains des composés apolaires éluant après 30 min.

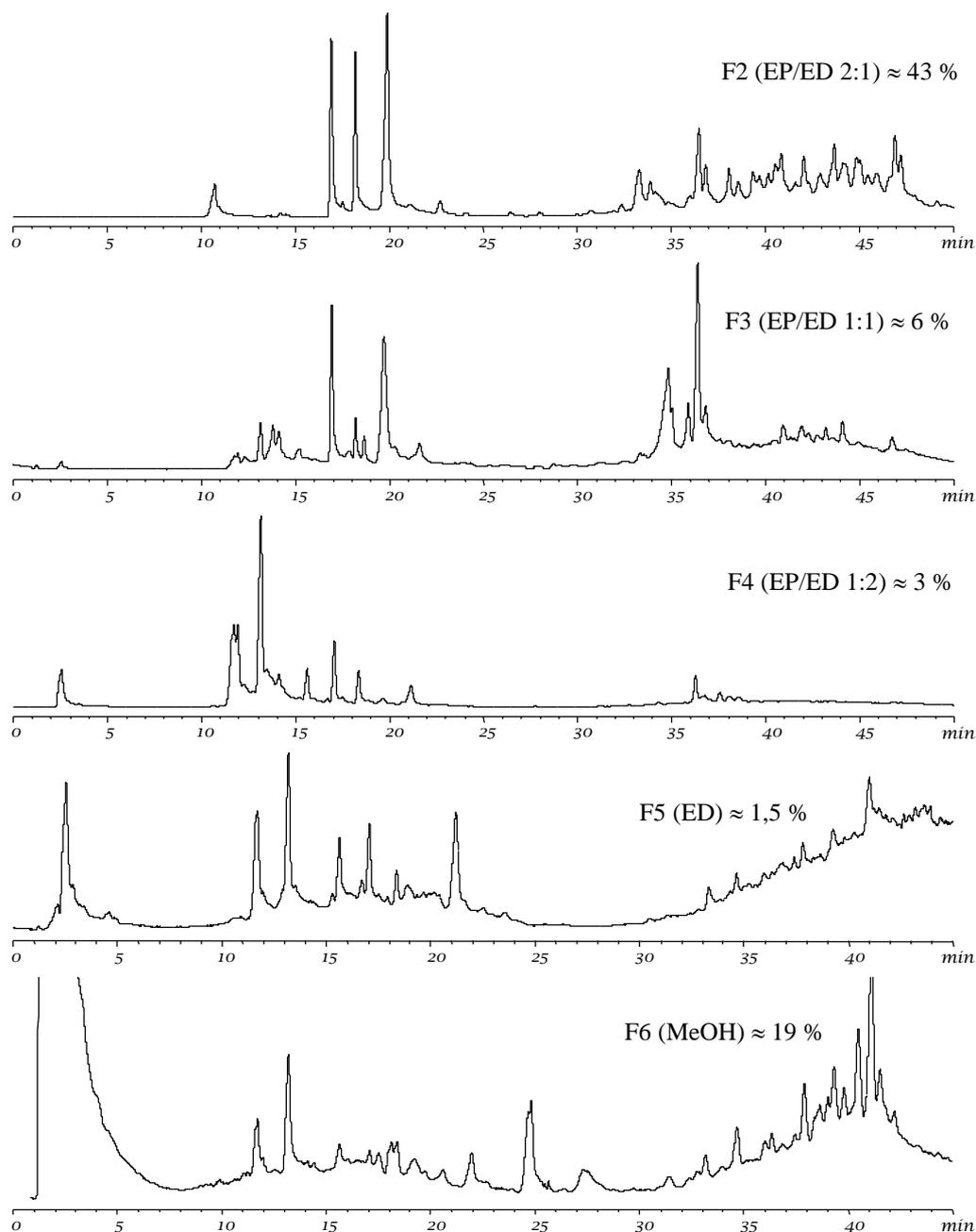


FIGURE 123 - CHROMATOGRAMMES DES FRACTIONS F2 A F6 PROVENANT DE L'EXTRAIT BRUT AU DICHLOROMETHANE

La fraction F2 a été fractionnée par chromatographie sous vide en phase inverse (C18) afin d'obtenir des sous-fractions de composition plus simple. Un total de neuf systèmes de solvants de polarité décroissante a été utilisé, ce qui a permis de récupérer neuf sous-fractions (Figure 124). La première est un rinçage à l'eau, les cinq suivantes sont constituées d'un mélange méthanol/eau avec des proportions de méthanol croissantes, la septième est uniquement constituée de méthanol, la huitième d'un mélange méthanol/dichlorométhane 50:50 et enfin la dernière est uniquement constituée de dichlorométhane.

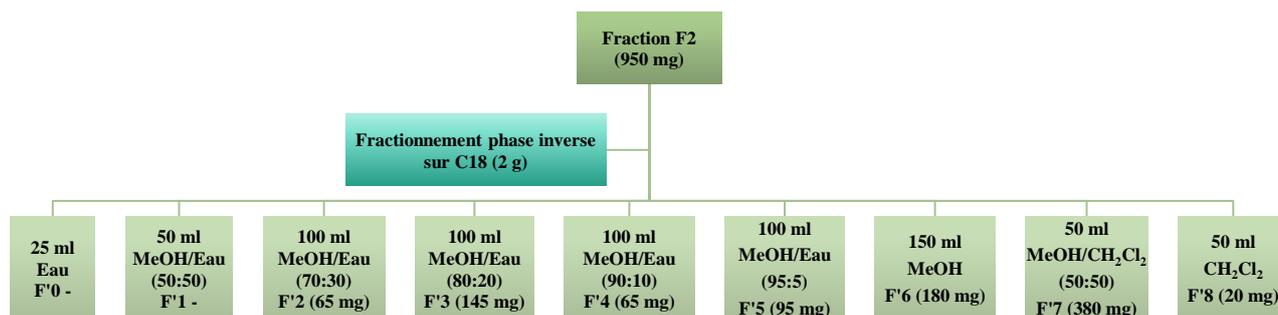


FIGURE 124 - FRACTIONNEMENT EN PHASE INVERSE DE LA FRACTION F2

Les cinq sous-fractions F'2 à F'8 ont été analysées par HPLC-UV-ELSD en phase inverse (C18), dans les mêmes conditions que la fraction F2, afin d'évaluer leur composition et leur complexité.

La fraction F'2 est principalement constituée du composé minoritaire éluant à 11 min. La fraction F'3 est principalement constituée des trois composés majoritaires à 17, 18 et 20 min. Enfin les autres fractions sont constituées des composés les plus apolaires.

III.3.1.4. TESTS BIOLOGIQUES DES FRACTIONS

III.3.1.4.1. CYTOTOXICITE

Les tests de cytotoxicité *in vitro* ont été réalisés dans les mêmes conditions que précédemment, cependant trois lignées ont été testées ici. Le gliome U373 utilisé précédemment, le carcinome du poumon A549 et le mélanome SKMEL28. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 35.

TABLEAU 35 - VALEURS D'IC₅₀ (µg/ml) POUR L'INHIBITION DE LA CROISSANCE CELLULAIRE *IN VITRO* DE DIFFERENTES LIGNEES CANCEREUSES PAR LES FRACTIONS F1 A F6

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
A549	>100	>100	27	61	50	41
SKMEL28	>100	>100	33	41	41	27
U373	>100	>100	27	54	45	27

Les fractions F1 et F2 n'ont pas montré d'activité aux concentrations testées. En revanche les fractions F3, F4, F5 et F6 ont montré une activité envers toutes les lignées, en particulier F3 et F6, où les valeurs d'IC₅₀ sont les plus basses.

Il est donc probable que les composés actifs se trouvent parmi les minoritaires entre 11 et 25 min, et non parmi les composés les moins polaires ni les 3 composés majoritaires.

Cependant les composés purs obtenus ci-après n'ont pas pu être testés pendant la durée de ces travaux. Ils devront donc être testés ultérieurement.

III.3.1.4.2. ACTIVITE ANTI-TYROSINASE

Les tests anti-tyrosinase *in vitro* ont été réalisés dans les mêmes conditions que précédemment.

Seule la fraction F4 a montré une inhibition de 65 %. Les composés purs obtenus à partir de cette fraction n'ont pas pu être testés pendant la durée de ces travaux. Ils devront donc être testés ultérieurement.

III.3.1.5. ETUDE DE LA SOUS-FRACTION F'4

La sous-fraction F'4 est uniquement constituée des trois composés majoritaires de l'extrait, éluant entre 17 et 20 min (environ 100 % d'acétonitrile). Cette sous-fraction a donc été analysée en RMN afin d'évaluer le type de structure présent (Figure 125).

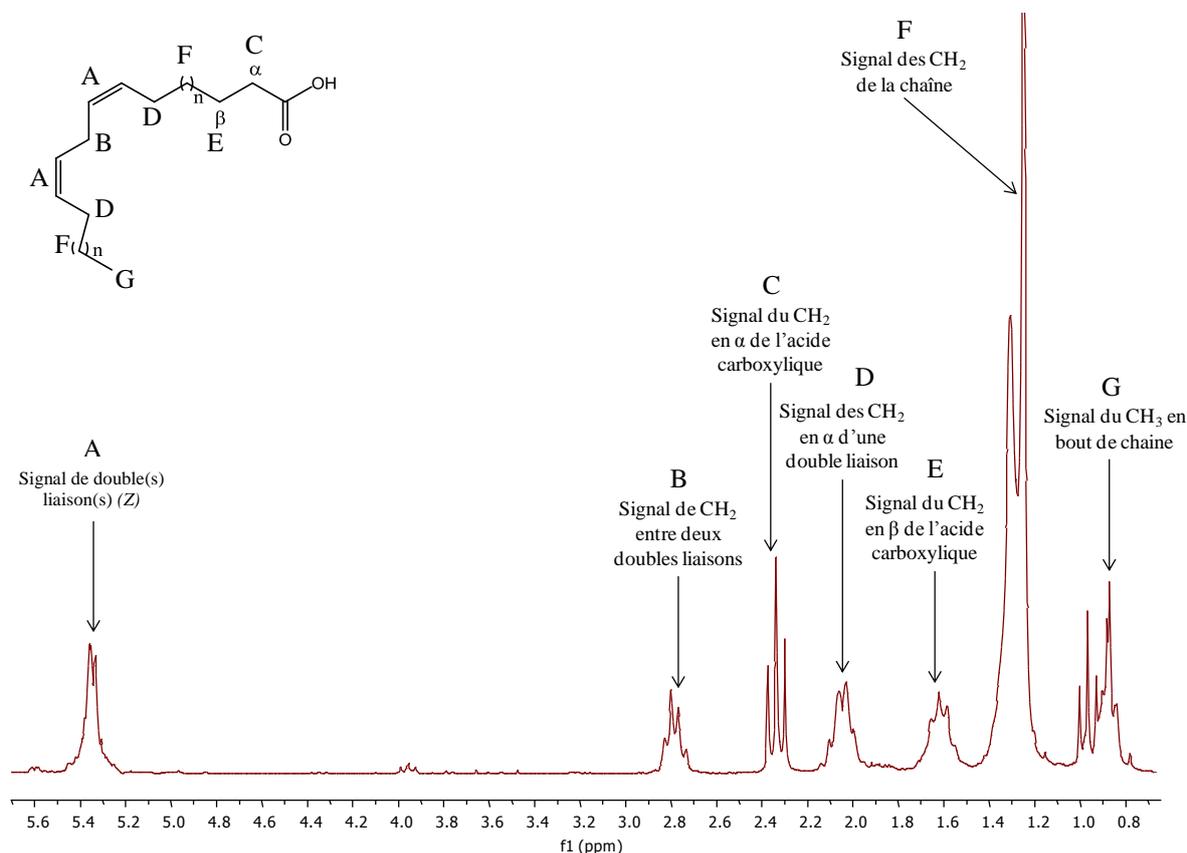


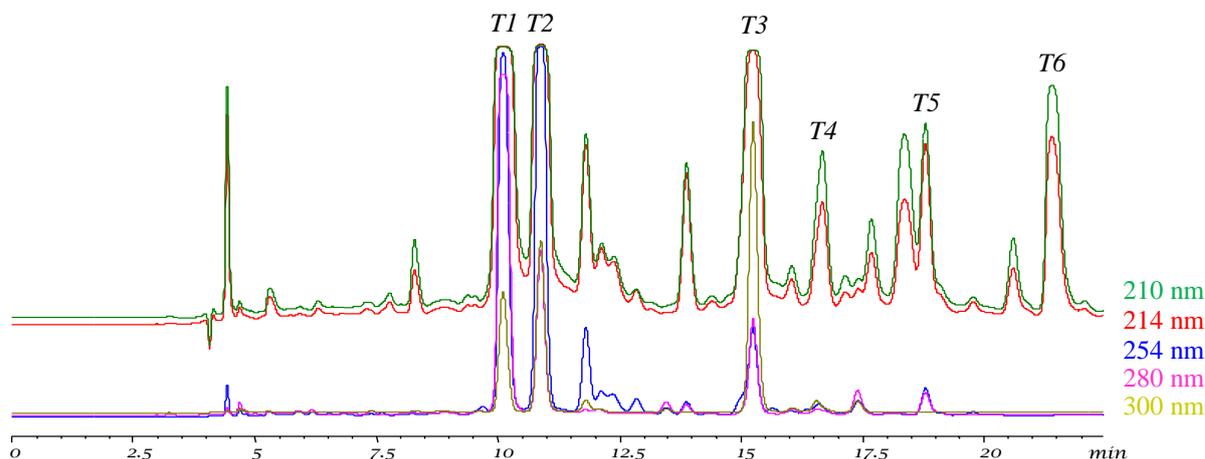
FIGURE 125 - SPECTRE RMN ¹H DE LA SOUS-FRACTION F'4

Le spectre RMN ¹H de ces trois composés indique des signaux correspondant à des acides gras insaturés. En effet, les signaux à 0,9 (G) correspondent aux CH₃ terminaux, les signaux à 1,3 (F) correspondent aux CH₂ de la chaîne, les signaux à 1,6 (E) correspondent aux CH₂ en β de l'acide carboxylique terminal, les signaux à 2,3 (C) correspondent aux CH₂ en α de l'acide carboxylique, les signaux à 5,4 (A) correspondent aux protons de doubles liaisons en (Z), les signaux à 2,0 (D) correspondent aux CH₂ en α des doubles liaisons et enfin les signaux à 2,8 (B) correspondent aux CH₂ entre deux doubles liaisons.

Ces composés présentant peu d'intérêt en termes d'activité biologique, leurs structures n'ont pas été identifiées avec précision.

III.3.1.6. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES COMPOSES DE LA SOUS-FRACTION F'3

Les composés majoritaires de la sous-fraction F'3 ont été isolés par HPLC semi-préparative en phase inverse (C18). Le suivi chromatographique ne pouvant pas être réalisé par ELSD, plusieurs longueurs d'ondes UV ont été choisies afin de repérer au mieux chaque composé (Figure 126).



Colonne C18, 250 × 10 mm, 5 µm, gradient Eau/MeCN/iPrOH, 5 min à 55 % MeCN, 70 % MeCN en 1 min, 100 % MeCN en 12 min, puis 5 min à 100 % MeCN, puis 20 % MeCN et 80 % iPrOH en 1 min, puis 5 min à 80 % iPrOH

FIGURE 126 - CHROMATOGRAMME DE LA FRACTION F'3

Des composés très minoritaires et/ou fortement co-élus entre eux n'ont pas pu être isolés en quantité suffisante. Ainsi les composés les plus minoritaires n'ont pas pu être identifiés. Cependant, un total de 6 composés a pu être isolé en quantité suffisante. Ils ont été nommés T1 à T6 et seront toujours identifiés comme tel par la suite.

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C du composé T1 indiquent des signaux correspondant à deux cycles benzéniques reliés entre eux par une fonction ester et un oxyméthylène. Le cycle directement relié à l'oxyméthylène est monosubstitué tandis que le cycle relié directement à la fonction ester est également lié à deux méthoxy en position 2 et 6. Cette structure correspond au 2,6-diméthoxybenzoate de benzyle (Figure 127), fréquent dans le règne végétal mais encore jamais identifié chez *S. virgaurea*.¹⁹² Ce composé a montré auparavant une activité spasmolytique et analgésique.^{193,194}

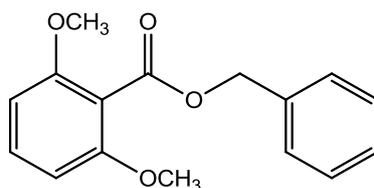


FIGURE 127 - STRUCTURE DU BENZYL 2,6-DIMETHOXYBENZOATE

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C du composé *T2* indiquent également des signaux correspondant à deux cycles benzéniques reliés entre eux par une fonction ester et un oxyméthylène. Le cycle directement relié à l'oxyméthylène est toujours monosubstitué tandis que le cycle relié directement à la fonction ester est lié à un hydroxy en position 2 et à un méthoxy en position 6. Cette structure correspond au 2-hydroxy-6-méthoxybenzoate de benzyle (Figure 128), également fréquent dans le règne végétal mais encore jamais identifié chez *S. virgaurea*.¹⁹⁵ Ce composé a montré auparavant une activité immunostimulante.¹⁹⁶

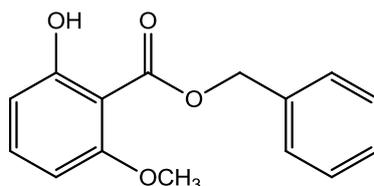
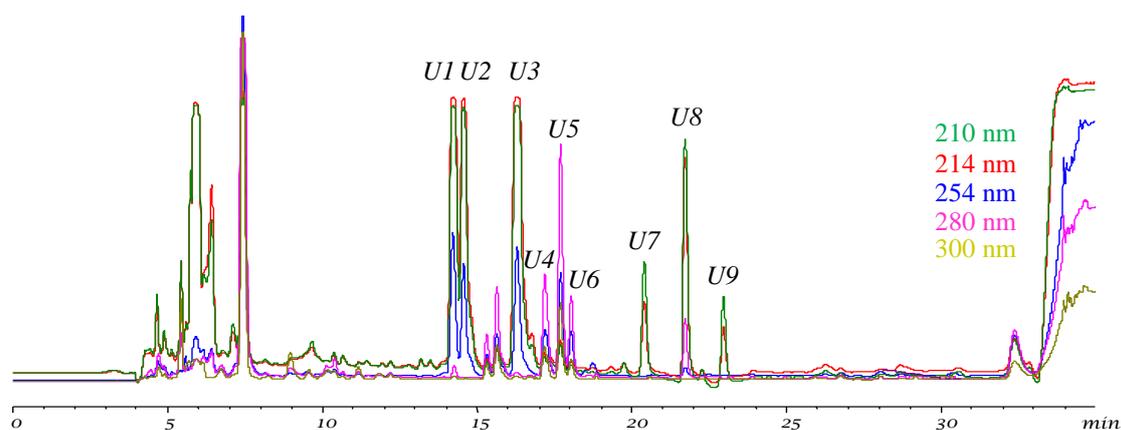


FIGURE 128 - STRUCTURE DU BENZYL 2-HYDROXY-6-METHOXYBENZOATE

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C des autres composés indiquent des signaux correspondant à des acides gras. Ces composés étant minoritaires et présentant peu d'intérêt en termes d'activité biologique, leurs structures n'ont pas été identifiées avec précision.

III.3.1.7. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES COMPOSES DE LA FRACTION F4

Les composés majoritaires de la fraction F4 ont été isolés par HPLC semi-préparative en phase inverse (C18). Le suivi chromatographique ne pouvant pas être réalisé par ELSD, plusieurs longueurs d'ondes UV ont été choisies afin de repérer au mieux chaque composé (Figure 129).



Colonne C18, 250 × 10 mm, 5 µm, gradient Eau/MeCN/IPrOH, 5 min à 55 % MeCN, 70 % MeCN en 1 min, 100 % MeCN en 12 min, puis 5 min à 100 % MeCN, puis 20 % MeCN et 80 % IPrOH en 1 min, puis 5 min à 80 % IPrOH

FIGURE 129 - CHROMATOGRAMME DE LA FRACTION F4

Des composés très minoritaires et fortement co-élus entre eux n'ont pas pu être isolés en quantité suffisante. Ainsi les composés les plus minoritaires n'ont pas pu être identifiés. Cependant, un total de 9 composés a pu être isolé en quantité suffisante. Ils ont été nommés U1 à U9 et seront toujours identifiés comme tel par la suite.

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C du composé U1 indiquent des signaux correspondant à un cycle benzénique relié à une double liaison orientée en (*E*) elle-même liée à un acide carboxylique. Cette structure correspond à l'acide cinnamique (Figure 130), encore jamais identifié chez *S. virgaurea*. L'acide cinnamique est un composé courant, possédant une faible toxicité et de nombreuses activités biologiques, telles que des activités antimicrobiennes et antioxydantes.¹⁹⁷

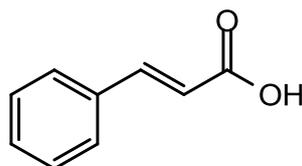


FIGURE 130 - STRUCTURE DE L'ACIDE CINNAMIQUE

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C des autres composés ont tous montré des signaux correspondant à des acides gras liés à des sucres. Ces structures correspondent donc à des glycolipides.

Ces composés étant minoritaires et présentant peu d'intérêt en termes d'activité biologique, leurs structures n'ont pas été identifiées avec précision.

L'extrait au dichlorométhane est donc principalement composé d'acides gras et dérivés, mais également de composés aromatiques, encore jamais identifiés chez *S. virgaurea* et potentiellement actifs. Ces composés sont probablement responsables de certaines activités de l'extrait, comme l'activité antimicrobienne.

Il sera cependant nécessaire d'identifier et surtout de tester davantage de composés de cet extrait, afin d'identifier les responsables des différentes activités. Une injection en GC-MS permettrait par exemple d'identifier les composés les plus volatils de cet extrait.

Pour compléter cette étude des composés hydrophobes et pour tenter de remplacer les solvants organiques toxiques comme le dichlorométhane ou l'hexane par des procédés d'extraction plus « vert », une extraction au CO_2 supercritique a également été réalisée. Le CO_2 supercritique correspond, en termes de polarité et de type de métabolites extraits, à l'hexane, au cyclohexane ou encore au dichlorométhane, selon la proportion de co-solvant utilisé (généralement du MeOH), mais il a l'avantage de ne pas rejeter de déchets ou très peu, et d'être beaucoup plus rapide.

III.3.2. L'EXTRAIT AU CO₂ SUPERCRITIQUE

III.3.2.1. EXTRACTION

Les parties aériennes fleuries de la plante ont été broyées finement et ont été extraites par un système d'extraction au CO₂ supercritique, avec 1 % de méthanol et une pression de 100 bars pendant 30 min à 50 °C.

L'extrait brut ainsi obtenu, de couleur jaune pâle, représente environ 0,1 % de la masse de matière sèche. Il a été analysé par HPLC-UV-ELSD avec une colonne C18 de 250 mm.

Le rendement est ici très faible, le CO₂ supercritique extrait uniquement les composés les plus hydrophobes, très minoritaires dans la plante. Le profil HPLC est semblable à celui de l'extrait au dichlorométhane, les trois acides gras sont toujours majoritaires. Cependant l'étude par HPLC et RMN de ces nombreux composés apolaires, minoritaires et fortement co-élus est longue et délicate. La plupart des composés extraits par CO₂ supercritique pouvant être analysés par chromatographie gazeuse, l'extrait a été analysé par GC-MS à l'aide d'une colonne apolaire (Figure 131).

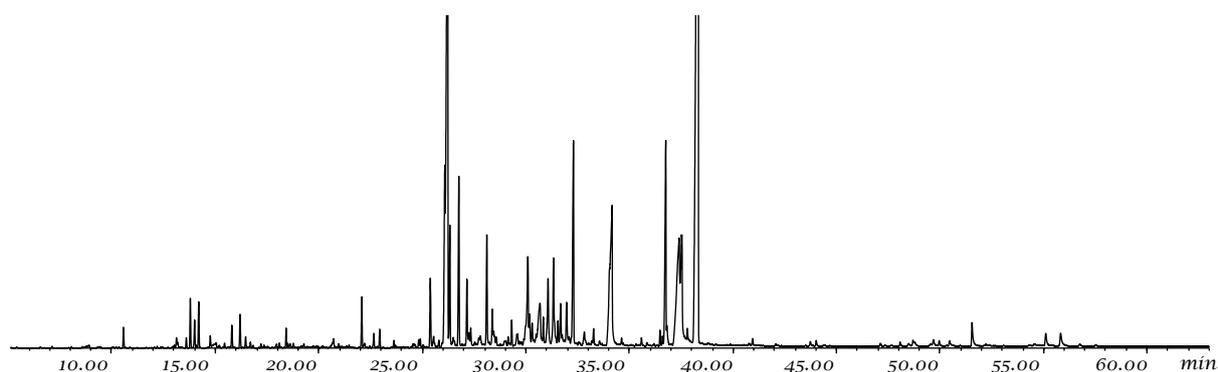


FIGURE 131 - CHROMATOGRAMME GC-MS DE L'EXTRAIT AU CO₂ SUPERCRITIQUE DE *S. VIRGAUREA ALPESTRIS*

De nombreux composés sont observés sur le chromatogramme ainsi obtenu. L'identification d'une partie des composés a pu être réalisée grâce au couplage avec la spectrométrie de masse.

III.3.2.2. IDENTIFICATION DES COMPOSES PAR GC-MS

Un total de 65 composés a pu être identifié par spectrométrie de masse et comparaison des indices de rétention avec la littérature (Tableau 36). Les pourcentages notés dans le tableau correspondent aux pourcentages obtenus par GC-MS par rapport à l'ensemble des composés détectés. Ils ne correspondent pas aux quantités réelles dans l'extrait mais permettent d'évaluer la proportion approximative.

La plupart sont des composés terpéniques, ils sont au nombre de 30, mono-, sesqui-, di- et triterpènes confondus, oxygénés ou non. Les plus nombreux sont les mono- et sesquiterpènes.

Une quinzaine de composés aromatiques (acides, alcools, aldéhydes, esters...) a également été identifiée. L'acide cinnamique et le 2,6-diméthoxybenzoate de benzyle par exemple, identifiés précédemment dans l'extrait au dichlorométhane, se retrouvent dans l'extrait au CO₂ supercritique.

Enfin, tout comme dans l'extrait au dichlorométhane, de nombreux acides gras et dérivés (alcools, esters) ont également été identifiés.

Parmi ces 65 composés, seuls 19 avaient été identifiés dans l'huile essentielle des parties aériennes,²⁶ principalement des monoterpènes et sesquiterpènes. Tous les composés plus lourds ou moins volatils présents dans l'extrait au CO₂ (di- et triterpènes, acides gras, esters...) sont difficilement extraits par hydrodistillation et donc ne se retrouvent pas dans l'huile essentielle. A l'inverse, de nombreux mono- et sesquiterpènes présents dans l'huile essentielle n'ont pas été retrouvés dans l'extrait au CO₂. Cela peut être dû à la méthode d'extraction et/ou à une variabilité au niveau de la matière première.

TABLEAU 36 - COMPOSES IDENTIFIES DANS L'EXTRAIT AU CO₂ SUPERCRITIQUE

Identification	IR	%	Notes olfactives ^{198,199}
<i>Acides carboxyliques</i>			
Acide 4-hydroxybutyrique	916	0,016	-
Acide hexanoïque	983	0,036	-
Acide 3-hexénoïque	1021	0,009	-
Acide benzoïque	1173	0,126	-
Acide octanoïque	1178	0,033	<i>sucré, fromage</i>
Acide benzèneacétique	1250	0,051	<i>sucré, miel</i>
Acide nonanoïque	1271	0,085	<i>vert, gras</i>
Acide décanoïque	1374	0,025	<i>gras, rance</i>
Acide cinnamique	1428	0,097	<i>miel</i>
Acide dodécanoïque	1564	0,267	-
Acide hexadécanoïque	1968	5,751	-
Acide linoléique	2144	5,148	-
Acide stéarique	2167	0,531	-
<i>Alcools</i>			
Alcool benzylique	1036	0,260	<i>sucré, floral</i>
2-Phényléthanol	1114	0,079	<i>miel, épices, rose, lilas</i>
9,12,15-Octadécatrién-1-ol	2152	3,635	-
<i>Aldéhydes</i>			
Benzaldéhyde	961	0,019	<i>amande, sucre cuit</i>
Vanilline	1398	0,050	<i>vanille</i>
<i>Cétone</i>			
Acétone de géranyle	1452	0,037	<i>magnolia, vert</i>
<i>Esters</i>			
Acétate de bornyle	1287	0,245	<i>camphré</i>
Benzoate d'isoamyle	1437	0,035	<i>sucré, fruité</i>
4-Méthoxysalicylate de méthyle	1445	0,212	-
Myristate de méthyle	1723	0,216	<i>miel</i>
Benzoate de benzyle	1767	2,325	<i>balsamique, huile, herbe</i>
Benzoate de 2-phényléthyle	1858	0,824	-
Salicylate de benzyle	1874	3,533	<i>légèrement floral, épicé, balsamique</i>
Palmitate de méthyle	1923	0,258	-
2-Méthoxybenzoate de benzyle	1993	0,124	-
Linoléate de méthyle	2094	0,208	-
9,12,15-Octadécatriénoate de méthyle	2100	0,140	-
Octanoate de méthyle	2125	0,062	<i>gras</i>
2,6-Diméthoxybenzoate de benzyle	2195	23,613	-

<i>Monoterpènes hydrocarbonés</i>			
α -Pinène	933	0,020	<i>pin, genièvre, térébenthine</i>
β -Pinène	976	0,017	<i>pin, résine, térébenthine</i>
<i>p</i> -Cymène	1025	0,017	<i>solvant, essence, citron</i>
Limonène	1029	0,014	<i>citron, menthe</i>
<i>Monoterpènes oxygénés</i>			
α -Campholénal	1127	0,126	<i>bois de santal</i>
<i>trans</i> -Pinocarvéol	1140	0,364	<i>floral</i>
<i>cis</i> -Verbénol	1142	0,035	-
<i>trans</i> -Verbénol	1146	0,563	-
<i>p</i> -Cymén-8-ol	1186	0,078	<i>floral, sucré, citron</i>
Myrténal	1197	0,315	<i>fraiche, herbeuse, épicée</i>
(-)-Verbénone	1210	0,420	<i>épicé, menthe, camphre</i>
(-)-Carvéol	1220	0,153	<i>cumin</i>
Carvone	1245	0,051	<i>cumin, menthe</i>
Pipériténone	1313	0,029	<i>mentholé, phénolique</i>
<i>trans-p</i> -Menth-6-én-2,8-diol	1379	0,072	-
<i>Sesquiterpènes hydrocarbonés</i>			
β -Caryophyllène	1422	0,670	<i>bois, épicé</i>
α -Humulène	1457	0,246	<i>bois</i>
Germacrène D	1484	0,113	<i>bois, épicé</i>
α -Muuroolène	1502	0,025	<i>bois</i>
β -Sesquiphéllandrène	1525	0,086	<i>bois</i>
<i>Sesquiterpènes oxygénés</i>			
Spathuléol	1587	3,221	<i>herbe, fruité</i>
Oxyde de caryophyllène	1592	11,993	<i>herbe, sucré, épicé</i>
Caryophylla-4(12),8(13)-dién-5-ol	1642	0,313	-
Acide <i>iso</i> -zizanoïque	1795	1,594	-
Acide zizanoïque	1814	1,524	-
<i>Diterpène oxygéné</i>			
Phytol	2113	0,379	<i>fleuri</i>
<i>Triterpènes</i>			
β -Amyrine	3120	0,339	-
α -Amyrine	3159	0,392	-
<i>Composés divers</i>			
Maltol	1112	0,135	<i>caramel</i>
Benzothiazole	1224	0,025	<i>soufré</i>
<i>m</i> -Guaiacol	1227	0,090	<i>fumé, sucré, phénolique, vert, gras</i>
Dihydroactinidiolide	1533	0,117	<i>sucré</i>

III.4. CONCLUSION

Dans le cadre du développement du bain de bouche contre les candidoses et de la mise en place d'une filière, la composition phytochimique globale de différents extraits de *S. virgaurea alpestris* a été étudiée et différents tests biologiques ont été effectués. Le premier objectif était d'identifier la composition de l'extrait polaire, qui sera intégré dans la composition du bain de bouche, afin de faciliter les étapes de formulation. Le second objectif était de valoriser la plante dans son ensemble, pour différentes applications, afin de faciliter la mise en place de la filière.

Ainsi une dizaine de composés aromatiques ont été identifiés dans l'extrait polaire, dont trois nouveaux acides octulosoniques, encore jamais identifiés dans la nature et trois composés phénoliques jamais identifiés chez *S. virgaurea*. Par ailleurs une fraction polysaccharidique majoritaire a également été détectée, ainsi que l'ensemble des saponines caractérisées dans le Chapitre I.

Différents tests biologiques ont été mis en place pour valoriser la plante dans d'autres domaines, tels que la pharmaceutique ou la cosmétique. L'extrait brut a montré un potentiel antioxydant prometteur, il sera donc nécessaire de poursuivre les études dans cette voie. De plus, la fraction des composés phénoliques a montré une activité anti-tyrosinase, les composés purs devront donc être testés afin d'identifier les structures responsables de cette inhibition. Ces deux types d'activité seraient particulièrement intéressants pour une utilisation en cosmétique, pour des soins correcteurs antitaches par exemple, qui comportent généralement des actifs anti-tyrosinase *et* antioxydants. Par ailleurs, les saponines ont montré une activité inhibitrice de plusieurs lignées de cellules cancéreuses, des tests complémentaires sont actuellement en cours afin d'identifier le mécanisme d'action et la toxicité avant d'envisager une application.

D'autre part, deux extraits apolaires ont également été étudiés. Les composés apolaires sont en faible proportion dans la plante mais ils deviendront un sous-produit lorsque les composés polaires seront extraits pour la formulation du bain de bouche. Il est donc important de valoriser la matière végétale dans son ensemble. Ainsi, des composés aromatiques ont été identifiés dans ces deux extraits, aux côtés de trois acides gras majoritaires et de nombreux composés terpéniques. L'extrait au dichlorométhane a également montré un potentiel antioxydant et une activité inhibitrice de la tyrosinase et de cellules cancéreuses prometteurs, une recherche plus approfondie des actifs devra ainsi être effectuée. Un nombre limité de tests ayant pu être réalisé pendant ces travaux, il sera nécessaire de mettre en place ultérieurement un criblage plus étendu en fonction du type de composés identifiés.

CONCLUSION GENERALE

Dans le but de valoriser la biodiversité végétale des Alpes-Maritimes et dans le cadre de la lutte contre les pathologies bucco-dentaires, une plante commune de cette région, *S. virgaurea*, a été sélectionnée pour son potentiel inhibiteur de la conversion levure-hyphes de *C. albicans*.

Le premier objectif de ces travaux de Thèse était d'identifier les actifs responsables de cette activité. Grâce à un fractionnement bioguidé, une famille de saponines a été identifiée comme étant particulièrement active contre la forme filamenteuse de *C. albicans*. Un total de onze saponines a été identifié, dont cinq nouvellement caractérisées lors de cette étude. La majorité possède un squelette acide polygalactique, jusqu'ici caractéristique de *S. virgaurea*, mais l'une d'entre elle a présenté un aglycone acide zanhique, encore jamais identifié dans cette plante. Les tests sur les composés purifiés ont permis de confirmer la responsabilité des saponines dans cette activité inhibitrice. La plupart ont en effet montré une inhibition totale ou partielle. A l'inverse d'autres n'ont pas présenté d'inhibition aux concentrations testées, en particulier celles possédant une chaîne hydroxybutyrate. Des études avaient été réalisées dans le passé sur l'activité des saponines contre *C. albicans* mais l'inhibition des saponines envers la conversion levure-hyphes, un des facteurs clés de virulence, n'avait encore jamais été étudiée. Le calcul d'un pharmacophore, pour tenter d'identifier une éventuelle relation structure-activité, n'a pas donné de résultats prédictifs. Une étude de relation structure-activité à plus grande échelle permettrait d'obtenir davantage de résultats. L'extrait brut pourra ainsi être utilisé comme actif dans la composition d'un traitement contre *C. albicans* de type bain de bouche.

Dans un objectif de valorisation « durable », la mise en place d'une filière dans les Alpes-Maritimes a été initiée. Le second objectif de cette Thèse était ainsi d'étudier la variabilité phytochimique de *S. virgaurea* selon différents paramètres afin d'avoir une meilleure connaissance du comportement des actifs de la plante. Une étude comparative centrée sur la famille des saponines a été effectuée sur plusieurs populations de la vallée de la Tinée. Afin de réaliser cette étude, une méthode rapide de dosage des saponines totales par HPLC-ELSD a été développée et validée. Cette étude comparative a permis de mettre en évidence certains facteurs de variation. Le taux de saponines totales varie ainsi principalement en fonction de la partie de la plante considérée et en fonction de l'année de récolte. Une autre méthode rapide de dosage des saponines totales a également été mise en place par HPTLC, celle-ci s'est avérée légèrement moins précise mais plus adaptée à l'étude de nombreux échantillons, utile

pour la mise en place de la filière par exemple. Cependant, toutes les saponines n'étant pas actives, une troisième méthode de dosage a été développée par HPLC-ELSD en équivalent routine, dans le but de doser toutes les saponines majoritaires séparément et ainsi observer d'éventuelles différences dans le profil de cette famille. Cette étude comparative a permis de mettre en évidence d'autres facteurs de variation. Le profil varie ainsi principalement selon la localisation géographique et en particulier selon le type de sol. Les extraits sont cependant tous actifs quelle que soit la zone de récolte ce qui permettra d'étendre la zone de culture sans se limiter à la vallée de la Tinée et au parc du Mercantour.

Aucune différence phytochimique n'ayant été observée entre la sous-espèce *virgaurea* et la sous-espèce *alpestris*, une étude de génétique des populations a été réalisée dans le but de vérifier l'existence d'une réelle différence génétique entre ces deux sous-espèces. Cette étude n'a montré aucune différence génétique entre *virgaurea* et *alpestris*. Les différences phénotypiques existant entre ces deux sous-espèces sont donc probablement davantage dues à l'influence environnementale et non pas à des potentialités génétiques différentes.

Enfin, dans le cadre du développement du traitement bucco-dentaire et de la mise en place d'une filière, l'objectif était d'identifier dans un premier temps la composition de l'extrait polaire, qui sera intégré dans la composition du bain de bouche, afin de faciliter les étapes de formulation. Dans un second temps le but était de valoriser la plante dans son ensemble, pour différentes applications, afin de faciliter la mise en place de la filière. La composition phytochimique globale de différents extraits de *S. virgaurea alpestris* a ainsi été étudiée et différents tests biologiques ont été effectués. Une dizaine de composés aromatiques ont été identifiés dans l'extrait polaire, dont trois nouveaux acides octulosoniques, encore jamais identifiés dans la nature et trois composés phénoliques jamais identifiés chez *S. virgaurea*. L'extrait brut et en particulier la fraction phénolique a montré des activités antioxydante et anti-tyrosinase prometteuses. Par ailleurs la fraction des saponines ainsi que deux saponines pures ont montré une activité inhibitrice de plusieurs lignées cancéreuses, des tests complémentaires sont actuellement en cours afin d'identifier leur mécanisme d'action et leur toxicité avant d'envisager une application. Les extraits apolaires ont eux aussi montré des activités antioxydante, anti-tyrosinase et inhibitrice de plusieurs lignées cancéreuses. Des composés aromatiques ont été identifiés aux côtés de trois acides gras majoritaires et de nombreux composés terpéniques. Une recherche plus approfondie des composés responsables de ces activités devra être effectuée. De plus, un nombre limité de tests ayant pu être réalisés pendant ces travaux, il sera nécessaire de mettre en place ultérieurement un criblage plus étendu afin de déterminer d'autres applications éventuelles.

Ces travaux de valorisation de *S. virgaurea* et d'initiation d'une filière innovante furent ainsi le point de départ d'un projet plus large qui permettrait la valorisation de nombreuses autres plantes méditerranéennes dans différents domaines. Cependant certains points importants restent encore à évaluer avant d'envisager la création de la filière, comme le choix entre la cueillette et la culture, selon les volumes requis. La cueillette peut en effet suffire si les demandes ne dépassent pas une certaine quantité à définir, mais elle devra être remplacée par la culture si les demandes augmentent, pour ne pas surexploiter les zones sauvages. Cependant, le coût des terrains et de la main d'œuvre dans la région Provence-Alpes-Côte-d'Azur peut poser des problèmes de rentabilité et de compétitivité par rapport à d'autres producteurs comme les pays de l'Europe de l'Est. Une étude précise des coûts engendrés pour la cueillette et/ou la culture de cette plante devra donc être réalisées et comparée au marché actuel, en prenant également en compte la qualité de la matière végétale.



PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I - MATIERES PREMIERES NATURELLES UTILISEES

Les parties aériennes de *S. virgaurea alpestris* et *S. virgaurea virgaurea* ont été récoltées dans différentes zones de la vallée de la Tinée (Figure 132), à différentes altitudes, chaque année de 2008 à 2012, pendant la période de floraison (période estivale). Sauf mention contraire elles ont été séchées à l'obscurité à température ambiante. Les échantillons ont été identifiés par Jean-Louis Polidori (botaniste). Un spécimen pour chaque sous-espèce a été déposé au jardin botanique de Nice (n° C-3173 pour *virgaurea* et n° C-3174 pour *alpestris*). Le détail des différents lots est présenté dans le Tableau 37. Les fleurs grainant automatiquement après récolte, les fleurs et les graines ne pourront pas être distingués.

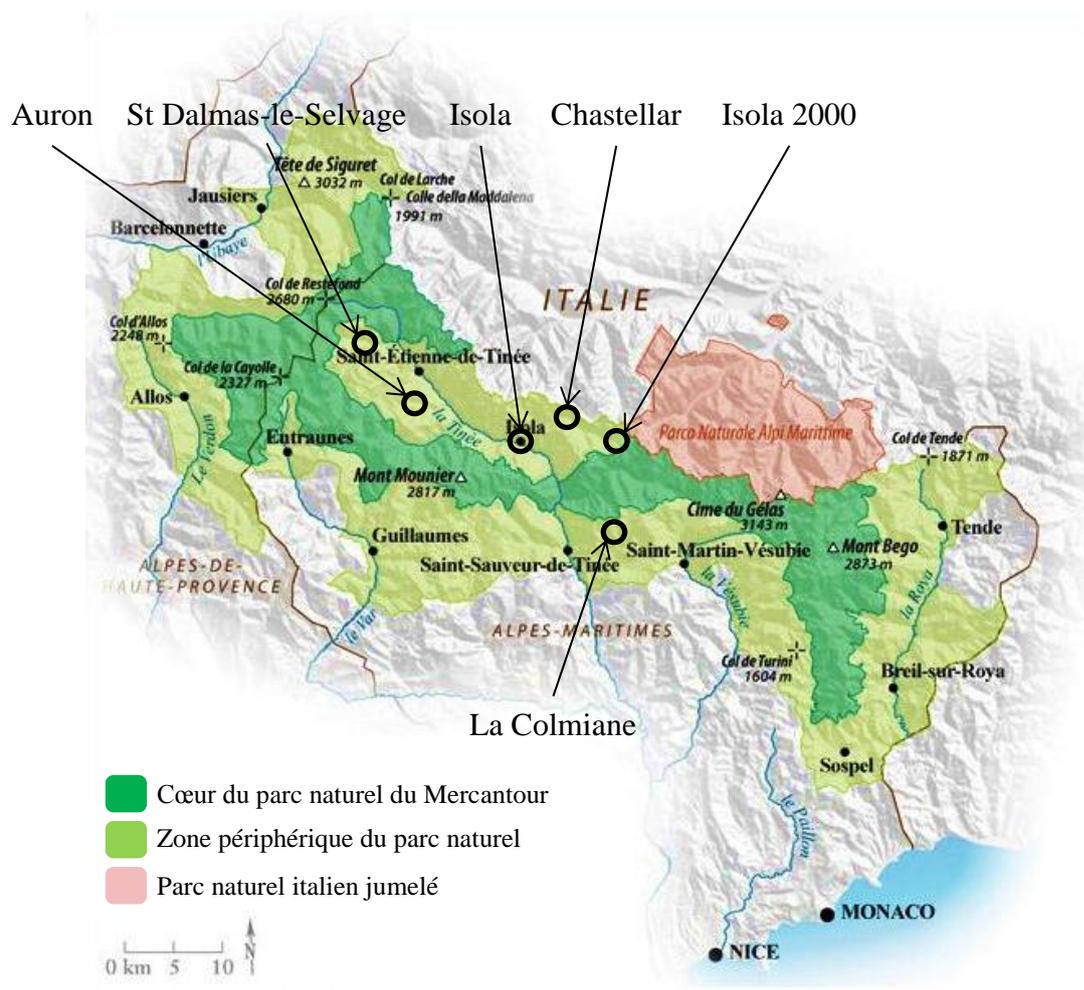


FIGURE 132 - CARTE DE LA ZONE DE RECOLTE DE *S. VIRGAUREA* (PARC NATUREL DU MERCANTOUR)¹⁶⁰

TABLEAU 37 - DETAILS SUR LES DIFFERENTES POPULATIONS DE *S. VIRGAUREA*

Espèce récoltée	Année de récolte	Lieu de récolte	Altitude	
Etude de la variabilité géographique et annuelle				
<i>S. virgaurea alpestris</i>	2008	Isola 2000 Les Roubines	2200 m	
		St Dalmas le Selvage	1500 m	
	2009	Isola 2000 Les Roubines	2200 m	
		Auron	1600 m	
	2010	Isola 2000 Les Roubines	2200 m	
		Auron	1600 m	
	2011	Isola 2000 Les Roubines	2200 m	
		Auron	1600 m	
		St Dalmas le Selvage	1500 m	
	<i>S. virgaurea virgaurea</i>	2008	Auron	1600 m
		2009	La Colmiane	1500 m
		2010	La Colmiane	1500 m
Chastellares			1650 m	
2011		La Colmiane	1500 m	
		Auron	1600 m	
		Chastellares	1650 m	
Etude de la variabilité saisonnière				
<i>S. virgaurea alpestris</i>	2011 Phase A Début de floraison/Hampe florale formées	Isola 2000 Les Roubines	2200 m	
	2011 Phase B Pleine floraison	Isola 2000 Les Roubines	2200 m	
	2011 Phase C Fin de floraison	Isola 2000 Les Roubines	2200 m	
Etude des cultures expérimentales/boutures				

<i>S. virgaurea alpestris</i>	2010	Isola 2000 Les Roubines (bouture provenant de la même zone)	2200 m
	2011	Isola 2000 Les Roubines (bouture provenant de la même zone)	2200 m
		Pépinière Isola village (bouture provenant d'Isola 2000 Les Roubines)	875 m
		Pépinière Isola village (bouture provenant d'Auron)	875 m
		St Dalmas le Selvage (bouture provenant d'Isola 2000 Les Roubines)	1500 m
<i>S. virgaurea virgaurea</i>	2010	Pépinière Isola village (bouture provenant de La Colmiane)	875 m
	2011	Pépinière Isola village (bouture provenant de La Colmiane)	875 m
		St Dalmas le Selvage (bouture provenant de La Colmiane)	1500 m
Etude du mode de conservation			
<i>S. virgaurea alpestris</i> (séchage naturel à l'obscurité)	2011	Isola 2000 Les Roubines	2200 m
<i>S. virgaurea alpestris</i> (extraction à l'état frais)	2011	Isola 2000 Les Roubines	2200 m
<i>S. virgaurea alpestris</i> (congélation à -18 °C et extraction juste après décongélation)	2008	Isola 2000 Les Roubines	2200 m
Etude des différents organes			
<i>S. virgaurea alpestris</i> (Fleurs/Graines)	2011	Isola 2000 Les Roubines	2200 m
<i>S. virgaurea alpestris</i> (Feuilles)	2011	Isola 2000 Les Roubines	2200 m
<i>S. virgaurea alpestris</i> (Tiges)	2011	Isola 2000 Les Roubines	2200 m
<i>S. virgaurea alpestris</i> (Racines/Rhizomes)	2008	Isola 2000 Les Roubines	2200 m

CHAPITRE II - REACTIFS ET SOLVANTS

Les produits chimiques et solvants ont été achetés chez Sigma-Aldrich (*St. Quentin Fallavier, France*), VWR Prolabo (*Fontenay-sous-bois, France*) ou Eurisotop (*Saint Aubin, France*).

Les solvants utilisés pour la chromatographie liquide haute performance (HPLC) sont des solvants de grade HPLC utilisés tels quels pour des analyses directes ou des préparations de solutions d'étalonnage. Les autres solvants sont préalablement distillés et séchés si nécessaire suivant les recommandations de la littérature²⁰⁰.

Les réactifs sont commerciaux et utilisés sans purification supplémentaire.

Les fractionnements ont été effectués par chromatographie liquide sur colonne de gel de silice greffée C18 (*Polygoprep C18, 60-50 µm, Macherey-Nagel*) ou gel de silice non greffée (*Geduran Si 60, 40-63 µm, Merck*).

CHAPITRE III - APPAREILLAGE

III.1. HPLC-UV-ELSD

Toutes les analyses HPLC et les purifications (HPLC semi-preparative) ont été réalisées avec un système Agilent 1200 équipé d'un détecteur UV DAD et d'un ELSD Alltech 3300. Deux colonnes analytiques Luna C18 (*Phenomenex, 250 x 4,6 mm ; 5 µm et 150 x 4,6 mm ; 5 µm*), une colonne analytique Synergi Fusion-RP (*Phenomenex 250 x 4,6 mm ; 4 µm*) et une colonne semi-préparative Luna C18 (*Phenomenex, 250 x 10 mm ; 5 µm*) ont été utilisées.

L'acétonitrile, l'eau et l'isopropanol, de grade HPLC (*Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France*), ont été acidifiés par 0,1 % d'acide formique.

L'ELSD est paramétré dans les conditions suivantes :

Température 40 °C

Débit gazeux 1,5 l/min

Gain 1 (sauf mention contraire)

III.2. HPTLC

Les analyses HPTLC ont été réalisées avec un système HPTLC CAMAG (*Muttenz, Suisse*), équipé d'un passeur d'échantillons automatique (ATS 4), d'une chambre de développement automatique ADC2 avec contrôle d'humidité, d'un visualiseur et d'un scanner.

Les plaques utilisées sont des plaques HPTLC en verre recouvertes d'une couche de 0,25 mm de gel de silice 60 F254, 20×10 cm (*Merck, Allemagne*).

III.3. HRMS

Les analyses des masses exactes des saponines *S1* et *S2* ont été effectuées avec un spectromètre de masse QStar Elite (*Applied Biosystems SCIEX*) équipé d'une source d'ionisation à pression atmosphérique (API) assistée pneumatiquement.

Les échantillons ont été ionisés en mode electrospray positif dans les conditions suivantes :

Tension electrospray (ISV) 5500 V

Tension d'orifice (OR) 50 V

Pression du gaz de nébulisation (air) 20 Psi

Les spectres de masse haute résolution ont été obtenus avec un analyseur temps de vol (TOF). Les mesures de masse exacte ont été effectuées en triplicat avec un double étalonnage interne.

Les analyses des masses exactes des autres saponines ont été effectuées avec un spectromètre de masse SYNAPT G2 HDMS (*Waters, UK*) équipé d'une source d'ionisation à pression atmosphérique (API) assistée pneumatiquement. Les échantillons ont été ionisés en mode electrospray positif dans les conditions suivantes :

Tension electrospray (ISV) 2.8 kV

Tension d'orifice (OR) 70 V

Débit du gaz de nébulisation (azote) 800 l/h

Les spectres de masse haute résolution ont été obtenus avec un analyseur temps de vol (TOF). Les mesures de masse exacte ont été effectuées en triplicat avec un double étalonnage interne.

Les analyses des masses exactes des acides octulosoniques ont été effectuées avec un système ACQUITY UPLC[®]/Xevo[™] G2 QToF (*Waters, UK*) équipé d'une colonne ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ (2.5 × 100 mm, 1.7 μm).

Les échantillons ont été ionisés en mode electrospray négatif. Les spectres de masse haute résolution ont été obtenus avec un analyseur temps de vol (TOF). L'étalonnage a été effectué avec la Leucine-enkephalin.

III.4. GC-MS

Les analyses GC-MS ont été réalisées sur un chromatographe Agilent 6890N équipé d'un spectromètre de masse Agilent 5973N sur colonne capillaire HP5-MS (*polydiméthylsiloxane, 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm ; Agilent*).

III.5. RMN

Les analyses des saponines ont été réalisées sur un spectromètre BRUKER Avance DRX-500 (aimant de 11,75 teslas), muni d'une cryosonde (sonde à antennes refroidies). Il s'agit d'une sonde triple résonance TXI 500 MHz inverse ¹H-¹³C/¹⁵N de diamètre de 5 mm et de gradient Z.

Les autres analyses ont été réalisées sur un autre spectromètre BRUKER Avance DRX-500. La sonde utilisée est également une sonde triple résonance TXI 500 MHz inverse ¹H-¹³C/¹⁵N de diamètre de 5 mm et de gradient Z mais sans refroidissement.

Les spectres ont été calibrés en référence au signal du solvant deutéré correspondant (pyridine *d*₅, DMSO *d*₆, CDCl₃, MeOH *d*₄).

Les expériences 1D ¹H et ¹³C ont été réalisées, ainsi que les expériences 2D COSY, HSQC, HMBC, NOESY (ou ROESY) et HSQC-TOCSY.

III.6. POUVOIR ROTATOIRE

Les mesures de pouvoir rotatoire ont été réalisées avec un polarimètre JASCO P2000 équipé d'une cellule de 1 ml (2.5 mm de diamètre interne et 100 mm de longueur) à 20 °C. Un blanc a été réalisé avant chaque mesure avec le solvant utilisé pour la dilution de l'échantillon (méthanol ou méthanol/eau). Le pouvoir rotatoire spécifique [α]_D a été calculé selon la loi de Biot.

CHAPITRE IV - CONDITIONS OPERATOIRES

IV.1. CARACTERISATION PHYTOCHIMIQUE DE *S. VIRGAUREA* : ETUDE DES SAPONINES

IV.1.1. EXTRACTION

L'ensemble des extractions effectuées dans le but de caractériser les saponines a été réalisé avec le protocole suivant :

Les sommités fleuries ont été broyées très finement à l'aide d'un blender à puissance maximale pendant 1 à 2 minutes.

Une masse équivalente à 25 g de poudre de plante a été extraite avec 250 ml d'eau distillée dans un erlenmeyer placé dans un extracteur à ultrasons REUS (*Contes, France*) pendant 4 h, constamment réfrigéré à 5 °C et agité.

Le mélange a ensuite été filtré sur Büchner, le filtrat a été conservé et la matière végétale extraite à nouveau avec 250 ml d'eau distillée, dans les mêmes conditions. Une nouvelle filtration et une mise en commun des deux filtrats a permis d'obtenir un extrait total brun foncé. Cet extrait a ensuite été lyophilisé afin d'accéder à sa masse ($5 \pm 0,6$ g) et au rendement d'extraction ($20 \pm 2,5$ %).

Conditions analytiques

Les extraits bruts ont été analysés par HPLC (appareil, colonnes et solvants décrit en III.1) avec la méthode suivante :

Eluants Eau (A) / Acétonitrile (B) / Isopropanol (C)

Débit 1 ml/min

Volume

d'injection 20 µl

Gradient 0-5 min 15 % B et 85 % A ; 5-35 min 15-55 % B ;

35-40 min 55-100 % B ; 40-41 min 100 % B ;

41-42 min 100-60 % B et 0-40 % C ; 42-47 min 40 % C ;

47-49 min 40-0 % C, 60-15 % B et 0-85 % A

Gain ELSD 1

IV.1.2. FRACTIONNEMENT

L'ensemble des fractionnements effectués dans le but de caractériser les saponines a été réalisé avec le protocole suivant :

L'extrait brut a été repris dans 20 ml d'eau distillée et soumis à un fractionnement par chromatographie sous vide (VLC)¹³⁷ en phase inverse (C18, 50 g). Après un rinçage à l'eau (fraction F0), 4 systèmes de solvants de polarité décroissante ont été utilisés :

MeOH/Eau 1:2 (180 ml) fraction F1 (740 ± 150 mg)

MeOH/Eau 1:1 (180 ml) fraction F2 (715 ± 100 mg)

MeOH/Eau 2:1 (180 ml) fraction F3 (494 ± 80 mg)

MeOH (180 ml) fraction F4 (102 ± 50 mg)

Pour chaque fraction, le solvant a été évaporé sous vide, le résidu a été repris dans de l'eau, congelé à l'azote liquide et lyophilisé. La pesée a été faite juste après lyophilisation.

Conditions analytiques

Les fractions ont été analysées par HPLC (appareil, colonnes et solvants décrit en III.1) avec la méthode suivante :

Eluants Eau (A) / Acétonitrile (B) / Isopropanol (C)

Débit 1 ml/min

Volume

d'injection 20 µl

Gradient 0-5 min 15 % B et 85 % A ; 5-35 min 15-55 % B ;

35-40 min 55-100 % B ; 40-41 min 100 % B ;

41-42 min 100-60 % B et 0-40 % C ; 42-47 min 40 % C ;

47-49 min 40-0 % C, 60-15 % B et 0-85 % A

Gain ELSD 1

IV.1.3. ISOLEMENT

Les fractions F3 et F4 ont été rassemblées, reprises dans un mélange méthanol/eau 1:1 (50 mg/ml) et les composés majoritaires ont été isolés par HPLC semi-préparative (appareil, colonne et solvants décrit en III.1) dans les conditions décrites ci-dessous. Le suivi chromatographique a été réalisé sans ELSD, uniquement avec le détecteur UV-DAD.

Conditions préparatives

Eluants Eau (A) / Acétonitrile (B) / Isopropanol (C)

Débit 3 ml/min

Volume d'injection 100 µl

Gradient 0-5 min 30 % B et 70 % A ; 5-40 min 30-45 % B ;
40-41 min 45-100 % B ; 41-42 min 100 % B ;
42-43 min 100-60 % B et 0-40 % C ; 43-48 min 40 % C ;
48-50 min 60-30 % B et 0-70 % A

λ UV 205, 210, 214, 254 et 280 nm

Une purification supplémentaire a été réalisée sur certains composés à l'aide d'une colonne RP-Fusion (4,6 × 250 mm) et avec un gradient optimisé pour chaque composé, afin d'éliminer le maximum de composés minoritaires co-élus :

Eluants Eau (A) / Acétonitrile (B) / Isopropanol (C)

Débit 0,8 ml/min

Volume d'injection 100 µl

Gradients 0-5 min 27 % B et 73 % A ; 5-40 min 27-35 % B ;

S1 et S2 40-41 min 35-100 % B ; 41-42 min 100 % B

S6, S7 et S8 0-5 min 33 % B et 67 % A ; 5-40 min 33-37 % B ;
40-41 min 37-100 % B ; 41-42 min 100 % B

S9 et S10 0-5 min 37 % B et 63 % A ; 5-40 min 37-41 % B ;
40-41 min 41-100 % B ; 41-42 min 100 % B

S11 0-5 min 37 % B et 63 % A ; 5-40 min 37-40 % B ;
40-41 min 40-100 % B ; 41-42 min 100 % B

IV.1.4. CARACTERISATION

IV.1.4.1. COMPOSE *S1*

Les signaux RMN du composé *S1* ne correspondent à aucun composé connu. Les caractéristiques de ce dernier sont décrites ci-après :

Forme Solide amorphe blanc cassé

Formule brute C₇₀H₁₁₄O₃₆

Pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20} = -26,9$ (c 0,65 ; MeOH)

UV λ_{\max} 195 nm

RMN ¹H et ¹³C (Pyridine *d*₅, 500 MHz) Tableau 38, Tableau 39 et Figure 133 à Figure 144

HRMS $[M+2Na]^{2+}$ *m/z* 788,3438 ; $\Delta = 0,1$ ppm (Figure 145)

(calculé pour C₇₀H₁₁₄O₃₆, **1530,7090**)

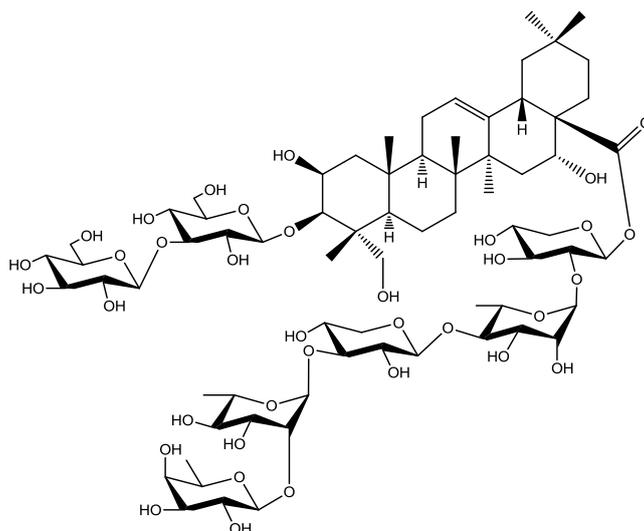


TABLEAU 38 - ATTRIBUTION DES SIGNAUX RMN ¹³C ET ¹H (J EN Hz) ET CORRELATIONS 2D DE LA PARTIE AGLYCONE DU COMPOSE SI (PYRIDINE d₅, 500 MHz)

N°	δ _C	δ _H	Mult. (J, Hz)		¹ H- ¹ H COSY	¹ H- ¹³ C HMBC	ROESY
1	44,5	1,27 2,28	m m	CH ₂	Agl-1b, 2 Agl-1a	Agl-25	Agl-1b, 2 Agl-1a, 2, 16
2	70,9	4,79	m	CH	Agl-1a, b, 3		Agl-1a, b, 3
3	83,4	4,33	m	CH	Agl-2	Agl-4, 24, Glc-1	Agl-2, 5
4	43,2	-	-	Cq	-		-
5	48,1	1,81	m	CH	Agl-6a	Agl-24, 25	Agl-3
6	18,5	1,63 1,89	m m	CH ₂	Agl-5, 6b Agl-6a		
7	33,4	1,70 1,82	m m	CH ₂	Agl-6b, 7b Agl-6a, 7a	Agl-26	
8	40,5	-	-	Cq	-		-
9	47,8	1,89	m	CH	Agl-11a, b	Agl-10	
10	37,3	-	-	Cq	-		-
11	24,3	2,09 2,18	m m	CH ₂	Agl-9, 11b, 12 Agl-9, 11a		Agl-12
12	123,1	5,65	br t (3,7)	CH	Agl-11a	Agl-9, 14	Agl-11a, b, 18
13	144,7	-	-	Cq	-		-
14	42,6	-	-	Cq	-		-
15	36,5	1,92 2,28	m m	CH ₂	Agl-16		Agl-15b Agl-15a
16	74,2	5,25	br s	CH	Agl-15a, b		
17	49,7	-	-	Cq	-		-
18	41,7	3,47	dd (13,4 ; 4,0)	CH	Agl-19a	Agl-12, 13, 14, 16, 17, 28	Agl-12, 30
19	47,6	1,35 2,77	m t (13,4)	CH ₂	Agl-18, 19b Agl-18, 19a	Agl-18, 20, 30	Agl-12, 18, 19b Agl-19a, 27
20	31,1	-	-	Cq	-		-
21	36,3	1,31 2,43	m m	CH ₂	Agl-21b, 22b Agl-21a, 22a	Agl-20 Agl-22	Agl-21b, 22b Agl-21a, 22a
22	32,4	2,21 2,41	m m	CH ₂	Agl-21b, 22b Agl-21a, 22a	Agl-16, 17, 28 Agl-16, 20	Agl-22b Agl-16, 22a
23	65,6	3,76 4,34	d (10,7) d (10,7)	CH ₂	Agl-23b Agl-23a	Agl-3 Agl-4, 5, 24	Agl-24
24	15,4	1,41	s	CH ₃	-	Agl-3, 4, 5, 23	Agl-23b
25	17,7	1,56	s	CH ₃	-	Agl-1, 9, 10	Agl-26
26	17,8	1,16	s	CH ₃	-	Agl-7, 8, 9, 14	Agl-15b, 25
27	27,4	1,79	s	CH ₃	-	Agl-8, 13, 14, 15	Agl-9, 19b
28	176,3	-	-	Cq	-		-
29	33,4	0,97	s	CH ₃	-	Agl-19, 20, 21, 30	Agl-19b, 21b
30	24,8	1,07	s	CH ₃	-	Agl-19, 20, 21, 29	Agl-18

**TABLEAU 39 - ATTRIBUTION DES SIGNAUX RMN ¹³C ET ¹H (J EN Hz) ET CORRELATIONS 2D DE LA PARTIE
SUCRES DU COMPOSE SI (PYRIDINE d₅, 500 MHz)**

N°	δ _C	δ _H	Mult. (J, Hz)		¹ H- ¹ H COSY	¹ H- ¹³ C HMBC	ROESY
Glucose HSQC-TOCSY (105,5 ; 88,9 ; 78,1 ; 74,4 ; 69,7 ; 62,4)							
1	105,5	5,14	d (7,7)	CH	Glc-2	Agl-3	Agl-3, Glc-3, 5
2	74,4	4,04	t (8,0)	CH	Glc-1, 3	Glc-1, 3	
3	88,9	4,13	t (8,1)	CH		Glc'-1, Glc-2, 4	Glc-5, Glc'-1
4	69,7	4,12	t (8,2)	CH	Glc-5	Glc-2, 3, 5, 6	
5	78,1	3,83	m	CH	Glc-4, Glc-6a, 6b		Glc-6b
6	62,4	4,27	br d (11,4 ; 3,5)	CH ₂	Glc-5, Glc-6b		Glc-6b
		4,38	dd (11,4 ; 2,0)		Glc-5, Glc-6a		Glc-6a
Glucose' HSQC-TOCSY (106,1 ; 78,9 ; 78,4 ; 75,8 ; 71,8 ; 62,7)							
1	106,1	5,26	d (7,6)	CH	Glu'-2	Glc-3	Glc'-3, 5, Glc-3
2	75,8	4,08	t (7,8)	CH		Glc'-1, 3	
3	78,4	4,04	t (8,0)	CH	Glu'-4	Glc'-1, 4	Glc'-1
4	71,8	4,16	t (8,0)	CH	Glu'-3, 5	Glc'-3	
5	78,9	4,03	m	CH	Glu'-4, 6a		Glc'-6b
6	62,7	4,30	dd (12,1 ; 6,2)	CH ₂	Glu'-4, 6b	Glc'-4	Glc'-6b
		4,55	dd(12,3 ; 2,0)		Glu'-6a		Glc'-6a
Xylose HSQC-TOCSY (95,4 ; 77,4 ; 77,0 ; 71,0 ; 67,3)							
1	95,4	6,18	d (6,7)	CH	Xyl-2	Xyl-5, Agl-28	Xyl-3, 5a
2	77,0	4,28	t (7,3)	CH	Xyl-1	Xyl-1, 3, Rha-1	Rha-1
3	77,4	4,22	t (7,7)	CH		Xyl-2, 4	Xyl-5a
4	71,0	4,17	m	CH	Xyl-5a, 5b	Xyl-3	Xyl-5a
5	67,3	3,82	dd (11,7 ; 9,0)	CH ₂	Xyl-1, 4, 5b	Xyl-1	Xyl-5b
		4,35	dd (12,1 ; 5,6)		Xyl-4, 5a	Xyl-1, 3	Xyl-5a
Rhamnose HSQC-TOCSY (101,9 ; 72,1) (84,3 ; 72,8 ; 68,9 ; 19,0)							
1	101,9	6,24	br s	CH	Rha-2	Rha-3, 5, Xyl-2	Xyl-2, Rha-2
2	72,1	4,79	br d (3,0)	CH	Rha-1, 3	Rha-3	
3	72,8	4,65	dd (9,1 ; 2,7)	CH	Rha-2, 4	Rha-4	
4	84,3	4,36	t (9,4)	CH	Rha-3	Rha-6, Xyl'-1	Xyl'-1
5	68,9	4,42	dq (9,7 ; 6,0)	CH	Rha-6		
6	19,0	1,76	d (6,0)	CH ₃	Rha-5	Rha-4, 5	Rha-4
Xylose' HSQC-TOCSY (107,1 ; 83,7 ; 76,3 ; 69,6 ; 67,5)							
1	107,1	5,07	d (7,7)	CH	Xyl'-2	Rha-4	Xyl'-2, Xyl'-5a, Rha-4
2	76,3	4,07	dd (7,7 ; 9,4)	CH	Xyl'-1, 3	Xyl'-1, 3	Xyl'-1
3	83,7	4,15	t (10,0)	CH	Xyl'-2	Xyl'-2, 4, 5a	Xyl'-5a, Rha'-1
4	69,6	4,09	m	CH	Xyl'-5a	Xyl'-3, 5a	
5	67,5	3,43	t (10,2)	CH ₂	Xyl'-4		Xyl'-1, 5b
		4,14	dd (10,4 ; 5,4)			Xyl'-3, 4	Xyl'-5a
Rhamnose' HSQC-TOCSY (101,6 ; 82,9) (74,7 ; 72,9 ; 69,8 ; 18,8)							
1	101,6	6,35	br s	CH	Rha'-2	Rha'-3, 5, Xyl'-4	Rha'-2, Xyl'-3
2	82,9	4,78	br d (3,1)	CH	Rha'-1, 3	Rha'-3, Fuc-1	Rha'1, Fuc-1
3	72,9	4,60	dd (9,2 ; 3,0)	CH	Rha'-2, 4	Rha'-4	Rha'-5
4	74,7	4,17	t (9,0)	CH	Rha'-3, 5	Rha'-5	
5	69,8	4,90	dq (9,3 ; 6,2)	CH	Rha'-4, 6		Rha'-3
6	18,8	1,59	d (6,0)	CH ₃	Rha'-5	Rha'-4, 5	Rha'-4, 5
Fucose HSQC-TOCSY (107,8 ; 75,6 ; 73,3 ; 73,0) (72,0 ; 17,6)							
1	107,8	5,11	d (7,7)	CH	Fuc-2	Fuc-5, Rha'-2	Fuc-5, 3, Rha'-2
2	73,3	4,44	dd (9,5 ; 7,8)	CH	Fuc-1, 3	Fuc-3	
3	75,6	4,08	dd (9,5 ; 3,0)	CH	Fuc-2		Fuc-5
4	73,0	3,98	br d (2,7)	CH		Fuc-2, 3	Fuc-3
5	72,0	3,77	br q (7,0)	CH	Fuc-6	Fuc-1, 4, 6	Fuc-1, 3, 4, 6
6	17,6	1,47	d (6,4)	CH ₃	Fuc-5	Fuc-4, 5	Fuc-4, 5

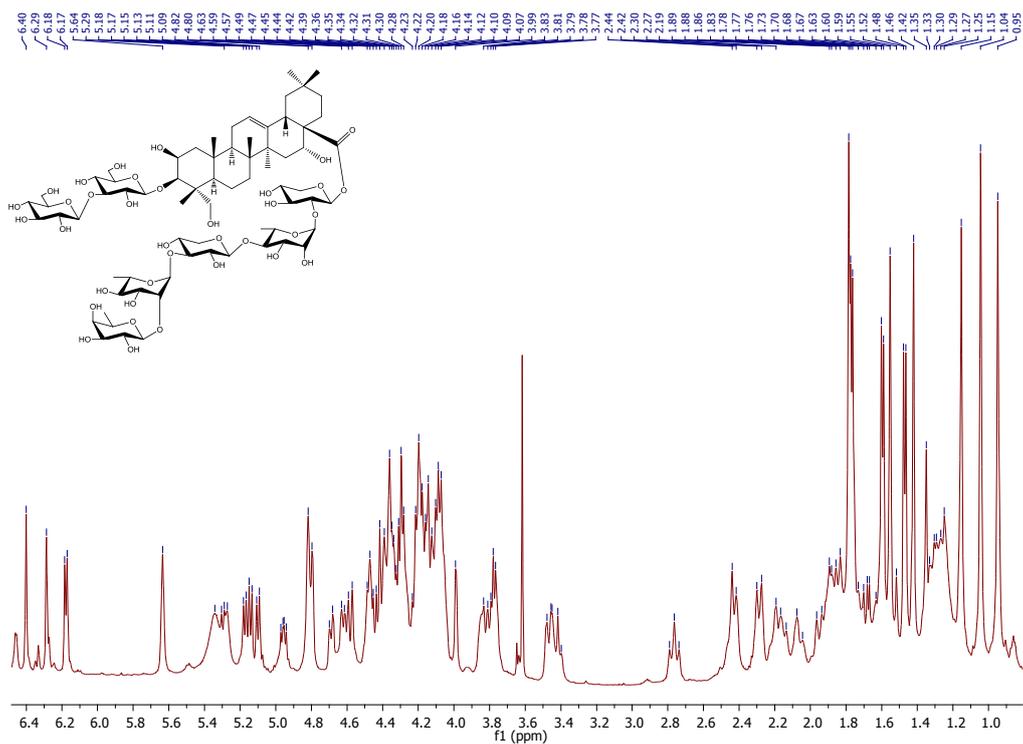


FIGURE 133 - SPECTRE RMN ^1H DU COMPOSE *SI* (PYRIDINE d_5 , 500 MHz, 285 K)

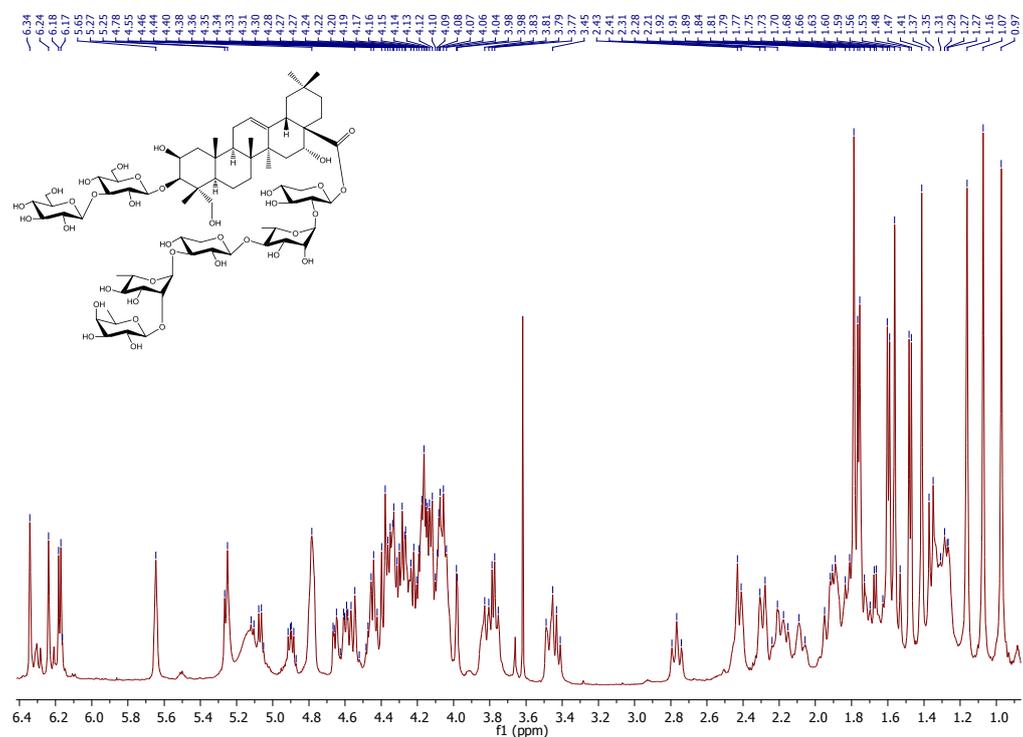


FIGURE 134 - SPECTRE RMN ^1H DU COMPOSE *SI* (PYRIDINE d_5 , 500 MHz, 300 K)

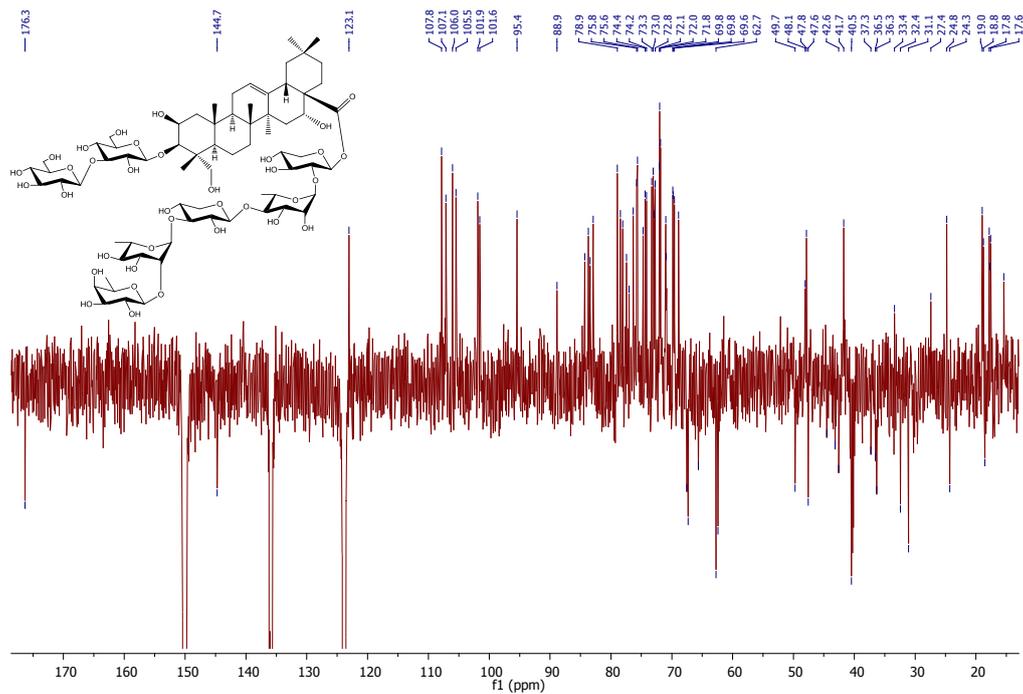


FIGURE 135 - SPECTRE RMN ^{13}C DU COMPOSE *SI* (PYRIDINE d_5 , 500 MHz, 300 K)

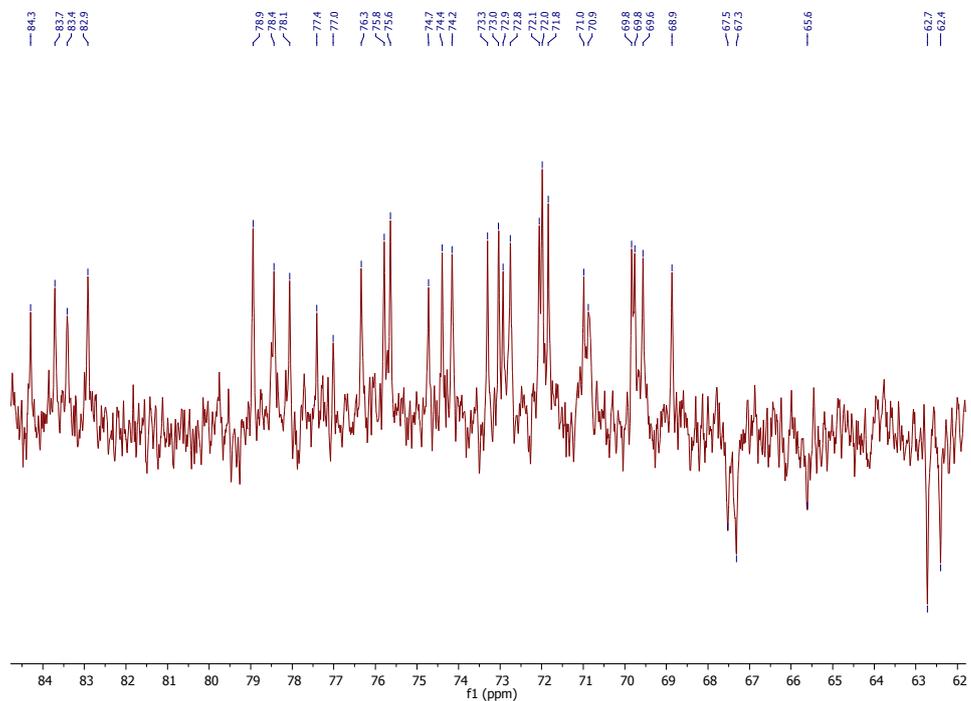


FIGURE 136 - SPECTRE RMN ^{13}C DU COMPOSE *SI* (ZOOM 62-85 PPM)

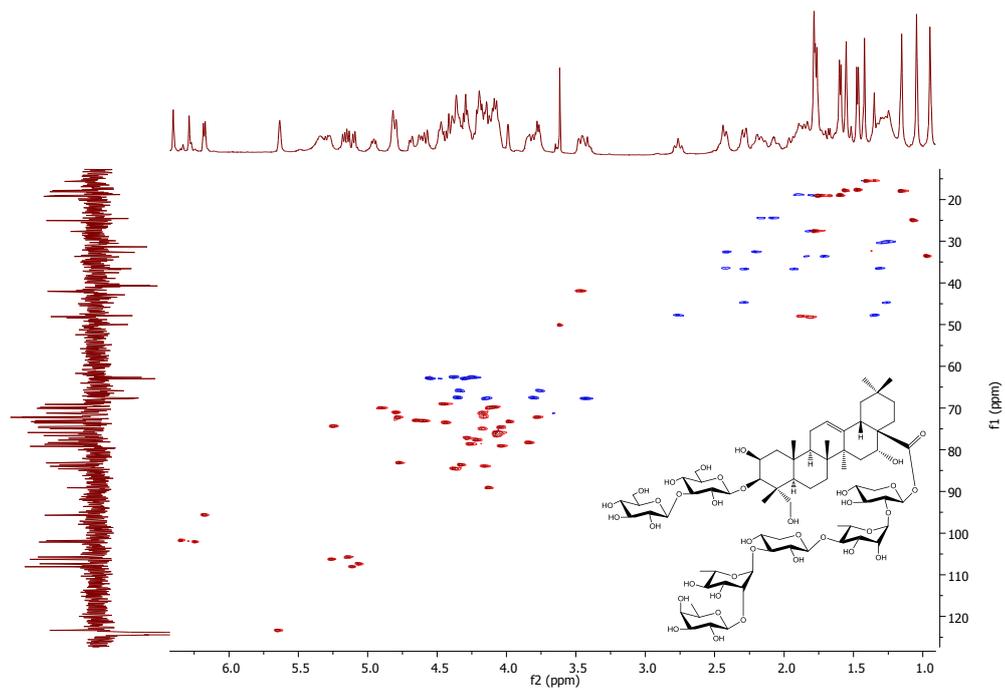


FIGURE 137 - SPECTRE RMN HSQC DU COMPOSE SI (PYRIDINE d_5 , F2 : 500 MHz, F1 : 125 MHz)

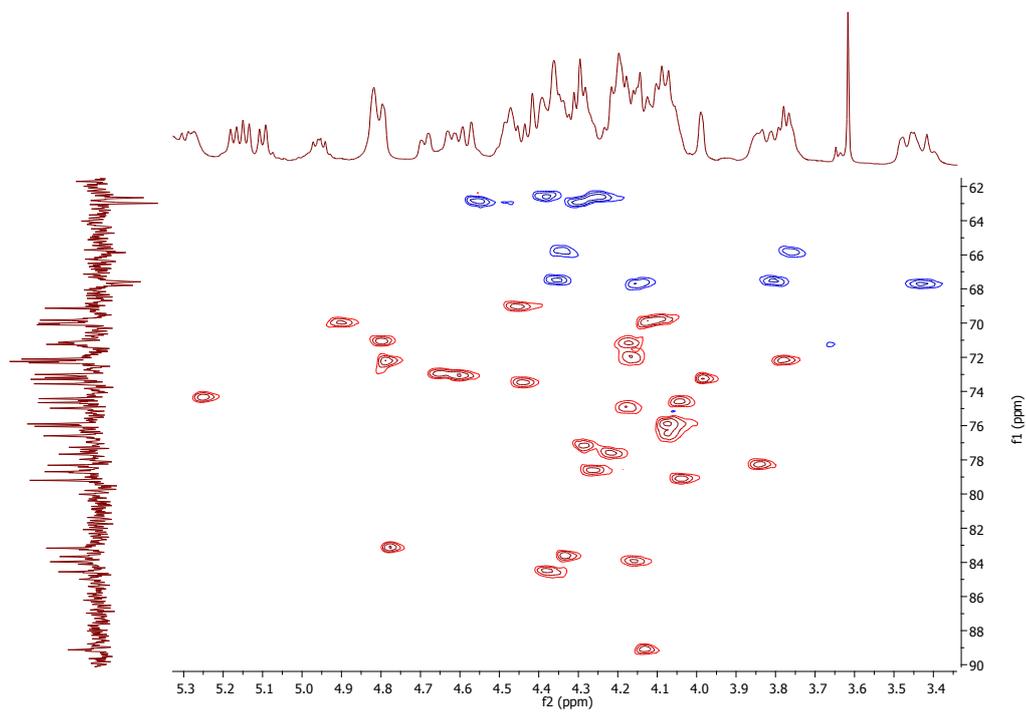


FIGURE 138 - SPECTRE RMN HSQC DU COMPOSE SI (ZOOM F2 : 3,3-5,3 PPM, F1 : 62-90 PPM)

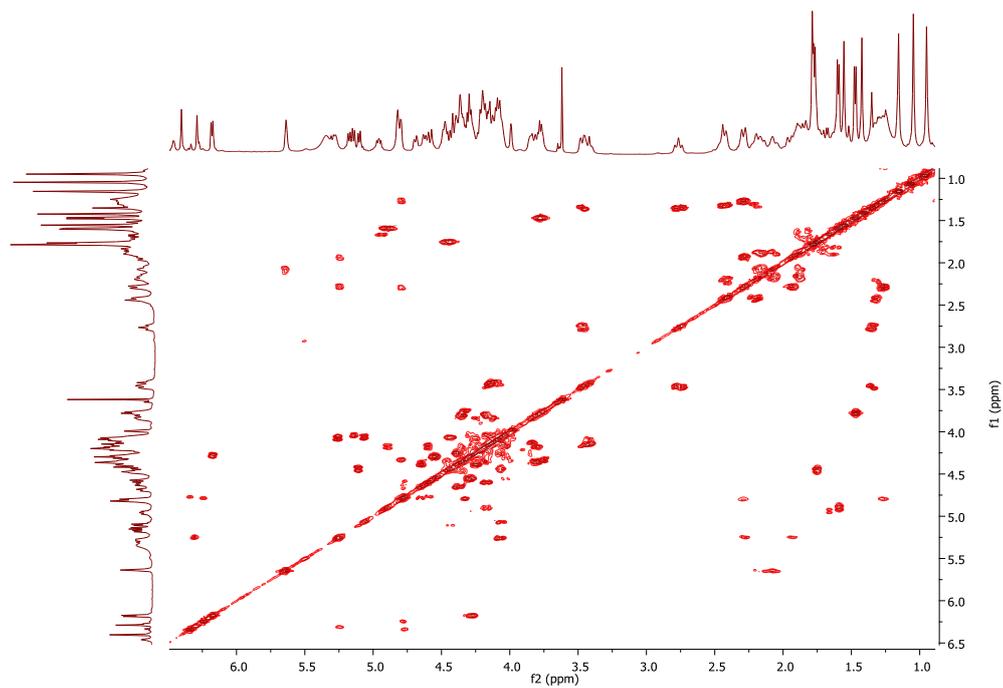


FIGURE 139 - SPECTRE RMN COSY DU COMPOSE *SI* (PYRIDINE d_5 , 500 MHz)

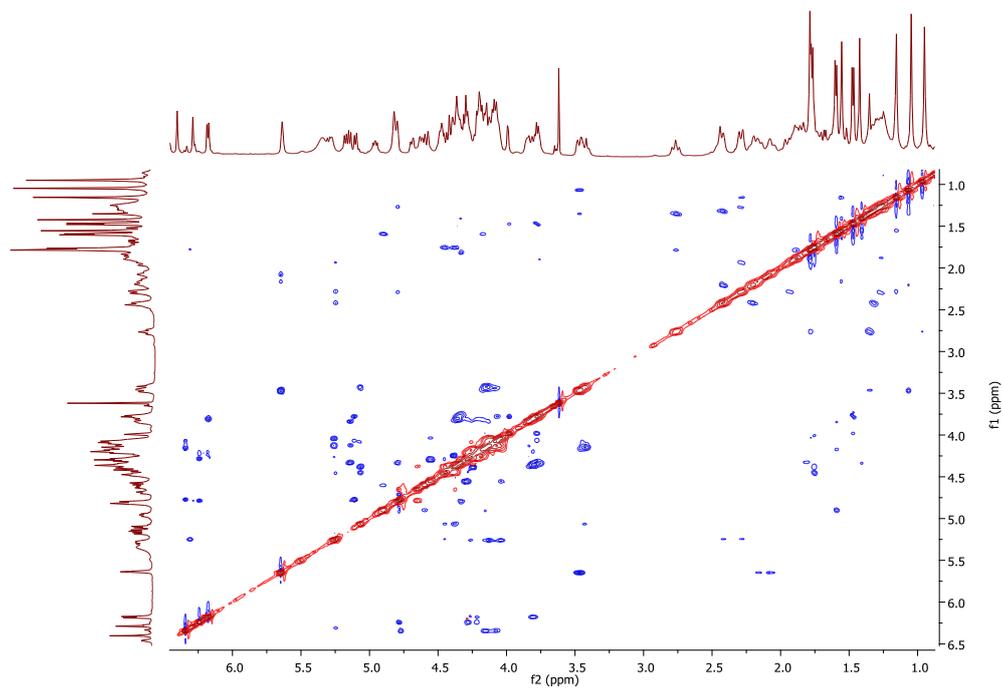


FIGURE 140 - SPECTRE RMN ROESY DU COMPOSE *SI* (PYRIDINE d_5 , 500 MHz)

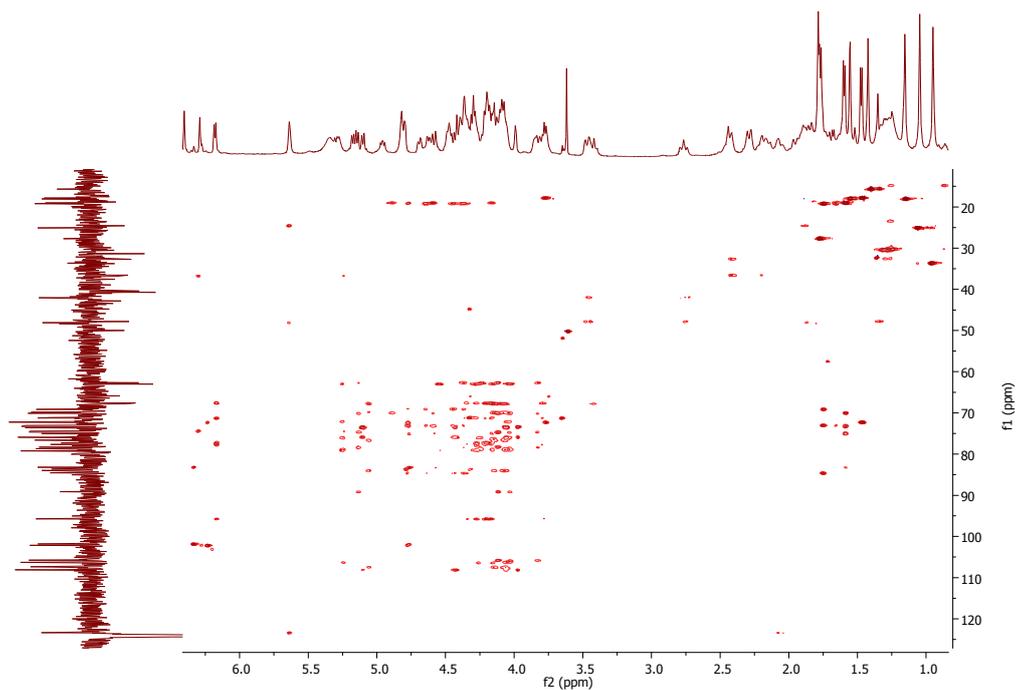


FIGURE 141 - SPECTRE RMN HSQC-TOCSY DU COMPOSE *SI* (PYRIDINE d_5 , F2 : 500 MHz, F1 : 125 MHz)

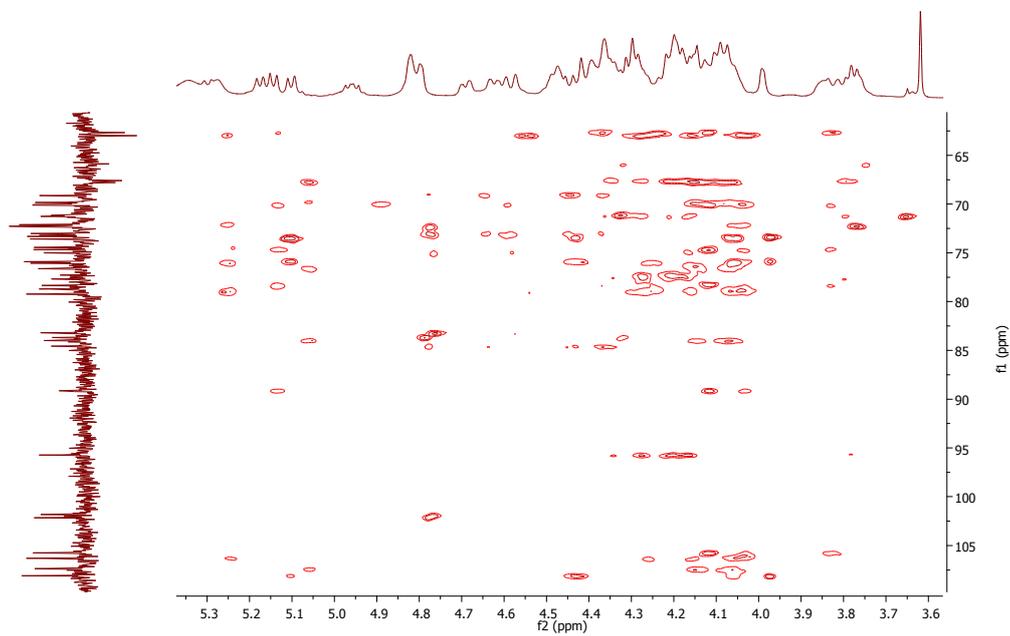


FIGURE 142 - SPECTRE RMN HSQC-TOCSY DU COMPOSE *SI* (ZOOM F2 : 3,6-5,4 PPM, F1 : 60-110 PPM)

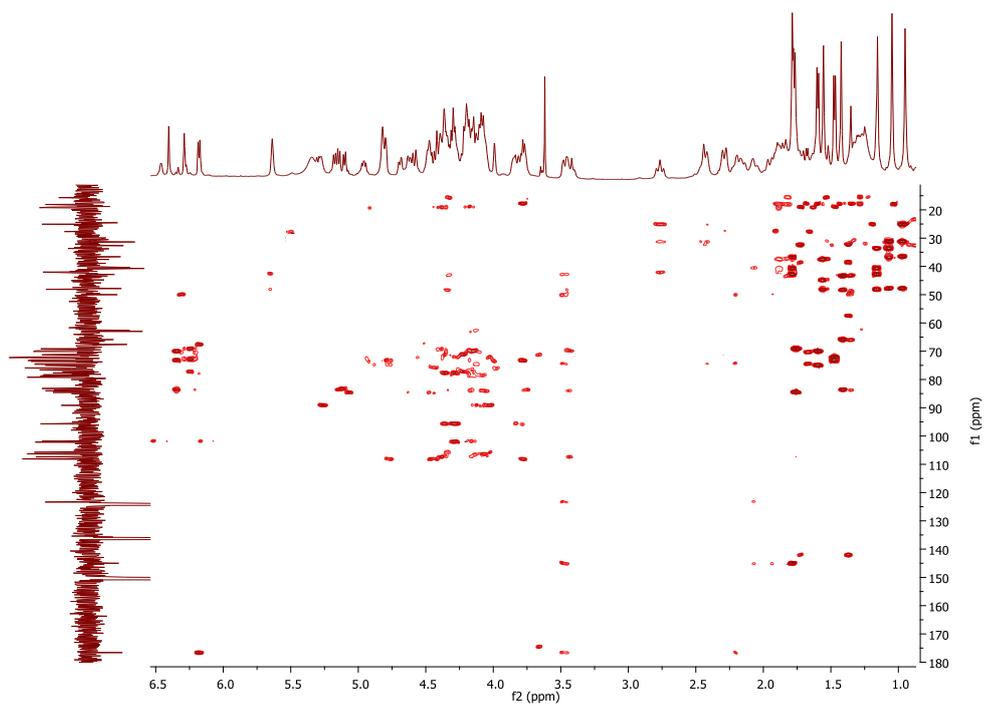


FIGURE 143 - SPECTRE RMN HMBC DU COMPOSE *SI* (PYRIDINE d_5 , F2 : 500 MHz, F1 : 125 MHz)

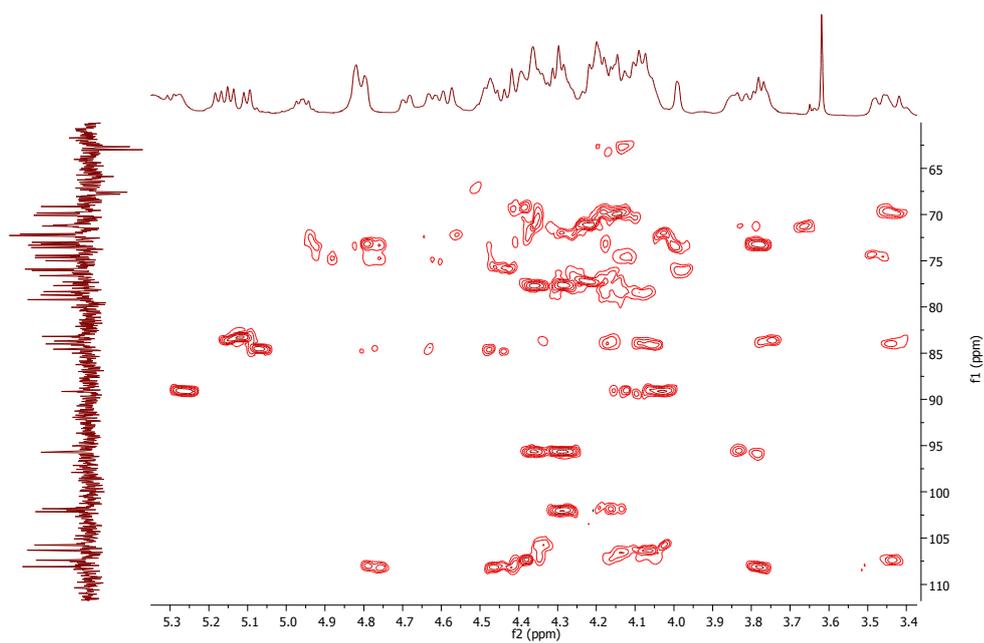


FIGURE 144 - SPECTRE RMN HMBC DU COMPOSE *SI* (ZOOM F2 : 3,4-5,3 PPM, F1 : 60-110 PPM)

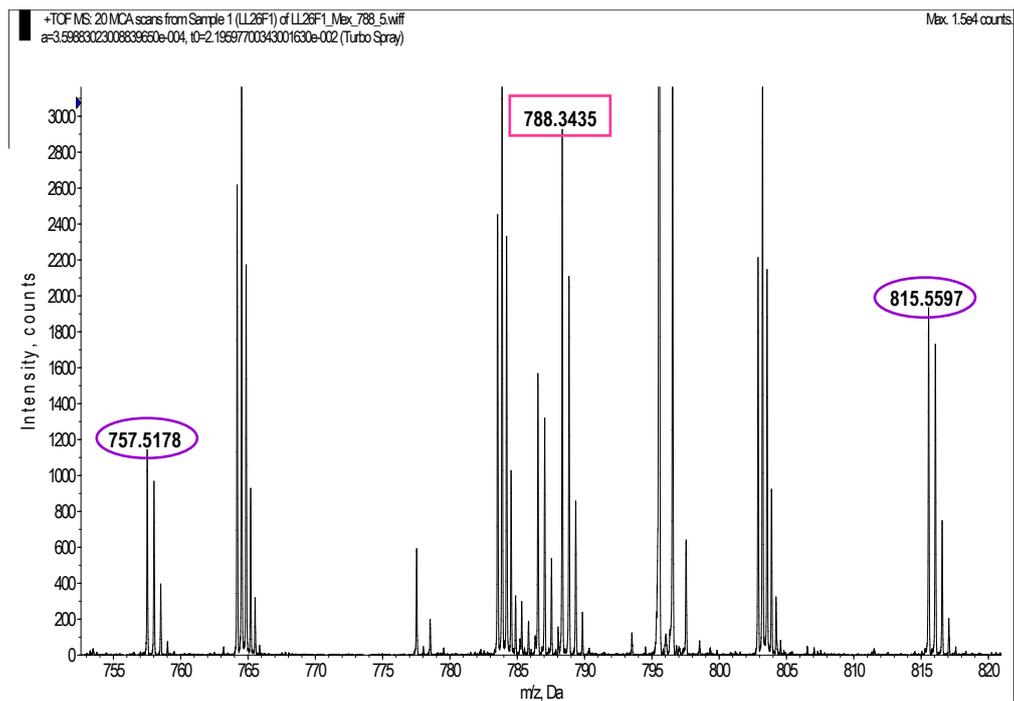


FIGURE 145 - SPECTRE HRESIMS DU COMPOSE *SI* EN MODE POSITIF ($[M+2Na]^{2+}$; STANDARD INTERNE ATTENDU A m/z 757,5178 ET m/z 815,5597)

IV.1.4.2. COMPOSE S2

Les signaux RMN du composé S2 ne correspondent à aucun composé connu. Les caractéristiques de ce dernier sont décrites ci-après :

Forme Solide amorphe blanc cassé

Formule brute C₆₄H₁₀₄O₃₁

Pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20} = -29,5$ (c 0,38 ; MeOH)

UV λ_{\max} 195 nm

RMN ¹H et ¹³C (Pyridine *d*₅, 500 MHz) Tableau 40, Tableau 41 et Figure 147 à Figure 157

HRMS $[M+2NH_4]^{2+}$ *m/z* 702,36187 ; $\Delta = 0,05$ ppm (Figure 146)

(calculé pour C₆₄H₁₀₄O₃₁, **1368,6562**)

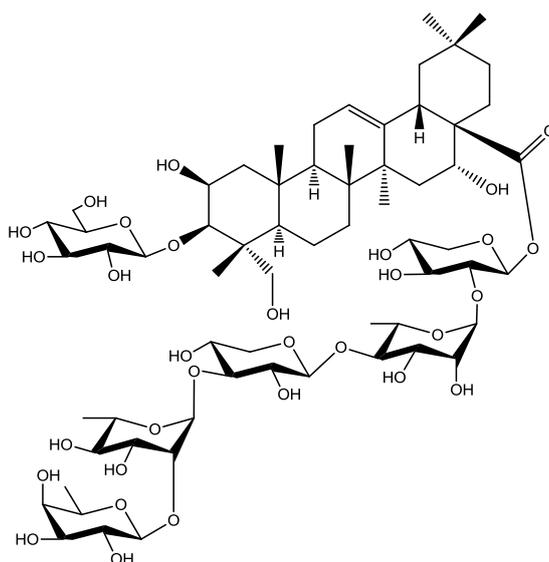


TABLEAU 40 - ATTRIBUTION DES SIGNAUX RMN ¹³C ET ¹H (J EN HZ) ET CORRELATIONS 2D DE LA PARTIE AGLYCONE DU COMPOSE S2 (PYRIDINE d₅, 500 MHz)

N°	δ _C	δ _H	Mult. (J, Hz)		¹ H- ¹ H COSY	¹ H- ¹³ C HMBC	ROESY
1	44,5	1,29	m	CH ₂	Agl-1b	Agl-3, 5, 25	Agl-1b, 2
		2,32	m		Agl-1a		Agl-1a, 2, 16
2	70,8	4,82	m	CH	Agl-1a, 1b		Agl-1a, 1b, 3
3	83,6	4,34	m	CH	Agl-2	Agl-4, 5, 24, Glc-1	Agl-2, 5, Glc-1
4	43,2	-	-	Cq	-		-
5	48,3	1,80	m	CH	Agl-6a	Agl-24, 25	Agl-3, 6b
6	18,7	1,65	m	CH ₂	Agl-6b	Agl-8, 10, 25, 26	Agl-5, 23a
		1,88	m		Agl-6a		
7	33,6	1,70	m	CH ₂	Agl-7b	Agl-26	
		1,82	m		Agl-7a		
8	40,5	-	-	Cq	-		-
9	47,9	1,89	m	CH	Agl-11a, b	Agl-8, 11, 25, 26, 27	
10	37,4	-	-	Cq	-		-
11	24,4	2,10	m	CH ₂	Agl-9, 12		Agl-12
		2,18	m				
12	123,2	5,65	br t (3,5)	CH	Agl-11a, b	Agl-9, 14	Agl-11a, b, 18
13	144,8	-	-	Cq	-		-
14	42,7	-	-	Cq	-		-
15	36,6	1,93	m	CH ₂	Agl-15b, 16	Agl-16, 17	Agl-15b, 16
		2,31	m		Agl-15a, 16		Agl-15a, 16
16	74,3	5,26	br s	CH	Agl-15a, 15b		Agl-15a, b, 22b, 27
17	49,8	-	-	Cq	-		-
18	41,9	3,48	dd (13,4 ; 3,4)	CH	Agl-19a, 19b	Agl-12, 13, 14, 16, 17, 19, 28	Agl-12, 30
19	47,7	1,36	m	CH ₂	Agl-18, 19b	Agl-17, 20 Agl-18, 20, 30	Agl-12, 18, 19b
		2,77	t (13,4)		Agl-18, 19a		Agl-18, 19a, 27, 29
20	31,2	-	-	Cq	-		-
21	36,4	1,33	m	CH ₂	Agl-21b, 22b	Agl-17, 18, 20, 30	Agl-21b, 22b
		2,43	m		Agl-21a		Agl-21a, 22a
22	32,5	2,23	m	CH ₂	Agl-21b, 22b	Agl-16, 17, 28 Agl-17, 18, 20, 30	Agl-21b, 22b
		2,43	m		Agl-22a		Agl-16, 21a, 22a, 29
23	66,3	3,76	d (10,7)	CH ₂	Agl-23b	Agl-3, 5	Agl-5, 23b, 24
		4,37	d (10,7)		Agl-23a		Agl-5, 23a, 24
24	15,5	1,43	s	CH ₃	-	Agl-3, 4, 5, 23, 25	Agl-23a, b
25	17,7	1,56	s	CH ₃	-	Agl-1, 5, 9, 10, 24	Agl-24, 26
26	17,8	1,17	s	CH ₃	-	Agl-7, 8, 9, 14	Agl-15b, 25
27	27,5	1,78	s	CH ₃	-	Agl-8, 13, 14, 15	Agl-9, 19b
28	176,4	-	-	Cq	-		-
29	33,5	0,98	s	CH ₃	-	Agl-19, 20, 21, 30	Agl-19b, 21b
30	24,9	1,08	s	CH ₃	-	Agl-19, 20, 21, 29	Agl-18, 21a, 29

**TABLEAU 41 - ATTRIBUTION DES SIGNAUX RMN ¹³C ET ¹H (J EN Hz) ET CORRELATIONS 2D DE LA PARTIE
SUCRES DU COMPOSE S2 (PYRIDINE d₅, 500 MHz)**

N°	δ _C	δ _H	Mult. (J, Hz)		¹ H- ¹ H COSY	¹ H- ¹³ C HMBC	ROESY
Glucose HSQC-TOCSY (106,0 ; 78,9 ; 78,7 ; 76,0 ; 71,9 ; 62,9)							
1	106,0	5,16	d (7,9)	CH	Glc-2	Agl-3	Glc-3, 5, Agl-3
2	76,0	4,03	t (8,3)	CH	Glc-1, 3	Glc-1, 3	Glc-3
3	78,9	4,20	t (8,9)	CH	Glc-2	Glc-2, 4	Glc-2
4	71,9	4,24	t (9,2)	CH	Glc-5		
5	78,7	3,92	ddd (8,7 ; 4,9 ; 2,3)	CH	Glc-4, 6a		Glc-3, 6a, b
6	62,9	4,36 4,49	dd (12,0 ; 5,2) dd (11,9 ; 2,1)	CH ₂	Glc-5, 6b Glc-6a		Glc-5, 6b Glc-5, 6a
Xylose HSQC-TOCSY (95,6 ; 77,5 ; 77,1 ; 71,1 ; 67,4)							
1	95,6	6,19	d (6,4)	CH	Xyl-2	Agl-28, Xyl-3, 5	Xyl-3, 5a
2	77,1	4,30	br t (7,3)	CH	Xyl-1, 3	Xyl-1, 3, Rha-1	Xyl-5a, Rha-1
3	77,5	4,23	t (9,2)	CH	Xyl-2, 4	Xyl-2, 4	
4	71,1	4,18	m	CH	Xyl-3, 5a, 5b	Xyl-2	Xyl-5a
5	67,4	3,81 4,36	dd (11,3 ; 8,5) dd (11,9 ; 5,2)	CH ₂	Xyl-4, 5b Xyl-4, 5a	Xyl-1, 4	Xyl-4, 5b Xyl-5a
Rhamnose HSQC-TOCSY (102,0 ; 72,2) (84,4 ; 72,9 ; 69,0 ; 19,0)							
1	102,0	6,24	br s	CH	Rha-2	Rha-2, 5, Xyl-2	Rha-2, Xyl-2
2	72,2	4,79	br d (3,3)	CH	Rha-1, 3	Rha-3	Rha-3, 5
3	72,9	4,67	dd (9,2 ; 2,7)	CH	Rha-2, 4		Rha-2, 4, 5
4	84,4	4,42	t (9,2)	CH	Rha-3	Rha-6, Xyl'-1	Xyl'-1
5	69,0	4,46	dq (9,7 ; 6,0)	CH	Rha-6		
6	19,0	1,76	d (5,8)	CH ₃	Rha-5	Rha-4, 5	Rha-4, 5
Xylose' HSQC-TOCSY (107,2 ; 84,1 ; 76,3 ; 69,7 ; 67,6)							
1	107,2	5,09	d (7,6)	CH	Xyl'-2	Xyl'-3, 5, Rha-4	Xyl'-2, 3, 5a, b, Rha-4
2	76,3	4,08	br t (8,1)	CH	Xyl'-1	Xyl'-3	Xyl'-5a
3	84,1	4,16	t (9,3)	CH		Xyl'-2, 4	Xyl'-5a, Rha'1
4	69,7	4,11	m	CH	Xyl'-5a		
5	67,6	3,43 4,16	t (10,1) dd (10,5 ; 5,6)	CH ₂	Xyl'-4, 5b Xyl'-5a	Xyl'-1, 4 Xyl'-1, 3, 4	Xyl'-5b Xyl'-5a
Rhamnose' HSQC-TOCSY (101,9 ; 83,0) (83,0 ; 74,9 ; 73,2 ; 69,9 ; 18,8)							
1	101,9	6,33	br s	CH	Rha'-2	Rha'-2, 3, 5, Xyl'-3	Rha'-2, Xyl'-3
2	83,0	4,79	br d (3,2)	CH	Rha'-1, 3	Rha'-4, Fuc-1	Rha'-3, Fuc-1
3	73,2	4,60	dd (9,2 ; 3,2)	CH	Rha'-2, 4		Rha'-2, 4
4	74,9	4,18	t (9,2)	CH	Rha'-3, 5		Rha'-2
5	69,9	4,91	dq (9,5 ; 6,1)	CH	Rha'-4, 6		Rha'-3
6	18,8	1,61	d (6,1)	CH ₃	Rha'-5	Rha'-4, 5	Rha'-4, 5
Fucose HSQC-TOCSY (108,0 ; 73,5 ; 75,8 ; 73,3 ; 17,8) (72,1 ; 17,8)							
1	108,0	5,13	d (7,6)	CH	Fuc-2	Fuc-3, Rha'-2	Fuc-5, 3, Rha'-2
2	73,5	4,46	dd (9,4 ; 7,6)	CH	Fuc-1, 3	Fuc-3	
3	75,8	4,06	dd (9,5 ; 3,0)	CH	Fuc-2		Fuc-5
4	73,3	3,99	br d (3,1)	CH	Fuc-5	Fuc-2, 3	Fuc-5
5	72,1	3,78	m	CH	Fuc-4, 6	Fuc-1, 4	Fuc-3, 4
6	17,8	1,48	d (6,4)	CH ₃	Fuc-5	Fuc-4, 5	Fuc-4, 5

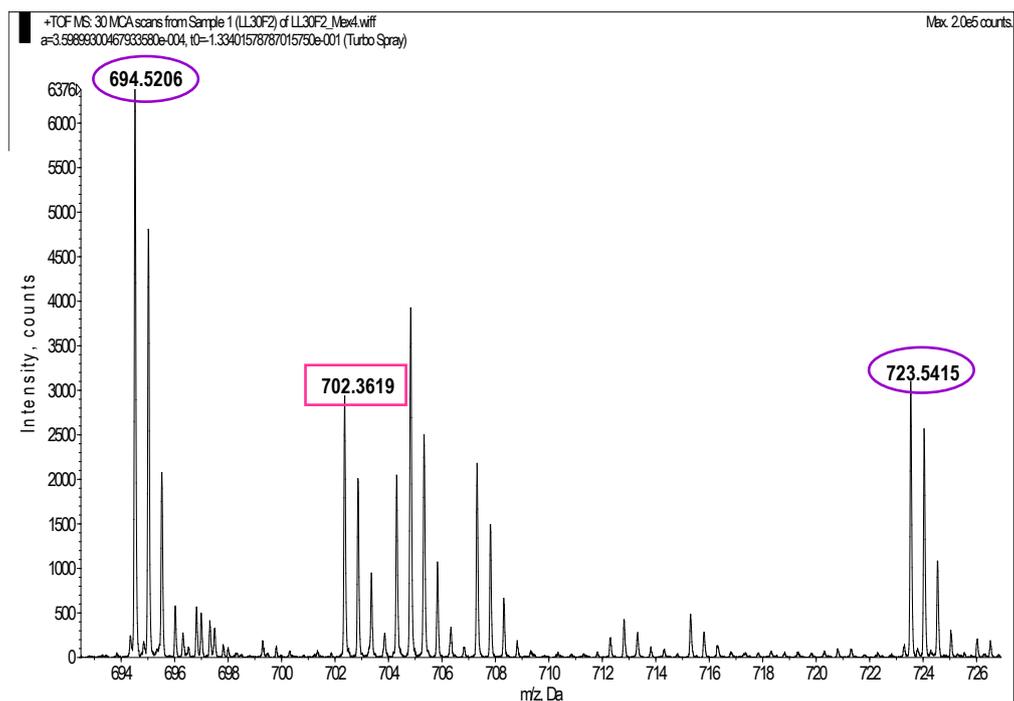


FIGURE 146 - SPECTRE HRESIMS DU COMPOSE S2 EN MODE POSITIF ($[M+2NH_4]^{2+}$; STANDARD INTERNE ATTENDU A M/Z 694,5206 ET M/Z 723,5415)

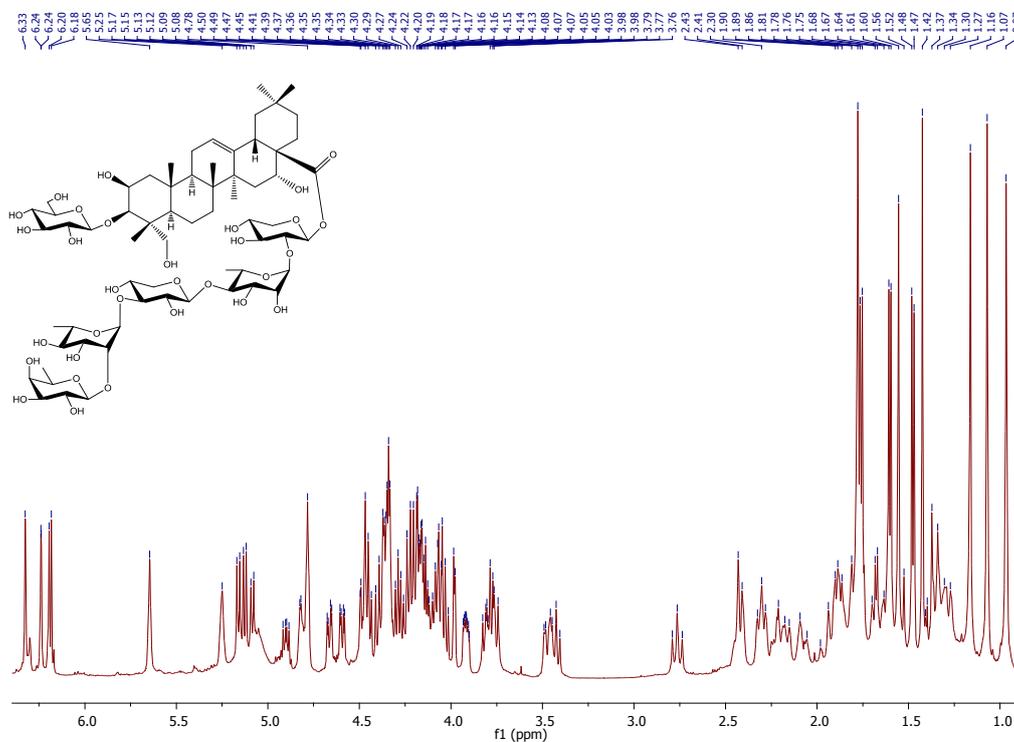


FIGURE 147 - SPECTRE RMN 1H DU COMPOSE S2 (PYRIDINE d_5 , 500 MHz, 300 K)

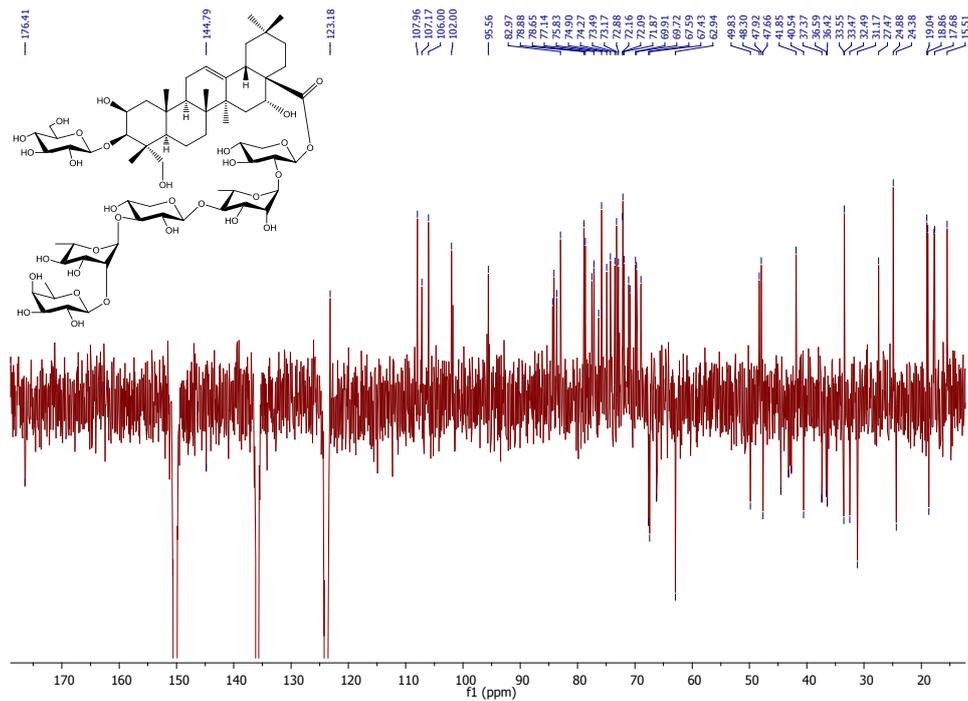


FIGURE 148 - SPECTRE RMN ^{13}C DU COMPOSE S2 (PYRIDINE d_5 , 500 MHz, 300 K)

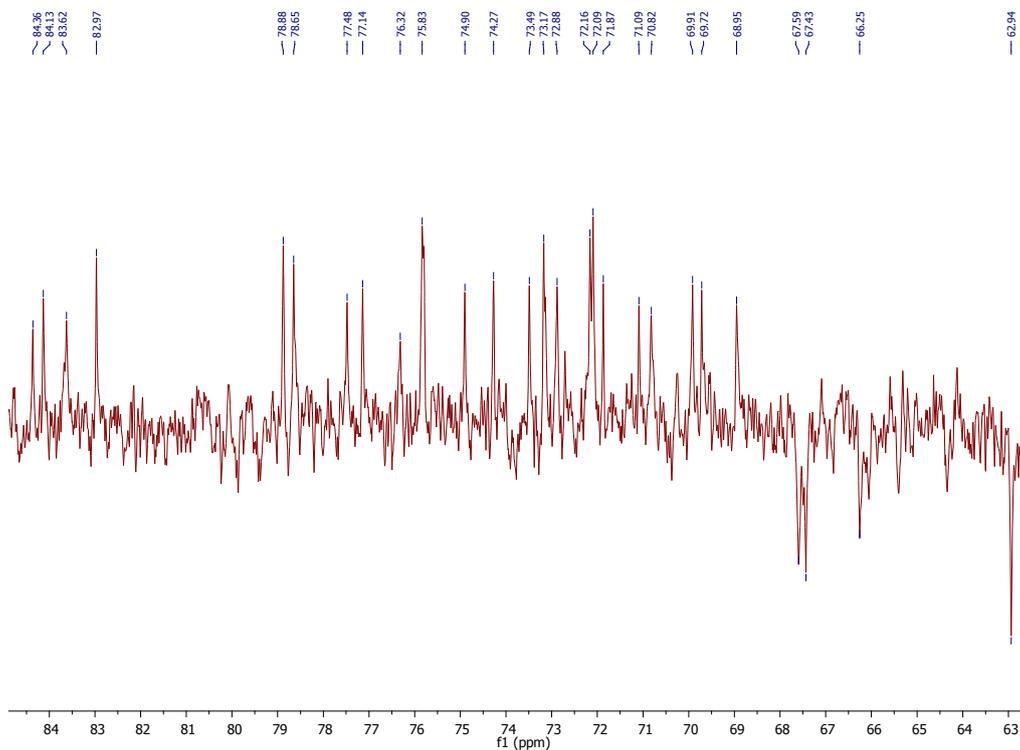


FIGURE 149 - SPECTRE RMN ^{13}C DU COMPOSE S2 (ZOOM 62-85 PPM)

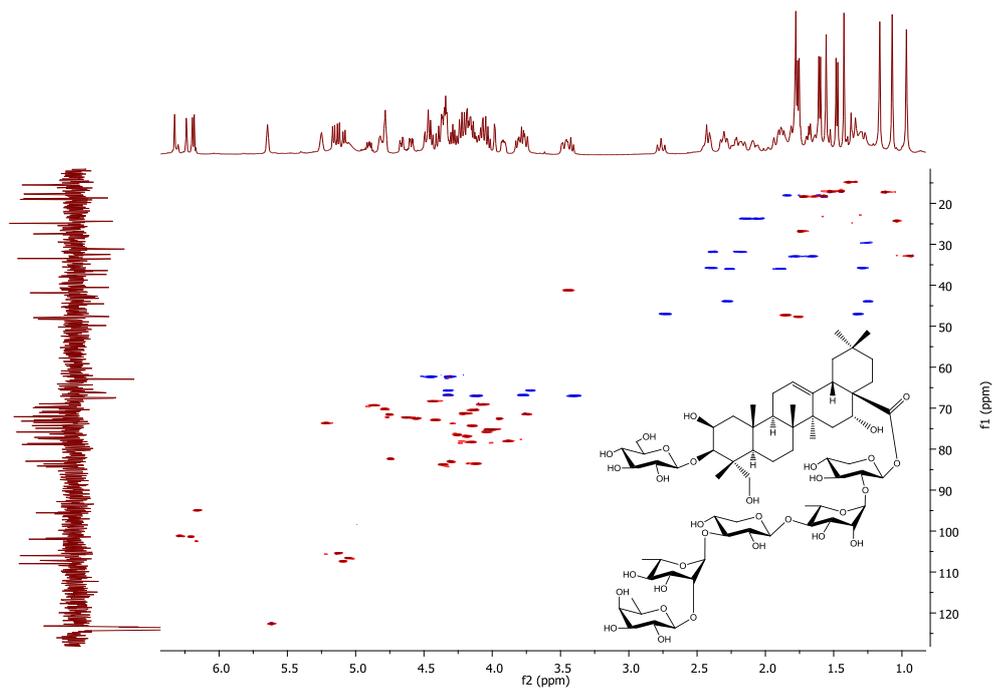


FIGURE 150 - SPECTRE RMN HSQC DU COMPOSE S2 (PYRIDINE d_5 , F2 : 500 MHz, F1 : 125 MHz)

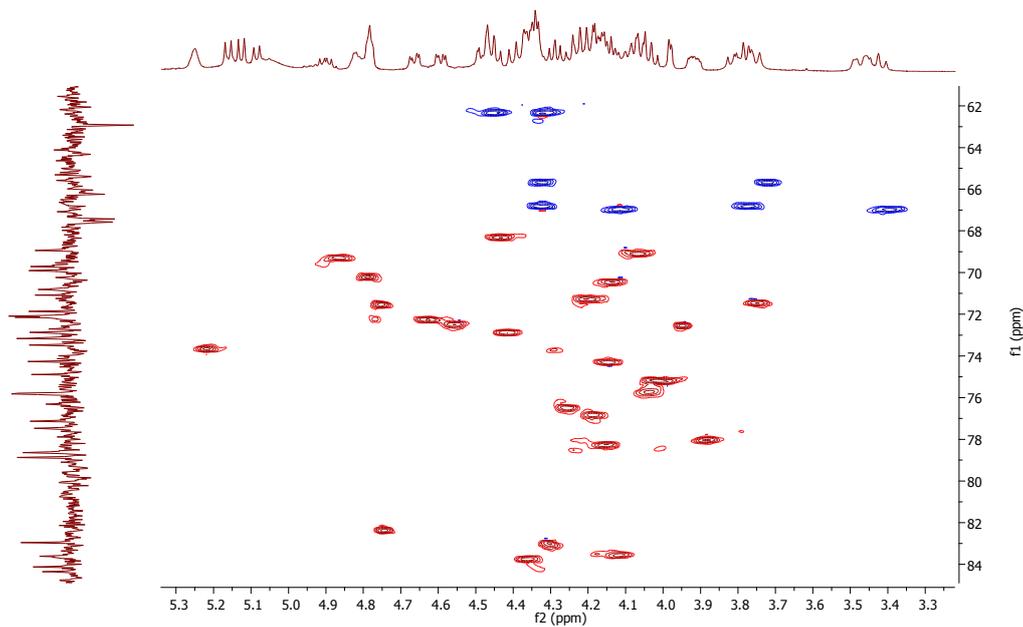


FIGURE 151 - SPECTRE RMN HSQC DU COMPOSE S2 (ZOOM F2 : 3,3-5,3 PPM, F1 : 62-85 PPM)

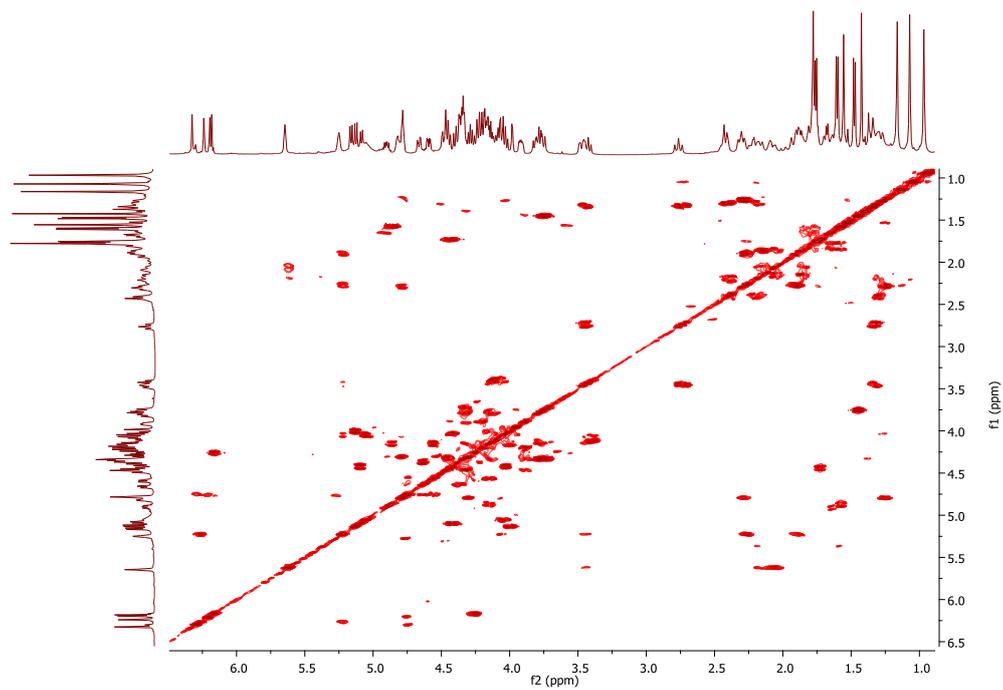


FIGURE 152 - SPECTRE RMN COSY DU COMPOSE S2 (PYRIDINE d_5 , 500 MHz)

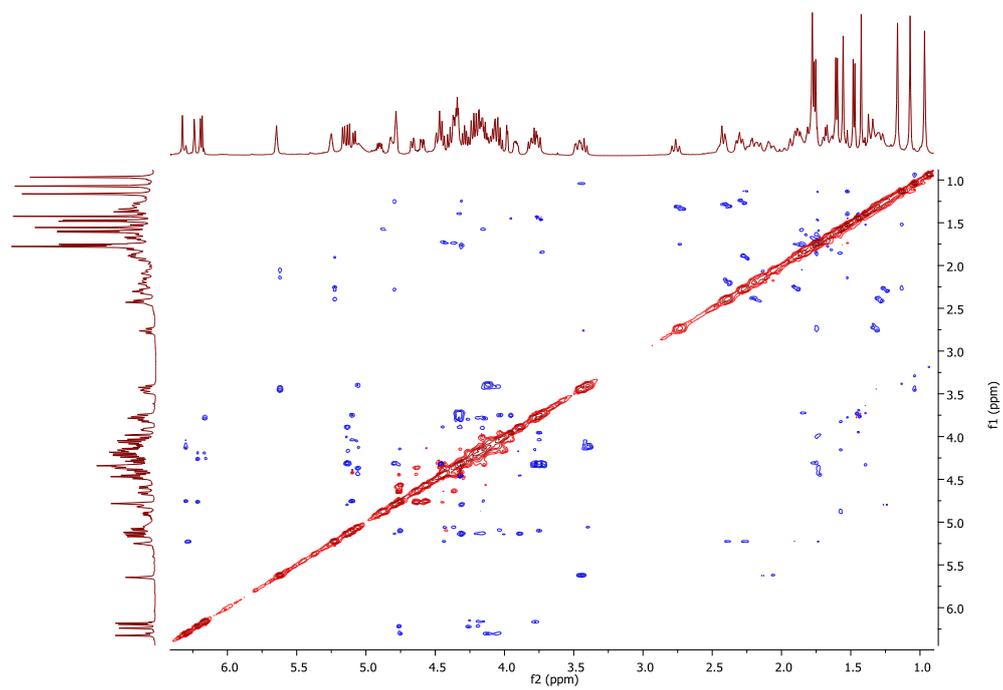


FIGURE 153 - SPECTRE RMN ROESY DU COMPOSE S2 (PYRIDINE d_5 , 500 MHz)

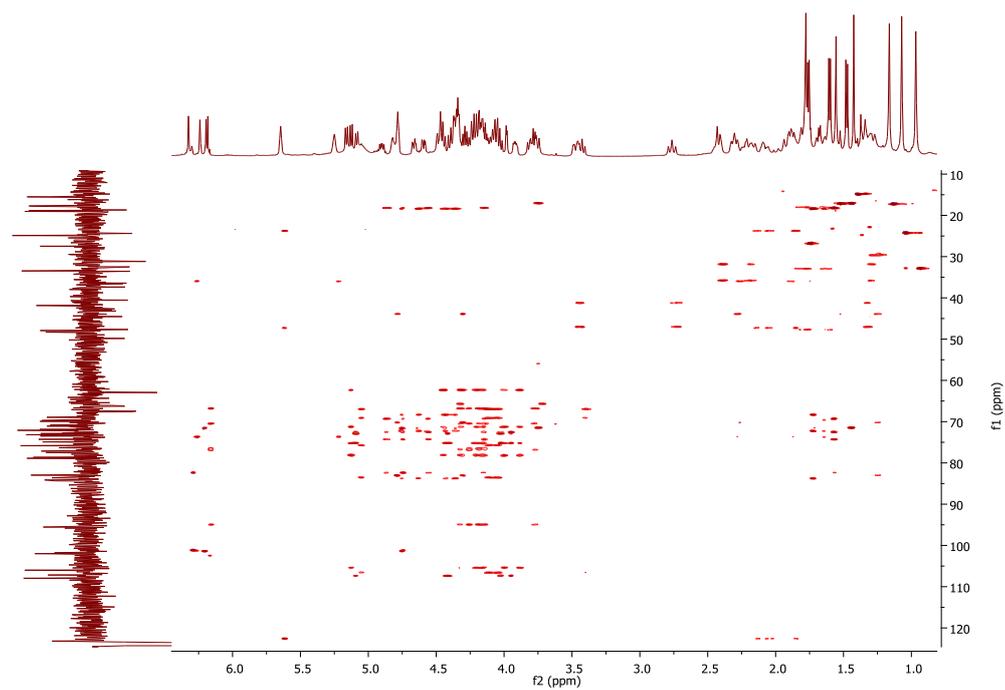


FIGURE 154 - SPECTRE RMN HSQC-TOCSY DU COMPOSE S2 (PYRIDINE d_5 , F2 : 500 MHz, F1 : 125 MHz)

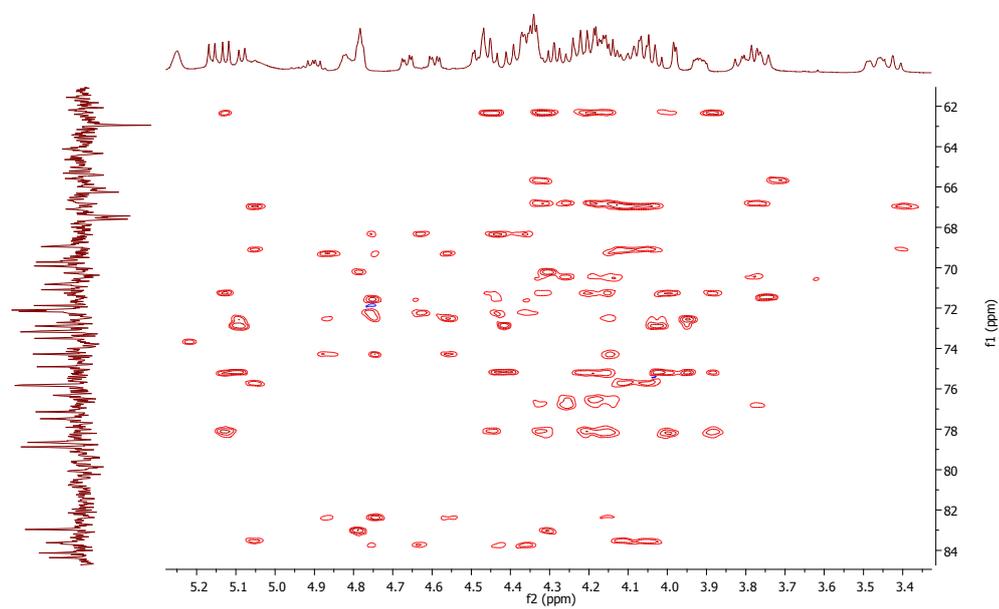


FIGURE 155 - SPECTRE RMN HSQC-TOCSY DU COMPOSE S2 (ZOOM F2 : 3,3-5,3 PPM, F1 : 61-85 PPM)

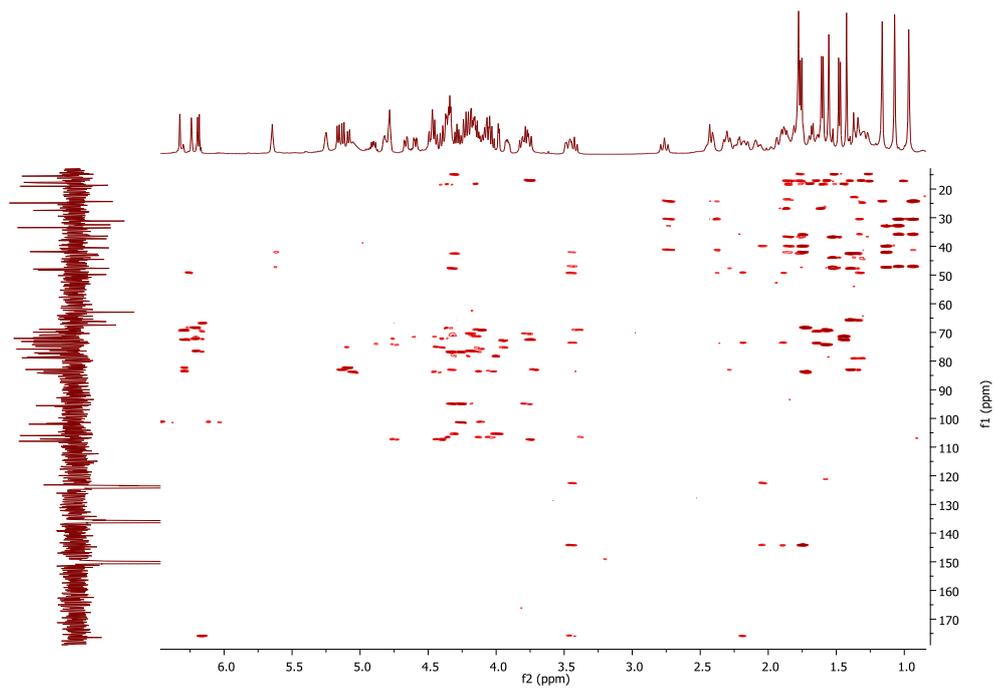


FIGURE 156 - SPECTRE RMN HMBC DU COMPOSE S2 (PYRIDINE d_5 , F2 : 500 MHz, F1 : 125 MHz)

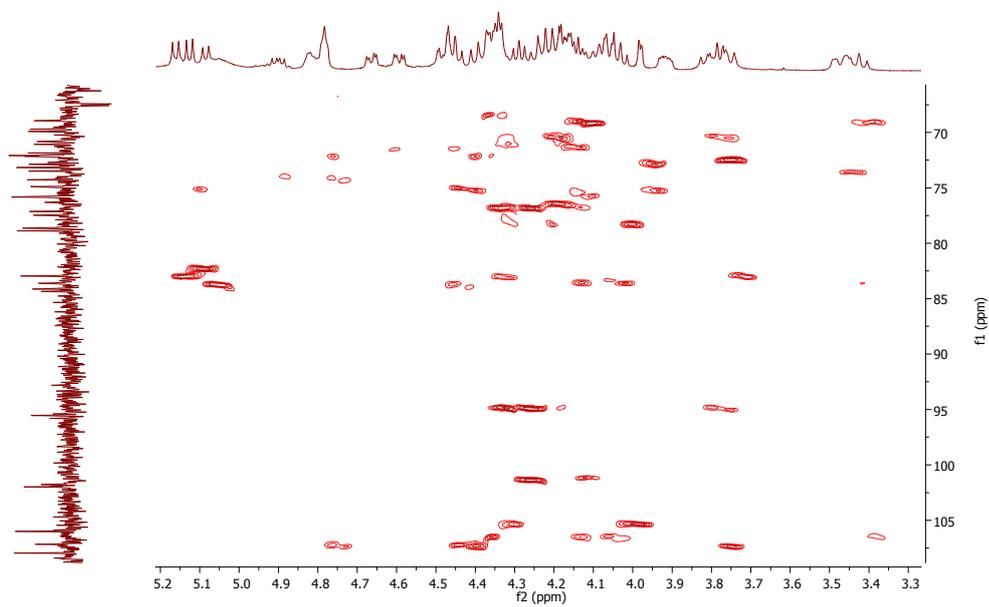


FIGURE 157 - SPECTRE RMN HMBC DU COMPOSE S2 (ZOOM F2 : 3,3-5,2 PPM, F1 : 65-110 PPM)

IV.1.4.3. COMPOSE S7

Les signaux RMN du composé S7 ne correspondent à aucun composé connu. Les caractéristiques de ce dernier sont décrites ci-après :

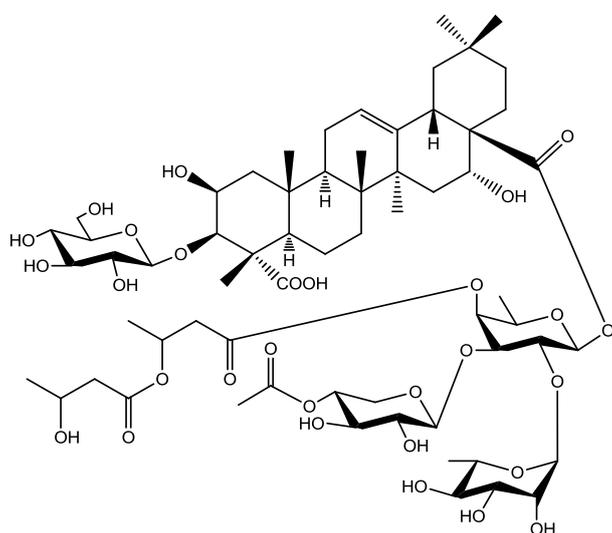
Forme Solide amorphe blanc cassé

Formule brute C₆₃H₉₈O₂₉

UV λ_{max} 195 nm

RMN ¹H et ¹³C (Pyridine d₅, 600 MHz) Tableau 42, Tableau 43 et Figure 159 à Figure 169

HRMS [M+Na]⁺ m/z 1341,6092 ; Δ = 0,5 ppm (Figure 158)
(calculé pour C₆₃H₉₈O₂₉, **1318,6200**)



**TABLEAU 42 - ATTRIBUTION DES SIGNAUX RMN ¹³C ET ¹H (J EN Hz) ET CORRELATIONS 2D DE LA PARTIE
AGLYCONE DU COMPOSE S7 (PYRIDINE d₅, 600 MHz)**

N°	δ _C	δ _H	Mult. (J, Hz)		¹ H- ¹ H COSY	¹ H- ¹³ C HMBC	ROESY
1	44,9	1,37 2,38	m m	CH ₂	Agl-1b Agl-1a		Agl-1b Agl-1a
2	70,8	4,83	m	CH	Agl-1a, 3		Agl-1a, 1b, 3
3	86,4	4,74	d (3,0)	CH	Agl-2		Agl-2, 5
4	53,3	-	-	Cq	-		-
5	52,9	2,11	m	CH	Agl-6a		Agl-3
6	21,6	1,65 1,87	m m	CH ₂	Agl-6b, 7b Agl-6a	Agl-8	Agl-6b Agl-6a
7	33,7	1,68 1,76	m m	CH ₂	Agl-7b Agl-7a	Agl-8	
8	40,5	-	-	Cq	-		-
9	48,1	1,92	m	CH	Agl-11a, 11b		Agl-5
10	37,2	-	-	Cq	-		-
11	24,4	2,10 2,23	m m	CH ₂	Agl-9, 11b, 12 Agl-9, 11a		Agl-11b, 12 Agl-11a, 12
12	122,6	5,65	br t (3,5)	CH	Agl-11a, 11b	Agl-14	Agl-11a, 11b, 18
13	145,0	-	-	Cq	-		-
14	42,7	-	-	Cq	-		-
15	36,5	1,94 2,25	m m	CH ₂	Agl-16		Agl-15b Agl-15a, 16
16	74,0	5,24	br s	CH			Agl-15a, b, 22b
17	49,9	-	-	Cq	-		-
18	41,9	3,40	dd (13,7 ; 3,7)	CH	Agl-19a, 19b	Agl-13, 14, 17	Agl-12, 19a, 22a, 30
19	48,0	1,35 2,75	m m	CH ₂	Agl-18, 19b Agl-18, 19a	Agl-17 Agl-30	Agl-12, 18, 19b Agl-19a, 27, 29
20	31,1	-	-	Cq	-		-
21	36,4	1,31 2,40	m m	CH ₂	Agl-21b, 22b Agl-21a, 22a		Agl-21b Agl-21a
22	32,0	2,24 2,46	m m	CH ₂	Agl-21b, 22b Agl-21a, 22a		Agl-22b Agl-22a
23	nd	-	-	Cq			
24	14,7	1,99	s	CH ₃	-	Agl-3, 4	Agl-25
25	17,5	1,63	s	CH ₃	-	Agl-1, 5, 9, 10	Agl-24, 26
26	17,8	1,20	s	CH ₃	-	Agl-7, 8, 9, 14	Agl-15b, 25
27	27,4	1,79	s	CH ₃	-	Agl-8, 13, 14, 15	Agl-9, 19b
28	176,4	-	-	Cq	-		-
29	33,5	0,95	s	CH ₃	-	Agl-19, 20, 21, 30	Agl-19b, 21b
30	24,9	1,03	s	CH ₃	-	Agl-19, 20, 21, 29	Agl-18

TABLEAU 43 - ATTRIBUTION DES SIGNAUX RMN ¹³C ET ¹H (J EN Hz) ET CORRELATIONS 2D DE LA PARTIE SUCRES ET ESTERS DU COMPOSE S7 (PYRIDINE *d*₅, 600 MHz)

N°	δ _C	δ _H	Mult. (J, Hz)		¹ H- ¹ H COSY	¹ H- ¹³ C HMBC	ROESY
Glucose HSQC-TOCSY (105,5 ; 78,9 ; 78,7 ; 75,5 ; 71,8 ; 62,9)							
1	105,5	5,16	d (7,7)	CH	Glc-2	Glc-2, 5	Glc-5, Agl-3
2	75,5	3,96	br t (8,1)	CH	Glc-1, 3	Glc-1, 3	
3	78,9	4,20	br t (8,7)	CH	Glc-2	Glc-2, 4, 5	Glc-5
4	71,8	4,19	br t (9,2)	CH	Glc-5	Glc-3, 5	Glc-2
5	78,7	3,94	m	CH	Glc-4, 6a	Glc-3	Glc-3, 6a, 6b
6	62,9	4,33	dd (11,7 ; 6,0)	CH ₂	Glc-5, 6b		Glc-5, 6b
		4,50	dd (11,7 ; 2,0)		Glc-6a	Glc-5, 6a	
Fucose HSQC-TOCSY (94,9 ; 81,9 ; 74,7 ; 73,3) (70,9 ; 17,0)							
1	94,9	6,04	d (8,1)	CH	Fuc-2	Agl-28	Fuc-2, 3, 4, 5, 6
2	73,3	4,66	br t (8,6)	CH	Fuc-1, 3	Fuc-1, 3, Rha-1	Fuc-1, 3, 4, Rha-1
3	81,9	4,42	dd (9,3 ; 2,7)	CH	Fuc-2, 4	Fuc-2	Fuc-1, 2, 5, 4, Xyl-1
4	74,7	5,75	br d (2,7)	CH	Fuc-3	Fuc-2, But-1	Fuc-1, 3, 5, 6
5	70,9	4,06	br q (6,3)	CH	Fuc-4, 6	Fuc-1, 4, 6	Fuc-1, 3, 4, 6
6	17,0	1,23	d (6,3)	CH ₃	Fuc-5	Fuc-4, 5	Fuc-4, 5
Rhamnose HSQC-TOCSY (102,1 ; 72,5) (74,2 ; 72,6 ; 70,6 ; 19,1)							
1	102,1	6,35	br s	CH	Rha-2	Rha-2, 5, Fuc-2	Rha-2, Fuc-2
2	72,5	4,81	m	CH	Rha-1	Rha-4	Rha-1, 3
3	72,6	4,51	dd (9,2 ; 2,9)	CH	Rha-2, 4	Rha-1, 4	Rha-2, 6
4	74,2	4,28	br t (9,2)	CH	Rha-3, 5	Rha-2, 3, 5, 6	Rha-6
5	70,6	4,54	m	CH	Rha-6		Rha-2, 4, 6
6	19,1	1,69	d (5,9)	CH ₃	Rha-5	Rha-4, 5	Rha-4, 5
Xylose HSQC-TOCSY (106,2 ; 73,0 ; 72,5 ; 72,3 ; 64,6)							
1	106,2	4,93	d (7,3)	CH	Xyl-2	Fuc-3	Xyl-3, 5a, Fuc-3
2	73,0	4,31	br t (8,2)	CH	Xyl-1, 3	Xyl-1, 3	Xyl-3, 4, 5a
3	72,5	4,16	br t (8,5)	CH	Xyl-2,4	Xyl-4	Xyl-1, 2, 4, 5a
4	72,3	5,50	m	CH	Xyl-3, 5a, 5b	Xyl-2, 3, Ac-1	Xyl-3, 5a, 5b
5	64,6	3,73	br t (11,0)	CH ₂	Xyl-4	Xyl-1, 3, 4	Xyl-1, 3, 4, 5b
		4,26	dd (11,0 ; 5,1)				Xyl-4, 5a
Acetate							
1	171,3	-	-	Cq	-		-
2	21,4	2,02	s	CH ₃		Ac-1	
Dimeric hydroxybutyrate HSQC-TOCSY (67,7 ; 40,9 ; 20,0) (64,7 ; 45,4 ; 24,3)							
1	170,3	-	-	Cq	-		-
2	40,9	2,56	dd (15,7 ; 6,0)	CH ₂	But-2b, 3	But-1, 3, 4	But-2b, 3
		2,73	dd (15,7 ; 6,7)		But-2a, 3		But-2a, 3
3	67,7	5,50	q (6,4)	CH	But-2a, 2b, 4	But-1, 1', 2, 4	But-2a, 2b, 4
4	20,0	1,31	d (6,2)	CH ₃	But-3	But-2, 3	But-3
1'	171,7	-	-	Cq	-		-
2'	45,4	2,66	dd (14,8 ; 5,5)	CH ₂	But-2'b, 3'	But-1', 3', 4'	But-2'b, 3'
		2,83	dd (14,8 ; 7,7)		But-2'a, 3'		But-2'a, 3'
3'	64,7	4,57	q (6,4)	CH	But-2'a, 2'b, 4'	But-1', 2'	But-2'a, 2'b, 4'
4'	24,3	1,41	d (6,2)	CH ₃	But-3'	But-2', 3'	But-3'

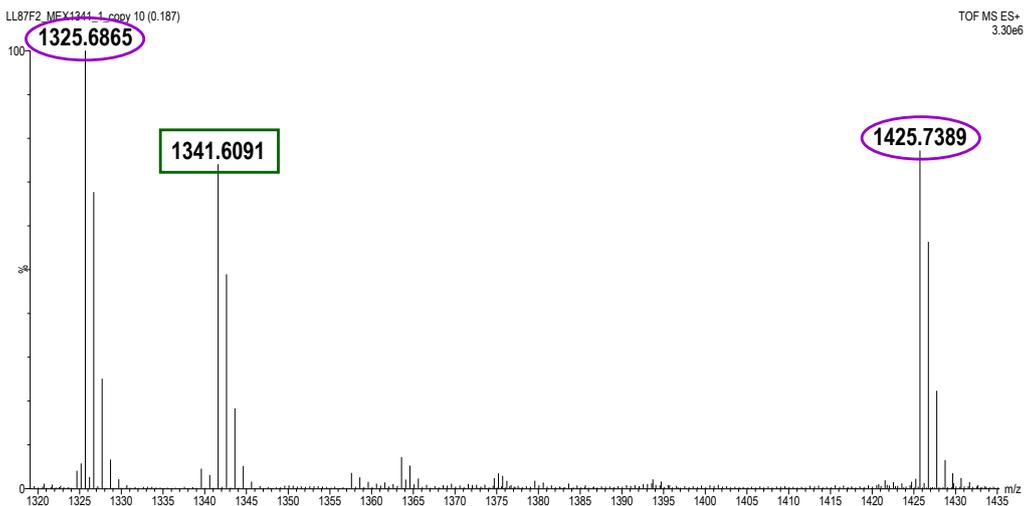


FIGURE 158 - SPECTRE HRESIMS DU COMPOSE S7 EN MODE POSITIF $[M+Na]^+$; STANDARD INTERNE
ATTENDU A M/Z 1325,6865 ET M/Z 1425,7389)

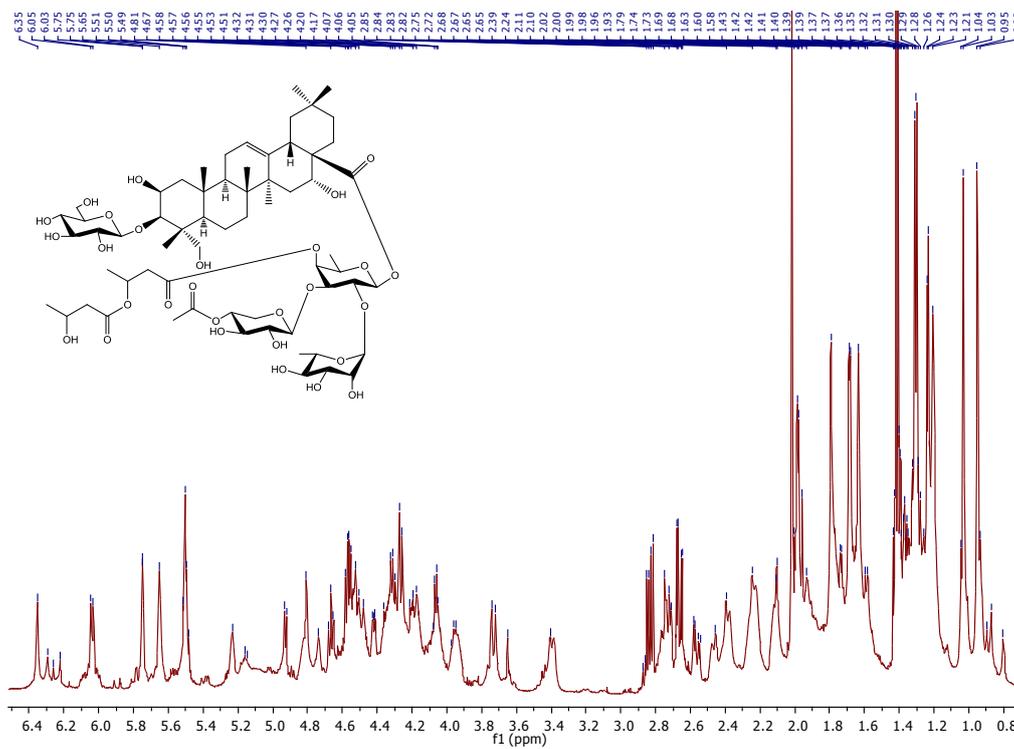


FIGURE 159 - SPECTRE RMN 1H DU COMPOSE S7 (PYRIDINE d_5 , 600 MHz, 300 K)

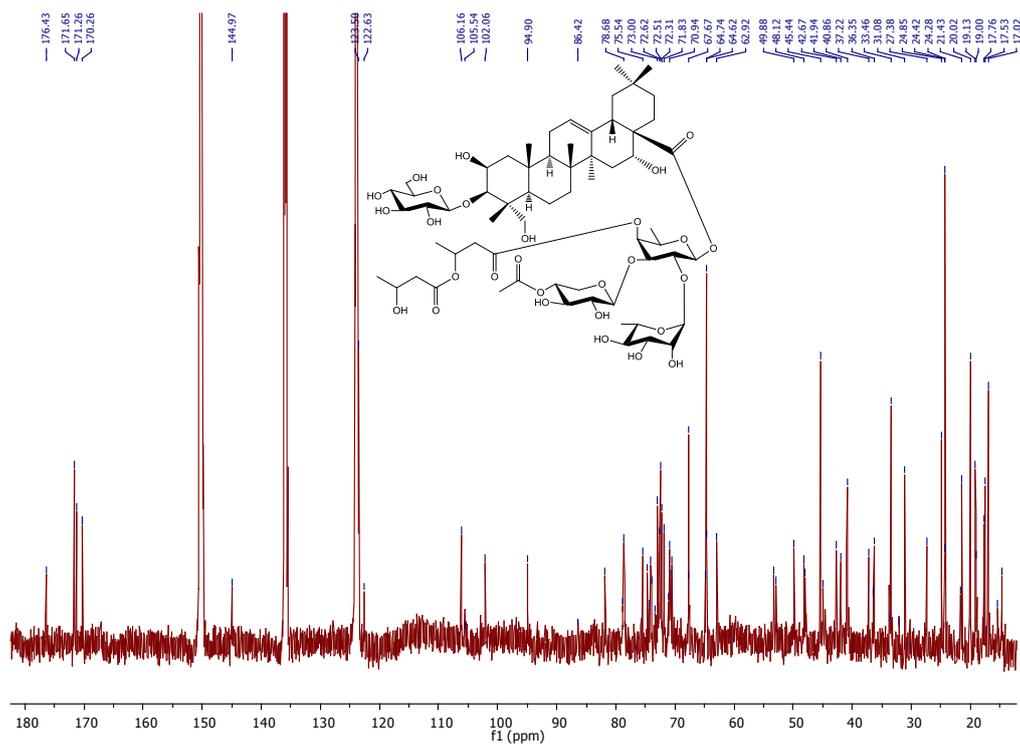


FIGURE 160 - SPECTRE RMN ^{13}C DU COMPOSE S7 (PYRIDINE d_5 , 600 MHz, 300 K)

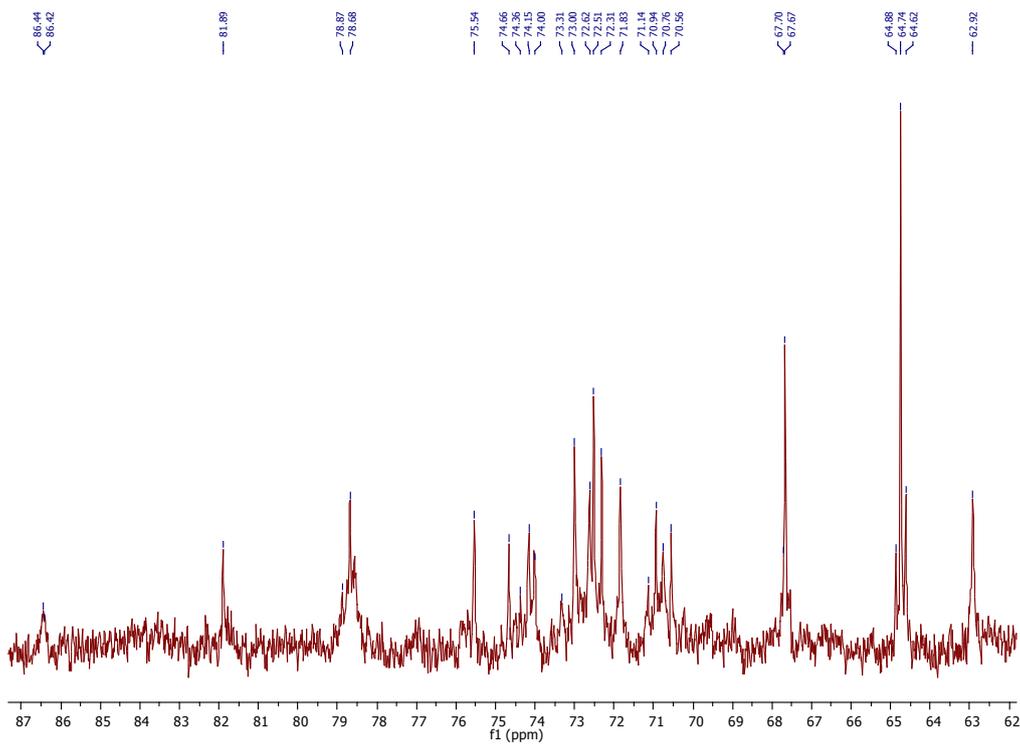


FIGURE 161 - SPECTRE RMN ^{13}C DU COMPOSE S7 (ZOOM 62-87 PPM)

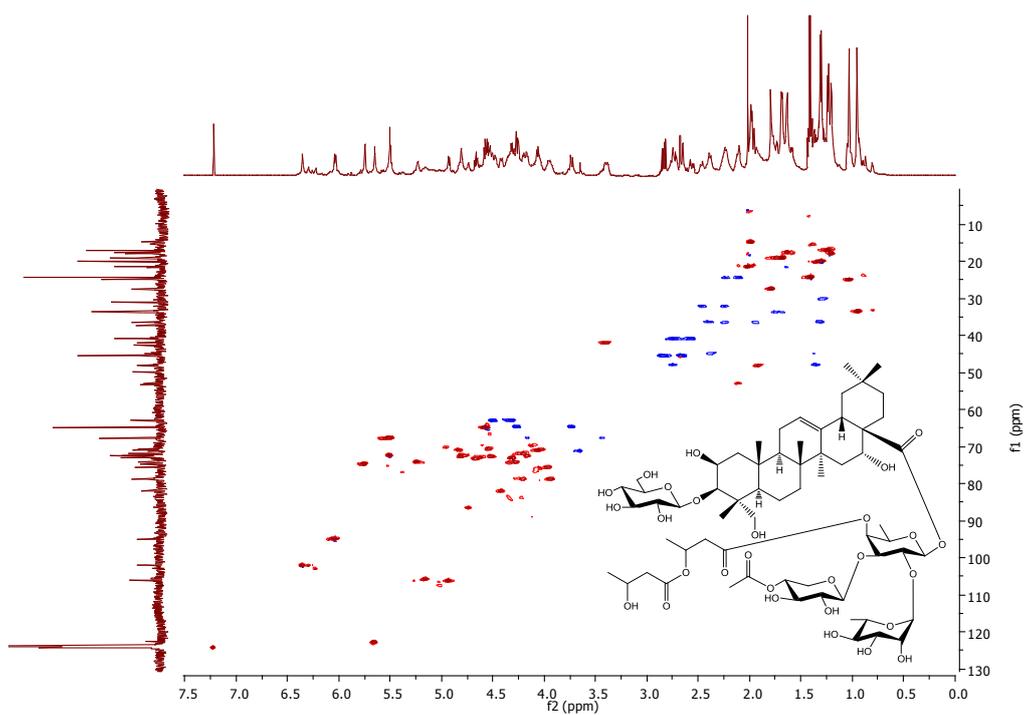


FIGURE 162 - SPECTRE RMN HSQC DU COMPOSE S7 (PYRIDINE d_5 , F2 : 600 MHz, F1 : 150 MHz)

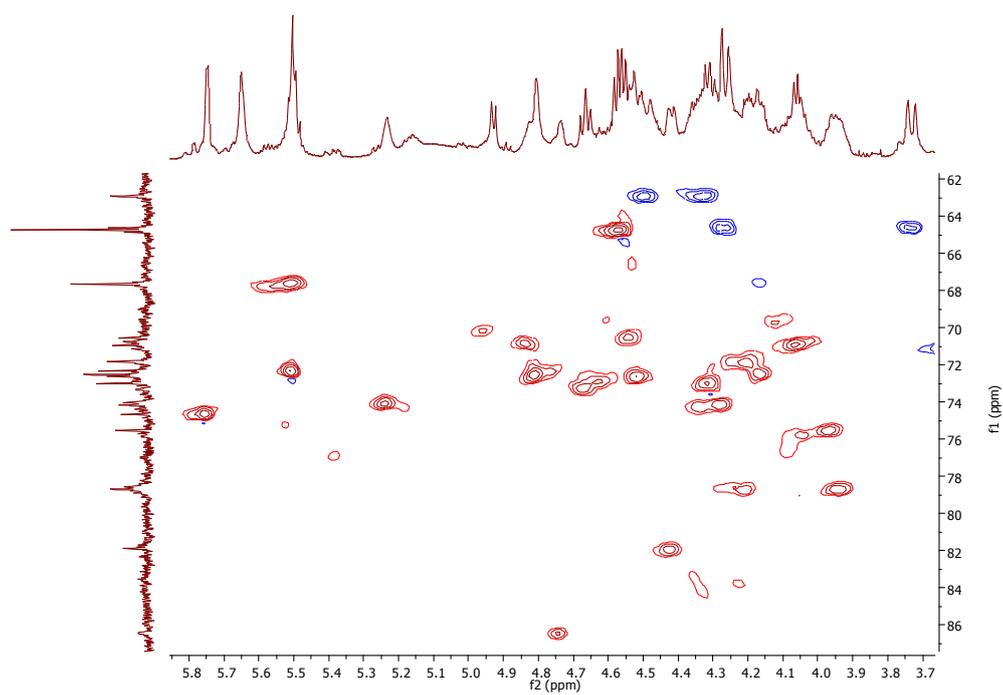


FIGURE 163 - SPECTRE RMN HSQC DU COMPOSE S7 (ZOOM F2 : 3,7-5,8 PPM, F1 : 62-87 PPM)

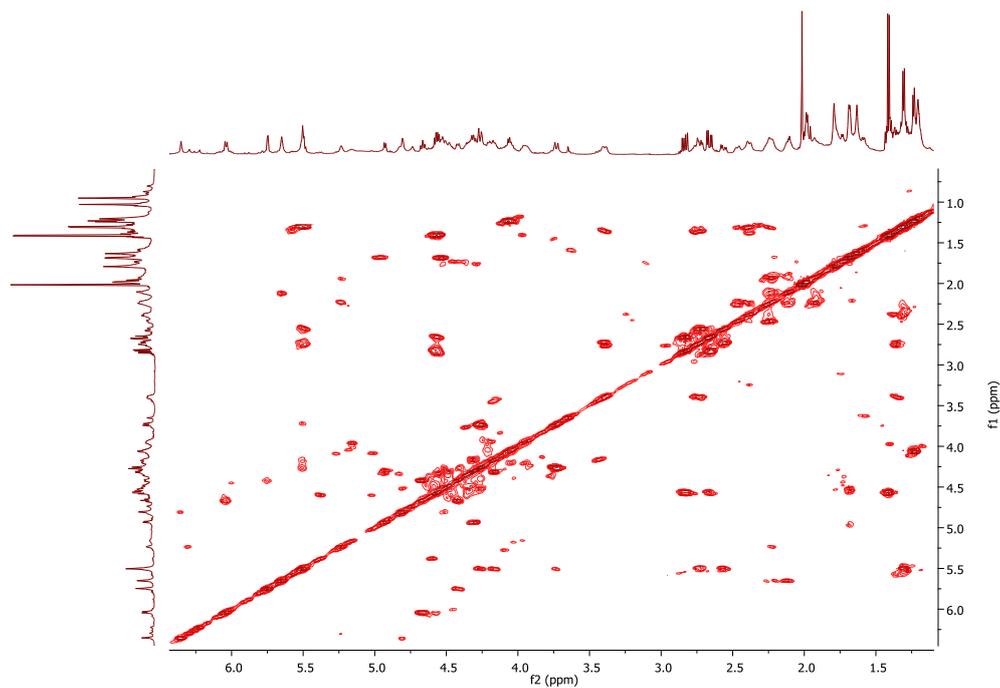


FIGURE 164 - SPECTRE RMN COSY DU COMPOSE S7 (PYRIDINE d_5 , 600 MHz)

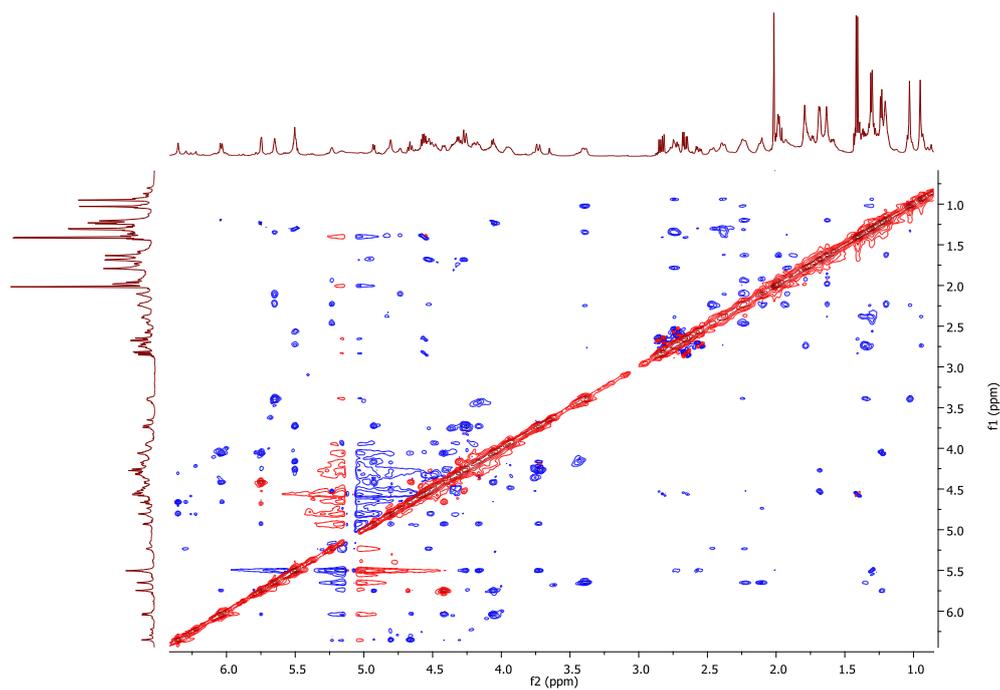


FIGURE 165 - SPECTRE RMN ROESY DU COMPOSE S7 (PYRIDINE d_5 , 600 MHz)

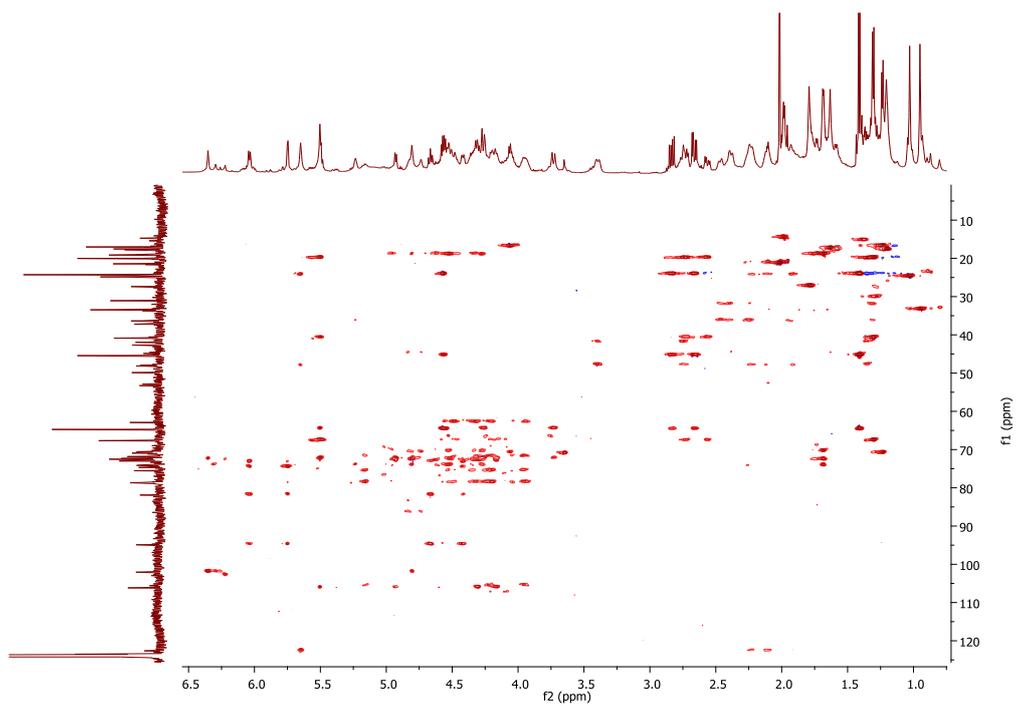


FIGURE 166 - SPECTRE RMN HSQC-TOCSY DU COMPOSE S7 (PYRIDINE d_5 , F2 : 600 MHz, F1 : 150 MHz)

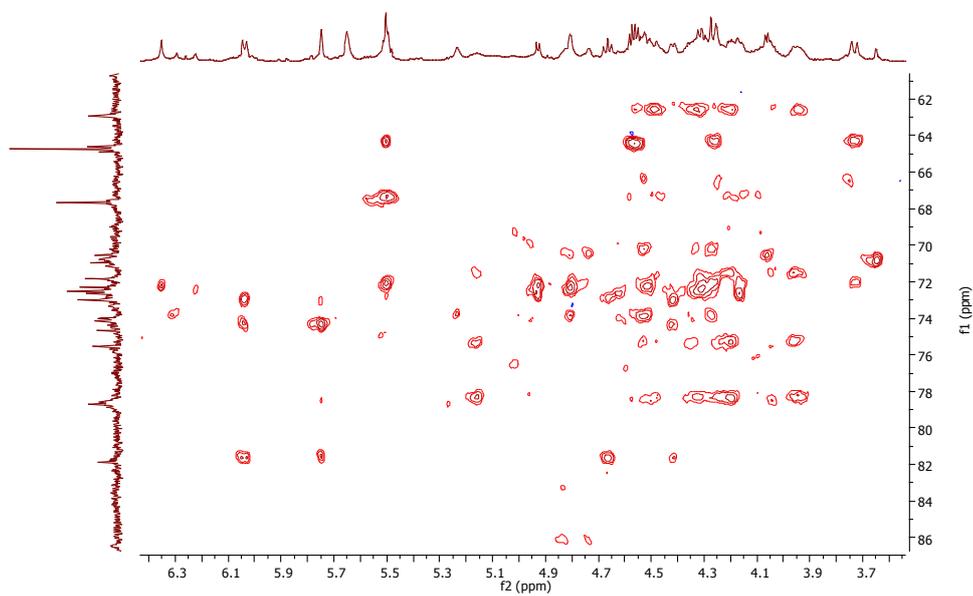


FIGURE 167 - SPECTRE RMN HSQC-TOCSY DU COMPOSE S7 (ZOOM F2 : 3,6-6,4 PPM, F1 : 62-86 PPM)

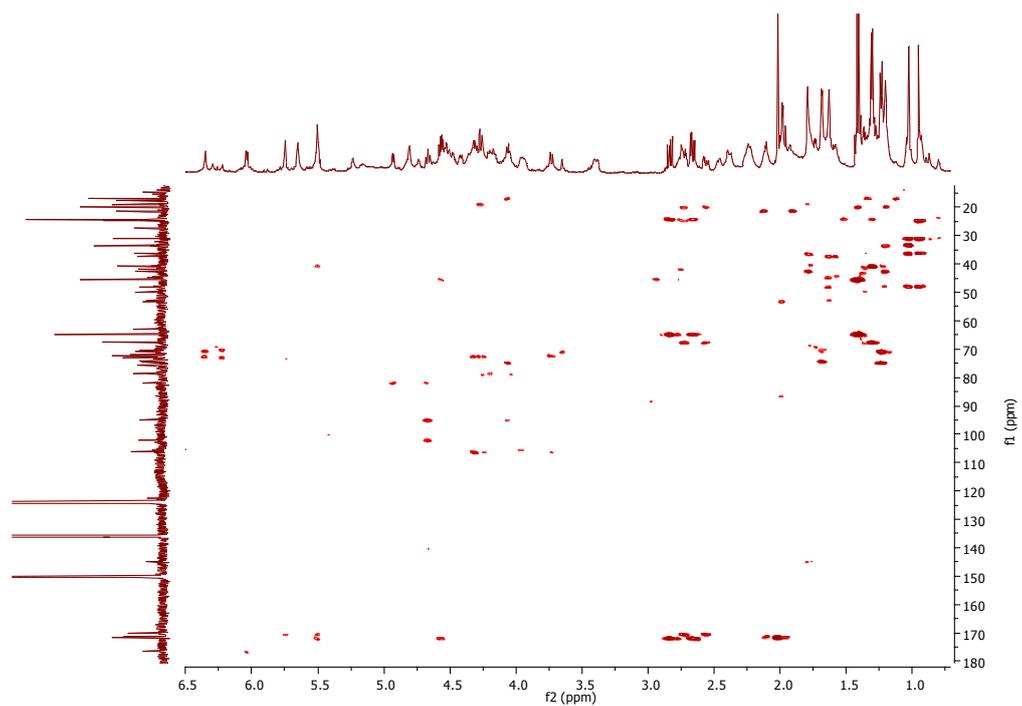


FIGURE 168 - SPECTRE RMN HMBC DU COMPOSE S7 (PYRIDINE d_5 , F2 : 600 MHz, F1 : 150 MHz)

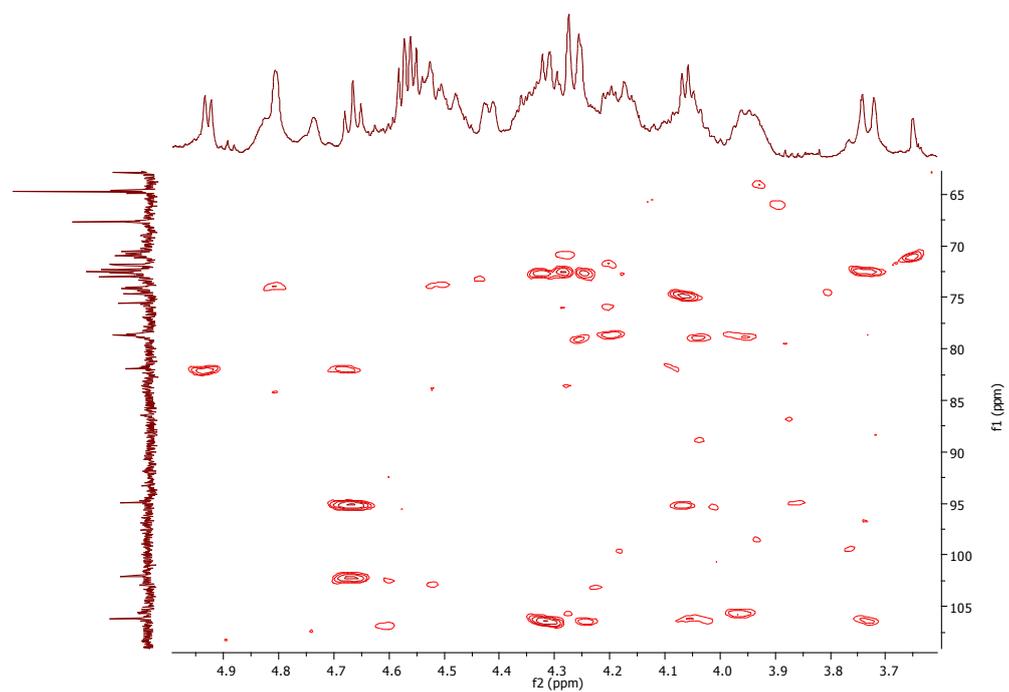


FIGURE 169 - SPECTRE RMN HMBC DU COMPOSE S7 (ZOOM F2 : 3,6-5,0 PPM, F1 : 65-110 PPM)

IV.1.4.4. COMPOSE S8

Les signaux RMN du composé S8 ne correspondent à aucun composé connu. Les caractéristiques de ce dernier sont décrites ci-après :

Forme Solide amorphe blanc cassé

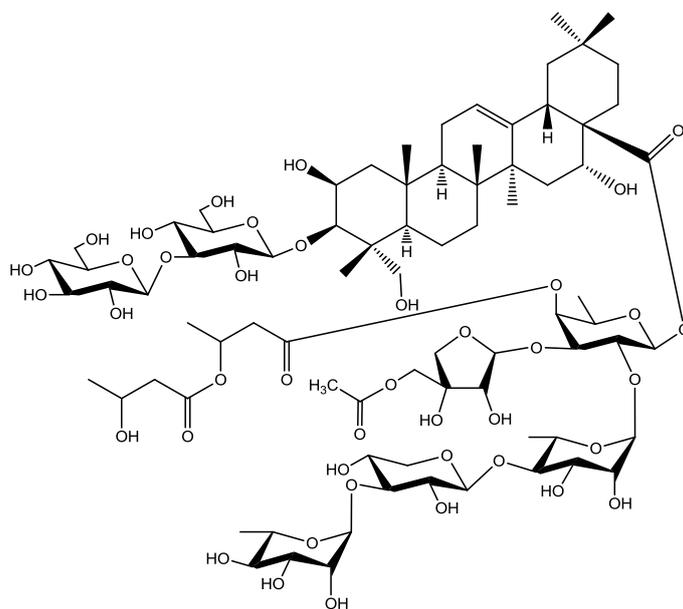
Formule brute $C_{80}H_{128}O_{41}$

UV λ_{\max} 195 nm

RMN 1H et ^{13}C (Pyridine d_5 , 600 MHz) Tableau 44, Tableau 45 et Figure 171 et Figure 181

HRMS $[M+2Na]^{2+}$ m/z 895,3859 ; $\Delta = 0,1$ ppm (Figure 170)

(calculé pour $C_{80}H_{128}O_{41}$, **1744,7934**)



**TABLEAU 44 - ATTRIBUTION DES SIGNAUX RMN ¹³C ET ¹H (J EN Hz) ET CORRELATIONS 2D DE LA PARTIE
AGLYCONE DU COMPOSE S8 (PYRIDINE *d*₅, 600 MHz)**

N°	δ _C	δ _H	Mult. (J, Hz)		¹ H- ¹ H COSY	¹ H- ¹³ C HMBC	ROESY
1	44,7	1,28	m	CH ₂	Agl-1b, 2		Agl-1b, 2
		2,32	m		Agl-1a		Agl-1a, 2
2	70,8	4,81	m	CH	Agl-1a, b, 3		Agl-1a, b, 3
3	83,5	4,35	m	CH	Agl-2		Agl-2, 5
4	43,2	-	-	Cq	-		-
5	48,2	1,83	m	CH			Agl-3
6	18,6	?	nd	CH ₂			
		1,89	m		Agl-7a		
7	33,6	1,71	m	CH ₂	Agl-6b, 7b	Agl-26	
		1,88	m		Agl-7a		
8	40,6	-	-	Cq	-		-
9	47,9	1,89	m	CH	Agl-11a, b	Agl-10	
10	37,4	-	-	Cq	-		-
11	24,4	2,09	m	CH ₂	Agl-9, 11b, 12		Agl-11b, 12
		2,21	m		Agl-9, 11a		Agl-11a, 12
12	123,0	5,65	br t (3,5)	CH	Agl-11a	Agl-14	Agl-11a, b, 18
13	144,7	-	-	Cq	-		-
14	42,7	-	-	Cq	-		-
15	36,6	1,94	m	CH ₂			Agl-15b
		2,27	m		Agl-15a, 26		
16	74,4	5,25	br s	CH	Agl-15a, b		
17	49,8	-	-	Cq	-		-
18	42,0	3,40	dd (14,0 ; 3,8)	CH	Agl-19a	Agl-12, 13, 16, 17, 28	Agl-12, 19a, 30
19	47,8	1,34	m	CH ₂	Agl-18, 19b		Agl-18, 19b
		2,75	m		Agl-18, 19a		Agl-19a, 27
20	31,1	-	-	Cq	-		-
21	36,3	1,30	m	CH ₂	Agl-21b, 22b	Agl-20	Agl-21b, 22b
		2,38	m		Agl-21a, 22a		Agl-21a
22	32,2	2,24	m	CH ₂	Agl-21b, 22b	Agl-16	Agl-22b
		2,42	m		Agl-21a, 22a		Agl-22a
23	65,8	3,75	d (11,0)	CH ₂	Agl-23b	Agl-3	Agl-6, 23b
		4,36	d (11,0)		Agl-23a		Agl-23a, 24
24	15,4	1,37	s	CH ₃	-	Agl-3, 4, 5, 23	Agl-23b
25	17,9	1,59	s	CH ₃	-	Agl-1, 9, 10	Agl-11, 24, 26
26	18,0	1,19	s	CH ₃	-	Agl-7, 8, 9, 14	Agl-15b, 25
27	27,4	1,79	s	CH ₃	-	Agl-8, 13, 14, 15	Agl-9, 19b
28	176,5	-	-	Cq	-		-
29	33,4	0,93	s	CH ₃	-	Agl-19, 20, 21, 30	Agl-19b
30	24,9	1,04	s	CH ₃	-	Agl-19, 20, 21, 29	Agl-18

TABLEAU 45 - ATTRIBUTION DES SIGNAUX RMN ¹³C ET ¹H (J EN HZ) ET CORRELATIONS 2D DE LA PARTIE SUCRES ET ESTERS DU COMPOSE S8 (PYRIDINE d₅, 600 MHz)

N°	δ _C	δ _H	Mult. (J, Hz)		¹ H- ¹ H COSY	¹ H- ¹³ C HMBC	ROESY
Glucose HSQC-TOCSY (105,7 ; 88,9 ; 78,2 ; 74,5 ; 4,13 ; 62,5)							
1	105,7	5,14	d (7,7)	CH	Glc-2	Agl-3	Glc-3, 4, 5, Agl-3
2	74,5	4,04	br t (8,0)	CH	Glc-1, 3	Glc-1, 3	Glc-4
3	88,9	4,11	br t (8,0)	CH	Glc-2	Glc-2, 4, 5	Glc-5
4	69,9	4,13	br t (8,1)	CH	Glc-5	Glc-3	Glc-2
5	78,2	3,84	m	CH	Glc-4, 6a, 6b		Glc-3, 6b
6	62,5	4,25	dd (11,8 ; 3,5)	CH ₂	Glc-5, 6b	Glc-4	Glc-5
		4,40	dd (11,8 ; 2,0)		Glc-5, 6a		
Glucose' HSQC-TOCSY (106,2 ; 79,1 ; 78,6 ; 75,9 ; 71,9 ; 62,8)							
1	106,2	5,26	d (7,8)	CH	Glu'-2	Glc-3	Glc'-3, 5, Glc-3
2	75,9	4,08	br t (8,0)	CH		Glc'-1, 3	
3	79,1	4,05	br t (8,0)	CH	Glu'-4	Glc'-1	Glc'-1
4	71,9	4,20	br t (8,2)	CH	Glu'-3, 5	Glc'-3, 5	
5	78,6	4,27	m	CH	Glu'-4, 6a	Glc'-4	Glc'-6b
6	62,8	4,32	dd (12,3 ; 6,2)	CH ₂	Glu'-4, 6b	Glc'-1, 4	Glc'-6b
		4,56	dd(12,3 ; 2,0)		Glu'-6a		Glc'-6a
Fucose HSQC-TOCSY (94,7 ; 80,9 ; 74,5 ; 74,3) (70,7 ; 16,8)							
1	94,7	6,00	d (8,1)	CH	Fuc-2	Agl-28	Fuc-3, 5
2	74,5	4,45	br t (8,3)	CH	Fuc-1, 3	Fuc-1, 3, Rha-1	Fuc-1, Rha-1
3	80,9	4,25	dd (9,2 ; 3,2)	CH	Fuc-2, 4		Fuc-1, 5, Api-1
4	74,3	5,72	br d (3,4)	CH	Fuc-3	Fuc-2, But-1	Fuc-3, 5
5	70,7	4,01	br q (6,5)	CH	Fuc-6	Fuc-4, 6	Fuc-1, 4
6	16,8	1,21	d (6,3)	CH ₃	Fuc-5	Fuc-4, 5	Fuc-4, 5
Rhamnose HSQC-TOCSY (102,6 ; 71,8) (84,2 ; 72,9 ; 69,4 ; 18,9)							
1	102,6	5,91	br s	CH	Rha-2	Rha-3, 5, Fuc-2	Rha-2, Fuc-2
2	71,8	4,70	m	CH	Rha-1, 3	Rha-3, 4	Rha-1, 4
3	72,9	4,62	dd (9,3 ; 2,9)	CH	Rha-2, 4		
4	84,2	4,32	br t (9,4)	CH	Rha-3	Rha-3, 5, 6, Xyl-1	Xyl-1
5	69,4	4,38	dq (9,9 ; 5,9)	CH	Rha-6		Rha-3
6	18,9	1,73	d (5,9)	CH ₃	Rha-5	Rha-4, 5	Rha-4, 5
Xylose HSQC-TOCSY (107,3 ; 83,6 ; 76,7 ; 69,5 ; 67,7)							
1	107,3	5,02	d (7,7)	CH	Xyl-2	Xyl-3, Rha-4	Xyl-2, 3, 5a, Rha-4
2	76,7	4,07	br t (8,4)	CH	Xyl-1, 3	Xyl-1, 3	Xyl-5a
3	83,6	4,22	br t (9,0)	CH	Xyl-2,4	Xyl-2, 4	Rha'-1
4	69,5	4,09	m	CH	Xyl-3, 5a		

5	67,7	3,45 4,18	br t (10,9) dd (10,9 ; 5,3)	CH ₂	Xyl-4	Xyl-4	Xyl-1, 5b Xyl-5a
Rhamnose' HSQC-TOCSY (102,9 ; 72,8) (74,3 ; 72,6 ; 70,2 ; 19,0)							
1	102,9	6,22	br s	CH	Rha'-2	Rha'-3, 5, Xyl-3	Rha'-2, Xyl-3
2	72,8	4,80	br d (2,9)	CH	Rha'-1, 3	Rha'-4	Rha'-1, 4
3	72,6	4,58	dd (9,2 ; 2,9)	CH	Rha'-2, 4		Rha'-4
4	74,3	4,33	br t (9,2)	CH	Rha'-3, 5	Rha'-2, 3	
5	70,2	4,96	dq (9,5 ; 6,2)	CH	Rha'-4, 6		
6	19,0	1,68	d (6,2)	CH ₃	Rha'-5	Rha'-4, 5	Rha'-4, 5
Apiose HSQC-TOCSY (112,7 ; 79,1)							
1	112,7	5,74	d (2,2)		Api-2	Fuc-3, Api-4	Fuc-3, Api-2, 4a
2	79,1	4,56	d (2,2)		Api-1	Api-1, 4	
3	78,7	-	-		-		-
4	75,7	4,37 4,53	d (9,6) d (9,6)		Api-4b, 5a, 5b Api-4a	Api-1, 3	Api-1, 4b Api-4a, 5b
5	67,6	4,49 4,64	d (11,3) d (11,3)		Api-4a, 5b Api-4a, 5a	Api-3, 4, Ac-1	Api-5b Api-5a
Acetate							
1	171,3	-	-	Cq	-		-
2	21,0	2,00	s	CH ₃		Ac-1	
Dimeric hydroxybutyrate HSQC-TOCSY (67,7 ; 40,9 ; 20,2) (64,7 ; 45,5 ; 24,3)							
1	170,7	-	-	Cq	-		-
2	40,9	2,76 2,96	dd (15,8 ; 6,5) dd (15,8 ; 6,7)	CH ₂	But-2b, 3 But-2a, 3	But-1, 3, 4	But-2b, 3 But-2a
3	67,7	5,58	q (6,4)	CH		But-1', 2, 4	But-2a
4	20,2	1,37	d (6,3)	CH ₃		But-2, 3	But-3
1'	171,7	-	-	Cq	-		-
2'	45,5	2,66 2,84	dd (14,8 ; 5,5) dd (14,8 ; 7,6)	CH ₂	But-2'b, 3' But-2'a, 3'	But-1', 3', 4'	But-2'b But-2'a, 3'
3'	64,7	4,58	m	CH	But-4'	But-1', 2'	But-2'a, 4'
4'	24,3	1,42	d (6,2)	CH ₃	But-3'	But-2', 3'	But-3'

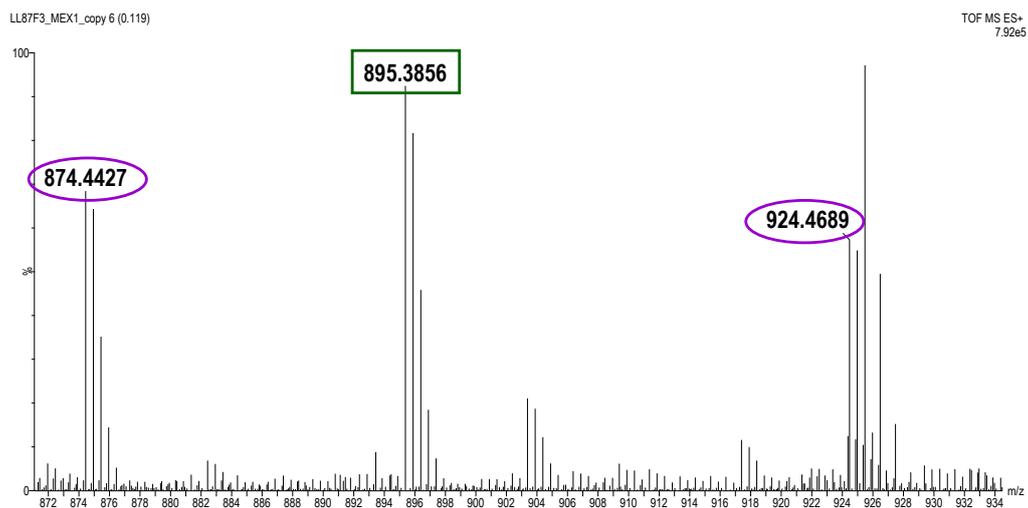


FIGURE 170 - SPECTRE HRESIMS DU COMPOSE S8 EN MODE POSITIF ($[M+2Na]^{2+}$; STANDARD INTERNE ATTENDU A M/Z 874,4427 ET M/Z 924,4689)

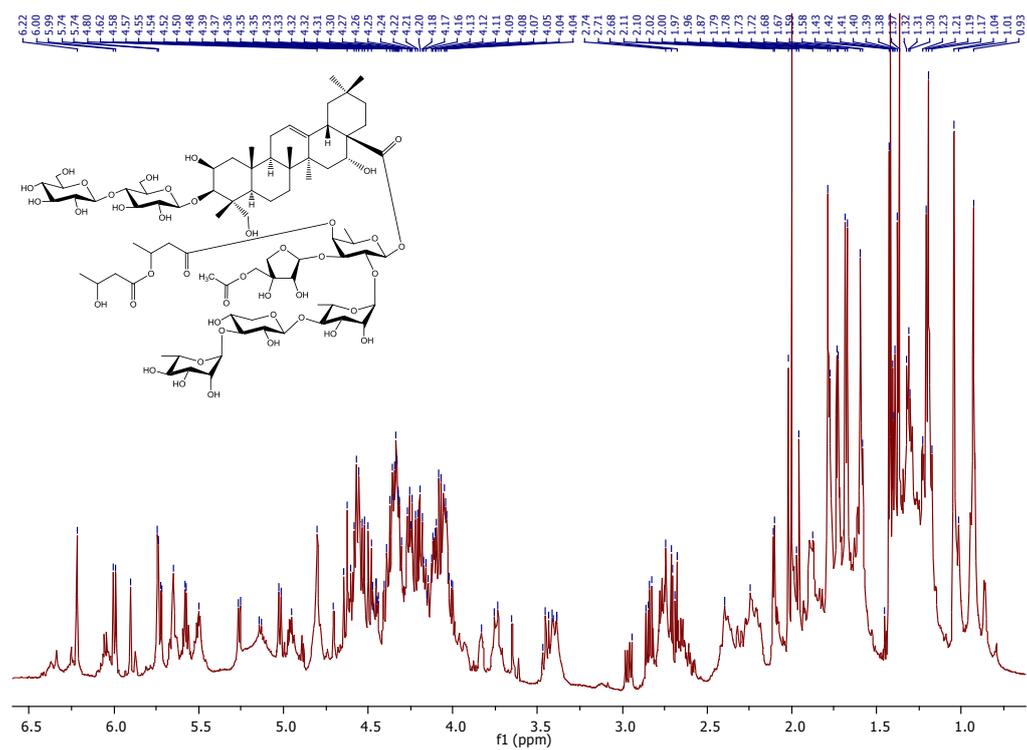


FIGURE 171 - SPECTRE RMN 1H DU COMPOSE S8 (PYRIDINE d_5 , 600 MHz, 300 K)

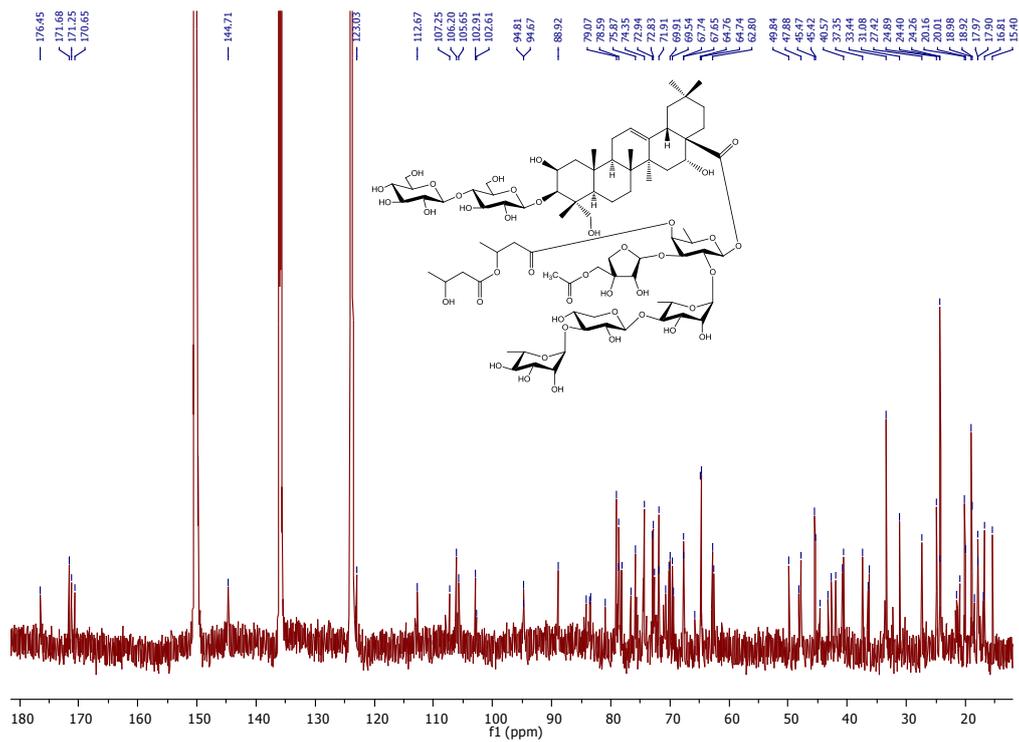


FIGURE 172 - SPECTRE RMN ^{13}C DU COMPOSE S8 (PYRIDINE d_5 , 600 MHz, 300 K)

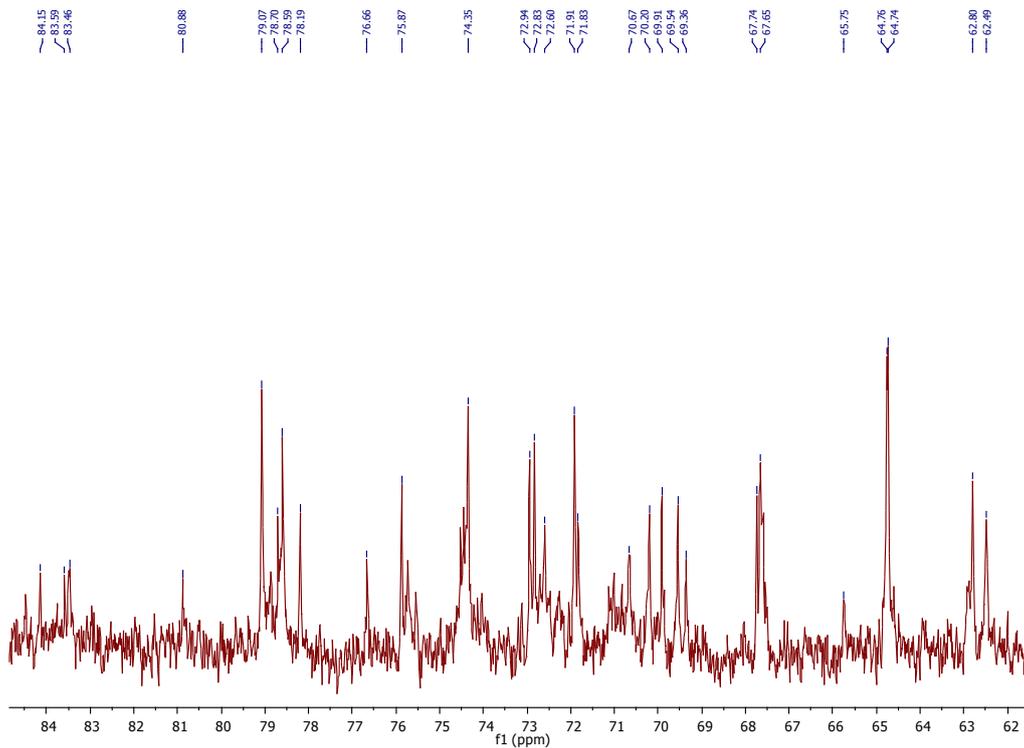


FIGURE 173 - SPECTRE RMN ^{13}C DU COMPOSE S8 (ZOOM 62-85 PPM)

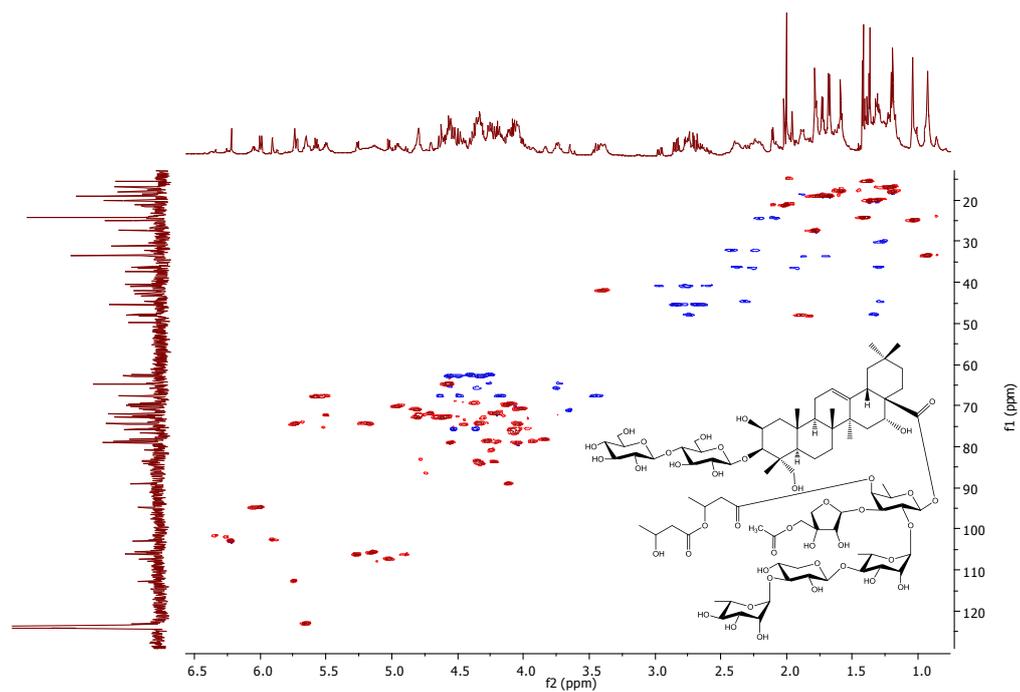


FIGURE 174 - SPECTRE RMN HSQC DU COMPOSE S8 (PYRIDINE d_5 , F2 : 600 MHz, F1 : 150 MHz)

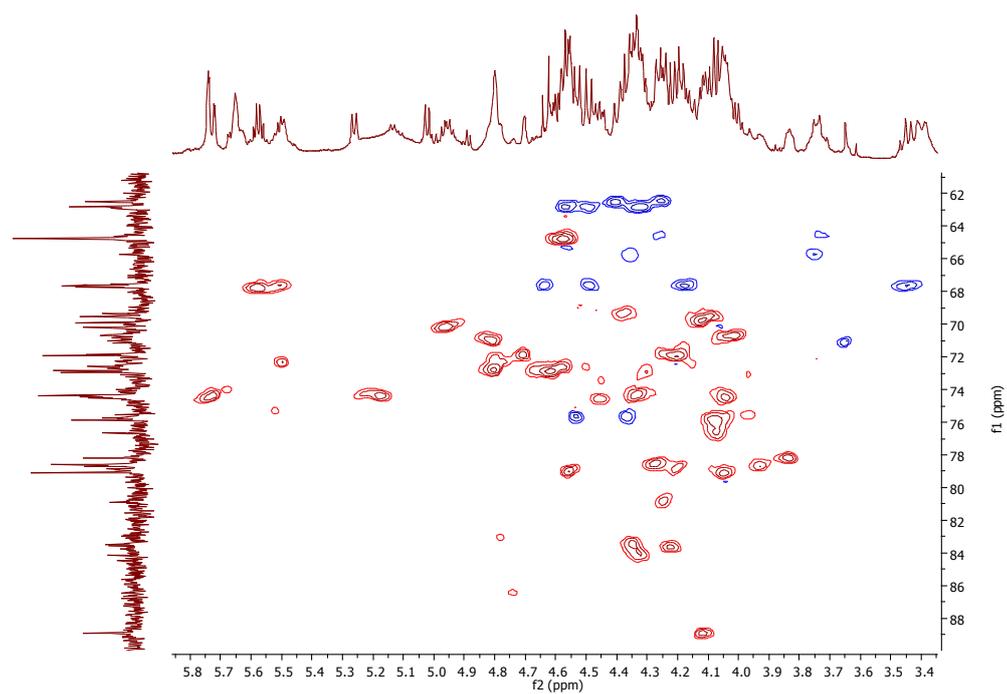


FIGURE 175 - SPECTRE RMN HSQC DU COMPOSE S8 (ZOOM F2 : 3,4-5,8 PPM, F1 : 61-90 PPM)

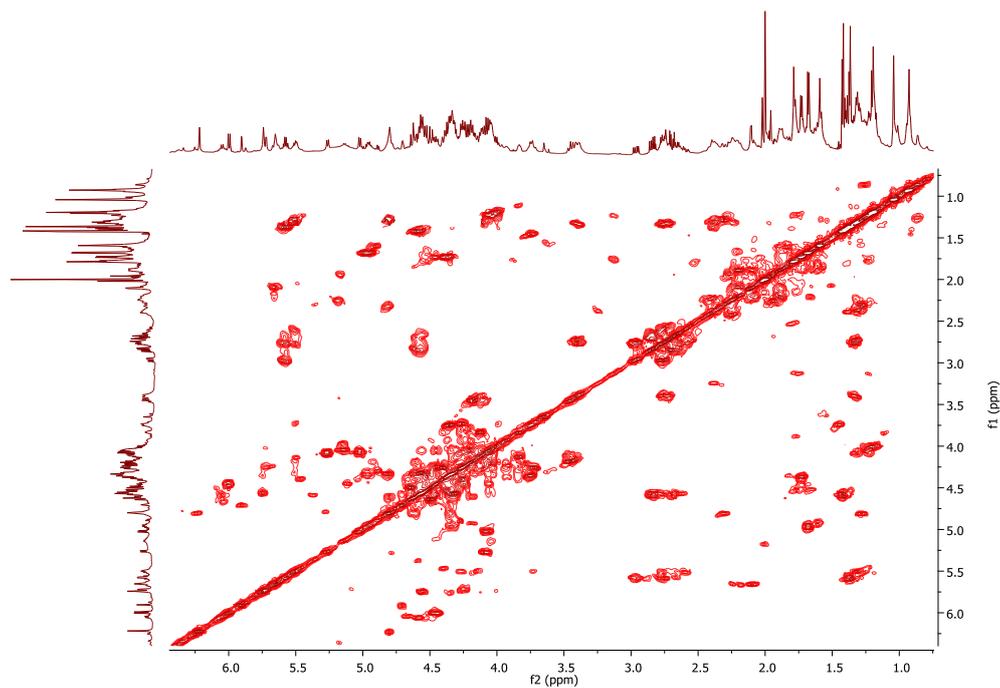


FIGURE 176 - SPECTRE RMN COSY DU COMPOSE S8 (PYRIDINE d_5 , 600 MHz)

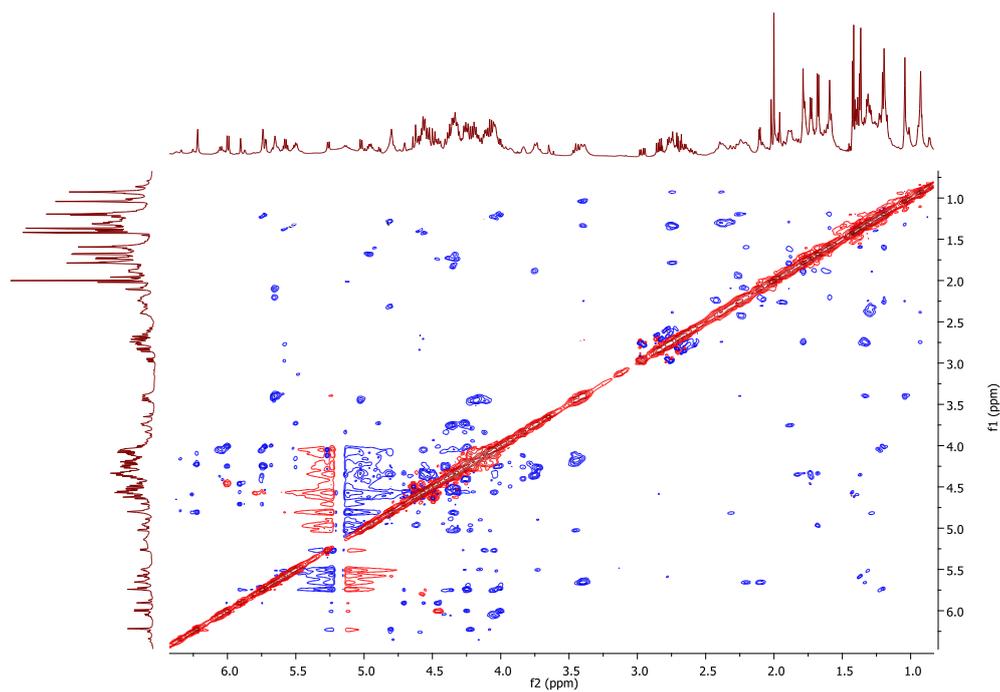


FIGURE 177 - SPECTRE RMN ROESY DU COMPOSE S8 (PYRIDINE d_5 , 600 MHz)

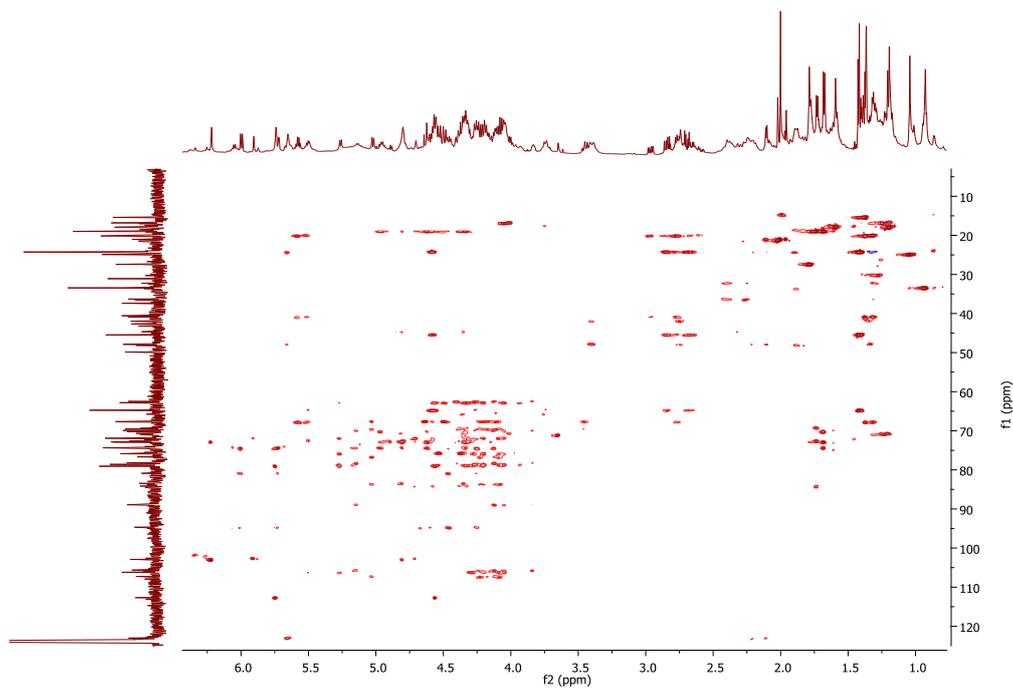


FIGURE 178 - SPECTRE RMN HSQC-TOCSY DU COMPOSE S8 (PYRIDINE d_5 , F2 : 600 MHz, F1 : 150 MHz)

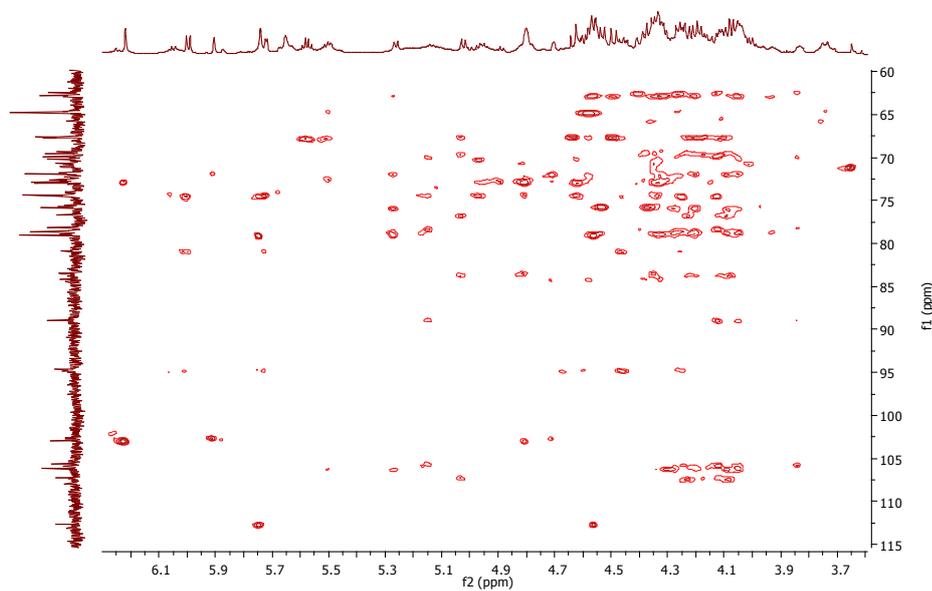


FIGURE 179 - SPECTRE RMN HSQC-TOCSY DU COMPOSE S8 (ZOOM F2 : 3,6-6,3 PPM, F1 : 60-115 PPM)

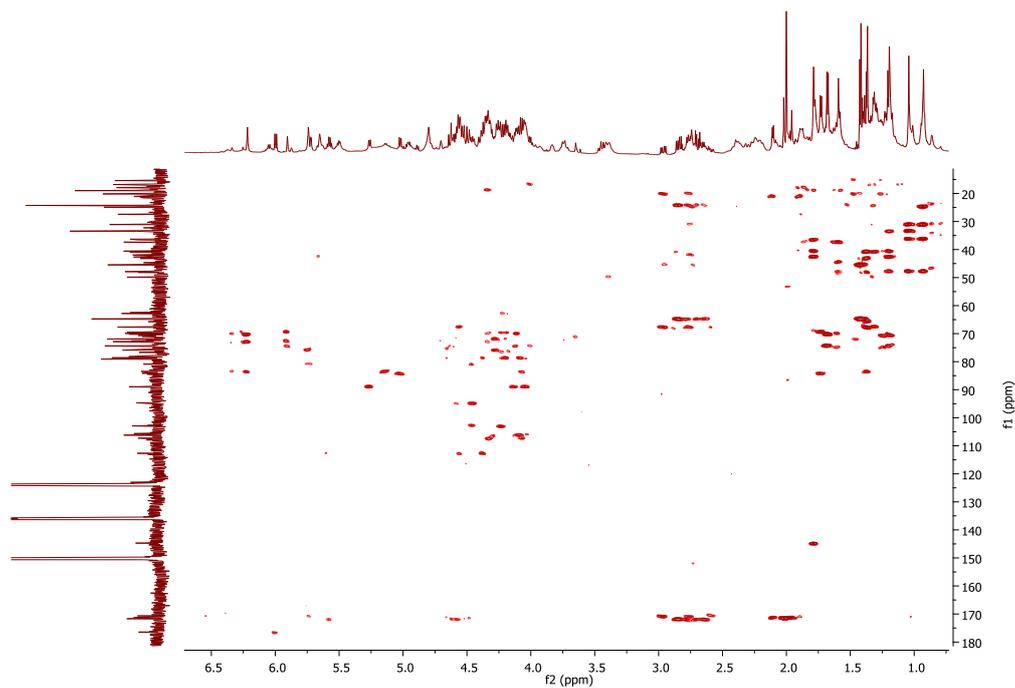


FIGURE 180 - SPECTRE RMN HMBC DU COMPOSE S8 (PYRIDINE d_5 , F2 : 600 MHz, F1 : 150 MHz)

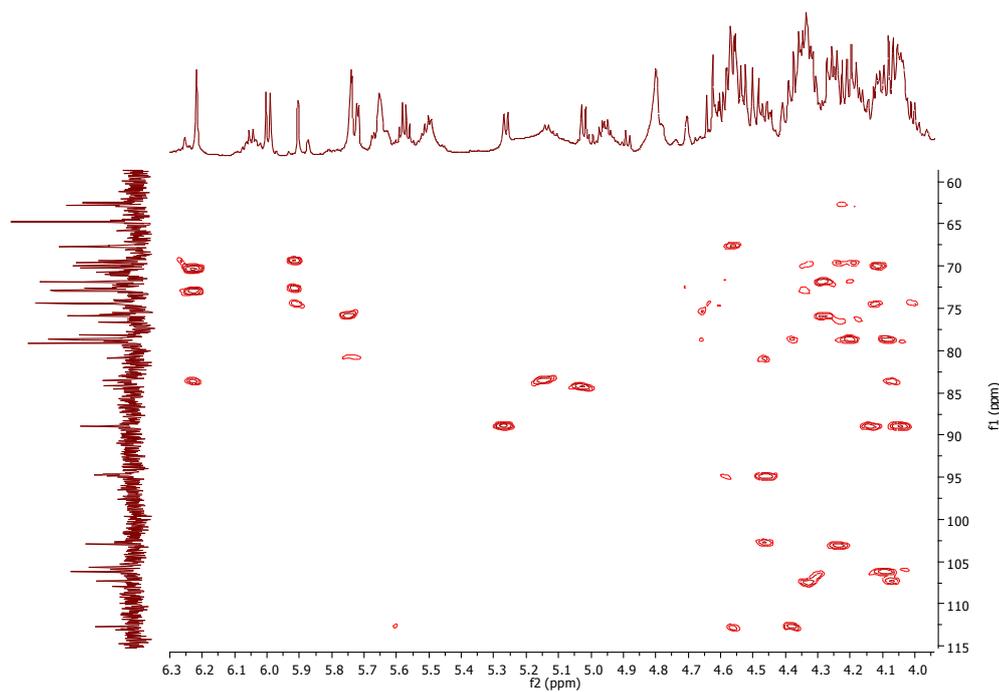


FIGURE 181 - SPECTRE RMN HMBC DU COMPOSE S8 (ZOOM F2 : 4,0-6,3 PPM, F1 : 60-115 PPM)

IV.1.4.5. COMPOSE S9

Les signaux RMN du composé S9 ne correspondent à aucun composé connu. Les caractéristiques de ce dernier sont décrites ci-après :

Forme Solide amorphe blanc cassé

Formule brute $C_{74}H_{118}O_{36}$

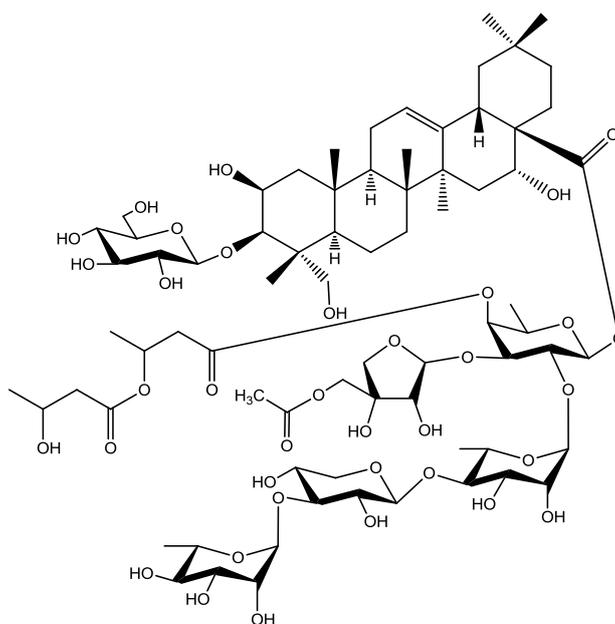
Pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20} = -14,0$ (c 0,53 ; MeOH)

UV λ_{max} 195 nm

RMN 1H et 13C (Pyridine d_5 , 500 MHz) Tableau 46, Tableau 47 et Figure 183 à Figure 193

HRMS $[M+Na]^+$ m/z 1605,7294 ; $\Delta = 0,05$ ppm (Figure 182)

(calculé pour $C_{74}H_{118}O_{36}$, **1582,7403**)



**TABLEAU 46 - ATTRIBUTION DES SIGNAUX RMN ¹³C ET ¹H (J EN Hz) ET CORRELATIONS 2D DE LA PARTIE
AGLYCONE DU COMPOSE S9 (PYRIDINE d₅, 500 MHz)**

N°	δ _C	δ _H	Mult. (J, Hz)		¹ H- ¹ H COSY	¹ H- ¹³ C HMBC	ROESY
1	44,5	1,31	m	CH ₂	Agl-1b, 2		Agl-1b, 2
		2,35	m		Agl-1a		Agl-1a, 2
2	70,6	4,82	m	CH	Agl-1a, 3		Agl-1a, 1b, 3
3	83,7	4,34	m	CH	Agl-2	Agl-24, Glc-1	Agl-2, 5, Glc-1
4	43,1	-	-	Cq	-		-
5	48,3	1,80	m	CH	Agl-6a	Agl-24, 25	Agl-3, 6b
6	18,6	1,66	nd	CH ₂	Agl-6b, 7b	Agl-8, 10, 25, 26	Agl-5, 23a
		1,88	m		Agl-6a		
7	33,6	1,72	m	CH ₂	Agl-6b, 7b	Agl-8, 11, 26, 27	Agl-6b
		1,87	m		Agl-7a		
8	40,6	-	-	Cq	-		-
9	48,0	1,89	m	CH	Agl-11a, 11b	Agl-8, 10, 11, 25, 26	Agl-5
10	37,4	-	-	Cq	-		-
11	24,4	2,10	m	CH ₂	Agl-9, 11b, 12		Agl-11b, 12
		2,22	m		Agl-9, 11a		Agl-11a, 12
12	123,0	5,65	br t (3,5)	CH	Agl-11a, 11b	Agl-9, 14	Agl-11a, 11b, 18
13	144,7	-	-	Cq	-		-
14	42,7	-	-	Cq	-		-
15	36,6	1,95	m	CH ₂	Agl-16		Agl-15b, 16
		2,25	m				Agl-15a, 16
16	74,3	5,23	br s	CH			Agl-15a, b, 22b
17	49,8	-	-	Cq	-		-
18	41,9	3,40	dd (13,9 ; 3,7)	CH	Agl-19a, 19b	Agl-13, 16	Agl-12, 30
19	47,9	1,34	m	CH ₂	Agl-18, 19b	Agl-17	Agl-12, 18, 19b
		2,75	m		Agl-18, 19a	Agl-20, 30	Agl-19a, 27, 29
20	31,1	-	-	Cq	-		-
21	36,3	1,30	m	CH ₂	Agl-21b, 22b	Agl-18	Agl-21b
		2,39	m		Agl-21a, 22a	Agl-30	Agl-21a
22	32,2	2,23	m	CH ₂	Agl-21b, 22b	Agl-16, 21	Agl-22b
		2,43	m		Agl-21a, 22a	Agl-18, 20	Agl-22a
23	66,4	3,75	d (11,0)	CH ₂	Agl-23b	Agl-3	Agl-23b, 9
		4,37	d (11,0)		Agl-23a		Agl-23a
24	15,4	1,38	s	CH ₃	-	Agl-3, 4, 5, 23	
25	17,9	1,58	s	CH ₃	-	Agl-1, 5, 9, 10	Agl-24, 26
26	18,0	1,19	s	CH ₃	-	Agl-7, 8, 9, 14	Agl-15b, 25
27	27,4	1,78	s	CH ₃	-	Agl-8, 13, 14, 15	Agl-9, 19b
28	176,4	-	-	Cq	-		-
29	33,4	0,93	s	CH ₃	-	Agl-19, 20, 21, 30	Agl-19b
30	24,9	1,04	s	CH ₃	-	Agl-19, 20, 21, 29	Agl-18, 29

TABLEAU 47 - ATTRIBUTION DES SIGNAUX RMN ¹³C ET ¹H (J EN HZ) ET CORRELATIONS 2D DE LA PARTIE SUCRES ET ESTERS DU COMPOSE S9 (PYRIDINE d₅, 500 MHz)

N°	δ _C	δ _H	Mult. (J, Hz)		¹ H- ¹ H COSY	¹ H- ¹³ C HMBC	ROESY
Glucose HSQC-TOCSY (106,0 ; 78,8 ; 78,6 ; 75,7 ; 71,8 ; 62,9)							
1	106,0	5,16	d (7,8)	CH	Glc-2	Agl-3, Glc-5	Glc-3, 4, 5, Agl-3
2	75,7	4,05	t (8,1)	CH	Glc-1, 3	Glc-1, 3	
3	78,8	4,22	t (8,7)	CH	Glc-2	Glc-2, 4, 5	Glc-5
4	71,8	4,24	t (9,2)	CH	Glc-5	Glc-3, 5	Glc-2
5	78,6	3,93	m	CH	Glc-4, 6a, 6b	Glc-3	Glc-3, 6b
6	62,9	4,34	dd (11,4 ; 5,9)	CH ₂	Glc-5, 6b	Glc-4	Glc-5
		4,49	dd (12,1 ; 2,0)		Glc-5, 6a		
Fucose HSQC-TOCSY (94,6 ; 80,9 ; 74,5 ; 74,3) (70,6 ; 16,8)							
1	94,6	6,00	d (8,1)	CH	Fuc-2	Agl-28	Fuc-3, 4
2	74,5	4,45	br t (8,4)	CH	Fuc-1, 3	Fuc-1, 3, Rha-1	Fuc-1, 4, Rha-1
3	80,9	4,25	dd (9,2 ; 3,2)	CH	Fuc-2, 4	Fuc-2, Api-1	Fuc-1, 5, Api-1
4	74,3	5,73	d (3,7)	CH	Fuc-3	Fuc-3, But-1	Fuc-1, 3, 5
5	70,6	4,03	dq (6,3 ; 4,0)	CH	Fuc-6	Fuc-4, 6	Fuc-1, 4
6	16,8	1,23	d (6,3)	CH ₃	Fuc-5	Fuc-4, 5	Fuc-4, 5
Rhamnose HSQC-TOCSY (102,6 ; 71,8) (84,2 ; 72,9 ; 69,3 ; 19,0)							
1	102,6	5,90	br s	CH	Rha-2	Rha-2, 5, Fuc-2	Rha-2, Fuc-2
2	71,8	4,71	m	CH	Rha-1	Rha-3, 4	Rha-1
3	72,9	4,63	dd (9,2 ; 2,9)	CH	Rha-4		
4	84,2	4,32	t (9,2)	CH	Rha-3	Rha-3, 5, 6, Xyl-1	Xyl-1
5	69,3	4,38	dq (9,9 ; 5,9)	CH	Rha-6		Rha-3
6	19,0	1,72	d (5,9)	CH ₃	Rha-5	Rha-4, 5	Rha-4, 5
Xylose HSQC-TOCSY (107,3 ; 83,8 ; 76,6 ; 69,6 ; 67,6)							
1	107,3	5,03	d (7,7)	CH	Xyl-2	Xyl-3, Rha-4	Xyl-3, 2, 5a, Rha-4
2	76,6	4,07	br t (8,4)	CH	Xyl-1, 3	Xyl-1, 3	Xyl-5a
3	83,8	4,22	t (9,0)	CH	Xyl-2,4	Xyl-2, 4	Rha'-1
4	69,6	4,11	m	CH	Xyl-3, 5a		
5	67,6	3,46	t (11,0)	CH ₂	Xyl-4	Xyl-1, 4	Xyl-1, 5b Xyl-5a
		4,18	dd (11,0 ; 5,1)				
Rhamnose' HSQC-TOCSY (103,0 ; 72,3) (74,3 ; 72,8 ; 70,2 ; 18,9)							
1	103,0	6,20	br s	CH	Rha'-2	Rha'-2, 3, 5, Xyl-3	Rha'-2, Xyl-3
2	72,6	4,81	br d (2,9)	CH	Rha'-1, 3	Rha'-2, 3, 4	Rha'-1, 4
3	72,8	4,63	dd (9,2 ; 3,0)	CH	Rha'-2, 4		Rha'-2
4	74,3	4,34	t (9,2)	CH	Rha'-3, 5	Rha'-3	
5	70,2	4,95	dq (9,5 ; 6,3)	CH	Rha'-4, 6	Rha'-4	
6	18,9	1,68	d (6,2)	CH ₃	Rha'-5	Rha'-4, 5	Rha'-4, 5
Apiose HSQC-TOCSY (112,7 ; 79,1)							

1	112,7	5,75	d (2,2)	CH	Api-2	Fuc-3	Fuc-3, Api-2, 4a
2	79,1	4,57	d (2,2)	CH	Api-1	Api-1	
3	78,7	-	-	Cq	-		-
4	75,8	4,36	d (9,6)	CH ₂	Api-4b, 5a, 5b	Api-1, 3	Api-1, 4b
		4,53	d (9,6)		Api-4a		Api-4a, 5b
5	67,6	4,49	d (11,1)	CH ₂	Api-4a, 5b	Api-3, 4, Ac-1	Api-5b
		4,63	d (11,2)		Api-4a, 5a		Api-5a
Acetate							
1	171,2	-	-	Cq	-		-
2	21,0	2,02	s	CH ₃		Ac-1	
Dimeric hydroxybutyrate HSQC-TOCSY (67,7 ; 40,8 ; 20,0) (64,7 ; 45,5 ; 24,3)							
1	170,6	-	-	Cq	-		-
2	40,8	2,78	m	CH ₂	But-2b, 3	But-1, 3, 4	But-2b, 3
		2,96	dd (15,8 ; 6,7)		But-2a, 3		But-2a
3	67,7	5,59	q (6,4)	CH		But-1', 2, 4	But-2a
4	20,0	1,36	d (6,2)	CH ₃		But-2, 3	But-3
1'	171,7	-	-	Cq	-		-
2'	45,5	2,68	dd (14,7 ; 5,5)	CH ₂	But-3'	But-1', 3', 4'	But-2'b, 3'
		2,84	dd (14,7 ; 7,6)				But-2'a
3'	64,7	4,58	m	CH	But-4'	But-1', 2', 4'	But-2'a, 4'
4'	24,3	1,42	d (6,2)	CH ₃	But-3'	But-2', 3'	But-3'

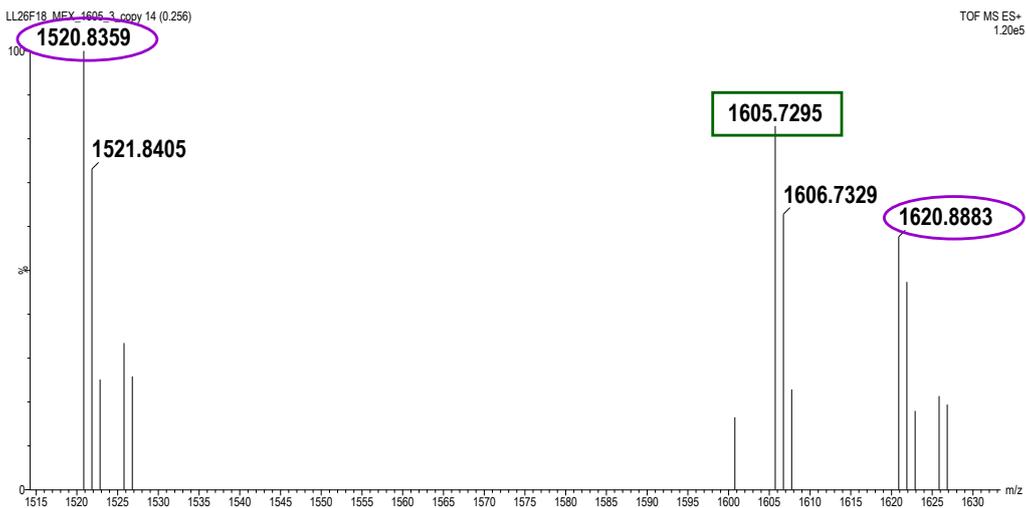


FIGURE 182 - SPECTRE HRESIMS DU COMPOSE S9 EN MODE POSITIF $[M+Na]^+$; STANDARD INTERNE
ATTENDU A M/Z 1520,8359 ET M/Z 1620,8883)

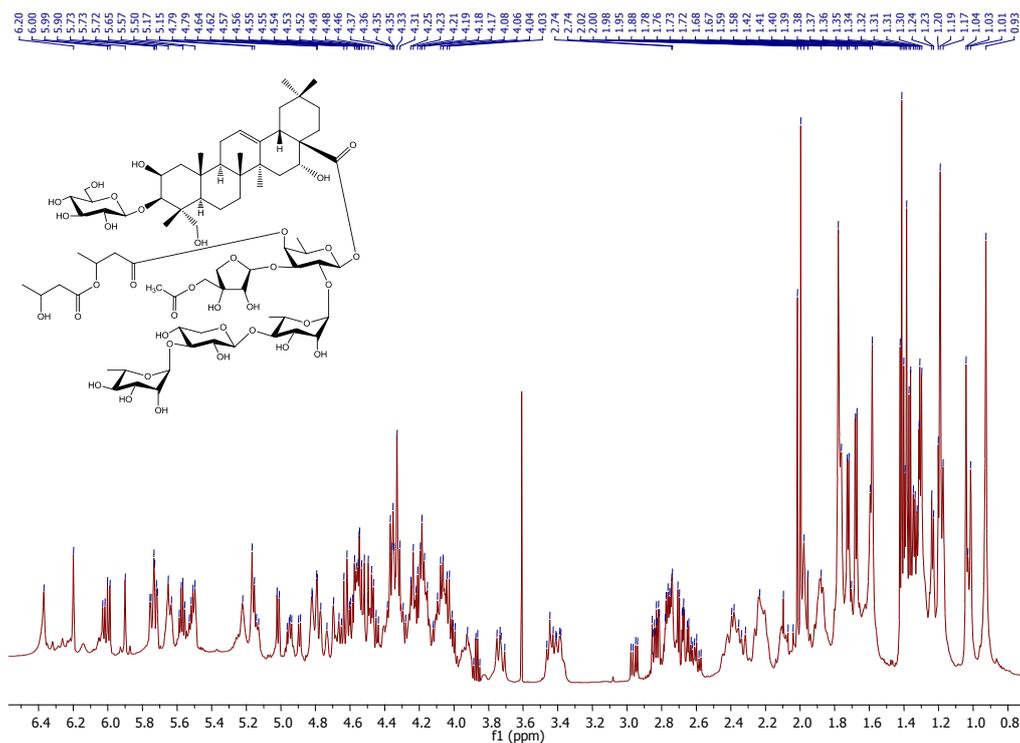


FIGURE 183 - SPECTRE RMN 1H DU COMPOSE S9 (PYRIDINE d_5 , 500 MHz, 300 K)

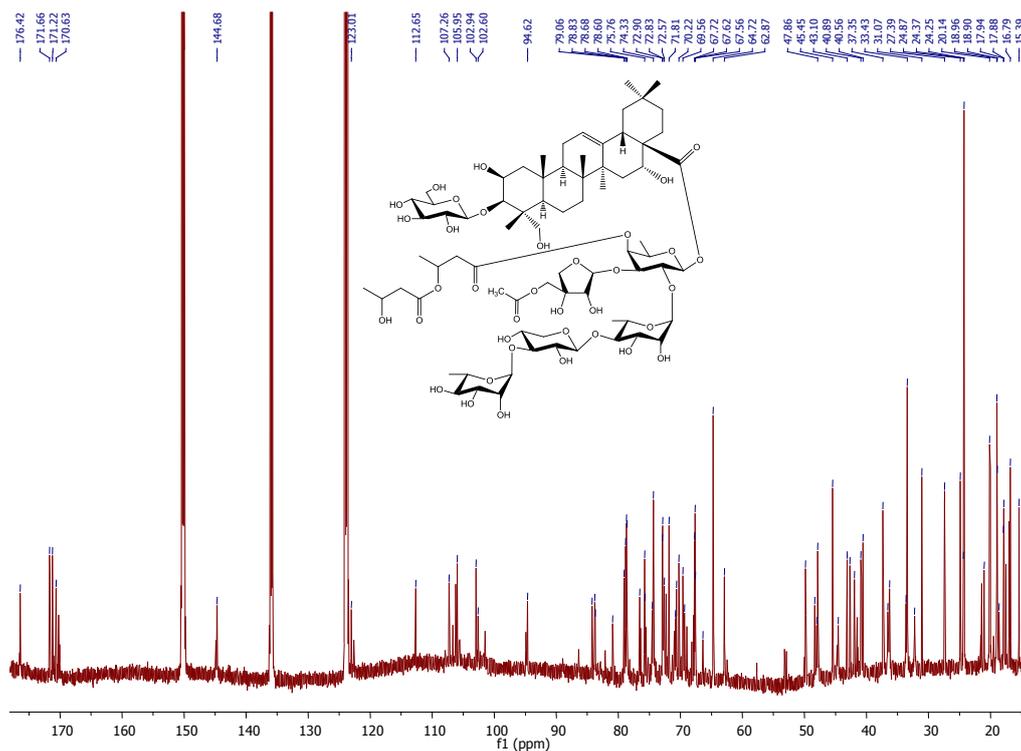


FIGURE 184 - SPECTRE RMN ^{13}C DU COMPOSE S9 (PYRIDINE d_5 , 500 MHz, 300 K)

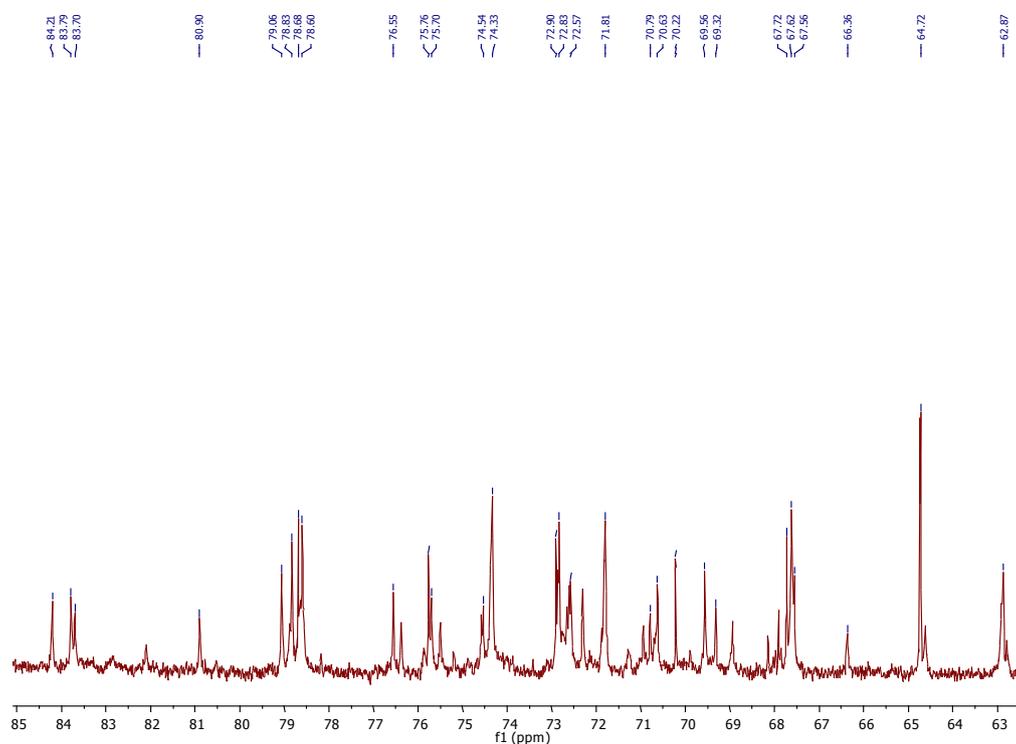


FIGURE 185 - SPECTRE RMN ^{13}C DU COMPOSE S9 (ZOOM 62-85 PPM)

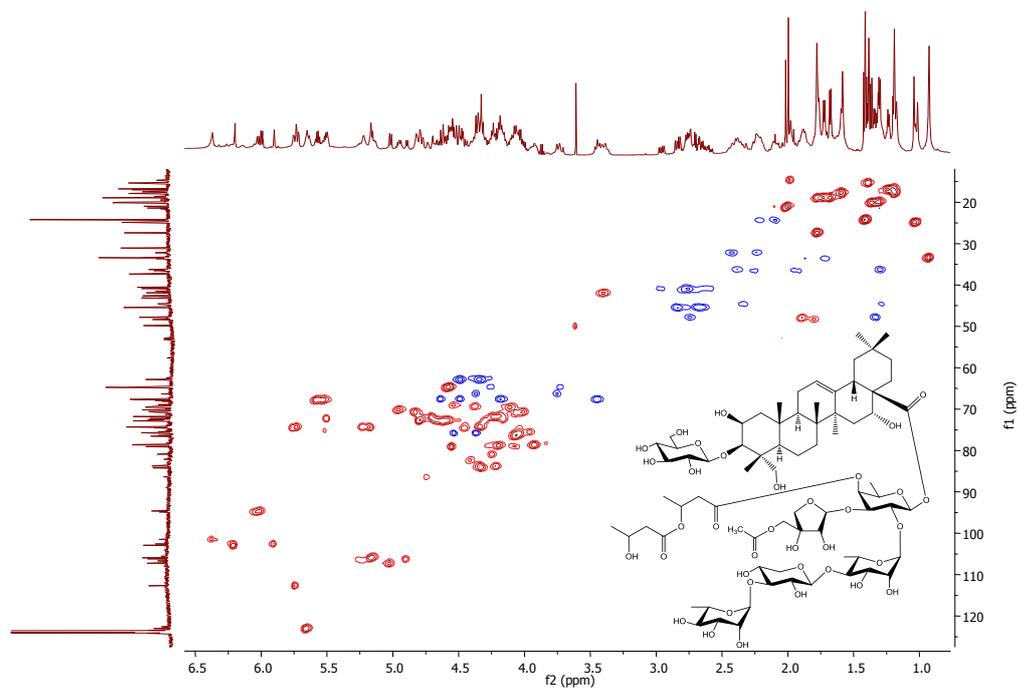


FIGURE 186 - SPECTRE RMN HSQC DU COMPOSE S9 (PYRIDINE d_5 , F2 : 500 MHz, F1 : 125 MHz)

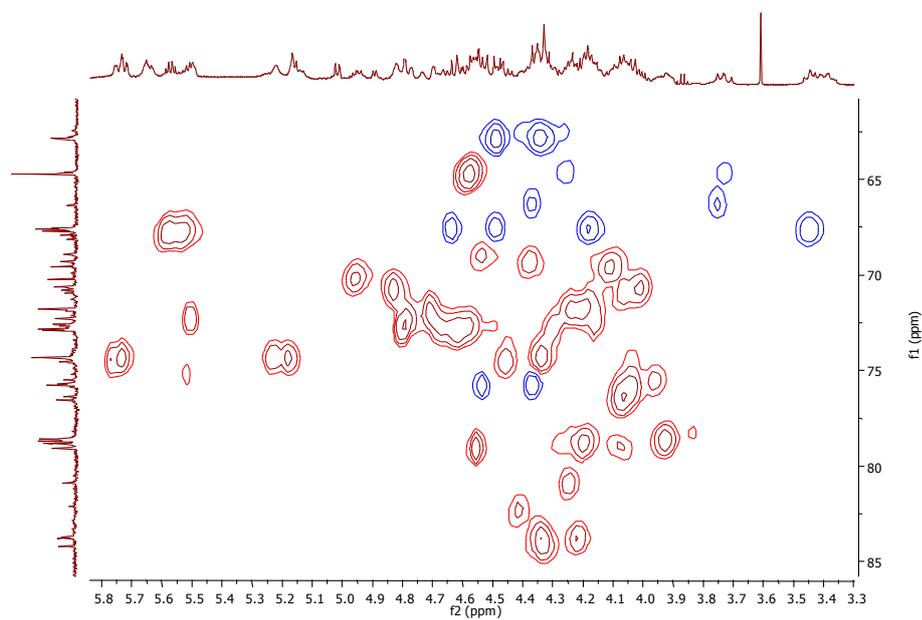


FIGURE 187 - SPECTRE RMN HSQC DU COMPOSE S9 (ZOOM F2 : 3,3-5,8 PPM, F1 : 60-85 PPM)

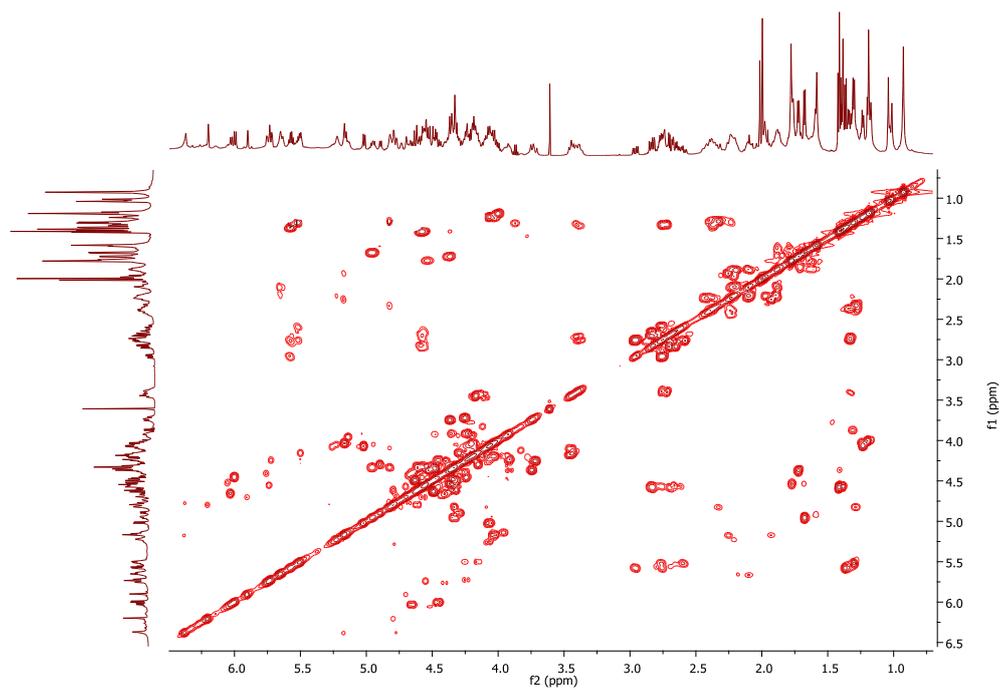


FIGURE 188 - SPECTRE RMN COSY DU COMPOSE S9 (PYRIDINE d_5 , 500 MHz)

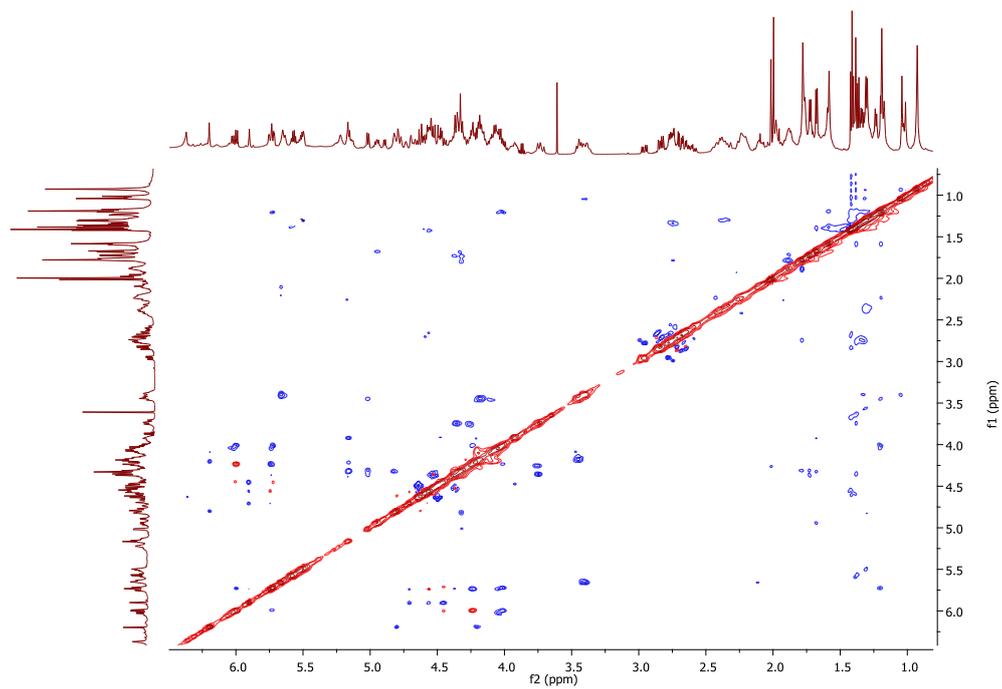


FIGURE 189 - SPECTRE RMN ROESY DU COMPOSE S9 (PYRIDINE d_5 , 500 MHz)

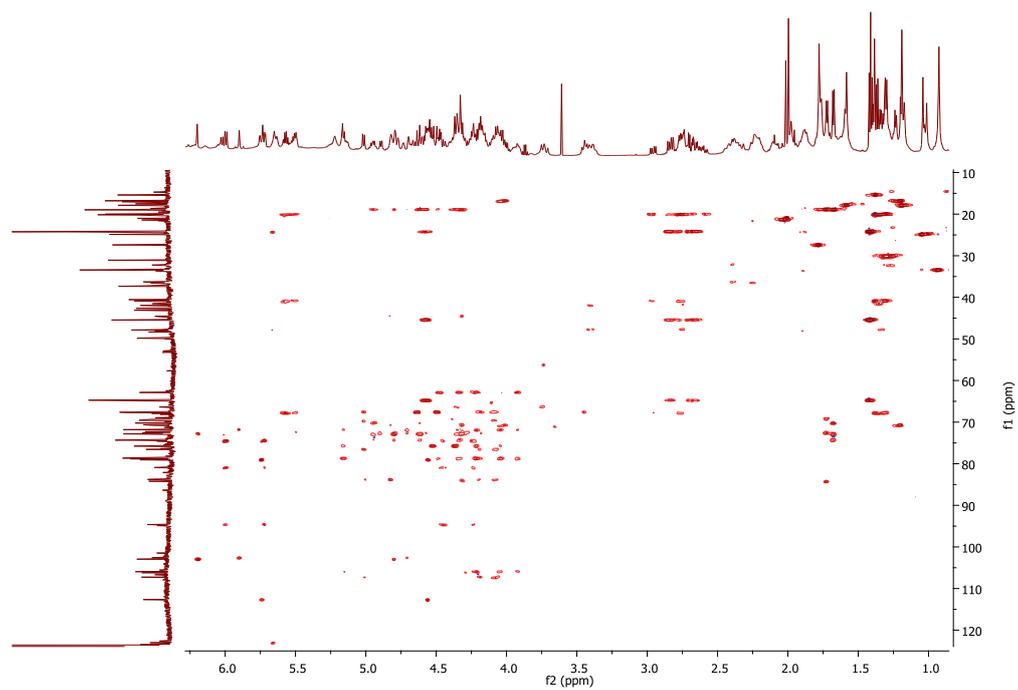


FIGURE 190 - SPECTRE RMN HSQC-TOCSY DU COMPOSE S9 (PYRIDINE d_5 , F2 : 500 MHz, F1 : 125 MHz)

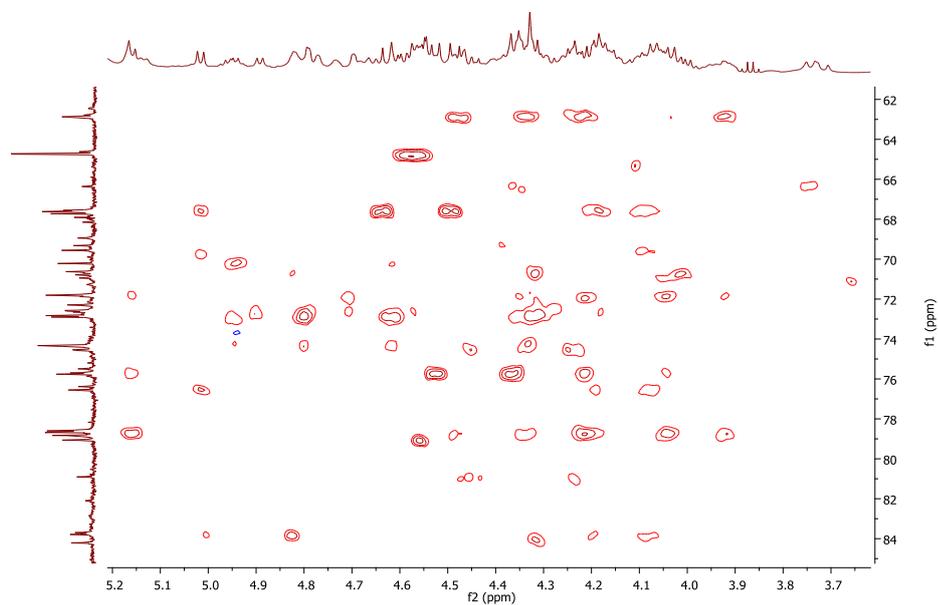


FIGURE 191 - SPECTRE RMN HSQC-TOCSY DU COMPOSE S9 (ZOOM F2 : 3,6-5,2 PPM, F1 : 62-85 PPM)

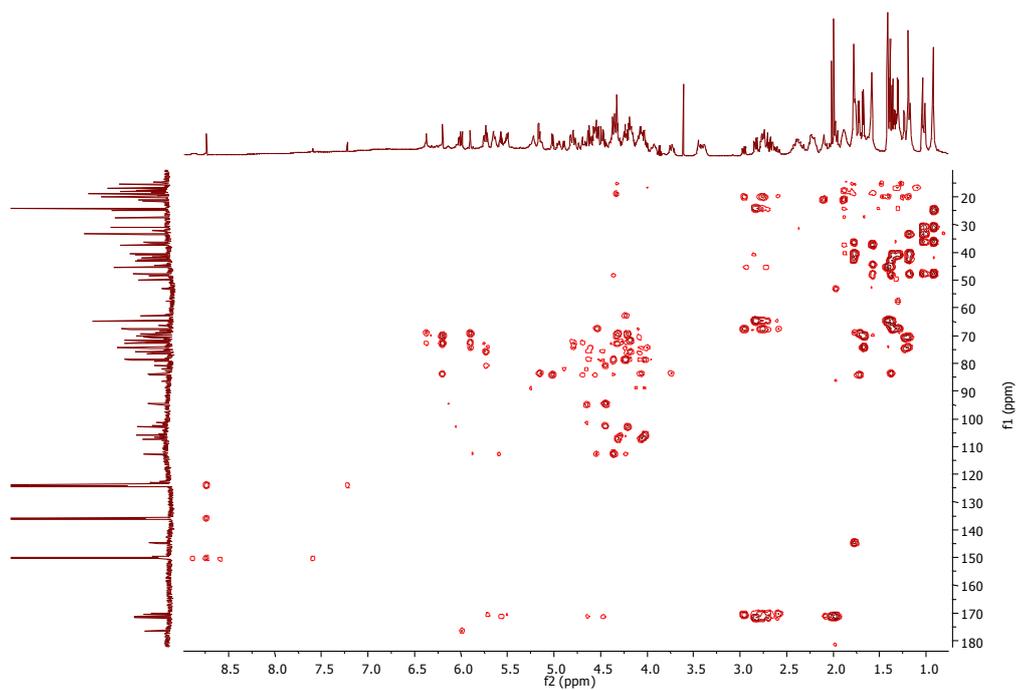


FIGURE 192 - SPECTRE RMN HMBC DU COMPOSE S9 (PYRIDINE d_5 , F2 : 500 MHz, F1 : 125 MHz)

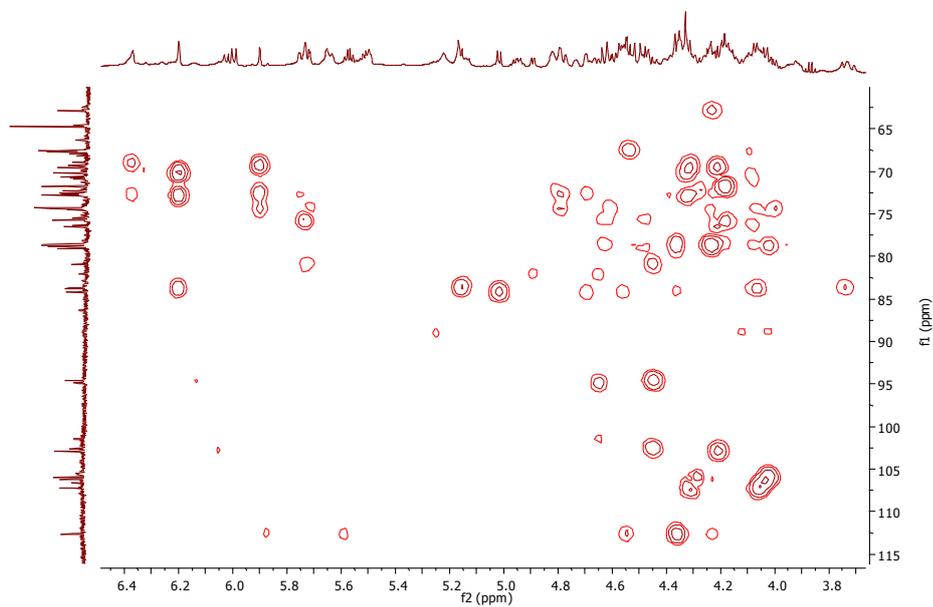


FIGURE 193 - SPECTRE RMN HMBC DU COMPOSE S9 (ZOOM F2 : 3,7-6,4 PPM, F1 : 60-115 PPM)

IV.1.5. CONFIGURATION ABSOLUE DES SUCRES

La fraction saponine (44 mg) a été dissoute dans 60 ml de HCl 1 N et chauffée à 90 °C pendant 2 h. Après neutralisation avec NaOH 1 N, le mélange réactionnel a été extrait au dichlorométhane (CH₂Cl₂) afin d'éliminer la partie triterpénique. La phase aqueuse, contenant les sucres, a été évaporée et séchée pour la suite du protocole.

Une partie du produit (4 mg) a été dissout dans 0,2 ml de pyridine anhydre contenant 4 mg de chlorhydrate de méthyl-L-cystéine et chauffé à 60 °C pendant 1 h dans un bloc chauffant. Un volume de 100 µl de triméthylsilylimidazole a ensuite été ajouté et le mélange a été chauffé à 60 °C pendant 10 min. Après évaporation sous un flux d'azote, le résidu a été repris avec 500 µl d'eau et 500 µl de CH₂Cl₂ et la phase organique a été analysée par GC-MS (appareil et colonne décrits en III.4) avec la méthode suivante :

Conditions analytiques

<i>Gaz vecteur</i>	hélium
<i>Débit</i>	1,2 ml/min
<i>Température de l'injecteur</i>	250 °C
<i>Split ratio</i>	1 : 70
<i>Volume d'injection</i>	0,3 µl
<i>Programmation de température</i>	120 °C à 300 °C en 10 °C/min puis palier de 10 min à 300 °C
<i>Température de la source d'ionisation</i>	230 °C
<i>Température de la ligne de transfert</i>	250 °C
<i>Energie d'ionisation</i>	70 eV

Les sucres ont été identifiés par comparaison des temps de rétention avec des sucres standards optiquement purs, également dérivés :

<i>D-glucose</i>	16,95 min	<i>L-glucose</i>	17,10 min
<i>D-fucose</i>	15,88 min	<i>L-fucose</i>	16,14 min
<i>D-xylose</i>	15,16 min	<i>L-xylose</i>	15,40 min
<i>D-apiose</i>	14,97 min	<i>L-rhamnose</i>	15,76 min

IV.1.6. TESTS BIOLOGIQUES

La souche de *C. albicans* utilisée, identifiée sous le code ATCC 10231, est la souche recommandée par la norme AFNOR pour les tests antimicrobiens. Elle a été cultivée à 37 °C en aérobiose sur gélose pour dénombrement (PCA) type Sabouraud Chloramphenicol (*bioMérieux, Marcy l'Etoile, France*). Un inoculum de 1×10^6 cellules/ml a été réalisé dans un milieu de culture liquide YEP contenant un extrait de levure (11 g.l^{-1} , *Sigma-Aldrich, St Louis, Mo, USA*), de la peptone (22 g.l^{-1} , *Oxoid, Basingstoke, UK*) et 2 % (m/v) de N-acetyl- α -D-glucosamine (GlcNAc) (*Calbiochem, Darmstadt, Germany*).

Cet inoculum a été incubé d'une part avec les différents échantillons et d'autre part avec de l'eau dans le cas du témoin négatif, à 37 °C sous agitation continue.

Le nombre total de cellules et le nombre d'hyphes ont été comptés à T = 0 et T = 4 h grâce à des cellules de comptage, sous microscope optique. Chaque test a été fait en double et trois expériences indépendantes ont été réalisées.

Le taux d'hyphes a été calculé grâce à l'équation suivante :

$$\text{Taux d'hyphes (\%)} = (\text{nombre d'hyphes} / \text{nombre de cellules totales}) \times 100$$

Puis le pourcentage de croissance des hyphes entre 0 et 4 h a été calculé :

$$\text{Croissance hyphes 0-4 h (\%)} = (\text{taux d'hyphes T4 h} - \text{taux d'hyphes T0}) / \text{taux d'hyphes T0}$$

Enfin, le pourcentage de la croissance des hyphes comparé à celui du témoin négatif a été calculé :

$$\text{Croissance hyphes (\%)} = (\text{croissance hyphes 0-4 h avec échantillon} - \text{croissance hyphes 0-4 h témoin négatif}) / \text{croissance hyphes 0-4 h témoin négatif}$$

Dans le cas d'un échantillon inactif, le pourcentage de croissance des hyphes doit être similaire au témoin négatif ($\approx 0\%$) ou supérieur. A l'inverse, dans le cas d'un échantillon actif, le pourcentage de croissance des hyphes doit être négatif (Tableau 48).

TABLEAU 48 - LEGENDE DES RESULTATS DES TESTS MICROBIOLOGIQUES

- 100 %	- 100 % à 0 %	0 %	> 0 %
Inhibition totale de croissance des hyphes	Inhibition partielle de croissance des hyphes	Pas d'inhibition de croissance des hyphes	Stimulation de croissance des hyphes
++	+	-	--

IV.1.7. ETUDE STATISTIQUE

L'étude statistique a été réalisée à l'aide du logiciel XLSTAT (Addinsoft).

L'évaluation statistique de la significativité a été réalisée grâce à un test de Fisher (LSD). Deux échantillons sont considérés comme significativement différents avec $*p < 0,05$, $**p < 0,005$ ou $***p < 0,0001$.

IV.1.8. MODELISATION MOLECULAIRE

La construction du modèle pharmacophore a été réalisée à l'aide du logiciel CATALYST. Les activités sont assignées comme suit : 0 pour les molécules inactives, 1 pour les molécules moyennement actives et 2 pour les molécules très actives. Une famille de 500 conformères a été générée avec une tolérance de conformation de 15 kcal.mol^{-1} . Le pharmacophore est construit avec un minimum de quatre caractéristiques parmi des interactions de type hydrophobe et hydrophile (liaisons hydrogènes...).

IV.1.9. GENETIQUE DES POPULATIONS

Un ensemble de 98 individus a été analysé à l'aide de 6 marqueurs microsatellites développés à partir de *S. sempervirens*.²⁰¹

IV.2. ETUDE DE LA VARIABILITE CHIMIQUE DE *S. VIRGAUREA*

IV.2.1. OPTIMISATION DE L'EXTRAIT

L'ensemble des extractions effectuées dans le but d'étudier la variabilité des saponines a été réalisé avec le protocole suivant :

Les sommités fleuries ont été broyées très finement à l'aide d'un blender à puissance maximale pendant 1 à 2 minutes.

Une masse équivalente à 2 g de poudre de plante a été extraite avec 35 ml d'une solution eau/méthanol (70:30) dans un tube Falcon® placé dans un extracteur à ultrasons REUS (*Contes, France*) pendant 4 h, constamment réfrigéré à 5 °C.

Le mélange a ensuite été filtré sur büchner, le filtrat a été conservé et la matière végétale extraite à nouveau avec 35 ml d'eau/méthanol (70:30), dans les mêmes conditions. Une nouvelle filtration et une mise en commun des deux filtrats a permis d'obtenir un extrait total brun foncé. Après évaporation du méthanol, cet extrait a été lyophilisé afin d'accéder à sa masse et au rendement d'extraction. Chaque lot a été extrait trois fois.

IV.2.2. TECHNIQUE DE DOSAGE DES SAPONINES TOTALES PAR HPLC-ELSD

Les extraits lyophilisés ont été pesés précisément et repris dans un volume d'eau/méthanol 70:30 de façon à obtenir une concentration exacte de 100 mg/ml.

La fraction de saponines de *S. virgaurea alpestris* sans impuretés (préparation Chapitre 0 p. 253) a été choisie comme étalon externe pour le dosage des saponines. La gamme étalon a été réalisée trois fois avec des concentrations en fraction saponines de 1 ; 5 ; 10 ; 15 et 20 mg/ml dans une solution eau/méthanol (70:30).

Conditions analytiques

Les extraits bruts et la gamme étalon ont été analysés par HPLC (appareil, colonnes et solvants décrit en III.1) avec la méthode suivante :

Eluants Eau (A) / Acétonitrile (B) / Isopropanol (C)

Débit 1 ml/min

Volume

d'injection 20 µl

Gradient 0-5 min 15 % B et 85 % A ; 5-35 min 15-55 % B ;

35-40 min 55-100 % B ; 40-41 min 100 % B ;

41-42 min 100-40 % B et 0-60 % C ; 42-47 min 60 % C ;

47-50 min 60-0 % C, 40-15 % B et 0-85 % A

Gain ELSD 4

IV.2.3. TECHNIQUE DE DOSAGE DES SAPONINES TOTALES PAR HPTLC

Les mêmes extraits que dans le paragraphe précédent ont été utilisés, à la même concentration de 100 mg/ml.

La même fraction de saponines a été choisie comme étalon externe pour le dosage des saponines. La gamme étalon a été réalisée trois fois avec des concentrations en fraction saponines de 1 ; 5 ; 10 ; 15 et 20 mg/ml dans une solution eau/méthanol (70:30).

Les échantillons ont été déposés à la vitesse de 50 nl/s (2 µl déposés), sous forme de bandes de 8 mm de long, espacées des bords de 20 mm et espacées entre elles de 3,4 mm. Ainsi, 15 échantillons ont été déposés sur une même plaque. Les bandes ont été déposées à 8 mm du bord inférieur et ont migré sur 62 mm.

Après le dépôt des échantillons, la plaque a été placée pendant 4 h dans une cuve double fermée contenant 25 ml d'HCl concentré (cuve saturée en vapeurs), en ayant pris soin de ne

jamais mettre en contact la plaque et le liquide. La plaque HPTLC a ensuite été chauffée pendant 20 min à 105 °C sur la plaque chauffante.

Après cette phase de pré-dérivation, la cuve nettoyée a été saturée pendant 20 min avec la phase mobile, constituée du système de solvants quaternaire : chloroforme/acide acétique/méthanol/eau (60:32:12:8). Le contrôle de l'humidité a été assuré pendant les 10 premières minutes à 38 % d'humidité, grâce à une solution à 33 % de MgCl₂. La plaque a ensuite été développée avec la phase mobile puis séchée pendant 5 min.

Enfin la plaque a été révélée par immersion pendant 1 s dans une solution d'anisaldéhyde sulfurique puis par chauffage à 105 °C pendant 5 min sur la plaque chauffante.

Les clichés ont été réalisés avant et immédiatement après révélation, à 366 nm et en lumière visible, dans le visualiseur. Les spectres UV ont été obtenus grâce au scanner. Les densitogrammes ont été effectués à 366 nm.

IV.2.4. TECHNIQUE DE DOSAGE DES SAPONINES MAJORITAIRES PAR HPLC-ELSD

Les mêmes extraits que dans le paragraphe précédent ont été utilisés, à la même concentration de 100 mg/ml.

La rutine a été choisie comme étalon externe pour le dosage de chacune des saponines. La gamme étalon a été réalisée trois fois avec des concentrations en rutine de 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 1,0 ; 1,5 et 2,0 mg/ml dans le méthanol.

Conditions analytiques

Les extraits bruts et la gamme étalon ont été analysés par HPLC (appareil, colonnes et solvants décrit en III.1) avec la méthode suivante :

Eluants Eau (A) / Acétonitrile (B) / Isopropanol (C)

Débit 1 ml/min

Volume

d'injection 20 µl

Gradient 0-5 min 15 % B et 85 % A ; 5-35 min 15-55 % B ;

35-40 min 55-100 % B ; 40-41 min 100 % B ;

41-42 min 100-40 % B et 0-60 % C ; 42-47 min 60 % C ;

47-50 min 60-0 % C, 40-15 % B et 0-85 % A

Gain ELSD 4

IV.2.5. ETUDE STATISTIQUE

L'étude statistique a été réalisée à l'aide du logiciel XLSTAT (Addinsoft).

L'Analyse de la variance a été calculée avec un test de Fisher (LSD). Deux échantillons sont considérés comme significativement différents avec $p < 0,05$.

La CAH et l'ACP ont été calculées à partir des valeurs obtenues avec l'ANOVA.

IV.3. CARACTERISATION PHYTOCHIMIQUE DE *S. VIRGAUREA* : ETUDE GLOBALE

IV.3.1. ETUDE DES COMPOSES HYDROPHILES

IV.3.1.1. EXTRACTION

L'ensemble des extractions effectuées dans le but de caractériser les composés hydrophiles a été réalisé avec le protocole suivant :

Les sommités fleuries ont été broyées très finement à l'aide d'un blender à puissance maximale pendant 1 à 2 minutes.

Une masse équivalente à 20 g de poudre de plante a été extraite avec 200 ml d'eau/méthanol 50:50, dans un erlenmeyer placé dans un extracteur à ultrasons REUS (*Contes, France*) pendant 4 h, constamment réfrigéré à 5 °C et agité.

Le mélange a ensuite été filtré sur büchner, le filtrat a été conservé et la matière végétale extraite à nouveau avec 200 ml d'eau/méthanol 50:50, dans les mêmes conditions. Une nouvelle filtration et une mise en commun des deux filtrats a permis d'obtenir un extrait total brun foncé. Après évaporation du méthanol, cet extrait a été lyophilisé afin d'accéder à sa masse ($5 \pm 0,5$ g) et au rendement d'extraction (25 ± 3 %).

Conditions analytiques

Les extraits bruts ont été analysés par HPLC (appareil, colonnes et solvants décrit en III.1) avec la méthode suivante :

Eluants Eau (A) / Acétonitrile (B) / Isopropanol (C)

Débit 1 ml/min

Volume

d'injection 20 μ l

Gradient 0-5 min 15 % B et 85 % A ; 5-35 min 15-55 % B ;

35-40 min 55-100 % B ; 40-41 min 100 % B ;
41-42 min 100-40 % B et 0-60 % C ; 42-47 min 60 % C ;
47-50 min 60-0 % C, 40-15 % B et 0-85 % A

Gain ELSD 1

IV.3.1.2. FRACTIONNEMENT

L'ensemble des fractionnements effectués dans le but de caractériser les composés hydrophiles a été réalisé avec le protocole suivant :

L'extrait brut a été repris dans 10 ml d'eau distillée et soumis à un fractionnement par chromatographie sous vide (VLC)¹³⁷ en phase inverse (C18, 50 g). Après un rinçage à l'eau (fraction F0), 4 systèmes de solvants de polarité décroissante ont été utilisés :

Rinçage Eau (200 ml) fraction F0 (3,77 ± 0,1 g)

MeOH/Eau 1:2 (240 ml) fraction F1 (1,08 ± 0,2 g)

MeOH/Eau 1:1 (240 ml) fraction F2 (618 ± 200 mg)

MeOH/Eau 2:1 (240 ml) fraction F3 (309 ± 50 mg)

MeOH (240 ml) fraction F4 (218 ± 80 mg)

Pour chaque fraction, le solvant a été évaporé sous vide, le résidu a été repris dans de l'eau, congelé à l'azote liquide et lyophilisé.

Conditions analytiques

Les fractions ont été analysées par HPLC (appareil, colonnes et solvants décrit en III.1) avec la méthode suivante :

Eluants Eau (A) / Acétonitrile (B) / Isopropanol (C)

Débit 1 ml/min

Volume

d'injection 20 µl

Gradient 0-5 min 15 % B et 85 % A ; 5-35 min 15-55 % B ;

35-40 min 55-100 % B ; 40-41 min 100 % B ;

41-42 min 100-40 % B et 0-60 % C ; 42-47 min 60 % C ;

47-50 min 60-0 % C, 40-15 % B et 0-85 % A

Gain ELSD 4

IV.3.1.3. ISOLEMENT DES COMPOSES DE LA FRACTION F1

La fraction F1 a été reprise dans de l'eau distillée de façon à obtenir une solution à 100 mg/ml et les composés majoritaires ont été isolés par HPLC semi-préparative (appareil, colonne et solvants décrit en III.1) dans les conditions décrites ci-dessous. Le suivi chromatographique a été réalisé sans ELSD, uniquement avec le détecteur UV-DAD.

Conditions préparatives

Eluants Eau (A) / Acétonitrile (B)

Débit 3 ml/min

Volume d'injection 70 µl

Gradient 0-5 min 15 % B et 85 % A ; 5-35 min 15-50 % B ;
35-40 min 50-100 % B ; 40-45 min 100 % B ;
45-47 min 100-15 % B et 0-85 % A

λ UV 205, 210, 254, 280 et 300 nm

IV.3.1.4. ISOLEMENT DES COMPOSES DE LA FRACTION F2

La fraction F2 a été reprise dans un mélange méthanol/eau 50:50 de façon à obtenir une solution à 50 mg/ml et les composés majoritaires ont été isolés par HPLC semi-préparative (appareil, colonne et solvants décrit en III.1) dans les conditions décrites ci-dessous. Le suivi chromatographique a été réalisé sans ELSD, uniquement avec le détecteur UV-DAD.

Conditions préparatives

Eluants Eau (A) / Acétonitrile (B)

Débit 3 ml/min

Volume d'injection 100 µl

Gradient 0-5 min 20 % B et 80 % A ; 5-35 min 20-37 % B ;
35-40 min 37-100 % B ; 40-45 min 100 % B ;
45-47 min 100-20 % B et 0-80 % A

λ UV 205, 210, 254, 280 et 300 nm

IV.3.1.5. CARACTERISATION

IV.3.1.5.1. COMPOSE P2

Les signaux RMN du composé *P2* ne correspondent à aucun composé connu. Les caractéristiques de ce dernier sont décrites ci-après :

Forme Solide amorphe jaune-brun

Formule brute C₁₅H₁₆O₈

Pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20} = -4,7$ (c 1,98 ; MeOH/Eau 2:1)

UV λ_{\max} 240 nm

RMN ¹H et ¹³C (DMSO *d*₆, 500 MHz) Tableau 49 et Figure 195 à Figure 200

HRMS [M-H]⁻ *m/z* 323,0765 ; $\Delta = -0,6$ ppm (Figure 194)
(calculé pour C₁₅H₁₆O₈, **324,0843**)

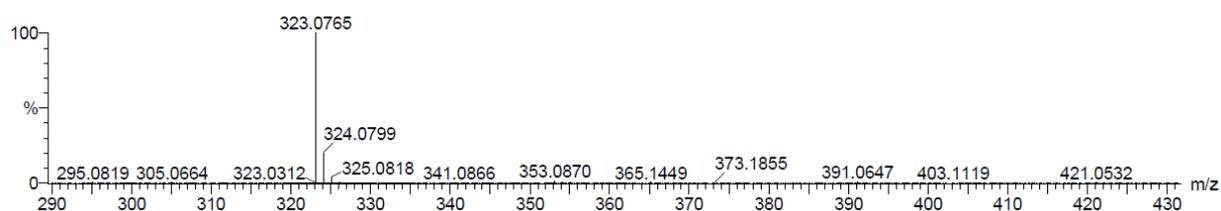
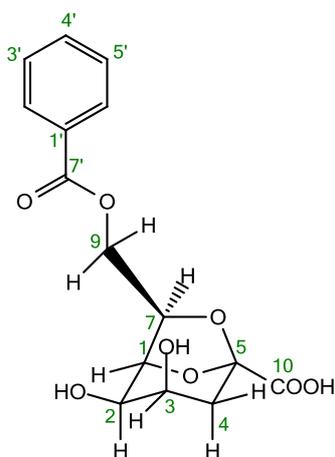


FIGURE 194 - SPECTRE HRESIMS DU COMPOSE *P2* EN MODE NEGATIF [M-H]⁻

TABLEAU 49 - ATTRIBUTION DES SIGNAUX RMN ^{13}C ET ^1H (J EN HZ) ET CORRELATIONS 2D DU COMPOSE P2
(DMSO d_6 , 500 MHz, 300 K)

N°	δ_{C}	δ_{H}	Mult. (J, Hz)		^1H - ^1H COSY	^1H - ^{13}C HMBC	ROESY
1	76,3	4,44	t (4,4)	CH	2, 7	2, 3, 5, 7	2, 9a
2	68,0	3,89	t (4,9)	CH	1, 3	1, 7	1, 4
3	63,7	4,00	m	CH	2, 4	1, 2, 5, 10	4
4	39,2	2,11	m	CH ₂	3	2, 3, 5, 10	2, 3
5	103,1	-	-	Cq			
7	78,7	4,34	m	CH	1, 9	1, 2, 9	9a, b
9	64,3	4,78	dd (2,8 ; 12,0)	CH ₂	7, 9b	7'	1, 7, 9b
		5,13	dd (8,4 ; 12,0)		7, 9a	1, 7, 7'	9a
10	168,9	-	-	Cq			
1'	129,8	-	-	Cq			
2'	129,2	7,98	dd (1,3 ; 8,3)	CH	3', 5'	4', 7'	3', 5'
3'	128,8	7,53	t (7,7)	CH	2', 4', 6'	1', 2', 6'	2', 6'
4'	133,3	7,66	t (7,4)	CH	3', 5'	2', 6'	
5'	128,8	7,53	t (7,7)	CH	2', 4', 6'	1', 2', 6'	2', 6'
6'	129,2	7,98	dd (1,3 ; 8,3)	CH	3', 5'	4', 7'	3', 5'
7'	165,7	-	-	Cq			

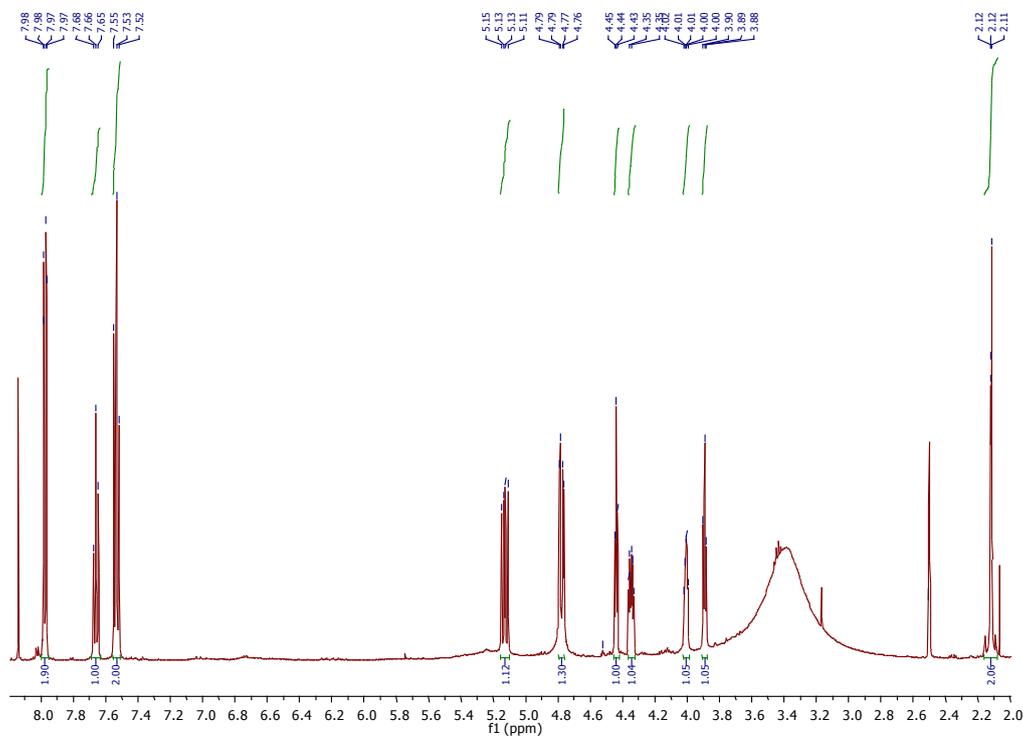


FIGURE 195 - SPECTRE RMN ^1H DU COMPOSE P2 (DMSO d_6 , 500 MHz, 300 K)

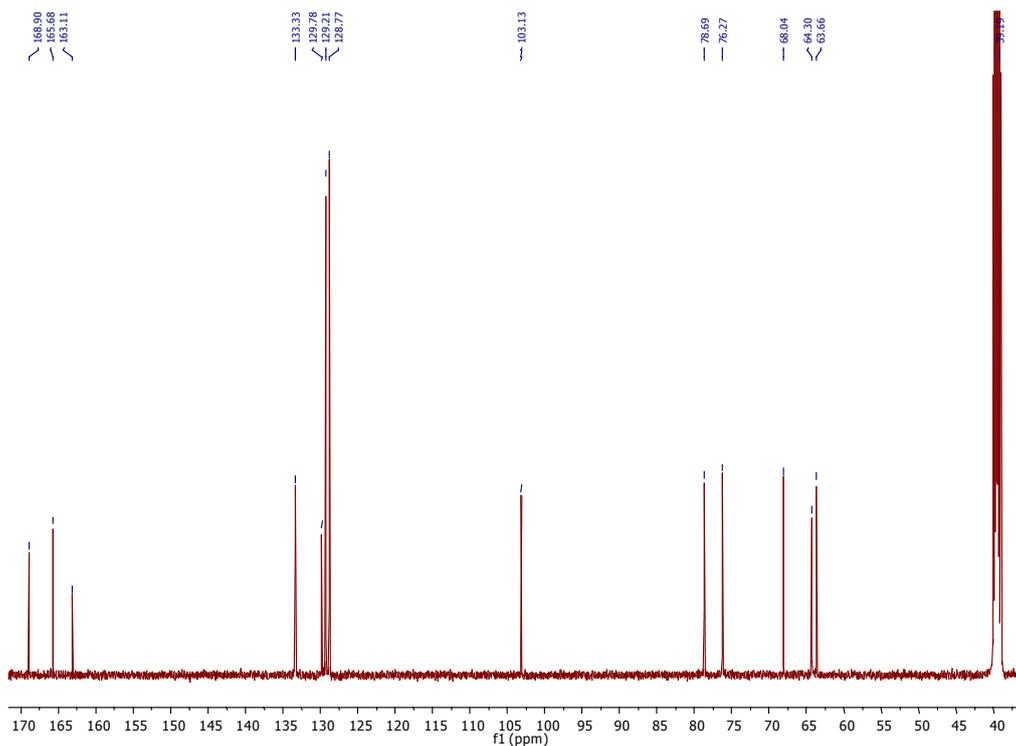


FIGURE 196 - SPECTRE RMN ^{13}C DU COMPOSE *P2* (DMSO d_6 , 500 MHz, 300 K)

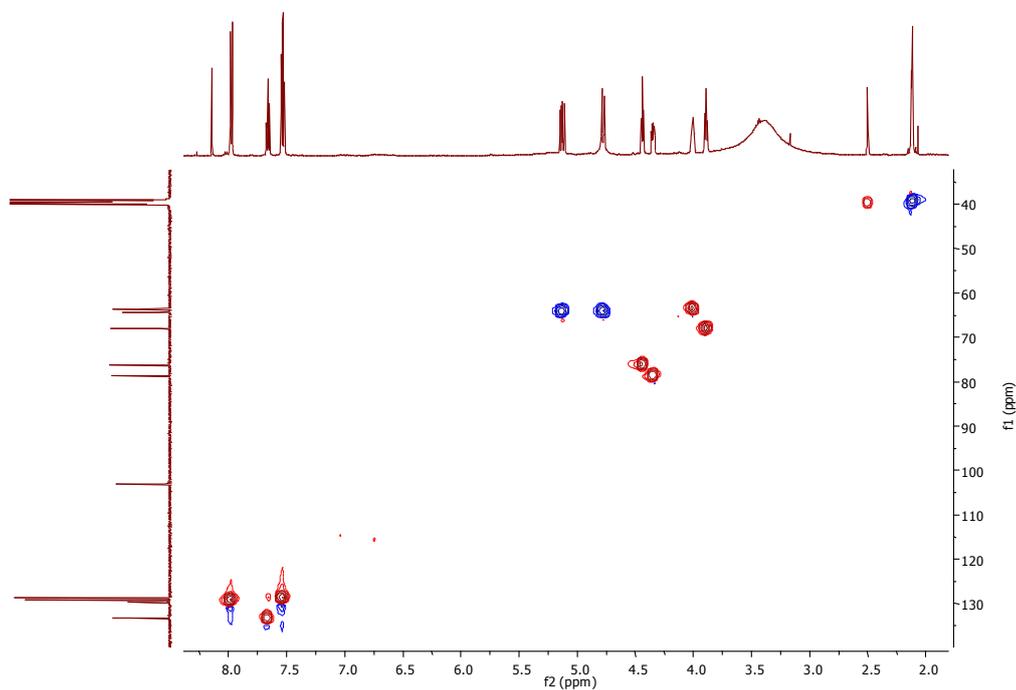


FIGURE 197 - SPECTRE RMN HSQC DU COMPOSE *P2* (DMSO d_6 , 500 MHz, 300 K)

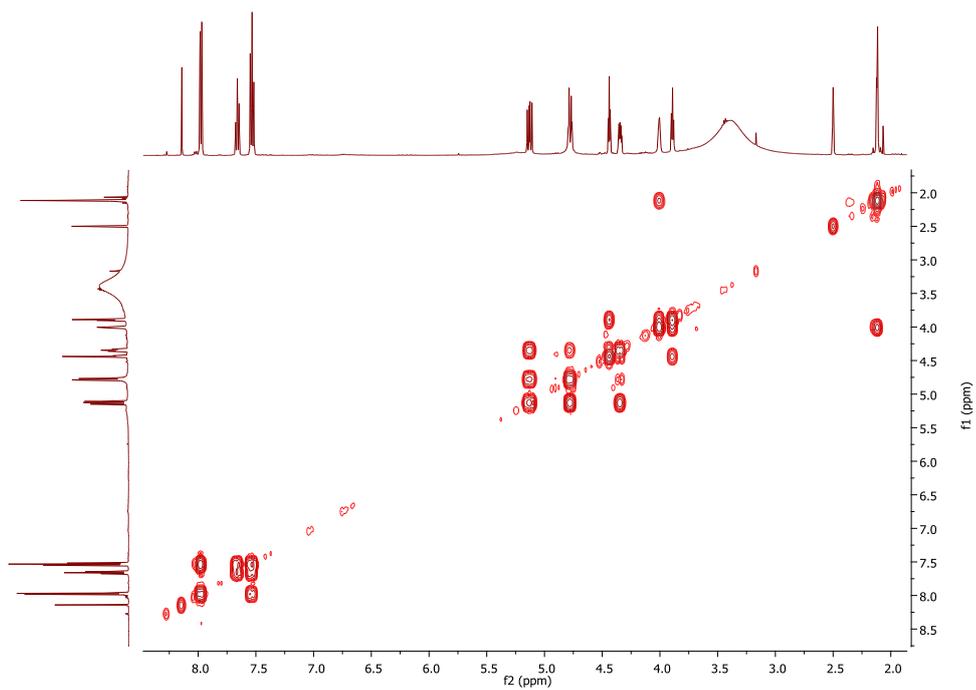


FIGURE 198 - SPECTRE RMN COSY DU COMPOSE P2 (DMSO d_6 , 500 MHz, 300 K)

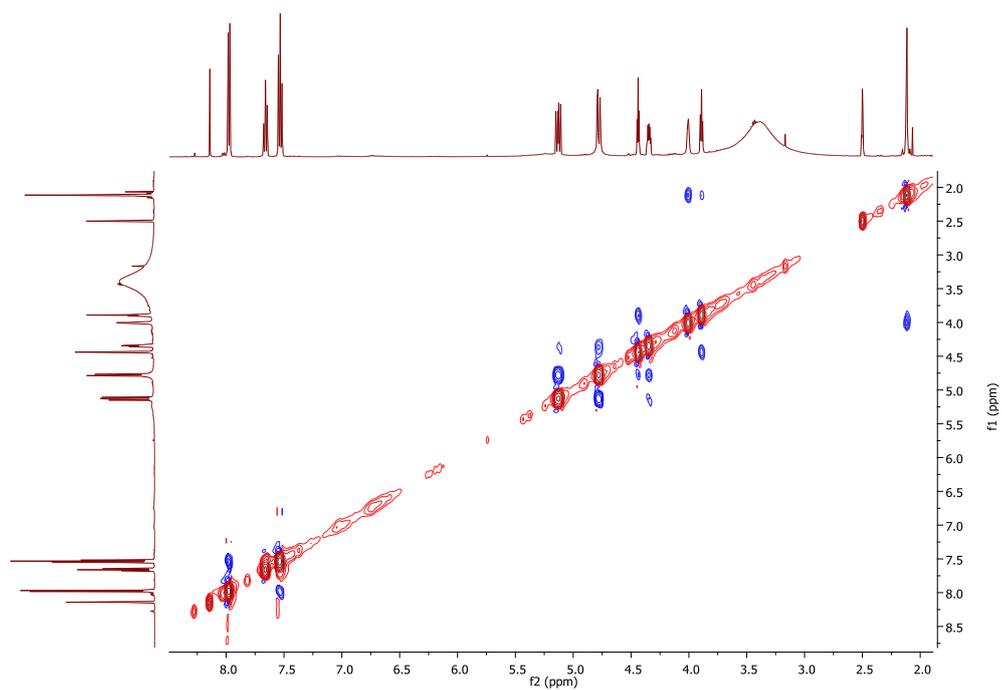


FIGURE 199 - SPECTRE RMN NOESY DU COMPOSE P2 (DMSO d_6 , 500 MHz, 300 K)

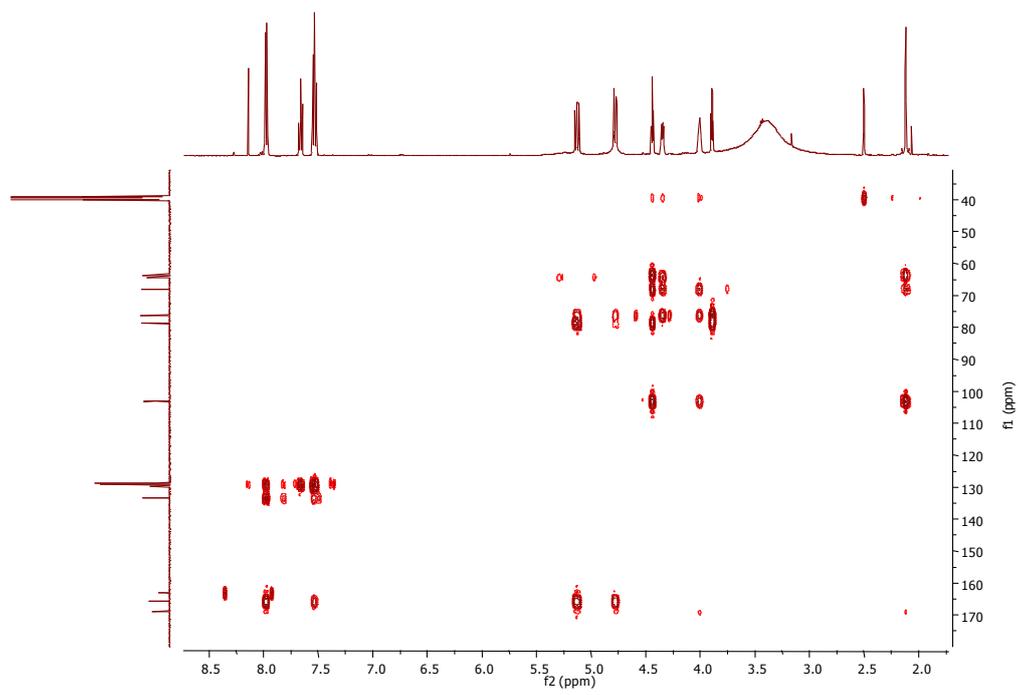


FIGURE 200 - SPECTRE RMN HMBC DU COMPOSE P2 (DMSO d_6 , 500 MHz, 300 K)

IV.3.1.5.2. COMPOSE P5

Les signaux RMN du composé *P5* ne correspondent à aucun composé connu. Les caractéristiques de ce dernier sont décrites ci-après :

Forme Solide amorphe jaune-brun

Formule brute C₁₇H₁₈O₉

Pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20} = -50,9$ (c 0,3 ; MeOH/Eau 2:1)

UV λ_{\max} 280 nm

RMN ¹H et ¹³C (DMSO *d*₆, 500 MHz) Tableau 50 et Figure 202 à Figure 207

HRMS $[M-H]^-$ m/z 365,0871 ; $\Delta = -0,5$ ppm (Figure 201)
(calculé pour C₁₇H₁₈O₉, **366,0949**)

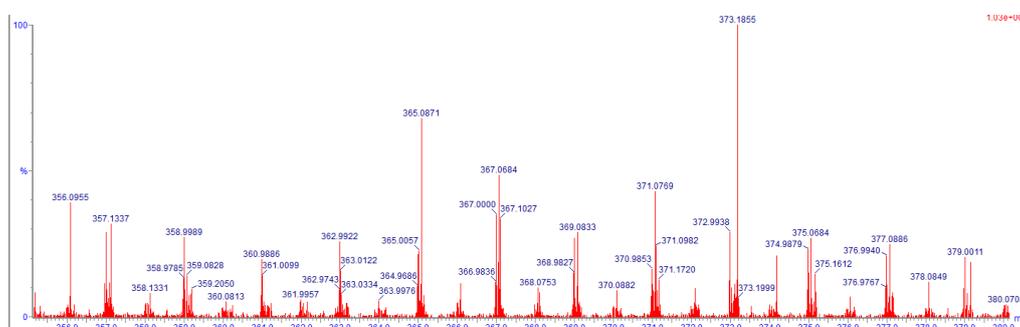
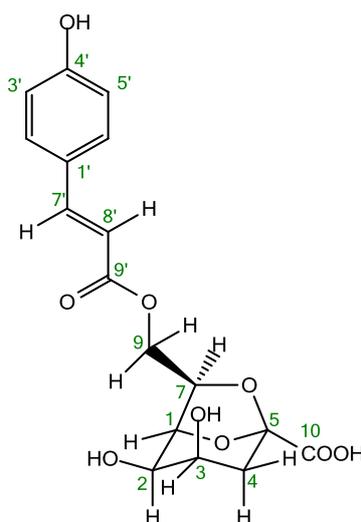


FIGURE 201 - SPECTRE HRESIMS DU COMPOSE *P5* EN MODE NEGATIF $[M-H]^-$

TABLEAU 50 - ATTRIBUTION DES SIGNAUX RMN ^{13}C ET ^1H (J EN HZ) ET CORRELATIONS 2D DU COMPOSE P5
(DMSO d_6 , 500 MHz, 300 K)

N°	δ_{C}	δ_{H}	Mult. (J, Hz)		^1H - ^1H COSY	^1H - ^{13}C HMBC	ROESY
1	76,1	4,31	t (4,3)	CH	2, 7	2, 5, 7, 9	2, 7
2	68,1	3,84	t (5,0)	CH	1, 3	1, 7	1, 3
3	63,7	3,96	m	CH	2, 4		2, 4
4	39,4	2,07	m	CH ₂	3	2, 3, 5	3
5	103,5	-	-	Cq			
7	78,2	4,15	m	CH	1, 9b		1, 9b
9	63,8	4,56	dd (2,5 ; 12,1)	CH ₂	9b	9'	7, 9b
		4,95	dd (8,5 ; 12,1)		7, 9a	7, 9'	9a
10	169,2	-	-	Cq			
1'	134,5	-	-	Cq			
2'	129,7	7,61	dd (1,5 ; 7,6)	CH	3', 5'	7'	3', 5'
3'	128,1	7,38	d (7,5)	CH	2', 6'	1', 2', 4', 6'	2', 6'
4'	129,1	-	-	Cq			
5'	128,1	7,38	d (7,5)	CH	2', 6'	1', 2', 4', 6'	2', 6'
6'	129,7	7,61	dd (1,5 ; 7,6)	CH	3', 5'	7'	3', 5'
7'	142,2	7,02	d (12,7)	CH	8'	2', 6', 8', 9'	8'
8'	119,5	6,03	d (12,7)	CH	7'	1', 2', 6', 7', 9'	7'
9'	165,6	-	-	Cq			

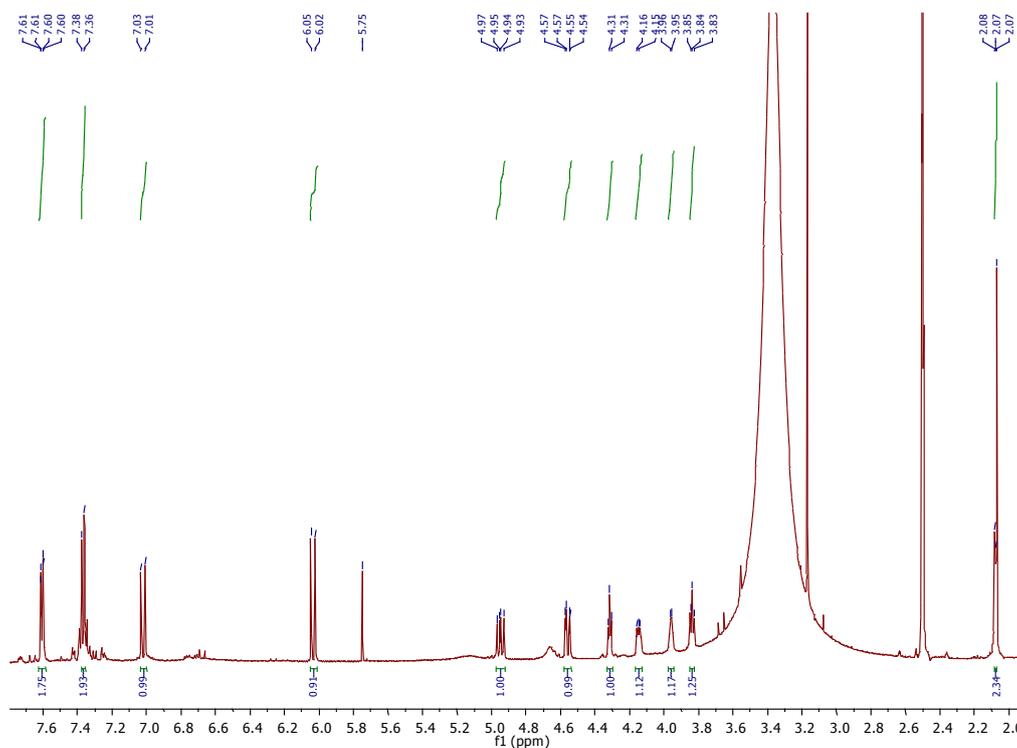


FIGURE 202 - SPECTRE RMN ^1H DU COMPOSE P5 (DMSO d_6 , 500 MHz, 300 K)

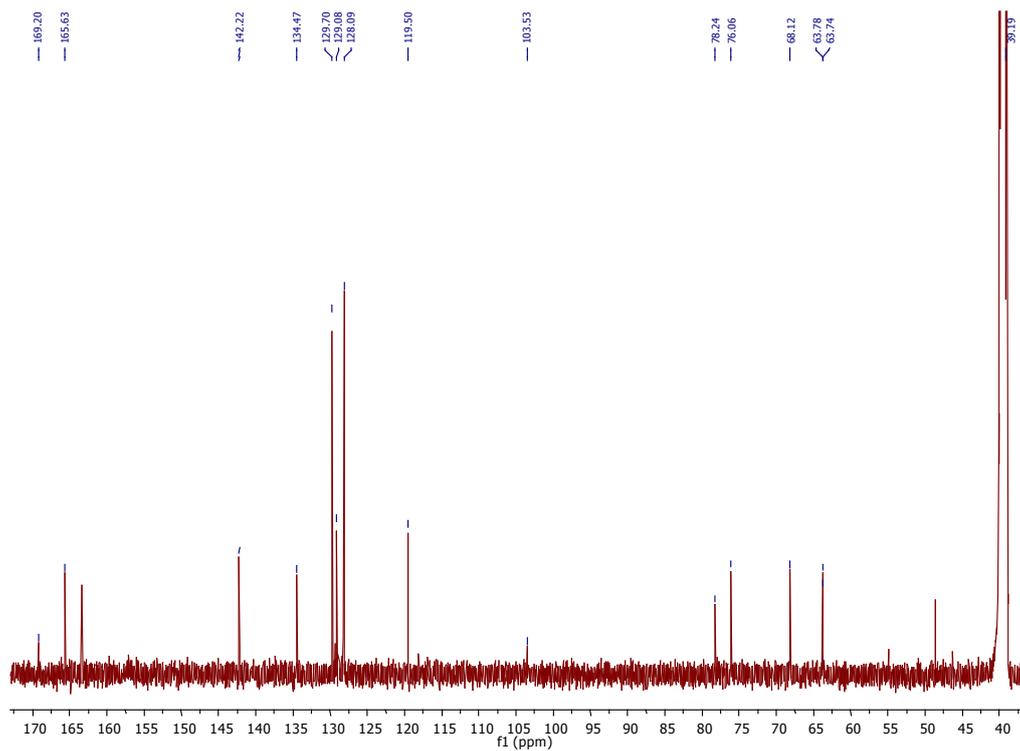


FIGURE 203 - SPECTRE RMN ^{13}C DU COMPOSE *P5* (DMSO d_6 , 500 MHz, 300 K)

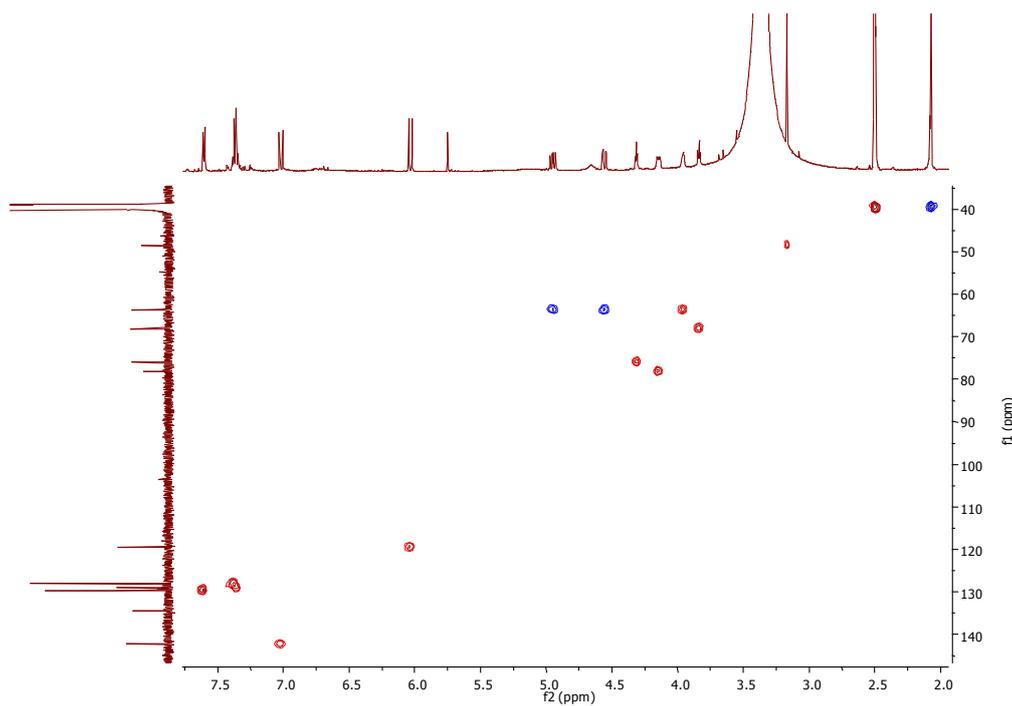


FIGURE 204 - SPECTRE RMN HSQC DU COMPOSE *P5* (DMSO d_6 , 500 MHz, 300 K)

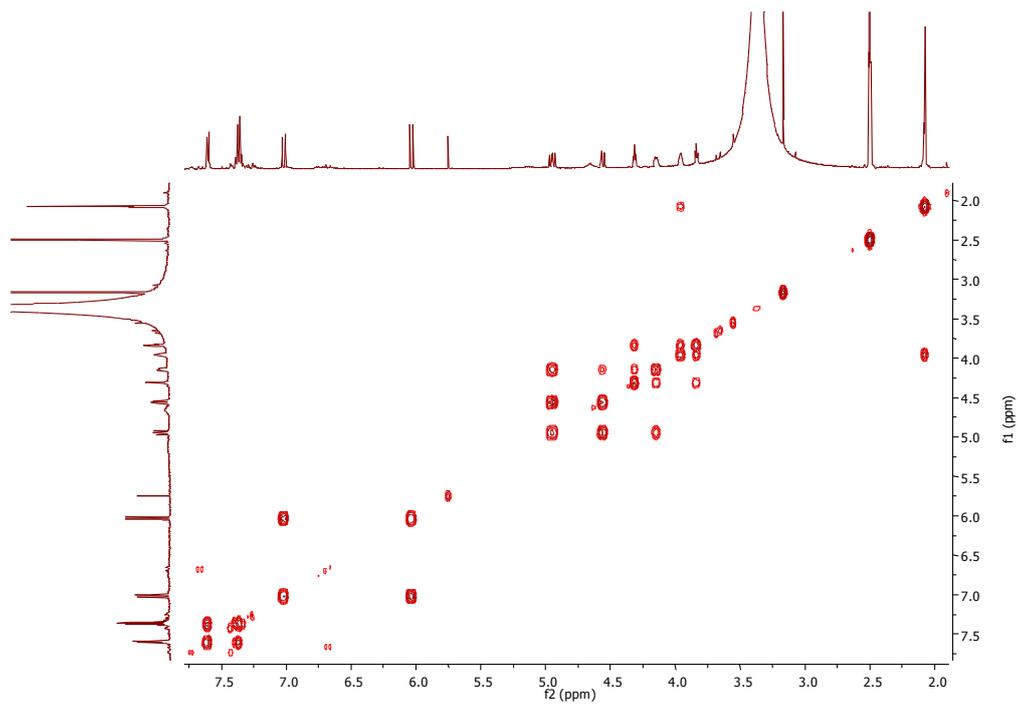


FIGURE 205 - SPECTRE RMN COSY DU COMPOSE P5 (DMSO d_6 , 500 MHz, 300 K)

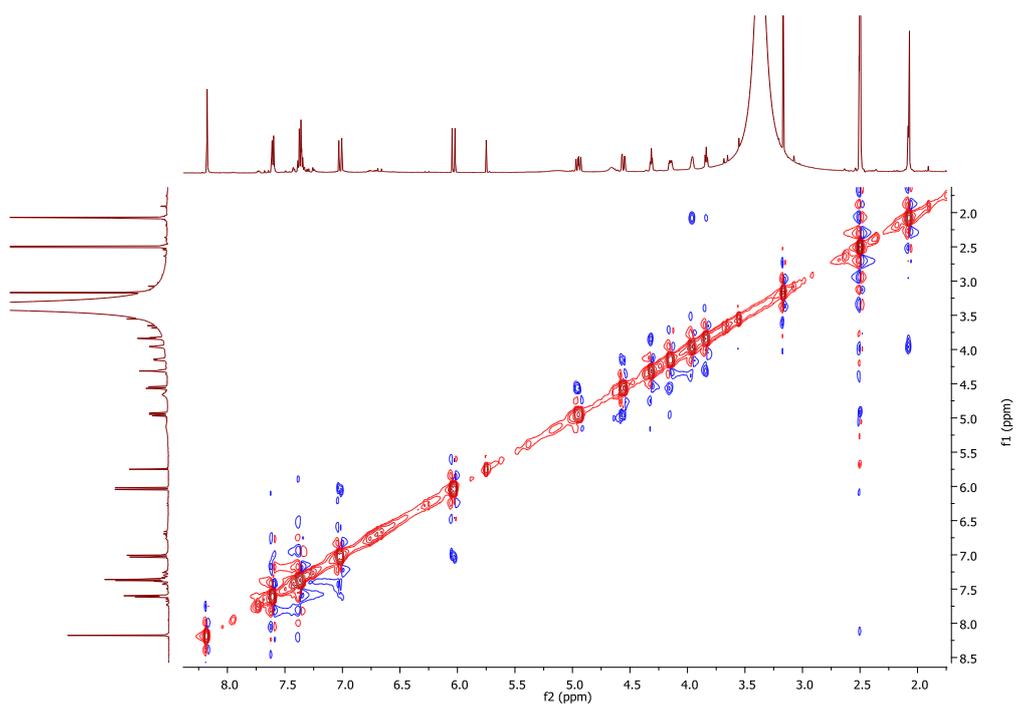


FIGURE 206 - SPECTRE RMN NOESY DU COMPOSE P5 (DMSO d_6 , 500 MHz, 300 K)

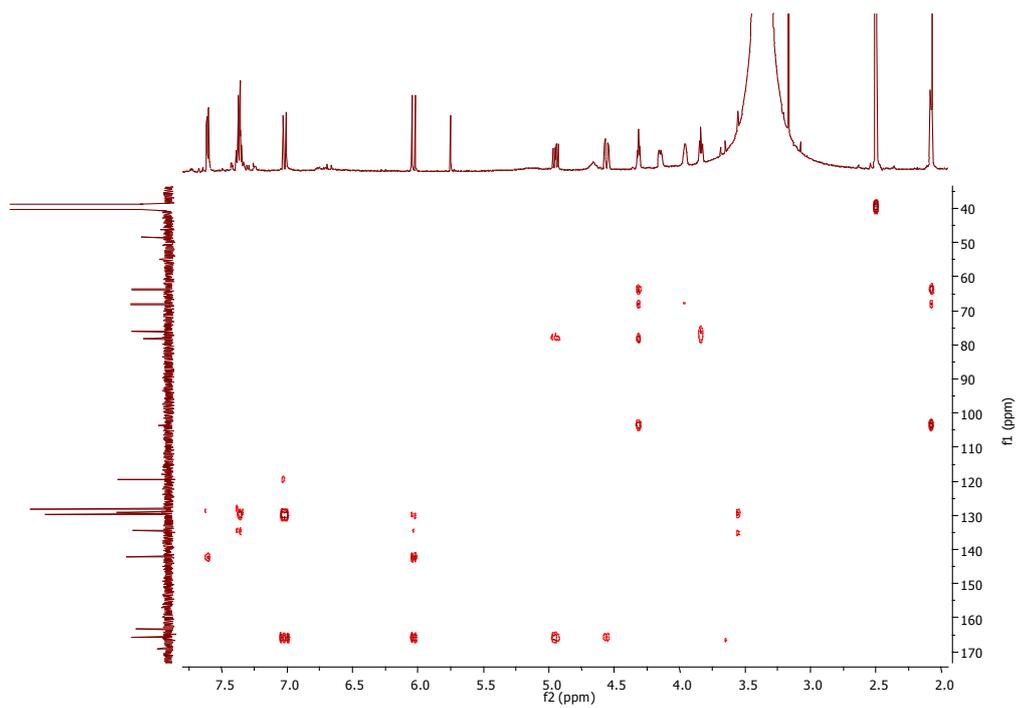


FIGURE 207 - SPECTRE RMN HMBC DU COMPOSE *P5* (DMSO d_6 , 500 MHz, 300 K)

IV.3.1.5.3. COMPOSE P6

Les signaux RMN du composé *P6* ne correspondent à aucun composé connu. Les caractéristiques de ce dernier sont décrites ci-après :

Forme Solide amorphe jaune-brun

Formule brute $C_{17}H_{18}O_8$

Pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20} = -11,2$ (c 0,5 ; MeOH/Eau 1:1)

UV λ_{max} 280 nm

RMN 1H et ^{13}C (DMSO d_6 , 500 MHz) Tableau 51 et Figure 209 à Figure 214

HRMS $[M-H]^-$ m/z 349,0922 ; $\Delta = -0,3$ ppm (Figure 208)

(calculé pour $C_{17}H_{18}O_8$, **350,1000**)

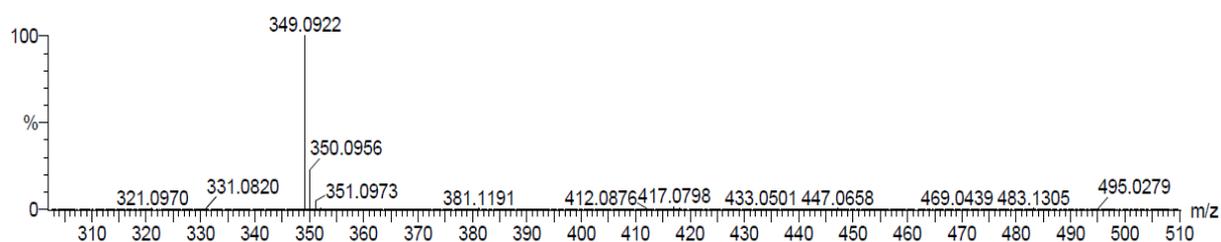
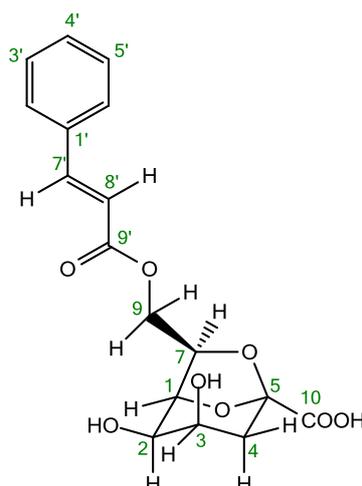


FIGURE 208 - SPECTRE HRESIMS DU COMPOSE *P6* EN MODE NEGATIF $[M-H]^-$

TABLEAU 51 - ATTRIBUTION DES SIGNAUX RMN ^{13}C ET ^1H (J EN HZ) ET CORRELATIONS 2D DU COMPOSE P6
(DMSO d_6 , 500 MHz, 300 K)

N°	δ_{C}	δ_{H}	Mult. (J, Hz)		^1H - ^1H COSY	^1H - ^{13}C HMBC	ROESY
1	76,2	4,39	t (4,3)	CH	2, 7	2, 5, 7, 9	2, 7
2	68,0	3,87	t (5,0)	CH	1, 3	1, 7	1, 3
3	63,7	3,99	m	CH	2, 4		2, 4
4	39,2	2,10	m	CH_2	3	2, 3, 5	3
5	103,2	-	-	Cq			
7	78,6	4,26	m	CH	1, 9b		1, 9b
9	63,8	4,63	dd (2,4 ; 12,2)	CH_2	9b	9'	7, 9b
		5,01	dd (8,7 ; 12,2)		7, 9a		
10	169,0	-	-	Cq			
1'	134,0	-	-	Cq			
2'	128,4	7,73	dd (2,0 ; 7,5)	CH	3', 4', 5'	1', 3', 5', 7'	8'
3'	128,9	7,42	m	CH	2', 6'	1', 3', 5'	
4'	130,5	7,43	m	CH	2', 6'		
5'	128,9	7,42	m	CH	2', 6'	1', 3', 5'	
6'	128,4	7,73	dd (2,0 ; 7,5)	CH	3', 4', 5'	1', 3', 5', 7'	8'
7'	144,5	7,66	d (16,0)	CH	8'	1', 2', 6', 8', 9'	8'
8'	118,1	6,68	d (16,0)	CH	7'	1', 7', 9'	2', 6', 7'
9'	166,2	-	-	Cq			

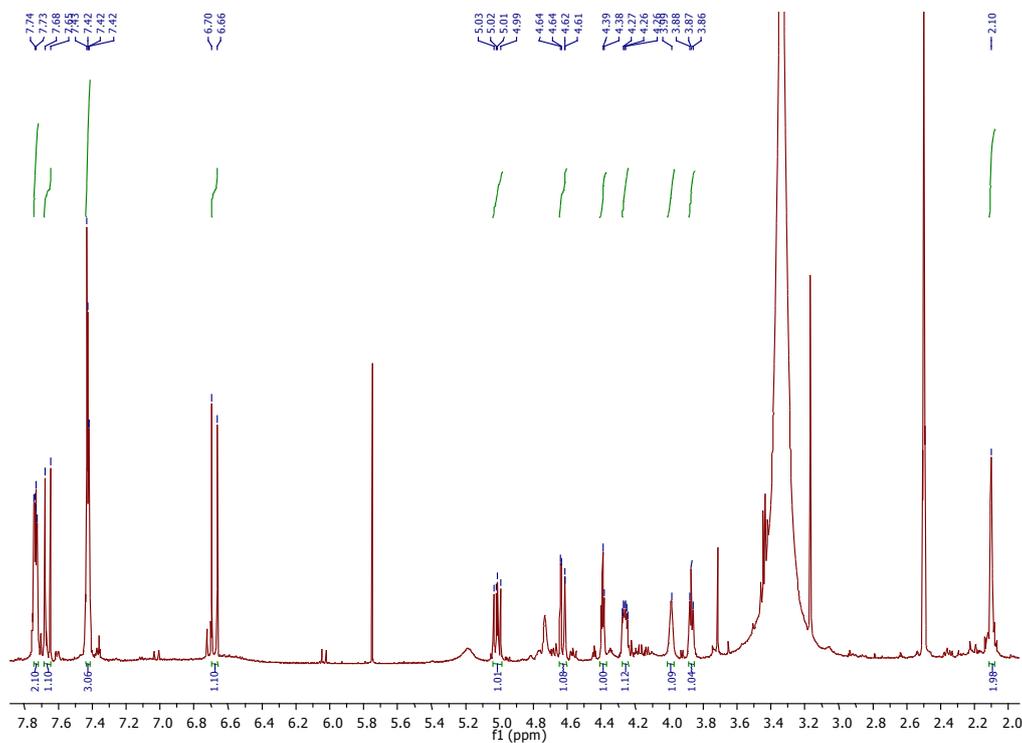


FIGURE 209 - SPECTRE RMN ^1H DU COMPOSE P6 (DMSO d_6 , 500 MHz, 300 K)

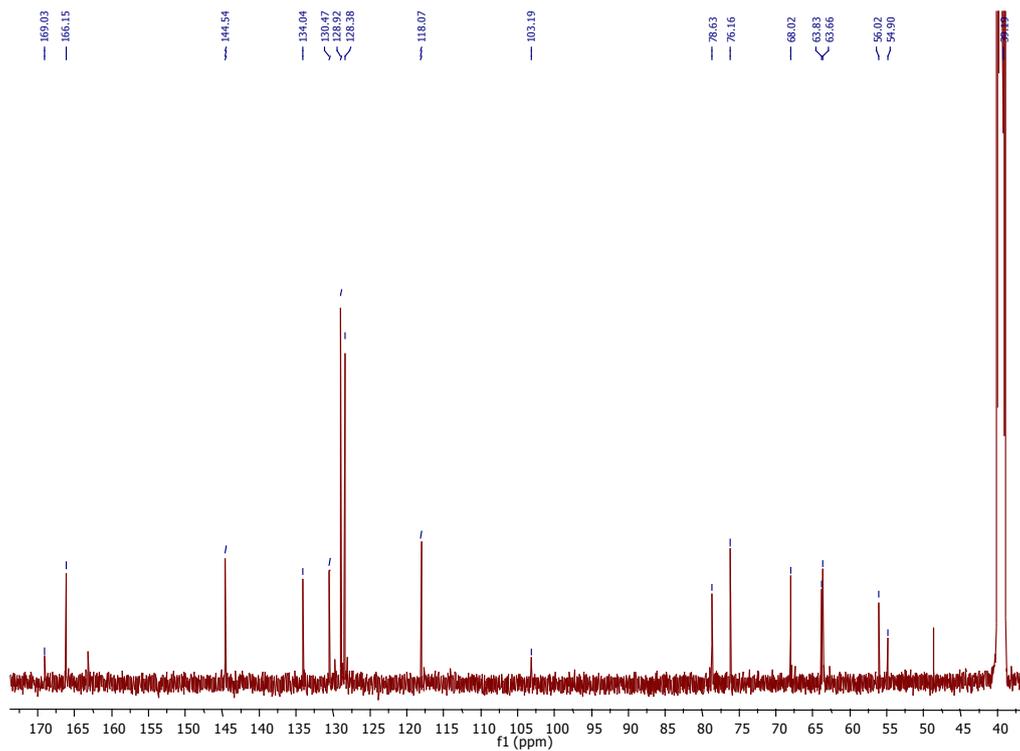


FIGURE 210 - SPECTRE RMN ^{13}C DU COMPOSE *P6* (DMSO d_6 , 500 MHz, 300 K)

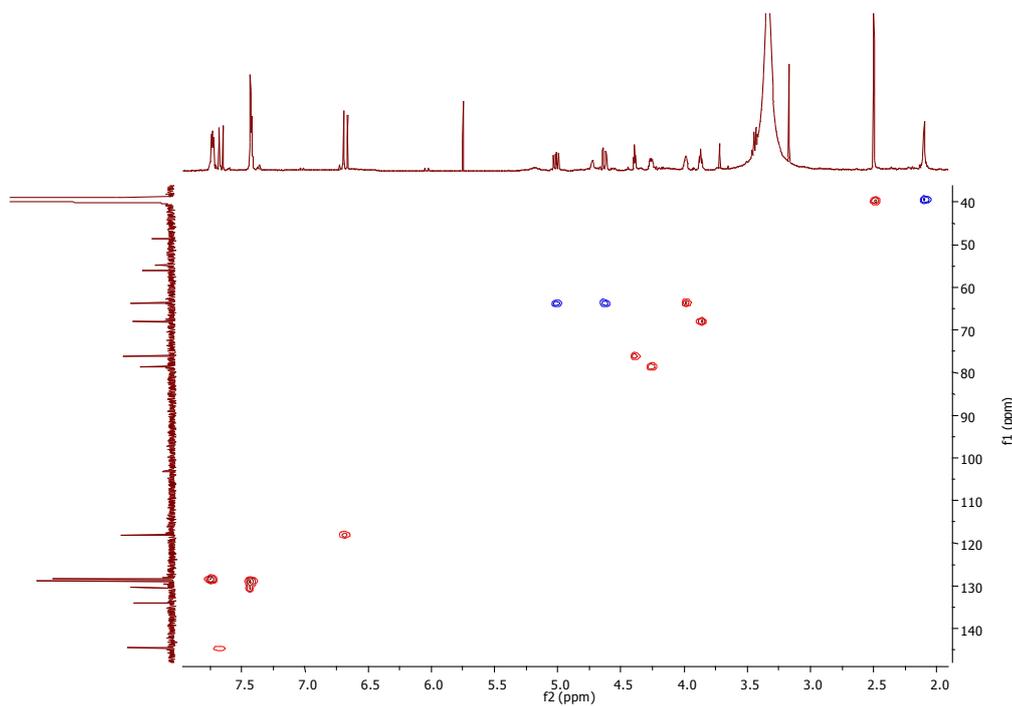


FIGURE 211 - SPECTRE RMN HSQC DU COMPOSE *P6* (DMSO d_6 , 500 MHz, 300 K)

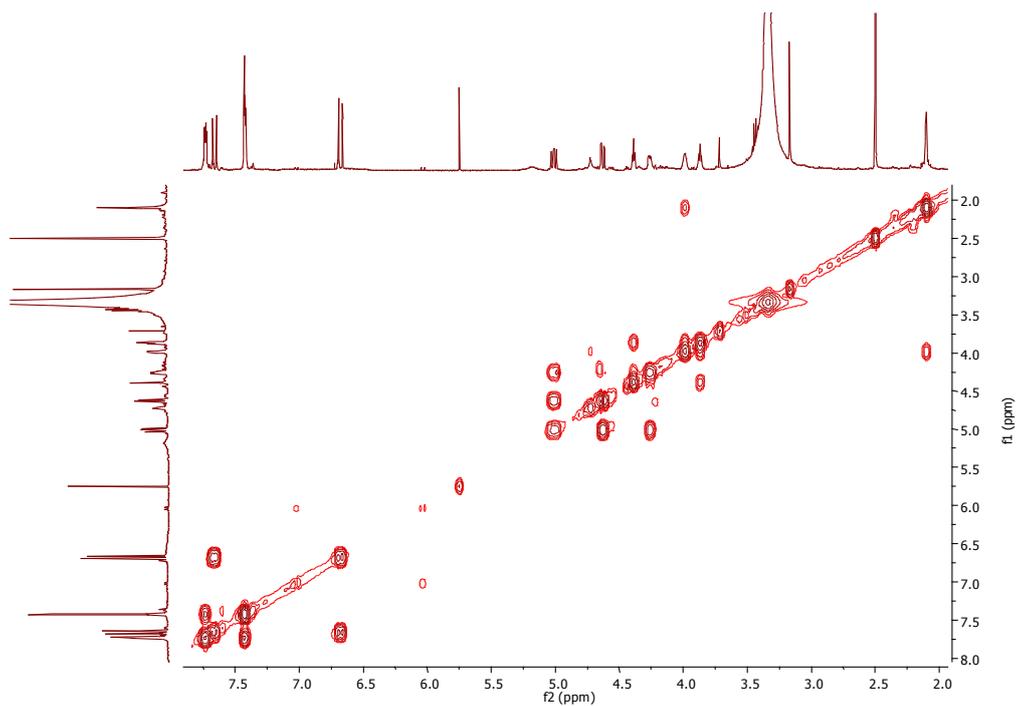


FIGURE 212 - SPECTRE RMN COSY DU COMPOSE P6 (DMSO d_6 , 500 MHz, 300 K)

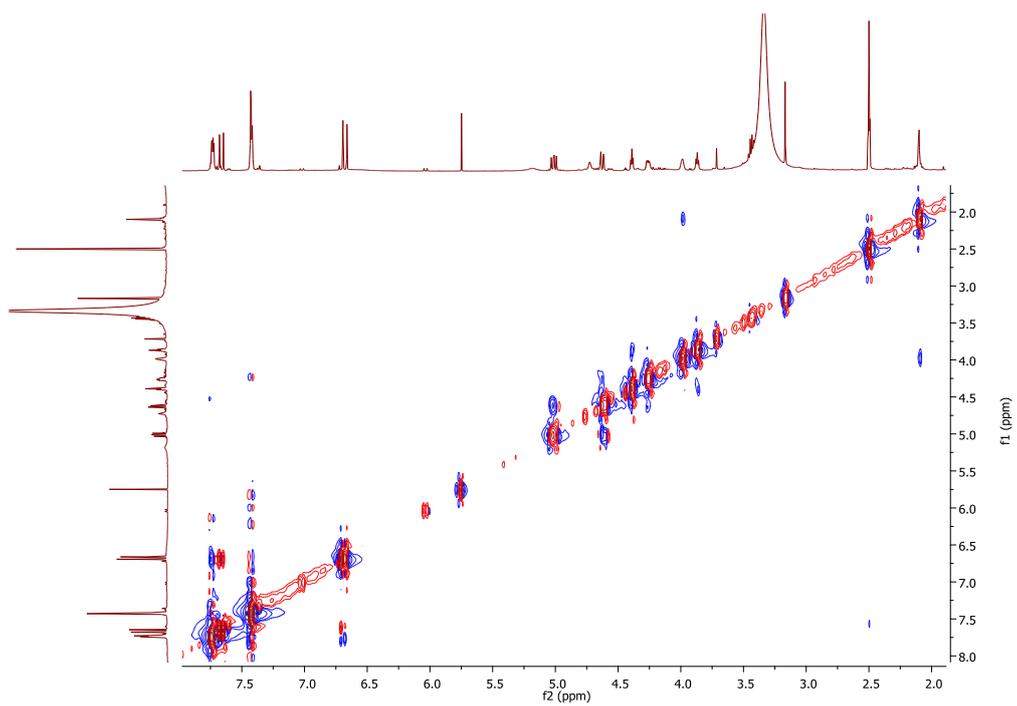


FIGURE 213 - SPECTRE RMN NOESY DU COMPOSE P6 (DMSO d_6 , 500 MHz, 300 K)

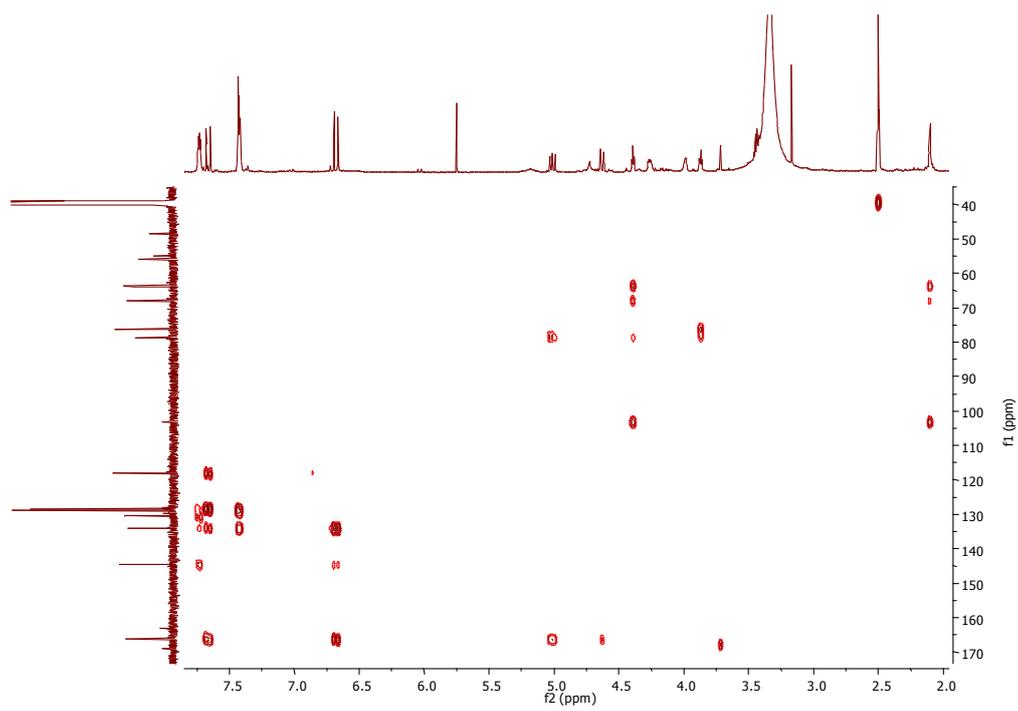


FIGURE 214 - SPECTRE RMN HMBC DU COMPOSE P6 (DMSO *d*₆, 500 MHz, 300 K)

IV.3.2. ETUDE DES COMPOSES HYDROPHOBES

IV.3.2.1. EXTRACTION

Les sommités fleuries ont été broyées très finement à l'aide d'un blender à puissance maximale pendant 1 à 2 minutes.

Une masse équivalente à 100 g de poudre de plante a été extraite avec 1 l de dichlorométhane, dans un erlenmeyer, pendant 4 h, sous agitation mécanique.

Le mélange a ensuite été filtré sur papier filtre, le filtrat a été conservé et la matière végétale extraite à nouveau avec 1 l de dichlorométhane, dans les mêmes conditions. Une nouvelle filtration et une mise en commun des deux filtrats a permis d'obtenir un extrait total vert foncé. Le dichlorométhane a été évaporé sous vide jusqu'à obtenir un résidu sec afin d'accéder à la masse de l'extrait (2,23 g) et au rendement d'extraction (2,23 %).

Conditions analytiques

L'extrait brut a été analysé par HPLC (appareil, colonnes et solvants décrit en III.1) avec la méthode suivante :

Eluants Eau (A) / Acétonitrile (B) / Isopropanol (C)

Débit 1 ml/min

Volume

d'injection 20 µl

Gradient 0-5 min 50 % B et 50 % A ; 5-15 min 50-100 % B ;

15-20 min 100 % B ; 20-40 min 100-20 % B et 0-80 % C ;

40-45 min 80 % C ; 45-50 min 80-0 % C, 20-50 % B et 0-50 % A

Gain

ELSD 1

IV.3.2.2. FRACTIONNEMENT

L'extrait brut a été soumis à un fractionnement par chromatographie sous vide (VLC)¹³⁷ en phase normale (Silice, 40 g). Un dépôt solide a été réalisé en mélangeant la totalité de l'extrait brut (2,23 g) avec 4 g de silice et 20 ml de dichlorométhane. Le solvant a été évaporé sous vide jusqu'à obtenir une poudre homogène. Un total de 6 systèmes de solvants de polarité croissante a été utilisé :

Ether de pétrole (1,1 l) fraction F1 (610 mg)

Ether/Ether de pétrole 1:2 (600 ml) fraction F2 (950 mg)

Ether/Ether de pétrole 1:1 (600 ml) fraction F3 (135 mg)

Ether/Ether de pétrole 2:1 (600 ml) fraction F4 (70 mg)

Ether (600 ml) fraction F5 (30 mg)

MeOH (700 mL) fraction F6 (420 mg)

Le solvant de chaque fraction a été évaporé sous vide jusqu'à obtenir un résidu sec.

La fraction F2 a été soumise à un fractionnement type « chromatographie flash » en phase inverse (C18, 2 g). Un dépôt solide a été réalisé en mélangeant la totalité de la fraction (950 mg) avec 2 g de silice et 10 ml de THF. Le solvant a été évaporé sous vide jusqu'à obtenir une poudre homogène. Après un rinçage à l'eau (fraction F'0), 8 systèmes de solvants de polarité décroissante ont été utilisés :

Rinçage Eau (25 ml) fraction F'0

MeOH/Eau 50:50 (50 ml) fraction F'1

MeOH/Eau 70:30 (100 ml) fraction F'2 (65 mg)

MeOH/Eau 80:20 (100 ml) fraction F'3 (145 mg)

MeOH/Eau 90:10 (100 ml) fraction F'4 (65 mg)

MeOH/Eau 95:5 (100 ml) fraction F'5 (95 mg)

MeOH (150 ml) fraction F'6 (180 mg)

MeOH/CH₂Cl₂ 50:50 (50 ml) fraction F'7 (380 mg)

CH₂Cl₂ (50 ml) fraction F'8 (20 mg)

Le solvant de chaque fraction a été évaporé sous vide jusqu'à obtenir un résidu sec.

IV.3.2.3. ISOLEMENT

La fraction F4 a été reprise dans du THF de façon à obtenir une solution à 50 mg/ml et les composés majoritaires ont été isolés par HPLC semi-préparative (appareil, colonne et solvants décrit en III.1) dans les conditions décrites ci-dessous. Le suivi chromatographique a été réalisé sans ELSD, uniquement avec le détecteur UV-DAD.

Conditions préparatives

Eluants Eau (A) / Acétonitrile (B) / Isopropanol (C)

Débit 3 ml/min

Volume d'injection 70 µl

Gradient 0-5 min 55 % B et 45 % A ; 5-6 min 55-70 % B ;
6-18 min 70-100 % B ; 18-28 min 100 % B ;
28-29 min 100-20 % B et 0-80 % C ; 29-34 min 80 % C ;
34-36 min 80-0 % C, 20-55 % B et 0-45 % A

λ UV 210, 214, 254, 280 et 300 nm

La fraction F'3 a été reprise dans du THF de façon a obtenir une solution à 50 mg/ml et les composés majoritaires ont été isolés par HPLC semi-préparative (appareil, colonne et solvants décrit en III.1) dans les conditions décrites ci-dessous. Le suivi chromatographique a été réalisé sans ELSD, uniquement avec le détecteur UV-DAD.

Conditions préparatives

Eluants Eau (A) / Acétonitrile (B) / Isopropanol (C)

Débit 3 ml/min

Volume d'injection 70 µl

Gradient 0-5 min 55 % B et 45 % A ; 5-6 min 55-70 % B ;
6-18 min 70-100 % B ; 18-28 min 100 % B ;
28-29 min 100-20 % B et 0-80 % C ; 29-34 min 80 % C ;
34-36 min 80-0 % C, 20-55 % B et 0-45 % A

λ UV 210, 214, 254, 280 et 300 nm

IV.3.3. TESTS BIOLOGIQUES

IV.3.3.1. CYTOTOXICITE

Les tests de cytotoxicité *in vitro* ont été réalisés par le laboratoire de toxicologie de la faculté de pharmacie de l'Université Libre de Bruxelles.

Ils ont été réalisés sur trois lignées de cellules cancéreuses humaines. L'A549,¹⁷⁰ l'U373,^{171,172} et la SKMEL-28.^{173,174}

La croissance des cellules cancéreuses a été déterminée grâce au test colorimétrique au MTT. Les tests ont été réalisés dans le DMSO (concentration maximale 100 µg/ml) et la lecture de la concentration inhibant 50 % de la croissance cellulaire (IC₅₀) a été effectuée à 72 h.

IV.3.3.2. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

Les tests antimicrobiens *in vitro* ont été réalisés par le laboratoire d'analyse Nixe à Sophia-Antipolis. Les tests ont été effectués sur trois types de micro-organismes différents, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, avec une concentration de 4 mg/ml pour les extraits, 2 mg/ml pour les fractions et 500 µg/ml pour les composés purs, dans de l'eau avec 1 % de DMSO ou 1 % d'une solution éthanol/eau 60:40 (dissolution de l'extrait). Un blanc avec de l'eau et 1 % du solvant correspondant a également été réalisé. La lecture a été effectuée à 24, 48 et 72 h.

IV.3.3.3. ACTIVITE ANTIOXYDANTE

Les tests antioxydants *in vitro* ont été réalisés par le laboratoire GREEN à Avignon.

Deux types de tests ont été réalisés, le dosage de l'activité anti-radicalaire grâce au réactif DPPH et le dosage des phénols totaux grâce au réactif de Folin-Ciocalteu. Les solutions ont été réalisées dans le méthanol et huit répétitions ont été effectuées pour chaque test.

Pour le dosage des phénols totaux, les tests ont été réalisés à 1 mg/ml, les résultats sont exprimés en équivalent acide gallique (en µg/ml).

Pour le dosage de l'activité anti-radicalaire, la concentration permettant la réduction de 50 % de la concentration initiale en DPPH présent (IC₅₀) a été mesurée (exprimée en µg/ml).

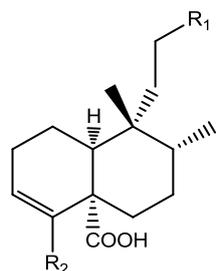
IV.3.3.4. ACTIVITE ANTI-TYROSINASE

Les tests anti-tyrosinase *in vitro* ont été réalisés par le Centre de criblage de molécules bioactives au CEA de Grenoble. Ils ont été réalisés dans le DMSO à 1, 10 et 100 µg/ml.

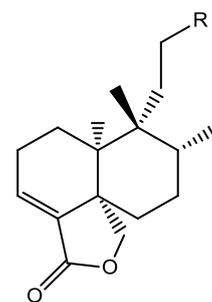
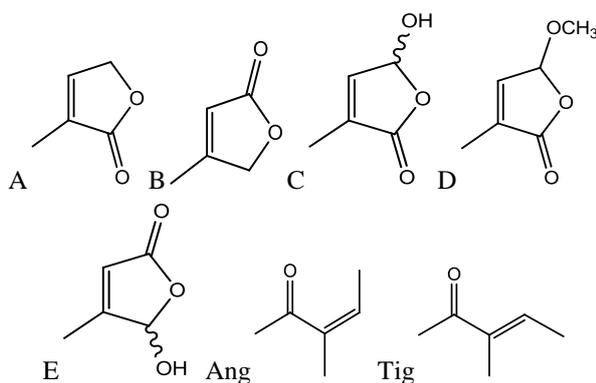


ANNEXES

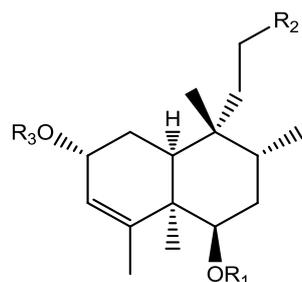
ANNEXE 1 - ENSEMBLE DES CLERODANES IDENTIFIES CHEZ *S. VIRGAUREA*



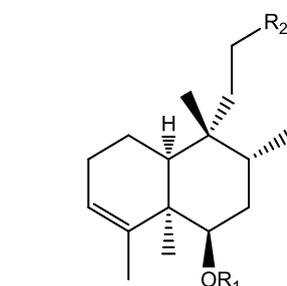
- 23 $R_1=\text{A}$ $R_2=\text{CH}_3$
 24 $R_1=\text{A}$ $R_2=\text{CH}_2\text{OAng}$
 25 $R_1=\text{C}$ $R_2=\text{CH}_3$
 26 $R_1=\text{C}$ $R_2=\text{CH}_2\text{OAng}$
 27 $R_1=\text{D}$ $R_2=\text{CH}_3$
 28 $R_1=\text{E}$ $R_2=\text{CH}_3$
 29 $R_1=\text{E}$ $R_2=\text{CH}_2\text{OAng}$



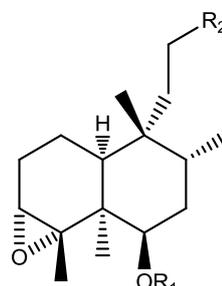
- 30 $R=\text{A}$
 31 $R=\text{B}$



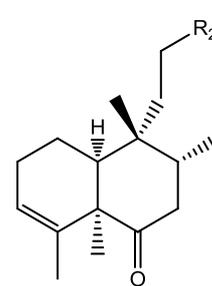
- 36a $R_1=\text{Ang}$ $R_2=\text{B}$ $R_3=\text{H}$
 36b $R_1=\text{Ang}$ $R_2=\text{B}$ $R_3=\text{Ac}$
 37a $R_1=\text{Tig}$ $R_2=\text{B}$ $R_3=\text{H}$
 37b $R_1=\text{Tig}$ $R_2=\text{B}$ $R_3=\text{Ac}$



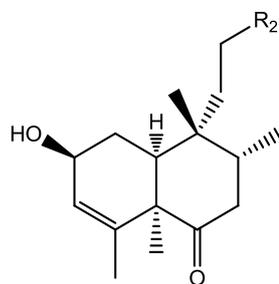
- 32 $R_1=\text{Ang}$ $R_2=\text{B}$
 33 $R_1=\text{Tig}$ $R_2=\text{B}$



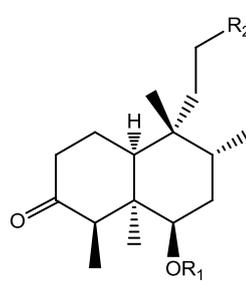
- 35a $R_1=\text{Ang}$ $R_2=\text{B}$
 35b $R_1=\text{Tig}$ $R_2=\text{B}$



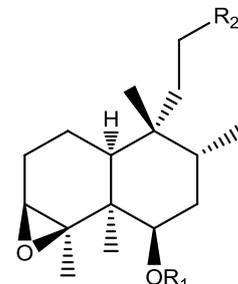
- 34 $R_2=\text{B}$



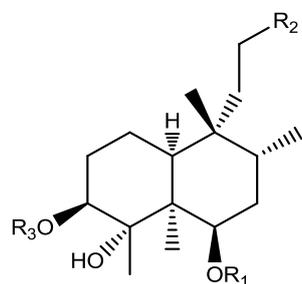
- 38 $R_2=\text{B}$



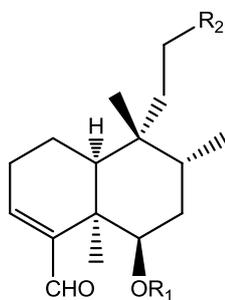
- 39a $R_1=\text{Ang}$ $R_2=\text{B}$
 39b $R_1=\text{Tig}$ $R_2=\text{B}$



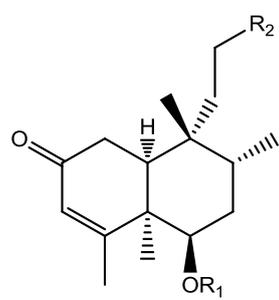
- 40a $R_1=\text{Ang}$ $R_2=\text{B}$
 40b $R_1=\text{Tig}$ $R_2=\text{B}$



- 41a $R_1=\text{Ang}$ $R_2=\text{B}$ $R_3=\text{H}$
 41b $R_1=\text{Ang}$ $R_2=\text{B}$ $R_3=\text{Ac}$
 41c $R_1=\text{Tig}$ $R_2=\text{B}$ $R_3=\text{H}$
 41d $R_1=\text{Tig}$ $R_2=\text{B}$ $R_3=\text{Ac}$

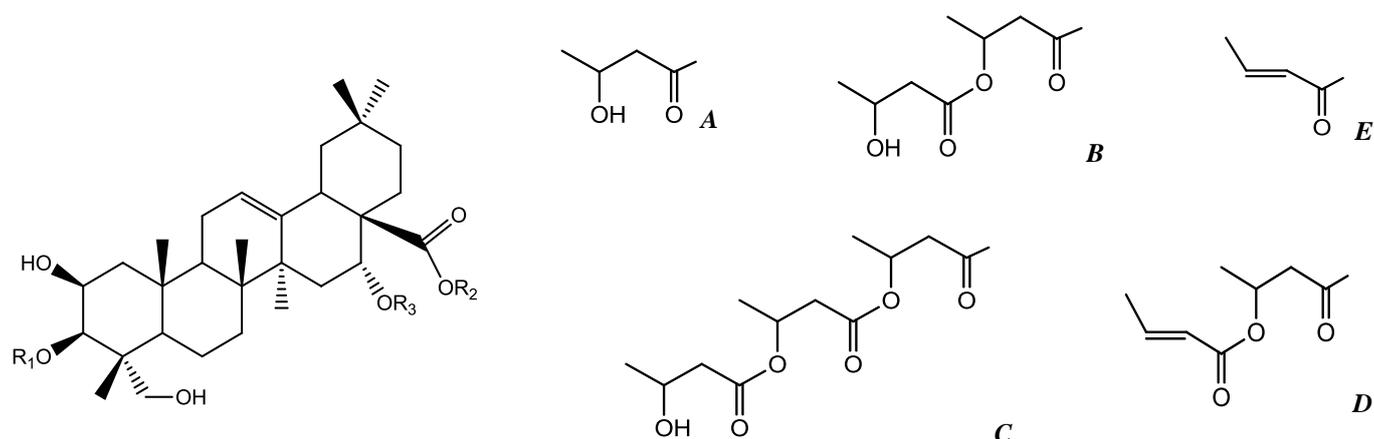


- 42a $R_1=\text{Ang}$ $R_2=\text{B}$
 42b $R_1=\text{Tig}$ $R_2=\text{B}$



- 43a $R_1=\text{Ang}$ $R_2=\text{B}$
 43b $R_1=\text{Tig}$ $R_2=\text{B}$

ANNEXE 2 - ENSEMBLE DES SAPONINES IDENTIFIEES CHEZ *S. VIRGAUREA*



<i>n</i> [•]	R ₁	R ₂	R ₃	Formule brute	Masse
44	R ₁ =H	R ₂ =H	R ₃ =Glc ⁻² -Ara	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₅	798
45	R ₁ =H	R ₂ =H	R ₃ =Glc ⁻² -Ara ⁻⁴ -A	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₇	884
46	R ₁ =H	R ₂ =Rha	R ₃ =Glc ⁻² -Ara	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₉	944
47	R ₁ =H	R ₂ =Rha	R ₃ =Glc ⁻² -Ara ⁻⁴ -A	C ₅₁ H ₈₂ O ₂₁	1030
48	R ₁ =H	R ₂ =Xyl	R ₃ =Glc ⁻² -Ara	C ₄₆ H ₇₄ O ₁₉	930
49	R ₁ =H	R ₂ =Xyl	R ₃ =Glc ⁻² -Ara ⁻⁴ -A	C ₅₀ H ₈₀ O ₂₁	1016
50	R ₁ =H	R ₂ =Ara	R ₃ =Glc ⁻² -Ara	C ₄₆ H ₇₄ O ₁₉	930
51	R ₁ =H	R ₂ =Ara	R ₃ =Glc ⁻² -Ara ⁻⁴ -A	C ₅₀ H ₈₀ O ₂₁	1016
52	R ₁ =Glc ⁻⁴ -Glc	R ₂ =H	R ₃ =H	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₆	828
53	R ₁ =Glc	R ₂ =(Ara ⁻⁴ -Ac) ⁻³ -Ac	R ₃ =Glc ⁻² -Ara ⁻⁴ -A	C ₆₀ H ₉₄ O ₂₈	1262
54	R ₁ =Glc	R ₂ =(Ara ⁻⁴ -Ac) ⁻² -Ac	R ₃ =Glc ⁻² -Ara ⁻⁴ -A	C ₆₀ H ₉₄ O ₂₈	1262
55	R ₁ =Glc	R ₂ =(Ara ⁻⁴ -Ac) ⁻³ -Ac	R ₃ =Glc ⁻² -Ara	C ₅₆ H ₈₈ O ₂₆	1176
56	R ₁ =Glc	R ₂ =(Ara ⁻⁴ -Ac) ⁻² -Ac	R ₃ =Glc ⁻² -Ara	C ₅₆ H ₈₈ O ₂₆	1176
57	R ₁ =Glc	R ₂ =(Fuc ⁻⁴ -C) ⁻² -Rha ⁻⁴ -Xyl ⁻³ -Rha	R ₃ =H	C ₇₁ H ₁₁₄ O ₃₃	1494
58	R ₁ =Glc	R ₂ =(Fuc ⁻⁴ -Ac) ⁻² -Rha ⁻⁴ -Xyl ⁻³ -Rha	R ₃ =H	C ₆₁ H ₉₈ O ₂₈	1278
59	R ₁ =Glc	R ₂ =(Fuc ⁻⁴ -A) ⁻² -Rha ⁻⁴ -Xyl ⁻³ -Rha	R ₃ =H	C ₆₃ H ₁₀₂ O ₂₉	1322
60	R ₁ =Glc	R ₂ =(Fuc ⁻⁴ -A ⁻³ -Ac) ⁻² -Rha ⁻⁴ -Xyl ⁻³ -Rha	R ₃ =H	C ₆₅ H ₁₀₄ O ₃₀	1364
61	R ₁ =Glc	R ₂ =(Fuc ⁻⁴ -B) ⁻² -Rha ⁻⁴ -Xyl ⁻³ -Rha	R ₃ =H	C ₆₇ H ₁₀₈ O ₃₁	1408
62	R ₁ =Glc	R ₂ =(Fuc ⁻⁴ -D) ⁻² -Rha ⁻⁴ -Xyl ⁻³ -Rha	R ₃ =H	C ₆₇ H ₁₀₆ O ₃₀	1390
63	R ₁ =Glc	R ₂ =(Fuc ⁻³ -Api ⁻⁵ -Ac) ⁻⁴ -Ac ⁻² -Rha ⁻⁴ -Xyl ⁻³ -Rha	R ₃ =H	C ₆₈ H ₁₀₈ O ₃₃	1452
64	R ₁ =Glc ⁻³ -Xyl	R ₂ =(Fuc ⁻⁴ -C) ⁻² -Rha ⁻⁴ -Xyl ⁻³ -Rha	R ₃ =H	C ₇₆ H ₁₂₂ O ₃₇	1626

65	R ₁ =Glc- ³ -Xyl	R ₂ =(Fuc- ³ - C)- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	R ₃ =H	C ₇₆ H ₁₂₂ O ₃₇	1626
66	R ₁ =Glc- ³ -Xyl	R ₂ =(Fuc- ³ -Api- ⁵ -Ac)- ⁴ - C)- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	R ₃ =H	C ₈₃ H ₁₃₂ O ₄₂	1800
67	R ₁ =Glc- ³ -Xyl	R ₂ =(Fuc- ⁴ - B)- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	R ₃ =H	C ₇₂ H ₁₁₆ O ₃₅	1540
68	R ₁ =Glc- ³ -Xyl	R ₂ =Fuc- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	R ₃ =H	C ₆₄ H ₁₀₄ O ₃₁	1368
69	R ₁ =Glc- ³ -Glc	R ₂ =(Fuc- ⁴ - C)- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	R ₃ =H	C ₇₇ H ₁₂₄ O ₃₈	1656
70	R ₁ =Glc- ⁴ -Glc	R ₂ =Fuc- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	R ₃ =H	C ₆₅ H ₁₀₆ O ₃₂	1398
71	R ₁ =Glc- ³ -Glc	R ₂ =(Fuc- ³ -Api)- ⁴ -Ac)- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	R ₃ =H	C ₇₂ H ₁₁₆ O ₃₇	1572
72	R ₁ =Glc- ⁴ -Glc	R ₂ =(Fuc- ³ -Api)- ⁴ -Ac)- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	R ₃ =H	C ₇₂ H ₁₁₆ O ₃₇	1572
73	R ₁ =Glc	R ₂ =(Fuc- ⁴ - E)- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	R ₃ =H	C ₆₃ H ₁₀₀ O ₂₈	1304
74	R ₁ =Glc	R ₂ =Fuc- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	R ₃ =H	C ₅₉ H ₉₆ O ₂₇	1236
75	R ₁ =Glc- ³ -Glc	R ₂ =Fuc- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	R ₃ =H	C ₆₅ H ₁₀₆ O ₃₂	1398
76	R ₁ =Glc- ³ -Glc	R ₂ =Fuc- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha- ² -Fuc	R ₃ =H	C ₇₁ H ₁₁₆ O ₃₆	1544
77	R ₁ =Glc- ³ -Glc	R ₂ =(Fuc- ⁴ - B)- ² -Rha- ⁴ -Xyl- ³ -Rha	R ₃ =H	C ₇₃ H ₁₁₆ O ₃₀	1472

ANNEXE 3 - DOSAGE DES SAPONINES TOTALES PAR HPLC-ELSD

QUANTITE DE SAPONINES TOTALES DANS LES DIFFERENTS EXTRAITS BRUTS

Populations	Taux de saponines dans l'extrait brut (%)
<i>Solidago</i> commercial "La maison des plantes"	22,02 ± 1,12
<i>virgaurea</i> La Colmiane, 2009	17,44 ± 0,82
<i>virgaurea</i> La Colmiane, 2010 bouturée à Isola village	16,15 ± 1,48
<i>virgaurea</i> La Colmiane, 2010	14,56 ± 0,58
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2011 bouturée à Isola 2000	14,53 ± 1,28
<i>alpestris</i> Auron, 2009	13,56 ± 0,65
<i>virgaurea</i> Chastellar, 2011	13,20 ± 1,25
<i>alpestris</i> Auron, 2010	12,67 ± 0,23
<i>virgaurea</i> Auron, 2008	12,67 ± 0,21
<i>virgaurea</i> Chastellar, 2009 congelée	12,30 ± 0,58
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2008	12,22 ± 0,05
<i>alpestris</i> St Dalmas, 2011	11,91 ± 0,85
<i>alpestris</i> Isola 2000, 08.2009	11,76 ± 1,32
<i>virgaurea</i> La Colmiane, 2011	11,68 ± 0,73
<i>alpestris</i> Auron, 2011 bouturée à Isola village	11,20 ± 0,11
<i>alpestris</i> Isola 2000 Bas, 2011, pleine floraison	11,09 ± 0,39
<i>alpestris</i> + <i>virgaurea</i> Auron, 2011	10,97 ± 0,98
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010 Fleurs/Graines	10,74 ± 0,74
<i>alpestris</i> Isola 2000, 07.2010	10,69 ± 0,97
<i>alpestris</i> Isola 2000 Bas, 2011 début de floraison	10,50 ± 0,39
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010 bouturée à Isola 2000	10,15 ± 0,03
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2011 bouturée à St Dalmas	10,04 ± 0,85
<i>alpestris</i> Isola 2000 Bas, 2011 fin de floraison	10,00 ± 0,64
<i>virgaurea</i> La Colmiane, 2011 bouturée à St Dalmas	9,88 ± 0,44
<i>alpestris</i> St Dalmas, 2008	9,63 ± 0,36
<i>virgaurea</i> Chastellar, 2010	9,59 ± 0,56
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010 Feuilles	9,33 ± 0,48
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010	9,29 ± 0,82
<i>alpestris</i> Isola 2000 Haut, 2011 pleine floraison	9,19 ± 0,33
<i>alpestris</i> Isola 2000 Haut, 2011 début de floraison	9,14 ± 0,62
<i>virgaurea</i> La Colmiane, 2011 bouturée à Isola village	9,01 ± 0,99
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010 début de floraison	8,94 ± 0,20
<i>alpestris</i> Isola 2000 Haut, 2011 fin de floraison	8,54 ± 0,93
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2009	8,34 ± 0,47
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2011	8,30 ± 1,57
<i>alpestris</i> Isola 2000 Hameau, 2011	8,09 ± 0,68
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2011 bouturée à Isola village	7,93 ± 0,36
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2011 frais	7,53 ± 0,43
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2010 Tiges	0,00 ± 0,00
<i>alpestris</i> Isola 2000, 2008 Rhizomes	0,00 ± 0,00

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Kingston, D. G. I., **2010**. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. *J. Nat. Prod.* 74, 3, 496-511.
2. Madinier, I., Geribaldi, M., **2008**. *Composition containing saponins*. FR08/07412, WO2010072923A1, France.
3. Médail, F., Quézel, P., **1999**. Biodiversity hotspots in the mediterranean basin: setting global conservation priorities. *Conserv. Biol.* 13, 6, 1510-1513.
4. Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A. B., Kent, J., **2000**. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 6772, 853-858.
5. Conservation International, Mediterranean Basin.
http://www.conservation.org/where/priority_areas/hotspots/europe_central_asia/Mediterranean-Basin/Pages/default.aspx, consulté le: 29 septembre 2011.
6. Médail, F., Diadema, K., **2006**. Biodiversité végétale méditerranéenne et anthropisation : approches macro et micro-régionales. *Ann. Géo.* 651, 618-640.
7. McChesney, J. D., Venkataraman, S. K., Henri, J. T., **2007**. Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochemistry* 68, 14, 2015-2022.
8. Wilson, M., **2004**. Microbial inhabitants of humans: their ecology and role in health and disease. Cambridge University Press, Cambridge.
9. Williams, D., Lewis, M., **2011**. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J. Oral Microbiol.* 3.
10. Sudbery, P. E., **2011**. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 10, 737-748.
11. Saville, S. P., Lazzell, A. L., Monteagudo, C., Lopez-Ribot, J. L., **2003**. Engineered control of cell morphology *in vivo* reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot. Cell* 2, 5, 1053-1060.
12. Perry, J. J., Staley, J. T., Lory, S., **2004**. Microbiologie: Cours et questions de révision. Dunod, Paris.
13. Calderone, R. A., Fonzi, W. A., **2001**. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 9, 7, 327-335.

14. Filler, S. G., Sheppard, D. C., **2006**. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *PLoS Path.* 2, 12, e129.
15. Furness, S., Worthington Helen, V., Bryan, G., Birchenough, S., McMillan, R., **2011**. Interventions for the management of dry mouth: topical therapies. *Cochrane Database Syst. Rev.* 10.1002/14651858.CD008934.pub2, 12.
16. Radfar, L., Shea, Y., Fischer, S. H., Sankar, V., Leakan, R. A., Baum, B. J., Pillemer, S. R., **2003**. Fungal load and candidiasis in Sjögren's syndrome. *Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol.* 96, 3, 283-287.
17. Humphrey, S. P., Williamson, R. T., **2001**. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J. Prosthet. Dent.* 85, 2, 162-169.
18. Leito, J. T. D., Ligtenberg, A. J. M., Nazmi, K., Veerman, E. C. I., **2009**. Identification of salivary components that induce transition of hyphae to yeast in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 9, 7, 1102-1110.
19. Inouye, S., Takahashi, M., Abe, S., **2009**. Inhibitory activity of hydrosols, herbal teas and related essential oils against filament formation and the growth of *Candida albicans*. *Jpn. J. Med. Mycol.* 50, 4, 243-251.
20. Messier, C., Grenier, D., **2011**. Effect of licorice compounds licochalcone A, glabridin and glycyrrhizic acid on growth and virulence properties of *Candida albicans*. *Mycoses* 54, 6, e801-e806.
21. Ueno, Y., Fukumatsu, M., Ogasawara, A., Watanabe, T., Mikami, T., Matsumoto, T., **2004**. Hyphae formation of *Candida albicans* is regulated by polyamines. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 6, 890-892.
22. Thiem, B., Goslinska, O., **2002**. Antimicrobial activity of *Solidago virgaurea* L. from *in vitro* cultures. *Fitoterapia* 73, 6, 514-516.
23. Kiselova, Y., Ivanova, D., Chervenkov, T., Gerova, D., Galunska, B., Yankova, T., **2006**. Correlation between the *in vitro* antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs. *Phytother. Res.* 20, 11, 961-965.
24. Bruneton, J., **2009**. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales 4th edition. Tec & Doc Lavoisier, Médicales Internationales, France.
25. Hostettmann, K., **2001**. Tout savoir sur les plantes médicinales des montagnes. Favre, Lausanne.

26. Kalembe, D., **1998**. Constituents of the essential oil of *Solidago virgaurea* L. *Flavour Frag. J.* 13, 6, 373-376.
27. Pietta, P., Gardana, C., Mauri, P., Zecca, L., **1991**. High-performance liquid chromatographic analysis of flavonol glycosides of *Solidago virgaurea*. *J. Chromatogr. A* 558, 1, 296-301.
28. Bader, G., Wray, V., Hiller, K., **1995**. The main saponins from the aerial parts and the roots of *Solidago virgaurea* subsp. *virgaurea*. *Planta Med.* 61, 2, 158-161.
29. Dockter, G., **2010**. *Composition and methods for clotting blood*. WO2010099319A2, USA.
30. Kergosien, G., Samain, H., **2008**. *Flexible article for nails with polymeric layer including a drying oil*. FR2940021A1, France.
31. Lou, S., **2010**. *Use of Solidago virgaurea in the treatment and prevention of viral infections*. US20100221367A1, USA.
32. Gundermann, K.-J., Muller, J., **2007**. Phytodolor - effects and efficacy of a herbal medicine. *Wien. Med. Wochenschr.* 157, 13-14, 343-347.
33. Pepeljnjak, S., Kustrak, D., Vukusic, I., **1998**. Investigation of the antimycotic activity of *Solidago virgaurea* and *Solidago gigantea* extracts. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 8, 2, 85-86.
34. Demir, H., Aık, L., Bali, E. B., Ko, L. Y., Kaynak, G., **2009**. Antioxidant and antimicrobial activities of *Solidago virgaurea* extracts. *Afr. J. Biotechnol.* 8, 2, 274-279.
35. Borchert, V., Czyborra, P., Fetscher, C., Goepel, M., Michel, M., **2004**. Extracts from *Rhois aromatica* and *Solidaginis virgaurea* inhibit rat and human bladder contraction. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 369, 3, 281-286.
36. Derda, M., Hadas, E., Thiem, B., **2009**. Plant extracts as natural amoebicidal agents. *Parasitol. Res.* 104, 3, 705-708.
37. Pawlaczyk, I., Czerchawski, L., Pilecki, W., Lamer-Zarawska, E., Gancarz, R., **2009**. Polyphenolic-polysaccharide compounds from selected medicinal plants of *Asteraceae* and *Rosaceae* families: chemical characterization and blood anticoagulant activity. *Carbohydr. Polym.* 77, 3, 568-575.
38. Kalembe, D., **1992**. Phenolic acids in four *Solidago* species. *Pharmazie* 47, 6, 471-472.

39. Jaiswal, R., Kiprotich, J., Kuhnert, N., **2011**. Determination of the hydroxycinnamate profile of 12 members of the *Asteraceae* family. *Phytochemistry* 72, 8, 781-790.
40. Chodera, A., Dabrowska, K., Senczuk, M., Wasik-Olejniak, A., Skrzypczak, L., Budzianowski, J., Ellnain-Wojtaszek, M., **1985**. Diuretic activity of a glucoside ester from the genus *Solidago*. *Acta Pol. Pharm.* 42, 2, 199-204.
41. Chodera, A., Dabrowska, K., Bobkiewicz-Kozłowska, T., Tkaczyk, J., Skrzypczak, L., Budzianowski, J., **1988**. Effect of leiocarposide on experimental urolithiasis in rats. *Acta Pol. Pharm.* 45, 2, 181-186.
42. Metzner, J., Hirschelmann, R., Hiller, K., **1984**. Antiphlogistic and analgesic effects of leiocarposide, a phenolic bisglucoside from *Solidago virgaurea* L. *Pharmazie* 39, 12, 869-870.
43. Hiller, K., Dube, G., Zeigan, D., **1985**. Virgaureosid A - a new bisdesmosidic phenol glycoside from *Solidago virgaurea* L. *Pharmazie* 40, 11, 795-796.
44. Haghi, G., Hatami, A., **2010**. Simultaneous quantification of flavonoids and phenolic acids in plant materials by a newly developed isocratic high-performance liquid chromatography approach. *J. Agric. Food Chem.* 58, 20, 10812-10816.
45. Starks, C. M., Williams, R. B., Goering, M. G., O'Neil Johnson, M., Norman, V. L., Hu, J.-F., Garo, E., Hough, G. W., Rice, S. M., Eldridge, G. R., **2010**. Antibacterial clerodane diterpenes from Goldenrod (*Solidago virgaurea*). *Phytochemistry* 71, 1, 104-109.
46. Goswami, A., Barua, R. N., Sharma, R. P., Baruah, J. N., Kulanthaivel, P., Herz, W., **1984**. Clerodanes from *Solidago virgaurea*. *Phytochemistry* 23, 4, 837-841.
47. Inose, Y., Miyase, T., Ueno, A., **1991**. Studies on the constituents of *Solidago virga-aurea* L. I. Structural elucidation of saponins in the herb. *Chem. Pharm. Bull.* 39, 8, 2037-2042.
48. Inose, Y., Miyase, T., Ueno, A., **1992**. Studies on the constituents of *Solidago virga-aurea* L. II. Structures of solidagosaponins X-XX. *Chem. Pharm. Bull.* 40, 4, 946-953.
49. Miyase, T., Inose, Y., Ueno, A., **1994**. Studies on the constituents of *Solidago virga-aurea* L. III. Structures of solidagosaponins XXI-XXIX. *Chem. Pharm. Bull.* 42, 3, 617-624.
50. Bader, G., Seibold, M., Tintelnot, K., Hiller, K., **2000**. Cytotoxicity of triterpenoid saponins Part 2: Relationships between the structures of glycosides of polygalacic acid and their activities against pathogenic *Candida* species. *Pharmazie* 55, 1, 72-74.

51. Bader, G., Plohmann, B., Hiller, K., Franz, G., **1996**. Cytotoxicity of triterpenoid saponins. Part 1: Activities against tumor cells *in vitro* and hemolytical index. *Pharmazie* 51, 6, 414-417.
52. Li, W., Asada, Y., Koike, K., Nikaido, T., Furuya, T., Yoshikawa, T., **2005**. Bellisosides A–F, six novel acylated triterpenoid saponins from *Bellis perennis* (compositae). *Tetrahedron* 61, 11, 2921-2929.
53. Hiller, K., Bader, G., Schulten, H.-R., **1987**. Virgaureasaponin 1, a new bisdesmosidic triterpenoid saponin of *Solidago virgaurea* L. *Pharmazie* 42, 8, 541-543.
54. Hiller, K., Bader, G., Dube, G., **1987**. Structure of Virgaureasaponin 2. *Pharmazie* 42, 11, 744-745.
55. Bader, G., Kulhanek, Y., Ziegler-Böhme, H., **1990**. The antifungal action of polygalacic acid glycosides. *Pharmazie* 45, 8, 618-620.
56. Bader, G., Seibold, M., Tintelnot, K., Hiller, K., **2000**. Cytotoxicity of triterpenoid saponins. Part 2: Relationships between the structures of glycosides of polygalacic acid and their activities against pathogenic *Candida* species. *Pharmazie* 55, 1, 72-74.
57. Bader, G., Wray, V., Hiller, K., **1992**. Virgaureasaponin 3, a 3,28-bisdesmosidic triterpenoid saponin from *Solidago virgaurea*. *Phytochemistry* 31, 2, 621-623.
58. Holme, D., Sorensen, N. A., **1954**. Studies related to naturally occurring acetylene compounds. XIV. The occurrence of 2-trans, 8-trans-2,8-decadiene-4,6-diyne-1-ol in nature. *Acta Chem. Scand.* 8, 34-41.
59. Jørgen, L., **1971**. Polyacetylenes of *Solidago virgaurea*: their seasonal variation and NMR long-range spin coupling constants. *Phytochemistry* 10, 3, 647-653.
60. Gründemann, E., Gil-Rjong, R., Hiller, K., **1979**. Knowledge about the saponins of the genus *Solidago*. Proton- and carbon-13-NMR spectroscopic studies on leiocarposide, a new phenolic glucoside. Part 4. *Pharmazie* 34, 7, 430-431.
61. Fötsch, G., Gründemann, E., Pfeifer, S., Hiller, K., Salzwedel, D., **1988**. Structure of leiocarposide. *Pharmazie* 43, 4, 278-280.
62. Klein Gebbinck, E. A., Jansen, B. J. M., de Groot, A., **2002**. Insect antifeedant activity of clerodane diterpenes and related model compounds. *Phytochemistry* 61, 7, 737-770.
63. Salah, M. A., Bedir, E., Toyang, N. J., Khan, I. A., Harries, M. D., Wedge, D. E., **2003**. Antifungal clerodane diterpenes from *Macaranga monandra* (L) Muell. et Arg. (*Euphorbiaceae*). *J. Agric. Food Chem.* 51, 26, 7607-7610.

64. Coll, J., Tandrón, Y., **2008**. neo-Clerodane diterpenoids from *Ajuga* : structural elucidation and biological activity. *Phytochem. Rev.* 7, 1, 25-49.
65. Magela, V. G., Jr., Goncalves, T. d. O., Regasini, L. O., Pinheiro, F. P. M., Pessoa, C. d. O., Costa, L. L. V., Buzanelli, T. R., Boralle, N., Bolzani, V. d. S., Cavalheiro, A. J., **2009**. Cytotoxic clerodane diterpenoids from *Casearia obliqua*. *J. Nat. Prod.* 72, 1847-1850.
66. Dewick, P. M., **2002**. Medicinal natural products a biosynthetic approach, Second Edition. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.
67. Cseke, L. J., Kirakosyan, A., Kaufman, P. B., Warber, S. L., Duke, J. A., Briemann, H. L., **2006**. Natural products from plants, Second Edition. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York.
68. Jacker, H.-J., Voigt, G., Hiller, K., **1982**. Zum antiexsudativen Verhalten einiger triterpensaponine. *Pharmazie* 37, 5, 380-382.
69. Bader, G., Binder, K., Hiller, K., Ziegler-Böhme, H., **1987**. The antifungal action of triterpene saponins of *Solidago virgaurea* L. *Pharmazie* 42, 2, 140.
70. Weber, E., Jakobs, G., **2005**. Biological flora of central Europe: *Solidago gigantea* Aiton. *Flora - morphology, distribution, functional ecology of plants* 200, 2, 109-118.
71. Jin, H., Ogino, K., Fujioka, T., Yoshida, M., Ishimaru, K., **2008**. A new acylphloroglucinol glycoside from *Solidago altissima* L. *J. Nat. Med.* 62, 2, 199-201.
72. Tori, M., Katto, A., Sono, M., **1999**. Nine new clerodane diterpenoids from rhizomes of *Solidago altissima*. *Phytochemistry* 52, 3, 487-493.
73. Bradette-Hebert, M.-E., Legault, J., Lavoie, S., Pichette, A., **2008**. A new labdane diterpene from the flowers of *Solidago canadensis*. *Chem. Pharm. Bull.* 56, 1, 82-84.
74. Zhang, J., Zhang, X., Lei, G., Li, B., Chen, J., Zhou, T., **2007**. A new phenolic glycoside from the aerial parts of *Solidago canadensis*. *Fitoterapia* 78, 1, 69-71.
75. Chaturvedula, V. S. P., Zhou, B.-N., Gao, Z., Thomas, S. J., Hecht, S. M., Kingston, D. G. I., **2004**. New lupane triterpenoids from *Solidago canadensis* that inhibit the lyase activity of DNA polymerase beta. *Bioorg. Med. Chem.* 12, 23, 6271-6275.
76. Apati, P., Szentmihályi, K., Kristó, S. T., Papp, I., Vinkler, P., Szoke, E., Kéry, A., **2003**. Herbal remedies of *Solidago* - correlation of phytochemical characteristics and antioxidative properties. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32, 4-5, 1045-1053.

77. Goulart, S., Moritz, M. I. G., Lang, K. L., Liz, R., Schenkel, E. P., Frode, T. S., **2007**. Anti-inflammatory evaluation of *Solidago chilensis* Meyen in a murine model of pleurisy. *J. Ethnopharmacol.* 113, 2, 346-353.
78. Tamura, E. K., Jimenez, R. S., Waismam, K., Gobbo-Neto, L., Lopes, N. P., Malpezzi-Marinho, E. A. L., Marinho, E. A. V., Farsky, S. H. P., **2009**. Inhibitory effects of *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract on acute inflammation. *J. Ethnopharmacol.* 122, 3, 478-485.
79. Zhu, X., Zhang, X., Chen, J., Tan, J., Chen, H., Wan, F., **2009**. Chemical composition of leaf essential oil from *Solidago decurrens* Lour. *J. Essent. Oil Res.* 21, 4, 354-356.
80. Shiraiwa, K., Yuan, S., Fujiyama, A., Matsuo, Y., Tanaka, T., Jiang, Z.-H., Kouno, I., **2011**. Benzyl benzoate glycoside and 3-Deoxy-d-manno-2-octulosonic acid derivatives from *Solidago decurrens*. *J. Nat. Prod.* 75, 1, 88-92.
81. Choi, S. Z., Choi, S. U., Lee, K. R., **2004**. Phytochemical constituents of the aerial parts from *Solidago virga-aurea* var. *gigantea*. *Arch. Pharmacol Res.* 27, 2, 164-168.
82. Webster, D., Taschereau, P., Belland, R. J., Sand, C., Rennie, R. P., **2008**. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. *J. Ethnopharmacol.* 115, 1, 140-146.
83. Morel, A. F., Dias, G. O., Porto, C., Simionatto, E., Stuker, C. Z., Dalcol, I. I., **2006**. Antimicrobial activity of extractives of *Solidago microglossa*. *Fitoterapia* 77, 6, 453-455.
84. Sabir, S. M., Ahmad, S. D., Hamid, A., Khan, M. Q., Athayde, M. L., Santos, D. B., Boligon, A. A., Rocha, J. B. T., **2012**. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compounds. *Food Chem.* 131, 3, 741-747.
85. Lendl, A., Reznicek, G., **2007**. Two new saponins from *Solidago gigantea*. *Scientia Pharmaceutica* 75, 3, 111-120.
86. Reznicek, G., Jurenitsch, J., Plasun, M., Korhammer, S., Haslinger, E., Hiller, K., Kubelka, W., **1991**. Four major saponins from *Solidago canadensis*. *Phytochemistry* 30, 5, 1629-1633.
87. Augustin, J. M., Kuzina, V., Andersen, S. B., Bak, S., **2011**. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* 72, 6, 435-457.
88. Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P. S., Becker, K., **2002**. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br. J. Nutr.* 88, 587-605.

89. Hostettmann, K., Marston, A., **1995**. Saponins. Cambridge University Press, Cambridge.
90. Vincken, J.-P., Heng, L., de Groot, A., Gruppen, H., **2007**. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* 68, 3, 275-297.
91. Skhirtladze, A., Perrone, A., Montoro, P., Benidze, M., Kemertelidze, E., Pizza, C., Piacente, S., **2011**. Steroidal saponins from *Yucca gloriosa* L. rhizomes: LC-MS profiling, isolation and quantitative determination. *Phytochemistry* 72, 1, 126-135.
92. Haralampidis, K., Trojanowska, M., Osbourn, A., **2002**. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants - History and trends in bioprocessing and biotransformation. In: Dutta, N., Hammar, F., Haralampidis, K., Karanth, N., König, A., Krishna, S., Kunze, G., Nagy, E., Orlich, B., Osbourn, A., Raghavarao, K., Riedel, K., Sahoo, G., Schomäcker, R., Srinivas, N., Trojanowska, M. (Eds.), vol. 75. Springer, Berlin / Heidelberg, 31-49.
93. Sparg, S. G., Light, M. E., van Staden, J., **2004**. Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol.* 94, 2-3, 219-243.
94. Takada, K., Nakao, Y., Matsunaga, S., van Soest, R. W. M., Fusetani, N., **2002**. Nobiloside, a new neuraminidase inhibitory triterpenoidal saponin from the marine sponge *Erylus nobilis*. *J. Nat. Prod.* 65, 3, 411-413.
95. Dai, H.-F., Edrada, R. A., Ebel, R., Nimtz, M., Wray, V., Proksch, P., **2005**. Norlanostane triterpenoidal saponins from the marine sponge *Melophlus sarassinorum*. *J. Nat. Prod.* 68, 8, 1231-1237.
96. Schöpke, T., Thiele, H., Hiller, K., Wray, V., Nimtz, M., **1996**. Triterpenoid saponins from *Bellis bernardii*. *J. Nat. Prod.* 59, 10, 939-943.
97. Schöpke, T., Wray, V., Nimtz, M., Hiller, K., **1996**. Triterpenoid saponins from *Bellium bellidioides*. structures of the minor deacylsaponins. *Phytochemistry* 41, 5, 1399-1403.
98. Su, Y., Koike, K., Guo, D., Satou, T., Liu, J., Zheng, J., Nikaido, T., **2001**. New apiose-containing triterpenoid saponins from *Conyza blinii*. *Tetrahedron* 57, 31, 6721-6726.
99. Ryu, C. S., Kim, C. H., Lee, S. Y., Lee, K. S., Choung, K. J., Song, G. Y., Kim, B.-H., Ryu, S. Y., Lee, H. S., Kim, S. K., **2012**. Evaluation of the total oxidant scavenging capacity of saponins isolated from *Platycodon grandiflorum*. *Food Chem.* 132, 1, 333-337.
100. Cachet, N., Regalado, E. L., Genta-Jouve, G., Mehiri, M., Amade, P., Thomas, O. P., **2009**. Steroidal glycosides from the marine sponge *Pandaros acanthifolium*. *Steroids* 74, 9, 746-750.

101. Regalado, E. L., Tasdemir, D., Kaiser, M., Cachet, N., Amade, P., Thomas, O. P., **2010**. Antiprotozoal steroidal saponins from the marine sponge *Pandaros acanthifolium*. *J. Nat. Prod.* 73, 8, 1404-1410.
102. Meinwald, J., **2010**. Natural products as molecular messengers. *J. Nat. Prod.* 74, 3, 305-309.
103. Dixon, R. A., **2001**. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411, 6839, 843-847.
104. González-Lamothe, R., Mitchell, G., Gattuso, M., Diarra, M., Malouin, F., Bouarab, K., **2009**. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 8, 3400-3419.
105. Gruiz, K., **1996**. Fungitoxic activity of saponins: practical use and fundamental principles. *Adv. Exp. Med. Biol.* 404, 527-534.
106. Man, S., Gao, W., Zhang, Y., Huang, L., Liu, C., **2010**. Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia* 81, 7, 703-714.
107. Mimaki, Y., Yokosuka, A., Kuroda, M., Sashida, Y., **2001**. Cytotoxic activities and structure-cytotoxic relationships of steroidal saponins. *Biol. Pharm. Bull.* 24, 11, 1286-1289.
108. Lu, Y., Luo, J., Kong, L., **2011**. Steroidal alkaloid saponins and steroidal saponins from *Solanum surattense*. *Phytochemistry* 72, 7, 668-673.
109. Miyase, T., Melek, F. R., Warashina, T., Selim, M. A., El Fiki, N. M., Kassem, I. A. A., **2010**. Cytotoxic triterpenoid saponins acylated with monoterpenic acids from fruits of *Gleditsia caspica* Desf. *Phytochemistry* 71, 16, 1908-1916.
110. Yokosuka, A., Sato, K., Mimaki, Y., **2010**. Cycloartane glycosides from the rhizomes of *Curculigo orchioides*. *Phytochemistry* 71, 17-18, 2174-2181.
111. Sánchez-Medina, A., Stevenson, P. C., Habtemariam, S., Peña-Rodríguez, L. M., Corcoran, O., Mallet, A. I., Veitch, N. C., **2009**. Triterpenoid saponins from a cytotoxic root extract of *Sideroxylon foetidissimum* subsp. *gaumeri*. *Phytochemistry* 70, 6, 765-772.
112. Yu, T. X., Ma, R. D., Yu, L. J., **2001**. Structure-activity relationship of tubeimosides in anti-inflammatory, antitumor, and antitumor-promoting effects. *Acta Pharmacol. Sin.* 22, 5, 463-468.
113. Zhang, Y., Zhang, Y. J., Jacob, M. R., Li, X. C., Yang, C. R., **2008**. Steroidal saponins from the stem of *Yucca elephantipes*. *Phytochemistry* 69, 1, 264-270.

114. Ekabo, O. A., Farnsworth, N. R., Henderson, T. O., Mao, G., Mukherjee, R., **1996**. Antifungal and molluscicidal saponins from *Serjania salzmanniana*. *J. Nat. Prod.* 59, 4, 431-435.
115. Sautour, M., Miyamoto, T., Lacaille-Dubois, M.-A., **2005**. Steroidal saponins from *Smilax medica* and their antifungal activity. *J. Nat. Prod.* 68, 10, 1489-1493.
116. Gosse, B., Gnabre, J., Bates, R. B., Dicus, C. W., Nakkiew, P., Huang, R. C. C., **2002**. Antiviral saponins from *Tieghemella heckelii*. *J. Nat. Prod.* 65, 12, 1942-1944.
117. Apers, S., Baronikova, S., Sindambiwe, J. B., Witvrouw, M., De Clercq, E., Vanden Berghe, D., Van Marck, E., Vlietinck, A., Pieters, L., **2001**. Antiviral, haemolytic and molluscicidal activities of triterpenoid saponins from *Maesa lanceolata*: establishment of structure-activity relationships. *Planta Med.* 67, 6, 528-532.
118. Bagalwa, J.-J. M., Voutquenne-Nazabadioko, L., Sayagh, C., Bashwira, A. S., **2010**. Evaluation of the biological activity of the molluscicidal fraction of *Solanum sisymbriifolium* against non target organisms. *Fitoterapia* 81, 7, 767-771.
119. Abdel-Gawad, M. M., El-Sayed, M. M., Abdel-Hameed, E. S., **1999**. Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of *Agave decipiens*. *Fitoterapia* 70, 4, 371-381.
120. Hernández-Carlos, B., González-Coloma, A., Orozco-Valencia, Á. U., Ramírez-Mares, M. V., Andrés-Yeves, M. F., Joseph-Nathan, P., **2011**. Bioactive saponins from *Microsechium helleri* and *Sicyos bulbosus*. *Phytochemistry* 72, 8, 743-751.
121. Oleszek, W., Bialy, Z., **2006**. Chromatographic determination of plant saponins - An update (2002-2005). *J. Chromatogr. A* 1112, 1-2, 78-91.
122. Miyase, T., Melek, F. R., El-Gindi, O. D., Abdel-Khalik, S. M., El-Gindi, M. R., Haggag, M. Y., Hilal, S. H., **1996**. Saponins from *Fagonia arabica*. *Phytochemistry* 41, 4, 1175-1179.
123. Oleszek, W. A., **2002**. Chromatographic determination of plant saponins. *J. Chromatogr. A* 967, 1, 147-162.
124. Lee, K. Y., Cho, Y. W., Park, J., Lee, D. Y., Kim, S. H., Kim, Y. C., Sung, S. H., **2010**. Quality control of *Pulsatilla koreana* based on the simultaneous determination of triterpenoidal saponins by HPLC-ELSD and principal component analysis. *Phytochem. Anal.* 21, 4, 314-321.
125. Liang, M., Zheng, Z., Yuan, Y., Kong, L., Shen, Y., Liu, R., Zhang, C., Zhang, W., **2007**. Identification and quantification of C21 steroidal saponins from *radix cynanchi atrati* by

high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection and electrospray mass spectrometric detection. *Phytochem. Anal.* 18, 5, 428-435.

126. Coran, S. A., Mulas, S., **2012**. Validated determination of primulasaponins in *primula* root by a high-performance-thin-layer-chromatography densitometric approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 70, 0, 647-651.

127. Banowski, B., Petersohn, D., Giesen, M., **2012**. *Deodorants and antiperspirants with hair lightening effect comprising platycodin*. DE102011087980A1, Germany.

128. Ogushi, K., Suzuki, S., **2012**. *Cosmetics containing Cyclamen persicum extract*. JP2012144501A, Japan.

129. Beisel, G., **1995**. *Stable foam product with medicinal, cosmetic, germicidal, or parasiticidal utility*. DE4410778A1, Germany.

130. Ibrahim, M. S., Ibrahim, S. A., **2012**. *System for reducing bacteria on food surfaces while extending shelf life*. WO2012106691A2, USA.

131. Riggs, J., Beadle, D., Vuocolo, K., **2012**. *Systemic fungicidal compositions with saponin and methods of use for protecting plants from fungal, bacterial, and viral diseases*. WO2012039846A1, USA.

132. Wu, J. Y., Gardner, B. H., Murphy, C. I., Seals, J. R., Kensil, C. R., Recchia, J., Beltz, G. A., Newman, G. W., Newman, M. J., **1992**. Saponin adjuvant enhancement of antigen-specific immune responses to an experimental HIV-1 vaccine. *J. Immunol.* 148, 5, 1519-1525.

133. Sarker, S. D., Latif, Z., Gray, A. I., **2006**. Natural product isolation - An overview. In: S. D. Sarker, Z. L., and A. I. Gray (Ed.), *Methods in Biotechnology, Natural Products Isolation, 2nd Ed.*, vol. 20. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1-25.

134. Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., Martínez, J. R., **2004**. Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopiia aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 1025, 1, 105-113.

135. Chemat, F., Vian, M. A., Cravotto, G., **2012**. Green extraction of natural products: concept and principles. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 7, 8615-8627.

136. Kerton, F. M., **2009**. *Alternative solvents for green chemistry*. RSC Pub.

137. Seidel, V., **2006**. Initial and bulk extraction. In: S. D. Sarker, Z. L., and A. I. Gray (Ed.), *Methods in Biotechnology, Natural Products Isolation, 2nd Ed.*, vol. 20. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 27-46.

138. Shimizu, Y., Li, B., **2006**. Purification of water-soluble natural products. In: S. D. Sarker, Z. L., and A. I. Gray (Ed.), *Methods in Biotechnology, Natural Products Isolation, 2nd Ed.*, vol. 20. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 416-438.
139. Nahar, L., Sarker, S. D., **2006**. Supercritical fluid extraction. In: S. D. Sarker, Z. L., and A. I. Gray (Ed.), *Methods in Biotechnology, Natural Products Isolation, 2nd Ed.*, vol. 20. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 47-76.
140. Kim, W.-J., Kim, J.-D., Kim, J., Oh, S.-G., Lee, Y.-W., **2008**. Selective caffeine removal from green tea using supercritical carbon dioxide extraction. *J. Food Eng.* 89, 3, 303-309.
141. Reid, R. G., Sarker, S. D., **2006**. Isolation of natural products by low-pressure column chromatography. In: S. D. Sarker, Z. L., and A. I. Gray (Ed.), *Methods in Biotechnology, Natural Products Isolation, 2nd Ed.*, vol. 20. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 117-157.
142. Latif, Z., **2006**. Isolation by preparative high-performance liquid chromatography. In: S. D. Sarker, Z. L., and A. I. Gray (Ed.), *Methods in Biotechnology, Natural Products Isolation, 2nd Ed.*, vol. 20. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 213-232.
143. Rouessac, F., Rouessac, A., Cruché, D., **2004**. Analyse chimique - 6ème édition - Méthodes et techniques instrumentales modernes. Dunod, Paris.
144. Caude, M., Jardy, A., **1994**. Chromatographie en phase, liquide : Théorie et méthodes de séparation. Techniques de l'ingénieur, Paris.
145. Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Glajch, J. L., **1997**. Practical HPLC method development. Wiley, New York.
146. Mathews, B. T., Higginson, P. D., Lyons, R., Mitchell, J. C., Sach, N. W., Snowden, M. J., Taylor, M. R., Wright, A. G., **2004**. Improving quantitative measurements for the evaporative light scattering detector. *Chromatographia* 60, 11, 625-633.
147. Reich, E., Schibli, A., **2007**. High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants. Thieme, New York.
148. Tranchant, J., **1968**. Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Masson et Cie, France.
149. Kobayashi, G. S., **1996**. Chapter 74 Disease of Mechanisms of Fungi. *Medical microbiology 4th edition*. Samuel Baron, Galveston.

150. Chevalier, M., Medioni, E., Precheur, I., **2012**. Inhibition of *Candida albicans* yeast-hyphal transition and biofilm formation by *Solidago virgaurea* water extracts. *J. Med. Microbiol.* 61, 7, 1016-1022.
151. Hara, S., Okabe, H., Mihashi, K., **1986**. Separation of aldose enantiomers by gas-liquid chromatography. *Chem. Pharm. Bull.* 34, 4, 1843-1845.
152. Hara, S., Okabe, H., Mihashi, K., **1987**. Gas-liquid chromatographic separation of aldose enantiomers as trimethylsilyl ethers of methyl 2-(polyhydroxyalkyl)thiazolidine-4(R)-carboxylates. *Chem. Pharm. Bull.* 35, 2, 501-506.
153. Milcent, R., Chau, F., **2003**. Chimie organique hétérocyclique: chimie et biochimie des principaux composés naturels. EDP Sciences, France.
154. Laurençon, L., Sarrazin, E., Chevalier, M., Prêcheur, I., Herbette, G., Fernandez, X., **2013**. Triterpenoid saponins from the aerial parts of *Solidago virgaurea alpestris* with inhibiting activity of *Candida albicans* yeast-hyphal conversion. *Phytochemistry* 86, 0, 103-111.
155. Sakai, K., Nagao, T., Okabe, H., **1999**. Triterpenoid saponins from the ground part of *Aster ageratoides* var. *ovatus*. *Phytochemistry* 51, 2, 309-318.
156. Kapusta, I., Stochmal, A., Perrone, A., Piacente, S., Pizza, C., Oleszek, W., **2005**. Triterpene saponins from barrel medic (*Medicago truncatula*) aerial parts. *J. Agric. Food Chem.* 53, 6, 2164-2170.
157. Voutquenne, L., Lavaud, C., Massiot, G., Men-Olivier, L. L., **2002**. Structure-activity relationships of haemolytic saponins. *Pharm. Biol.* 40, 4, 253-262.
158. Lanzotti, V., Termolino, P., Dolci, M., Curir, P., **2012**. Paviosides A–H, eight new oleanane type saponins from *Aesculus pavia* with cytotoxic activity. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 10, 3280-3286.
159. Muséum national d'Histoire naturelle, **2003**. Inventaire national du patrimoine naturel. http://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/611925/tab/taxo#, consulté le: 12.10.2012.
160. Parcs Nationaux de France, Parc National du Mercantour. <http://www.parcsnationaux.fr/layout/set/fiche/content/view/full/7466>, consulté le: 3 juin 2012.
161. Haccoun, R. R., **2007**. Statistiques: concepts et applications. Presses de l'Université de Montréal, Montréal.

162. Yamunadevi, M., Wesely, E. G., Johnson, M., **2012**. Chromatographic finger print studies on saponins of *Aerva lanata* (L.) Juss. ex Schultes by using HPTLC. *International Journal of Current Pharmaceutical Research* 4, 2, 52-57.
163. Wang, L., Wang, X., Yuan, X., Zhao, B., **2011**. Simultaneous analysis of diosgenin and sarsasapogenin in *Asparagus officinalis* byproduct by thin-layer chromatography. *Phytochem. Anal.* 22, 1, 14-17.
164. Avula, B., Wang, Y.-H., Rumalla, C. S., Ali, Z., Smillie, T. J., Khan, I. A., **2011**. Analytical methods for determination of magnoflorine and saponins from roots of *Caulophyllum thalictroides* (L.) Michx. using UPLC, HPLC and HPTLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 56, 5, 895-903.
165. Schwarzbach, A., Schreiner, M., Knorr, D., **2006**. Effect of cultivars and deep freeze storage on saponin content of white *asparagus* spears (*Asparagus officinalis* L.). *Eur. Food Res. Technol.* 222, 1, 32-35.
166. Wagner, H., Blatt, S., **1996**. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Springer, Berlin.
167. Adnani, N., Michel, C. R., Bugni, T. S., **2012**. Universal quantification of structurally diverse natural products using an evaporative light scattering detector. *J. Nat. Prod.* 75, 4, 802-806.
168. Barféty, J.-C., Énay, R., Gidon, M., **1995**. L'âge des Terres Noires et des formations associées dans les environs de Grenoble. *Géologie Alpine* 71, 165-168.
169. Parc national du Mercantour, **2002**. Atlas du parc national du Mercantour. <http://atlas.parcsnationaux.org/mercantour/Page.asp?page=23&ancre=#debut>, consulté le: 26 Octobre 2012.
170. Mijatovic, T., Mathieu, V., Gaussin, J. F., De Neve, N., Ribaucour, F., Van Quaquebeke, E., Dumont, P., Darro, F., Kiss, R., **2006**. Cardenolide-induced lysosomal membrane permeabilization demonstrates therapeutic benefits in experimental human non-small cell lung cancers. *Neoplasia* 8, 5, 402-412.
171. Lefranc, F., Mijatovic, T., Kondo, Y., Sauvage, S., Roland, I., Debeir, O., Krstic, D., Vasic, V., Gailly, P., Kondo, S., Blanco, G., Kiss, R., **2008**. Targeting the alpha 1 subunit of the sodium pump to combat glioblastoma cells *Neurosurgery* 62, 1, 211-222.
172. Ingrassia, L., Lefranc, F., Dewelle, J., Pottier, L., Mathieu, V., Spiegl-Kreinecker, S., Sauvage, S., El Yazidi, M., Dehoux, M., Berger, W., Van Quaquebeke, E., Kiss, R., **2009**. Structure-activity relationship analysis of novel derivatives of narciclasine (an *Amaryllidaceae* isocarboxystyryl derivative) as potential anticancer agents. *J. Med. Chem.* 52, 4, 1100-1114.

173. Mathieu, V., Pirker, C., Martin de Lassalle, E., Vernier, M., Mijatovic, T., DeNeve, N., Gaussin, J. F., Dehoux, M., Lefranc, F., Berger, W., Kiss, R., **2009**. The sodium pump alpha sub-unit: a disease progression-related target for metastatic melanoma treatment. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 9B, 3960-3972.
174. Van Goietsenoven, G., Hutton, J., Becker, J. P., Lallemand, B., Robert, F., Lefranc, F., Pirker, C., Vandebussche, G., Van Antwerpen, P., Evidente, A., Berger, W., Prevost, M., Pelletier, J., Kiss, R., Kinzy, T. G., Kornienko, A., Mathieu, V., **2010**. Targeting of eEF1A with *Amaryllidaceae* isocarbostryls as a strategy to combat melanomas. *FASEB J.* 24, 11, 4575-4584.
175. Vieira, M. G. A., da Silva, M. A., dos Santos, L. O., Beppu, M. M., **2011**. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *Eur. Polym. J.* 47, 3, 254-263.
176. Amidon, T. E., Liu, S., **2009**. Water-based woody biorefinery. *Biotechnol. Adv.* 27, 5, 542-550.
177. Ding, Y., Su, Y., Guo, H., Yang, F., Mao, H., Gao, X., Zhu, Z., Tu, G., **2010**. Phenylpropanoyl esters from Horsetail (*Coryza canadensis*) and their inhibitory effects on catecholamine secretion. *J. Nat. Prod.* 73, 2, 270-274.
178. Zhang, Y., Zhao, Q., Ma, J., Wu, B., Zeng, X., **2010**. Chemical characterization of phenolic compounds in *Erigeron* injection by rapid-resolution LC coupled with multi-stage and quadrupole-TOF-MS. Springer, Heidelberg.
179. Liao, S. G., Zhang, L. J., Li, C. B., Lan, Y. Y., Wang, A. M., Huang, Y., Zhen, L., Fu, X. Z., Zhou, W., Qi, X. L., Guan, Z. Z., Wang, Y. L., **2010**. Rapid screening and identification of caffeic acid and its esters in *Erigeron breviscapus* by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24, 17, 2533-2541.
180. Zhang, Y., Shi, P., Qu, H., Cheng, Y., **2007**. Characterization of phenolic compounds in *Erigeron breviscapus* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 18, 2971-2984.
181. Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., Iseki, K., **2011**. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int. J. Pharm.* 403, 1-2, 136-138.
182. Ohnishi, M., Morishita, H., Iwahashi, H., Toda, S., Shirataki, Y., Kimura, M., Kido, R., **1994**. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis. *Phytochemistry* 36, 3, 579-583.

183. Huang, M.-T., Smart, R. C., Wong, C.-Q., Conney, A. H., **1988**. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.* 48, 21, 5941-5946.
184. Basnet, P., Matsushige, K., Hase, K., Kadota, S., Namba, T., **1996**. Four di-O-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models. *Biol. Pharm. Bull.* 19, 11, 1479-1484.
185. Izuta, H., Narahara, Y., Shimazawa, M., Mishima, S., Kondo, S.-i., Hara, H., **2009**. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity of bee products and their constituents determined by ESR. *Biol. Pharm. Bull.* 32, 12, 1947-1951.
186. Hung, T. M., Na, M., Thuong, P. T., Su, N. D., Sok, D., Song, K. S., Seong, Y. H., Bae, K., **2006**. Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of *Dipsacus asper* Wall. *J. Ethnopharmacol.* 108, 2, 188-192.
187. Afanas'ev, I. B., Dcrozsko, A. I., Brodskii, A. V., Kostyuk, V. A., Potapovitch, A. I., **1989**. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 38, 11, 1763-1769.
188. Torel, J., Cillard, J., Cillard, P., **1986**. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry* 25, 2, 383-385.
189. Thiem, B., Wesolowska, M., Skrzypczak, L., Budzianowski, J., **2001**. Phenolic compounds in two *Solidago* L. species from *in vitro* culture. *Acta Pol. Pharm.* 58, 4, 277-281.
190. Wu, L.-l., Yang, X.-b., Huang, Z.-m., Liu, H.-z., Wu, G.-x., **2007**. *In vivo* and *in vitro* antiviral activity of hyperoside extracted from *Abelmoschus manihot* (L.). *Acta Pharmacol. Sin.* 28, 3, 404-409.
191. Rogerio, A. P., Kanashiro, A., Fontanari, C., Silva, E. V. G., Lucisano-Valim, Y. M., Soares, E. G., Faccioli, L. H., **2007**. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. *Inflammation Res.* 56, 10, 402-408.
192. Singh, P., Jain, R., Krishna, V., **1998**. Benzyl-2,6-dimethoxy and benzyl-2,3,5,6-tetramethoxybenzoates from *Blainvillea latifolia* Linn. *Nat. Prod. Sci.* 4, 42-44.
193. Rivero-Cruz, B., Rivero-Cruz, I., Rodriguez-Sotres, R., Mata, R., **2007**. Effect of natural and synthetic benzyl benzoates on calmodulin. *Phytochemistry* 68, 8, 1147-1155.
194. Palacios-Espinosa, F., Deciga-Campos, M., Mata, R., **2008**. Antinociceptive, hypoglycemic and spasmolytic effects of *Brickellia veronicifolia*. *J. Ethnopharmacol.* 118, 3, 448-454.

195. Kodpinid, M., Sadavongvivad, C., Thebtaranonth, C., Thebtaranonth, Y., **1984**. Benzyl benzoates from the root of *Uvaria purpurea*. *Phytochemistry* 23, 1, 199-200.
196. Choi, S. Z., Choi, S. U., Bae, S. Y., Pyo, S., Lee, K. R., **2005**. Immunobiological activity of a new benzyl benzoate from the aerial parts of *Solidago virga-aurea* var. *gigantea*. *Arch. Pharmacol Res.* 28, 1, 49-54.
197. Sova, M., **2012**. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. *Mini-Rev. Med. Chem.* 12, 8, 749-767.
198. The Pherobase - Database of pheromones and semiochemicals, **2003**. <http://www.pherobase.com/>, consulté le: 12 décembre 2012.
199. The good scents compagny, **1980**. <http://www.thegoodscentcompany.com/index.html>, consulté le: 12 décembre 2012.
200. Armarego, W. L. F., Perrin, D. D., **1997**. Purification of laboratory chemicals, 4th edition. Butterworth-Heinemann, Oxford.
201. Wieczorek, A. M., Geber, M. A., **2002**. Microsatellite *loci* for studies of population differentiation and range expansion in *Solidago sempervirens* L. (*Asteraceae*). *Mol. Ecol. Notes* 2, 4, 554-556.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Laurençon, L., Sarrazin, E., Chevalier, M., Prêcheur, I., Herbette, G., Fernandez, X., **2013**. Triterpenoid saponins from the aerial parts of *Solidago virgaurea alpestris* with inhibiting activity of *Candida albicans* yeast-hyphal conversion. *Phytochemistry* 86, 103-111.

Prêcheur, I., Laurençon, L., Chevalier, M., **2012**. Syndrome de Gougerot-Sjogren : atteinte buccale. *Ressources de l'association française de Gougerot-Sjogren*, 81, 4-9.

Prêcheur, I., Sakarovitch, C., Laurençon, L., Ruymi, R., Collomp, R., Brocker, P., Helou, C., Pouysségur-Rougier, V. Impact of antiseptic mouthwashes on dry mouth complaint. *Submitted*

Laurençon, L., Sarrazin, E., Chevalier, M., Prêcheur, I., Fernandez, X., 12-15 Juin **2011**. Anti-fungal triterpenoid saponins from the aerial parts of *Solidago virgaurea ssp. alpestris*. Trends in Natural Products Research: a PSE Young Scientists' Meeting, OP 16, Kolymvari, Crète.

Laurençon, L., Sarrazin, E., Chevalier, M., Prêcheur, I., Fernandez, X., 6-8 Septembre **2011**. Etude phytochimique de *Solidago virgaurea* L. pour le développement d'un bain de bouche contre la sécheresse buccale. 30^e Journées Internationales Huiles Essentielles et Extraits, Digne les Bains, France. - 1^e prix poster -