



**HAL**  
open science

# Recherche et développement d'ingrédients cosmétiques innovants favorisant la réparation cutanée à partir de matières premières naturelles d'origine méditerranéenne

Hortense Plainfossé

## ► To cite this version:

Hortense Plainfossé. Recherche et développement d'ingrédients cosmétiques innovants favorisant la réparation cutanée à partir de matières premières naturelles d'origine méditerranéenne. Chimie analytique. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2019. Français. NNT : 2019AZUR4102 . tel-02879832

**HAL Id: tel-02879832**

**<https://theses.hal.science/tel-02879832>**

Submitted on 24 Jun 2020

**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.



$$\rho \left( \frac{\partial v}{\partial t} + v \cdot \nabla v \right) = -\nabla p + \nabla \cdot T + f$$

$$e^{i\pi} + 1 = 0$$

# THÈSE DE DOCTORAT

Recherche et développement  
d'ingrédients cosmétiques innovants  
favorisant la réparation cutanée à partir  
de matières premières naturelles  
d'origine méditerranéenne

**Hortense PLAINFOSSE**

Institut de Chimie de Nice, UMR 7272

**Présentée en vue de l'obtention  
du grade de docteur** en chimie  
d'Université Côte d'Azur

**Dirigée par** : Pr Xavier Fernandez

**Soutenue le** : 18 décembre 2019

**Devant le jury, composé de :**

Anne Landreau, MCF HDR, Université d'Angers

Emilie Destandau, Professeur, Université d'Orléans

Grégory Verger-Dubois, PDG Laboratoires JYTA

Nicolas Fabre, Professeur, Université Toulouse III

Stéphane Azoulay, MCF HDR, Université Côte d'Azur

Xavier Fernandez, Professeur, Université Côte d'Azur



# Recherche et développement d'ingrédients cosmétiques innovants favorisant la réparation cutanée à partir de matières premières naturelles d'origine méditerranéenne

Jury :

Président du jury

Nicolas Fabre, Professeur, Université Toulouse III

Rapporteurs

Emilie Destandau, Professeur, Université d'Orléans

Nicolas Fabre, Professeur, Université Toulouse III

Examineurs

Anne Landreau, Maître de conférences HDR, Université d'Angers

Stéphane Azoulay, Maître de conférences HDR, Université Côte d'Azur

Xavier Fernandez, Professeur, Université Côte d'Azur

Invité

Grégory Verger-Dubois, PDG Laboratoires JYTA

## Résumé

Le secteur cosmétique est gouverné par les demandes des consommateurs en quête de produits naturels à l'efficacité démontrée, auxquelles les formulateurs répondent en y intégrant des actifs naturels et éco-conçus. Ces travaux de thèse portent sur le développement de tels actifs cosmétiques innovants favorisant la réparation cutanée à partir de matières premières naturelles d'origine méditerranéenne.

Les activités biologiques d'une centaine d'extraits naturels obtenus à partir de 77 matières végétales ont été évaluées à l'aide de tests *in vitro* (activités antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-âge - activités anti-hyaluronidase, anti-collagénase et anti-élastase-). Un total de 28 matières premières végétales se sont avérées particulièrement intéressantes en termes d'activités biologiques parmi lesquelles trois ont été sélectionnées pour la poursuite de cette étude. La germandrée lisse (*Teucrium lucidum* L.) a été choisie car il s'agit d'une plante endémique de la région méditerranéenne très peu étudiée. Le chêne pubescent (*Quercus pubescens* Willd.) et le prunier de Brignoles (*Prunus domestica* L.) ont été sélectionnés car il s'agit de co-produits de l'agriculture régionale, qu'il est par conséquent très intéressant de valoriser.

Cette étude a porté principalement sur la caractérisation phytochimique d'extraits de germandrée lisse obtenus par macération des parties aériennes, et favorisant la réparation cutanée. Huit composés principaux ont été isolés puis identifiés par RMN ; seuls trois d'entre eux avaient déjà été décrits dans le genre *Teucrium*. Cinq autres composés qui n'avaient pas été décrits précédemment dans *T. lucidum* ont également été caractérisés.

Cette étude a aussi permis de mettre en place une méthodologie de développement d'ingrédients cosmétiques naturels liquides et solides, de l'approvisionnement en matière première végétale, jusqu'à leur intégration dans un produit cosmétique fini. Cette méthodologie a été mise en place à travers l'étude des deux co-produits sélectionnés lors du criblage, à savoir le chêne pubescent et le prunier de Brignoles, et a permis d'identifier les étapes à adapter d'une matière première à l'autre, selon sa composition phytochimique.

**Mots clés** : ingrédients cosmétiques, matières premières naturelles, réparation cutanée, caractérisation phytochimique, *Teucrium lucidum* L.

## Abstract

The cosmetic industry is governed by consumers' expectations for natural products with proven efficacy, to which formulators reply by the integration of natural and eco-designed actives in those products. This PhD work focussed on the development of such innovative cosmetic actives favouring wound healing from Mediterranean plant materials.

The biological activities of a hundred natural extracts from 77 raw materials were screened using *in vitro* assays (antioxidant, anti-inflammatory and anti-age -anti-hyaluronidase, anti-collagenase and anti-elastase activities-activities). Among them, a total of 28 plants turned out to be especially interesting, and three were selected in this work frame. The germander (*Teucrium lucidum* L.) was selected because its Mediterranean endemicity, and as its phytochemistry was only cursorily studied. The downy oak (*Quercus pubescens* Willd.) and the Brignoles plum tree (*Prunus domestica* L.) were selected because they are regional agricultural by-products, which are therefore very interesting to valorise.

This study focussed on the phytochemical characterization of germander extracts obtained by maceration of aerial parts of germander and promote wound healing. Eight main compounds were isolated and identified by NMR; only three of them were previously described in the *Teucrium* gender. Further five compounds were also characterized; none of them has previously been described in *T. lucidum*.

Furthermore, the study consisted in the design of the methodology of development of liquid and solid natural cosmetic ingredients, from the supply of raw materials to the ingredients' integration in finished cosmetic products. This methodology was illustrated by the study of the two agricultural by-products selected beforehand, namely the downy oak and the Brignoles plum tree. It allowed to identify the steps to adapt to each plant material according to its phytochemical composition.

**Keyword**: cosmetic ingredients, natural raw materials, wound healing, phytochemical characterization, *Teucrium lucidum* L.

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Mme Emilie Destandau, professeure à l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) de l'Université d'Orléans et Mr Nicolas Fabre, professeur au Laboratoire de Pharmacochimie et Biologie pour le Développement (PHARMA-DEV) de l'Université Toulouse III d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Je remercie également Dr Anne Landreau et Dr Stéphane Azoulay de l'Institut de Chimie de Nice d'Université Côte d'Azur d'avoir accepté d'être examinateurs de ce travail.

Je tiens également à remercier tout particulièrement mon directeur de thèse, le professeur Xavier Fernandez, de m'avoir encadrée tout au long de ces trois années. Je le remercie pour ses conseils avisés et toutes les connaissances qu'il a partagées avec moi. Il a toujours veillé à me pousser dans mes retranchements, afin de développer mon esprit critique dans le domaine scientifique et de toujours m'améliorer.

Je tiens à remercier Grégory Verger-Dubois pour avoir financé ma thèse et m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet. Je souhaite également remercier toute l'équipe du groupe Verger-Dubois pour leur aide tout au long de ces trois années.

Je leur adresse à tous les deux des remerciements pour la liberté et les opportunités qu'ils m'ont offertes lors de mon doctorat. Je les remercie également pour la confiance qu'ils m'ont témoignée et le soutien qu'ils m'ont apporté lors de la création de NissActive, moins d'un an après mon arrivée au laboratoire. Cette belle aventure, bien que légèrement culottée, et que beaucoup qualifient de suicidaire, a été une source de motivation inépuisable au quotidien, et m'a poussée à m'investir tous les jours un peu plus dans ce doctorat. Je les remercie de m'avoir incitée à participer à différents concours de jeunes entrepreneurs, et à défendre notre projet aux quatre coins de la France. Même si cela m'a demandé une énergie folle, j'ai appris à me dépasser et à convaincre tout type de jury de la viabilité de notre concept. La complémentarité de toutes ces aventures vécues au cours de ces trois années, m'a permis d'évoluer et de me confronter aux attentes et exigences du monde professionnel, aussi bien dans le domaine de la recherche académique que dans le secteur entrepreneurial.

Je tiens à remercier le Dr Stéphane Azoulay et toute l'équipe Molécules Bioactives de l'ICN de m'avoir permis de réaliser les tests d'activités biologiques au sein de leur laboratoire. Je remercie également le Dr Gaëtan Herbette (Spectropole – Fédération Sciences Chimiques, Université Aix-Marseille) pour son aide et ses conseils avisés, ainsi que le Dr Samuel Bertrand (UFR des sciences pharmaceutiques et biologiques, Université de Nantes) qui m'a initiée à la dérégulation.

J'aimerais remercier tous les partenaires du groupe MVBV et de NissActive pour avoir mis à ma disposition le matériel végétal nécessaire à cette étude. Je remercie tout particulièrement l'association BIOPHYTO, l'association « La Prune de Brignoles », la société GMR, ainsi que l'équipe de jardiniers de Valrose pour avoir toujours répondu à mes requêtes.

Je tiens aussi à remercier le Pr Uwe Meierhenrich, tous les membres de l'Institut de Chimie de Nice, et d'Université Côte d'Azur pour le soutien qu'ils m'ont témoigné dans le projet NissActive. J'espère que nos collaborations perdureront encore de nombreuses années.

Je remercie également tous les membres du groupe MVBV pour tous nos échanges pendant ces 3 années. Je ne pourrais commencer sans remercier Popop, sans qui cette aventure n'aurait pas été possible : à mes côtés depuis le début de cette thèse, elle a rejoint l'aventure NissActive dès sa création. Je te remercie sincèrement pour ton aide précieuse, ton implication et surtout tes grandes qualités rédactionnelles (La rousse !). Tu as su jouer tous les rôles nécessaires pour m'aider à mener de front ces deux projets, que ce soit professionnellement ou personnellement avec ton esprit maternel. Je n'oublierais pas nos discussions (très) matinales, nos pauses café-chocolat, nos nombreuses soirées mondaines, notre voyage à Athènes (et j'en passe), qui ont fait de ces trois années, un plaisir quotidien, et qui je l'espère de tout cœur, se poursuivront dans cette même convivialité.

J'aimerais également remercier Manon, qui, arrivée lors de ma période de rédaction, et donc de doutes, a su m'apporter cette touche de légèreté. J'ai apprécié tous nos échanges, au laboratoire, ou non, d'une délicatesse à notre image, mais toujours très attentionnés.

Je voudrais également remercier mon « petit rayon de soleil », Maïlys, pour son implication, son innocence et surtout ses talents de pâtissière. Nos qualités de bricoleuses ont été mises à rude épreuve, mais ensemble, nous avons toujours su trouver la solution. Toutes les aventures avec la team NissActive (Maïlys, Manon et Pauline) ont été synonymes de rires et de plaisirs (surtout culinaires).

Je tiens également à remercier Casalou et Thomas Michel pour nos échanges sportifs et musclés, que ce soit au body barre ou sur la piste d'athlétisme.

Je voudrais remercier Anne et Papaye, ainsi que tous les doctorants de l'équipe MVBV, avec une mention spéciale à tous les Grassois du défouloir (Camille, Valentin, Mélissa et Mélissa). Vos histoires, toujours plus folles, ont fait de chaque journée à Grasse des moments inoubliables, toujours riches en rebondissements.

Je voudrais également remercier tous les étudiants, doctorants, post-doctorants de l'Institut, notamment Lorenzo pour nos petits échanges de bons procédés, ainsi que Céline et Chloé, pour leur bonne humeur et leur soutien. Je remercie aussi Najiba, pour m'avoir familiarisée avec le fonctionnement du laboratoire dès mon arrivée, pour ses petits regards subtils et surtout ses blagues d'une légèreté indéniable. Je ne pourrais oublier de remercier Maryne et ses délicieux pancakes à la banane.

J'aimerais remercier le club du CAVIGAL, où j'ai pu relâcher la pression lors d'innombrables tours de piste, avec une mention spéciale à Sandra pour nos sorties randonnées, et toutes les soirées sponsorisées par la Fourchette.

Je remercie également Mathilde, pour m'avoir fait découvrir le monde de la recherche universitaire au pays des Kiwis, et surtout ses paysages. Je voudrais remercier Karine et

Julien, pour m'avoir fait découvrir et prendre goût au domaine des extraits naturels, que ce soit des plantes alpines ou méditerranéennes.

Je remercie également mi hermano, Pablo, pour ces trois années de colocation, toujours plus riches en émotions. Chaque jour avec toi était composé de hasard, mais tu as toujours été là pour moi et as su m'écouter quand j'en avais besoin.

Je souhaiterais remercier chaleureusement mes petits JACTA, Tanguy, Sylvain, Léo, William, Yvan, Camille, Poli, pour nos aventures aux quatre coins du monde (Montréal, Tunis, Bruxelles, Samadet et Pomarez). Les nombreux week-ends passés ensemble, dans toutes les régions de France ont toujours été synonymes de rires et de découvertes, même si depuis 6 ans maintenant, nos activités et nos grands débats ont bien évolués. Je tiens surtout à remercier mes hôtes parisiens, pour m'avoir accueillie dans leur palace idéalement localisé pour un petit départ très matinal direction Orly.

Je remercie aussi Robin, pour son soutien au quotidien depuis maintenant 5 ans. Même depuis la région champenoise, tu as toujours cru en mes capacités et tu as su être là pour m'encourager et me suivre dans mes projets. Tous ces moments avec toi, synonymes de simplicité, m'ont permis de me ressourcer, et m'ont donné la force et la motivation de m'investir pleinement dans cette aventure, pour te rendre toujours plus fier.

Pour terminer, je voudrais remercier ma sœur jumelle Emma et mes deux petits frères Camille et Cassandra, et surtout mes parents qui ont toujours cru en moi. Si j'en suis arrivée là aujourd'hui, c'est grâce à vous et à votre soutien. Même si le kouign amann et la douceur du Gage Cleuz m'ont parfois manqué durant ces trois années, vous avez réussi à les faire voyager avec vous lors de vos nombreuses visites. Je vous dédie cette thèse, et tout mon parcours, car sans vous, rien de tout cela n'aurait été possible.

# Table des matières

Résumé .....	2
Abstract.....	2
Remerciements .....	3
Abréviations .....	11
Glossaire.....	15
Introduction générale.....	17
Chapitre 1 - Rappels bibliographiques .....	21
1.1. Les cosmétiques.....	22
1.1.1. Définition.....	22
1.1.2. Règlementation.....	23
1.1.3. Le marché des cosmétiques.....	24
1.1.4. Produits dermocosmétiques .....	26
1.2. La réparation cutanée.....	27
1.2.1. Structure de la peau .....	27
1.2.2. Mécanisme de la réparation cutanée .....	30
1.2.2.1. Phase inflammatoire .....	30
1.2.2.2. Phase proliférative .....	32
1.2.2.3. Phase de remodelage.....	34
1.2.2.4. Facteurs influençant la réparation cutanée .....	34
1.3. Actifs cosmétiques.....	36
1.3.1. Définition.....	36
1.3.2. Actifs naturels .....	36
1.3.2.1. Matières premières .....	36
1.3.2.2. Huiles essentielles .....	37
1.3.2.3. Huiles végétales .....	38
1.3.2.4. Extraits naturels .....	40
1.3.2.4.1. Méthodes d'obtention .....	40
A. Méthodes classiques .....	40
B. Techniques d'éco-extraction.....	41
1.3.2.4.2. Techniques de séparation et de concentration .....	43
1.3.2.4.3. Formulabilité des extraits.....	44
1.3.2.4.4. Méthodes d'analyse.....	46
A. Chromatographie liquide haute performance .....	47
B. Chromatographie gazeuse .....	48
C. Chromatographie sur couche mince à haute performance .....	49
D. Autres techniques chromatographiques .....	50
1.3.2.4.5. Techniques de séparation et d'isolement.....	51
1.3.2.4.6. Techniques de caractérisation structurale.....	54
1.3.2.4.7. Evaluation des activités biologiques.....	56
A. Activité antioxydante.....	56

B. Activité blanchissante .....	57
C. Activité anti-élastase.....	59
D. Activité anti-inflammatoire .....	59
E. Activité anti-collagénase.....	60
F. Activité anti-hyaluronidase.....	60
1.3.2.4.8. Extraits naturels favorisant la réparation cutanée .....	61
Chapitre 2 - Criblage de matières premières d'intérêt pour le développement d'ingrédients cosmétiques naturels favorisant la réparation cutanée .....	65
2.1. Provenance des matières premières.....	66
2.2. Extraction des matières premières végétales .....	67
2.3. Evaluation des activités biologiques des extraits .....	72
2.4. Sélection des matières premières d'intérêt .....	76
Chapitre 3 - Etude phytochimique et caractérisation de l'extrait de <i>Teucrium lucidum</i> L. ....	81
3.1. Etude bibliographique sur <i>Teucrium lucidum</i> L. ....	82
3.1.1. Origine et description botanique.....	82
3.1.2. Utilisation traditionnelle et toxicité .....	83
3.1.3. Phytochimie et activités biologiques de l'extrait de germandrée.....	84
3.2. Etude phytochimique de la germandrée.....	85
3.2.1. Etude de l'extrait TL_EtOH.....	85
3.2.1.1. Profil phytochimique .....	85
3.2.1.2. Fractionnement bioguidé de l'extrait TL_EtOH .....	86
3.2.2. Etude de l'extrait TL_ha.....	88
3.2.2.1. Conditions d'extraction .....	88
3.2.2.1. Etude comparative avec l'extrait TL_EtOH.....	90
3.2.2.2. Caractérisation phytochimique de l'extrait TL_ha .....	90
3.2.2.2.1. Caractérisation par HPTLC .....	91
A. Caractérisation des acides aminés.....	91
B. Caractérisation des glucides .....	93
C. Caractérisation des polyphénols et des flavonoïdes .....	95
D. Caractérisation des composés peu polaires .....	96
E. Caractérisation des proanthocyanidines, alcaloïdes et anthocyanes .....	96
3.2.2.2.2. Caractérisation par GC-MS et GC/FID.....	97
3.2.2.3. Caractérisation des groupes de composés A et B .....	98
3.2.2.3.1. Séparation des groupes de composés A et B .....	98
A. Séparation par extraction liquide-liquide .....	99
B. Séparation par extraction sur phase solide .....	101
C. Séparation par HPLC semi-préparative.....	106
3.2.2.4. Fractionnement bioguidé de l'extrait TL_ha .....	109
3.2.2.4.1. Etude de la fraction TL_ha_F3 .....	112
A. Caractérisation phytochimique par HPTLC, GC-MS, GC/FID et HPLC-DAD/DEDL .....	112
B. Etude de déréplication par UFLC-HRMS/MS.....	114
C. Isolement et caractérisation des composés majoritaires de la fraction TL_ha_F3 .....	131
3.2.2.4.2. Etude de la fraction TL_ha_F4 .....	138

A.	Caractérisation phytochimique par HPTLC, GC-MS, GC/FID et HPLC-DAD/DEDL	138
B.	Etude de la fraction TL_ha_F4 par déréplication .....	140
C.	Isolement et caractérisation du composé majoritaire de la fraction TL_ha_F4.....	143
3.2.2.4.3.	Etude de la fraction TL_ha_F6 .....	146
A.	Caractérisation phytochimique par HPTLC, GC-MS, GC/FID et HPLC-DAD/DEDL	146
B.	Etude de la fraction TL_ha_F6 par déréplication .....	149
C.	Isolement et caractérisation des composés majoritaires de la fraction TL_ha_F6 .	153
3.2.2.4.4.	Etude de la fraction TL_ha_F1 .....	172
3.2.2.4.5.	Etude de la fraction TL_ha_F2 .....	173
3.2.2.4.6.	Etude des fractions TL_ha_F5 et TL_ha_F7 .....	176
Conclusion	.....	183
Chapitre 4 - Méthodologie de développement d'un ingrédient cosmétique à partir de matière première naturelle	.....	187
4.1.	Méthodologie de développement .....	189
4.1.1.	Description des principales étapes du développement.....	189
4.1.1.1.	Caractérisation phytochimique de l'extrait sec et étude des activités biologiques	189
4.1.1.2.	Optimisation des conditions d'extraction .....	190
4.1.1.2.1.	Influence des paramètres d'extraction.....	190
4.1.1.2.2.	Développement d'un extrait liquide .....	191
4.1.1.3.	Etude de formulabilité .....	192
4.1.1.3.1.	Décoloration de l'extrait .....	192
4.1.1.4.	Mise sur support solide.....	193
4.1.1.5.	Etude de stabilité .....	194
4.1.1.6.	Etude de toxicité .....	194
4.1.1.7.	Estimation du prix de revient de l'ingrédient.....	195
4.1.1.8.	Objectivation et formulation de l'ingrédient dans un produit cosmétique fini .....	196
4.2.	Développement d'ingrédients à partir des parties aériennes de <i>Quercus pubescens</i> Willd.	196
4.2.1.	Choix de la matière première .....	196
4.2.2.	Caractérisation phytochimique de l'extrait de chêne.....	198
4.2.2.1.	Profil phytochimique et activités biologiques .....	198
4.2.2.2.	Caractérisation de l'extrait QP1_ha.....	201
4.2.2.3.	Isolement des groupes de composés A et B .....	203
4.2.2.4.	Fractionnement bioguidé de l'extrait QP1_ha .....	206
4.2.2.4.1.	Caractérisation phytochimique des fractions QP1_ha_F2 et QP1_ha_F3.....	208
4.2.2.4.2.	Caractérisation phytochimique des fractions QP1_ha_F4 et QP1_ha_F5.....	212
4.2.2.5.	Optimisation des conditions d'extraction .....	216
4.2.2.6.	Développement d'un extrait liquide .....	221
4.2.2.6.1.	Extraction au propylène glycol.....	221
4.2.2.6.2.	Optimisation des conditions d'extraction .....	226
4.2.2.6.3.	Extraction avec d'autres solvants .....	229
4.2.2.7.	Etude de formulabilité : décoloration de l'ingrédient liquide .....	231
4.2.2.8.	Mise sur support de l'extrait sec par atomisation .....	233
4.2.2.9.	Etude de stabilité de l'ingrédient liquide .....	235

4.2.2.10.	Etude de toxicité de l'ingrédient liquide .....	237
4.3.	Développement d'ingrédients à partir des feuilles de <i>Prunus domestica</i> L. ....	238
4.3.1.	Choix de la matière première .....	238
4.3.2.	Caractérisation phytochimique de l'extrait de prunier .....	241
4.3.2.1.	Profil phytochimique et activités biologiques .....	241
4.3.2.2.	Caractérisation de l'extrait PD_EtOH .....	242
4.3.2.3.	Fractionnement bioguidé de l'extrait PD_EtOH.....	247
4.3.2.3.1.	Caractérisation de la fraction PD_EtOH_F1 .....	248
4.3.2.3.2.	Caractérisation de la fraction PD_EtOH_F2.....	249
4.3.2.3.3.	Caractérisation de la fraction PD_EtOH_F3.....	250
4.3.2.3.4.	Caractérisation de la fraction PD_EtOH_F4.....	254
4.3.2.3.5.	Caractérisation des fractions PD_EtOH_F5 et PD_EtOH_F6.....	256
4.3.2.4.	Influence de l'année de récolte.....	260
4.3.2.5.	Optimisation des conditions d'extraction .....	262
4.3.2.5.1.	Influence des conditions d'extraction.....	262
4.3.2.5.2.	Double extraction des feuilles de prunier .....	267
4.3.2.6.	Développement d'un extrait liquide .....	270
4.3.2.6.1.	Extraction au propylène glycol.....	270
4.3.2.6.2.	Optimisation des conditions d'extraction .....	272
4.3.2.6.3.	Extraction avec d'autres solvants .....	275
4.3.2.7.	Etude de formulabilité : décoloration sur charbon actif .....	276
4.3.2.7.1.	Décoloration de l'extrait éthanolique .....	276
4.3.2.7.2.	Décoloration de l'extrait liquide.....	279
4.3.2.8.	Etudes de stabilité et de toxicité .....	281
Chapitre 5 - Matériels et méthodes .....		285
5.1.	Matériel végétal, extraction et traitement des extraits .....	286
5.1.1.	Collecte et identification du matériel végétal .....	286
5.1.2.	Extraction.....	286
5.1.2.1.	Extraction à l'aide d'un mélange hydroalcoolique .....	287
5.1.2.2.	Extraction accélérée par solvant .....	287
5.1.2.3.	Extraction au propylène glycol.....	287
5.1.2.4.	Extraction activée par ultra-sons .....	290
5.1.3.	Décoloration des extraits .....	290
5.1.4.	Atomisation des extraits secs .....	291
5.2.	Méthodes de chromatographie.....	291
5.2.1.	Chromatographie liquide haute performance .....	291
5.2.1.1.	Conditions d'analyses.....	291
5.2.1.2.	Dosage des composés identifiés par HPLC .....	292
5.2.1.3.	Séparation par HPLC semi-préparative.....	292
5.2.2.	Chromatographie sur couche mince de haute performance .....	293
5.2.3.	Chromatographie en phase gazeuse .....	294
5.2.3.1.	Analyses par GC-MS .....	294

5.2.3.2.	Analyses par GC/FID .....	296
5.3.	Techniques de séparation et/ou d'isolement.....	296
5.3.1.	Séparation sur colonne ouverte de silice .....	296
5.3.2.	Extraction liquide-liquide.....	297
5.3.3.	Extraction sur phase solide .....	297
5.3.3.1.	Séparation de l'extrait TL_ha.....	297
5.3.3.2.	Concentration des extraits liquides.....	298
5.4.	Techniques de caractérisation.....	298
5.4.1.	Spectrométrie de masse.....	298
5.4.1.1.	Analyses par HPLC-HRMS.....	298
5.4.1.2.	Analyses par HPLC-ESI-MS.....	300
5.4.2.	Résonnance magnétique nucléaire .....	300
5.4.3.	Colorimétrie .....	301
5.4.4.	Mesure du taux d'humidité des poudres .....	301
5.5.	Tests d'activité biologique .....	302
Conclusions et perspectives.....		305
Annexes.....		311
Annexe 1 - Etude de déréplication de la fraction TL_ha_F4 .....		312
Annexe 2 - Etude de déréplication de la fraction TL_ha_F6 .....		314
Références bibliographiques .....		317

## Abréviations

<b>Acronyme</b>	<b>Signification</b>
α-MSH	Hormone mélanotrope <i>alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone</i>
ABTS	Acide 2,2'-azino-bis(3-éthyl-benzothiazoline-6-sulfonique) <i>2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)</i>
ACN	Acétonitrile <i>Acetronitrile</i>
ADP	Adénosine DiPhosphate <i>Adenosine diphosphate</i>
AFNOR	Association Française de NORmalisation
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
ARPP	Autorité de Régulation Professionnelle de la Publicité
ASE	Extraction accélérée par solvant <i>Accelerated Solvent Extraction</i>
AU	Unité arbitraire <i>Arbitrary Unit</i>
BDIH	Association fédérale des sociétés industrielles et commerciales <i>Bundesverband Der Industrie- und Handelsunternehmen</i>
BPF	Bonnes Pratiques de Fabrication
BSA	Albumine sérique bovine <i>Bovin Serum Albumin</i>
CA	Charbon actif <i>Activated carbon</i>
CCM	Chromatographie sur Couche Mince <i>Thin-layer chromatography</i>
CDB	Convention sur la Diversité Biologique <i>Convention on biological diversity</i>
CE	Communauté Européenne <i>European community</i>
CEE	Communauté Économique Européenne <i>European economic community</i>
CFM-ID	<i>Competitive Fragmentation Modeling for metabolite IDentification</i>
CI <sub>50</sub>	Concentration Inhibitrice médiane <i>Half maximal inhibitory concentration</i>
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone <i>Carbon dioxide</i>
COSY	Spectroscopie de corrélation <i>COrrelation SpectroscopY</i>
CPC	Chromatographie de Partage Centrifuge <i>Centrifugal partition chromatography</i>
CPME	Méthoxycyclopentane <i>CycloPentyl Methyl Ether</i>
CSP	Code de la Santé Publique
CSSC	Comité Scientifique pour la Sécurité des Consommateurs <i>Scientific committee on consumer safety</i>
CTAB	Bromure de cétyltriméthylammonium <i>CetylTrimethylAmmonium Bromide</i>
D	Deutérium <i>Deuterium</i>
DAD	Détecteur à barrette de diodes <i>Diode Array Detection</i>
DAPA	Diphénylamine - aniline - acide phosphorique <i>Diphenylamine - Aniline - Phosphoric Acid</i>
DCM	Dichlorométhane <i>Dichloromethane</i>

DEDL	Détecteur Evaporatif par Diffusion de Lumière <i>Evaporative light scattering detector</i>
DL <sub>50</sub>	Dose Létale médiane <i>Median lethal dose</i>
DMSO	DiMéthylSulfOxide <i>Dimethylsulfoxide</i>
DNP	Dictionnaire des produits naturels <i>Dictionary of Natural Products</i>
DOPA	L-DOPA
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle <i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>
EGCG	EpiGalloCatéchine Gallate <i>Epigallocatechin gallate</i>
EL	Extrait liquide
ELL	Extraction liquide-liquide
eNOS	Oxyde nitrique synthase endothéliale <i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
ES-ASE	Extrait sec - Extraction accélérée par solvant
ESI	Ionisation par electrospray <i>ElectroSpray Ionization</i>
ES-M	Extrait sec - Macération
ES-SX	Extrait sec - Soxhlet
EtOAc	Acétate d'éthyle <i>Ethyl acetate</i>
EtOH	Ethanol <i>Ethanol</i>
eV	Electronvolt <i>Electronvolt</i>
FALGPA	2-furanacryloyl-L-leucylglycyl-L-prolyl-L-alanine <i>2-furanacryloyl-L-leucylglycyl-L-prolyl-L-alanine</i>
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux <i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes <i>Fibroblast Growth Factor</i>
FID	Détecteur à ionisation de flamme <i>Flame Ionization Detector</i>
FRAP	Test de la réduction du fer <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier <i>Fourier Transform InfraRed spectroscopy</i>
GC	Chromatographie en phase gazeuse <i>Gas Chromatography</i>
ha	Hydroalcoolique
HILIC	Chromatographie d'interaction hydrophile <i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HPTLC	Chromatographie sur couche mince à haute performante <i>High Performance Thin Layer Chromatography</i>
HRESIMS (IT-TOFMS)	<i>High Resolution ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry combining Ion Trap and Time Of Flight analyzers</i>
HRMS	Spectrométrie de masse haute performance <i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
ICN	Institut de Chimie de Nice
IL	Interleukine <i>Interleukin</i>

INCI	Nomenclature internationale des ingrédients cosmétiques <i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredients</i>
ISO	Organisation internationale de normalisation <i>International Organization for Standardization</i>
KGF	Facteur de croissance des kératinocytes <i>Keratinocyte Growth Factor</i>
L-DOPA	3,4-dihydroxyphénylalanine <i>L-3,4-dihydroxyphenylalanine</i>
MEC	Matrice ExtraCellulaire <i>Extracellular matrix</i>
MeOH	Méthanol <i>Methanol</i>
MMP	Métalloprotéase matricielle <i>Matrix MetalloProteinase</i>
MS	Spectrométrie de masse <i>Mass Spectrometry</i>
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
MVBV	Métabolome et Valorisation de la Biodiversité Végétale
NaOH	Soude <i>Sodium hydroxide</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
NRU	Test de fixation du rouge neutre <i>Neutral Red Uptake</i>
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economiques <i>Organisation for economic co-operation and development</i>
ORAC	Capacité d'absorption des radicaux oxygénés <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
PA	Parties aériennes <i>Aerial parts</i>
PD	<i>Prunus domestica L.</i>
PEG	Polyéthylène glycol <i>PolyEthylene Glycol</i>
PG	Propylène Glycol <i>Propylene glycol</i>
PHWE	Extraction à l'eau chaude sous pression <i>Pressurized Hot Water Extraction</i>
PPAM	Plantes à Parfum, Aromatiques et Médicinales
PTFE	PolyTétraFluoroEthylène <i>Polytetrafluoroethylene</i>
QP	<i>Quercus pubescens Willd.</i>
RD	Résidu de distillation <i>Distillation residue</i>
RI	Indice de rétention <i>Retention index</i>
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire <i>Nuclear magnetic resonance</i>
rpm	Tours par minute <i>Round per minute</i>
SGH	Système Général Harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques <i>Globally harmonised system of classification and labelling of chemicals</i>
SIDA	Syndrome d'ImmunoDéfiance Acquise <i>Acquired immune deficiency syndrome</i>
SIRIUS	<i>Sum formula Identification by Ranking Isotope patterns Using mass Spectrometry</i>
SP	Semi-préparative

SPE	Extraction sur phase solide <i>Solid Phase Extraction</i>
Suc-AAA-pNA	N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide <i>N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide</i>
TCAC	Taux de Croissance Annuel Composé <i>Compound annual growth rate</i>
TGF	Facteur de croissance transformant <i>Transforming Growth Factor</i>
TIMP	Inhibiteur tissulaire de métalloprotéases <i>Tissue Inhibitor of MetalloProteinase</i>
TL	<i>Teucrium lucidum L.</i>
TMSP	Acide TriMéthylSilylPropanoïque <i>Trimethylsilylpropanoic acid</i>
TNF	Facteur de nécrose tumorale <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TR	Temps de rétention <i>Retention time</i>
Tyr	L-tyrosine
u.m.a.	Unité de masse atomique <i>Atomic mass unit</i>
UAE	Extraction assistée par ultra-sons <i>Ultrasound Assisted Extraction</i>
UE	Union Européenne <i>European union</i>
UFLC	Chromatographie liquide ultra rapide <i>Ultra Fast Liquid Chromatography</i>
UPLC	Chromatographie en phase liquide à très haute performance <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UV	Ultraviolet <i>Ultraviolet</i>
V	Volt <i>Volt</i>
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
W	Tungstène <i>Tungsten</i>

Cellules grisées : abréviations définies spécifiquement dans le cadre de cette étude

## Glossaire

**Adipocyte** : cellule de l'organisme responsable du stockage de la graisse et réserve d'énergie.

**Angiogenèse** : processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux existants.

**Angiopoïétine** : facteur de croissance favorisant l'angiogenèse.

**Cellule de Langerhans** : cellule présentatrice d'antigène du tissu cutané assurant la défense contre les microorganismes par activation du système immunitaire.

**Cellule de Merkel** : cellule du système neuro-endocrinien localisée dans la couche basale de l'épiderme et spécialisée dans la perception du toucher.

**Cespiteux** : qui pousse en touffe compacte.

**Chimiotactique** : effet d'attraction ou de répulsion exercé par certaines substances sur une cellule vivante pouvant se rapprocher ou s'éloigner du point de diffusion de cette substance.

**Cornéocyte** : cellule biologiquement morte, dépourvue de noyau, qui correspond à l'état de différenciation terminale des kératinocytes.

**Duramen** : partie interne du bois (cœur).

**Entraînement à la vapeur d'eau** : technique d'obtention d'huile essentielle par mise en contact du matériel végétal avec la vapeur d'eau, sans macération. Les vapeurs obtenues, constituées d'eau et d'huile essentielle, sont refroidies, puis condensées. L'eau et les huiles essentielles sont séparées par décantation selon leurs densités.

**ex vivo** : qualifie les tests réalisés en dehors d'un organisme vivant, sur tissu ou culture cellulaire.

**Expression à froid** : procédé mécanique d'extraction sans chauffage d'huiles essentielles d'agrumes.

**Facteur de croissance transformant** : contrôle la prolifération, la différenciation cellulaire, et d'autres fonctions dans la plupart des cellules.

**Fibrine** : protéine filamenteuse fabriquée par le foie et intervenant dans le mécanisme de coagulation.

**Fibroblaste** : cellule du tissu conjonctif qui sécrète les composés de la matrice extracellulaire et les protéines du tissu conjonctif.

**Fibronectine** : glycoprotéine de la matrice extracellulaire qui sert de guide pour la migration des fibroblastes dans le derme.

**Fibrose** : modification de certains tissus caractérisée par un durcissement et une perte d'élasticité.

**Glabrescent** : qui perd ses poils.

**Glycoprotéine** : protéine portant un ou plusieurs groupements oligosides.

**Homéostasie** : phénomène par lequel un facteur est maintenu autour d'une valeur bénéfique afin de favoriser le fonctionnement optimal du système considéré par un phénomène de régulation.

**Hydrodistillation** : technique la plus utilisée pour l'obtention d'huile essentielle. Elle consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau qui est porté à ébullition sous pression atmosphérique.

**in silico** : qualifie les recherches effectuées au moyen de calculs mathématiques informatisés.

**in vitro** : qualifie des observations, recherches et examens réalisés en tubes ou plaques, hors de l'organisme vivant ou de la cellule.

**in vivo** : qualifie un processus biologique observé au sein d'un organisme vivant.

**Interféron** : substance de l'organisme dotée de propriétés antivirales, anticancéreuses et modulatrices du fonctionnement immunitaire.

**Kératinocyte** : cellule constitutive de l'épiderme synthétisant la kératine et participant à la protection de la peau contre les rayons ultraviolets par accumulation de mélanine.

**Lentigo** : petite tache hyperpigmentée sur la peau dont le diamètre varie entre 1 mm et quelques centimètres.

**Leucocyte** : cellule sanguine capable de se rendre dans les différents tissus pour participer aux mécanismes de défense immunitaire (on distingue les granulocytes, les monocytes et les lymphocytes).

**Leucotriène** : famille de molécules dérivées de l'acide arachidonique, appartenant aux prostaglandines, et jouant le rôle de médiateurs de l'inflammation.

**Lymphocyte** : cellule du système immunitaire responsable des réactions de défense de l'organisme contre les substances étrangères.

**Macrophage** : grande cellule ayant la propriété d'intégrer et de détruire les cellules lésées ou vieilles, les particules étrangères, les bactéries, etc. par phagocytose.

**Mastocyte** : cellule du tissu conjonctif qui sécrète des substances chimiques participant aux réactions immunitaires et à la coagulation du sang, et qui est impliquée dans les phénomènes d'allergie.

**Mélanine** : substance pigmentaire présente dans la peau, les cheveux, les poils et l'épithélium pigmentaire de l'iris.

**Mélanocyte** : cellule localisée dans l'épiderme ou le derme et responsable de la pigmentation de la peau par sécrétion de mélanine.

**Mélanosome** : structure intracellulaire spécifique des mélanocytes synthétisant les mélanines.

**Mélasma** : affection de la peau caractérisée par la présence de taches hyperpigmentées. Communément appelé masque de grossesse, il se retrouve particulièrement chez les femmes enceintes en raison de la stimulation de la production de mélanine induite par les œstrogènes.

**Monocyte** : type de leucocyte assurant essentiellement la phagocytose.

**Myofibroblaste** : fibroblaste contractile riche en  $\alpha$ -SMA (angl.  *$\alpha$ -smooth muscle actin*)

**Package R** : collection de fonctions R (langage de programmation) regroupées dans un ensemble.

**Pédologie** : science qui consiste à étudier les caractéristiques et l'évolution des sols.

**Phagocytose** : processus permettant à une cellule d'englober puis de digérer une substance étrangère.

**Radicaux libres** : molécules chimiques instables possédant un électron célibataire lui procurant une grande réactivité vis-à-vis des molécules environnantes.

**Stratum corneum** : encore connu sous le terme de couche cornée, il correspond à la couche cellulaire superficielle de l'épiderme.

---

# Introduction générale

---

Depuis les toutes premières civilisations, l'Homme se préoccupe de son apparence, accordant de l'importance à la beauté de son visage, de ses cheveux ou encore de son corps. Les premiers produits cosmétiques datant de l'Antiquité ont été retrouvés dans les sépultures en Egypte [1] : les Egyptiens se souciant de l'hygiène et de l'apparence, ont été les premiers à utiliser des parfums, puis du maquillage pour le visage. Les Grecs et les Romains utilisaient quant à eux des teintures pour cheveux, des huiles et crèmes parfumées pour le corps, ou encore du maquillage [2]. Au Moyen-Age, s'appuyant sur les savoirs antiques, grecs et arabes, Trota (femme médecin et chirurgien du XI<sup>ème</sup> siècle) décrivait dans son texte *De ornatu mulierum (De l'Ornement des femmes)* des recettes de produits de beauté incluant de nombreuses substances végétales, animales ou minérales, destinés au soin du corps, des cheveux et de la peau [2, 3].

Cet engouement pour les cosmétiques perdure tout au long de l'histoire, et évolue selon les canons de beauté spécifiques à chaque époque et zone géographique. Après la première guerre mondiale, l'essor de l'industrie chimique induit de profonds changements dans le domaine : les avancées de la chimie des solutions, de la chimie des polymères ou encore de la chimie de synthèse permettent le développement de produits cosmétiques et parfumants de plus en plus sophistiqués et perfectionnés. Les nouvelles formules (texture, sensorialité) et l'emploi d'actifs synthétiques apportent des réponses concrètes dans la lutte contre le vieillissement et permettent de masquer et corriger les imperfections de la peau dues au temps (aspect et texture) [1]. Les soins anti-âge connaissent un véritable essor à la fin des années 1980, grâce à l'intégration des notions de biologie cutanée dans les domaines du développement d'actifs cosmétiques et de la formulation. Le maintien d'une bonne hydratation de la peau est dès lors considéré comme le premier geste anti-âge. Les produits cosmétiques de plus en plus variés sont utilisés par toutes les générations car ils apportent aux consommateurs une sensation de bien-être.

Depuis sa création, l'industrie cosmétique se réinvente perpétuellement, selon les exigences des consommateurs, tout en s'adaptant à une réglementation en constante évolution [4]. Depuis quelques années, cette recherche du bien-être grâce à l'utilisation de produits cosmétiques, s'associe petit à petit à un retour au naturel marqué par la volonté des consommateurs d'utiliser des produits plus « verts », puisqu'ils considèrent les produits d'origine synthétique dangereux pour leur santé et l'environnement [5, 6]. Les préoccupations éthiques et environnementales des consommateurs, soucieux de la composition des produits qu'ils utilisent au quotidien, conduisent au développement d'actifs naturels toujours plus innovants [5]. Les consommateurs accordent également une importance croissante à l'efficacité de ces produits : les propriétés de ces derniers se doivent d'être scientifiquement prouvées pour les convaincre, étant donné qu'ils ne se satisfont plus de simples allégations marketing. De très nombreux tests d'efficacité pouvant être réalisés *in vitro*<sup>1</sup>, *ex vivo*<sup>\*</sup> ou encore *in vivo*<sup>\*</sup> ont été développés pour attester de ces activités [7].

---

<sup>1</sup> Les termes suivis d'un astérisque sont définis dans le glossaire p. 13

Au XX<sup>ème</sup> siècle, sont apparus les produits dermocosmétiques, qui se situent à la frontière entre les produits cosmétiques et la dermatologie. S'agissant d'un concept marketing développé par le pharmacien Pierre Fabre, il n'existe aucune définition légale de ces produits dans la réglementation cosmétique. Selon l'inventeur, les dermocosmétiques sont des produits cosmétiques qui répondent, en raison de leur technicité et de leur qualité, à un problème particulier de peau ou de cheveux, tout en préservant leur beauté et leur santé. Ils appartiennent, pour la plupart, à la catégorie des produits de « conseil pharmaceutique » et font parfois l'objet d'une recommandation de la part de médecins [8]. Cible principale de ces produits dermocosmétiques, la réparation cutanée est un processus très complexe qui se met naturellement en place suite à une altération de la structure de la peau. Composée de trois étapes séquentielles, elle fait intervenir de nombreux mécanismes impliquant des enzymes et facteurs de différentes natures. Les produits dermocosmétiques agissent sur ces différents acteurs de la réparation cutanée qui représentent des cibles de choix pour les ingrédients actifs qu'ils contiennent. Ils permettent l'accélération de ce processus de réparation et l'amélioration de l'aspect de la cicatrice résiduelle [9]. Tout comme les produits cosmétiques, les dermocosmétiques sont soumis aux nouvelles exigences des consommateurs [10]. Les actifs qu'ils contiennent se doivent d'être naturels et de présenter des activités attestées à l'aide de méthodes scientifiques afin de convaincre les consommateurs de leurs bienfaits.

La biodiversité végétale est une source abondante de molécules d'intérêt pour concevoir des actifs naturels destinés à différents domaines, et notamment à celui de la cosmétique. L'exploitation raisonnée de matières premières végétales permet d'obtenir des actifs répondant aux exigences des consommateurs en quête de naturalité. De nombreuses régions du globe présentant une biodiversité et un endémisme fortement menacés, sont définies comme des points chauds (angl. *hotspot*) de biodiversité [11]. Considéré comme le deuxième plus grand point chaud du monde, le bassin méditerranéen qui ne représente que 2 % de la surface terrestre, concentre 20 % de la richesse floristique de la planète, avec près de 30 000 espèces et sous-espèces de plantes différentes [12, 13]. Cette richesse fait de ce territoire une cible de choix pour s'approvisionner en molécules d'intérêt afin de développer notamment des ingrédients naturels conçus pour des formulations cosmétiques. Cependant, ces ressources naturelles ont été exploitées massivement durant des décennies et bien souvent de manière irraisonnée par les entreprises des pays industrialisés, sans fournir de contrepartie aux pays détenteurs de ces ressources [14]. La prise de conscience de la nécessité de protéger ces dernières a engendré en 1992, la signature de la Convention sur la Diversité Biologique (CDB), premier traité international régissant la conservation de la biodiversité, l'utilisation durable de ses éléments constitutifs et le partage juste et équitable des avantages découlant de l'exploitation de ses ressources génétiques. Le protocole de Nagoya, officiellement mis en œuvre en octobre 2014, est un accord supplémentaire à cette convention contribuant ainsi à la conservation et la sauvegarde des ressources génétiques mondiales [15].

C'est dans ce contexte que s'inscrivent ces travaux, développés à l'initiative des Laboratoires JYTA, entreprise de formulation cosmétique implantée dans le bassin méditerranéen depuis 1944. Spécialisés dans le développement de produits cosmétiques à partir de méthodes

artisanales, ils réalisent toutes les étapes nécessaires à la conception d'un produit cosmétique fini, des travaux de recherche et de développement jusqu'aux étapes de conditionnement et de distribution. Confrontés aux exigences des consommateurs, ils ont choisi de développer des ingrédients naturels et innovants favorisant la réparation cutanée à partir de matières premières d'origine méditerranéenne afin de les intégrer dans différentes gammes de produits cosmétiques.

Le développement d'ingrédients cosmétiques naturels constitue l'objet de cette étude. La première partie apporte les connaissances nécessaires à la contextualisation du sujet à travers une synthèse bibliographique qui présentera le domaine de la cosmétique, et plus particulièrement les dermocosmétiques. Le mécanisme d'action de la réparation cutanée sera explicité afin de comprendre comment des actifs cosmétiques peuvent influencer sur ce processus. Pour finir, les différentes techniques existantes pour développer des actifs d'origine naturelle ainsi que les moyens de prouver leurs activités biologiques seront présentées.

La seconde partie rendra compte des travaux effectués au cours de cette thèse en commençant par le criblage de matières premières pour le développement d'ingrédients naturels aux propriétés de réparateurs cutanés. Ensuite, l'étude phytochimique et la caractérisation d'un extrait de *Teucrium lucidum* L. sera détaillée. Au cours de cette étude, les familles de composés responsables des activités de cet extrait ont été caractérisées, et 8 composés principaux ont été isolés, puis identifiés par caractérisation structurale ; seuls trois d'entre eux avaient déjà été décrits dans le genre *Teucrium*. Cinq autres composés qui n'avaient pas été décrits précédemment dans *T. lucidum* ont également été caractérisés.

Après cela, les différentes étapes nécessaires au développement d'un ingrédient cosmétique naturel, mises en place dans le cadre de cette étude seront présentées. Cette méthodologie de développement sera illustrée à travers l'étude de deux co-produits de l'agriculture : les parties aériennes de *Quercus pubescens* Willd. et les feuilles de *Prunus domestica* L. L'étude de ces deux matières premières a mené au développement de deux ingrédients aux activités anti-âge, se présentant sous deux formes (liquide et solide) et répondant aux contraintes des formulateurs.

---

# Chapitre 1

## Rappels bibliographiques

---

L'étude bibliographique présentée dans ce chapitre permettra de cerner les enjeux de la cosmétique naturelle, notamment en ce qui concerne le développement d'ingrédients naturels actifs et concentrés, afin de répondre aux demandes des consommateurs. Un point sur le mécanisme de la réparation cutanée et sur l'action des ingrédients cosmétiques sur ce dernier sera présenté. Les différentes natures d'ingrédients cosmétiques seront également abordées, en portant une attention particulière aux extraits naturels obtenus par extraction à l'aide de solvant(s). Un état de l'art concernant les nombreuses techniques d'extraction conventionnelles, ainsi que les principales techniques d'éco-extraction utilisées pour l'obtention d'extraits naturels sera ensuite établi. Il sera suivi de la description de diverses techniques chromatographiques et des principales techniques de caractérisation employées pour l'élucidation de la composition chimique des extraits ainsi obtenus, et pour la mise en relation entre les activités biologiques observées et les molécules présentes dans ces extraits.

## 1.1. Les cosmétiques

### 1.1.1. Définition

Afin de caractériser les produits cosmétiques et ainsi de les différencier des médicaments, une définition a été introduite dans l'article 2 du règlement (CE) n°1223/2009 du Parlement européen qui régit les produits cosmétiques et leur mise sur le marché [4]. Ils sont définis comme « *toute substance ou tout mélange destiné à être mis en contact avec les parties superficielles du corps humain (épiderme, systèmes pileux et capillaire, ongles, lèvres et organes génitaux externes) ou avec les dents et les muqueuses buccales en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles* ». Les produits cosmétiques sont regroupés en quatre catégories : la parfumerie, les produits d'hygiène corporelle, le maquillage et les produits de beauté et soins de la peau.

Les produits dermocosmétiques se situent à la frontière entre les produits cosmétiques et les médicaments. Considérés comme des produits cosmétiques, ils sont donc soumis à la même réglementation, mais se rapprochent des médicaments par la présence de substance(s) active(s). La différence se situe au niveau de la fonction du produit, le médicament étant à visée préventive ou curative face à une affection dermatologique [16], alors que le produit dermocosmétique s'utilise pour nettoyer ou améliorer l'apparence de la peau [17]. En 1961, la notion de « cosméceutique » a été introduite aux Etats-Unis afin de définir les produits cosmétiques présentant des propriétés médicinales influant sur la santé de la peau ou sur son apparence [17]. Ils sont principalement utilisés pour assurer la photoprotection de la peau, c'est-à-dire à limiter les effets de son exposition au rayonnement solaire, mais également pour améliorer l'aspect des peaux sèches ou âgées, réduire les affections dermatologiques inflammatoires (acné, couperose, dermatites séborrhéiques et atopiques, psoriasis, etc.), ainsi que pour le soin des ongles et des cheveux [18]. Ils constitueraient donc les pendants des produits dermocosmétiques commercialisés en France notamment.

### 1.1.2. Règlementation

La première réglementation sur les produits cosmétiques a été introduite aux Etats-Unis en 1938 par la FDA et porte sur la régulation du commerce de ces produits. Concernant la législation européenne, il aura fallu attendre 1976 avec l'introduction de la Directive 76/768/CEE du Conseil concernant le rapprochement des législations des États membres relatives aux produits cosmétiques pour voir ce secteur réglementé pour la première fois [19]. Cette directive établit les règles générales portant sur l'autorisation et le contrôle des ingrédients, la sécurité du produit, l'information aux consommateurs et la publicité des produits cosmétiques afin d'établir sur une base commune des critères garantissant que les cosmétiques ne sont pas nocifs dans des conditions d'utilisations normales ou prévisibles. Modifiée à plusieurs reprises, cette réglementation a fait l'objet d'une refonte par la Commission Européenne en 2009. Les produits cosmétiques et leur mise sur le marché sont désormais soumis aux réglementations issues des dispositifs du règlement européen (règlement (CE) n°1223/2009 du Parlement européen et du Conseil du 30 novembre 2009) adopté le 11 juillet 2013 [4] et de l'article 3 de la loi n°2014-201 du 24 février 2014 portant sur diverses dispositions d'adaptation au droit de l'Union Européenne dans le domaine de la santé [20]. Contrairement aux médicaments, définis dans l'article L.5111-1 du Code de la santé publique [16], les produits cosmétiques ne peuvent présenter des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines.

Différentes directives générales sont mises en place pour orienter les entreprises de formulation cosmétique et assurer aux consommateurs la qualité et la sécurité des produits qu'ils utilisent [21]. Les propriétés des produits cosmétiques sont revendiquées par les fournisseurs sous forme d'allégations. A l'échelle française, le terme d'allégation a été défini par l'ARPP comme « *toute revendication, indication ou présentation utilisée pour la publicité d'un produit* ». Les allégations associées à un produit cosmétique concernent son efficacité ou tout autre caractéristique de ce dernier, et doivent être choisies avec précision et s'appuyer sur des preuves appropriées, notamment par le recours à des tests de 2 types : des *tests objectifs* permettant de mesurer la performance du produit à l'aide de tests instrumentaux, tests cliniques, etc., et des *tests de satisfaction* reposant sur la perception du consommateur après utilisation du produit [22]. L'article 20 du règlement européen n°1223/2009 et le règlement (UE) n°655/2013 de la Commission du 10 juillet 2013 établissent les critères communs auxquels les allégations relatives aux produits cosmétiques doivent répondre pour pouvoir être utilisées [4, 23]. La directive 2005/29/CE du Parlement européen et du Conseil du 11 mai 2005 traitant des pratiques commerciales déloyales des entreprises vis-à-vis des consommateurs protège ces derniers des allégations trompeuses que les fabricants pourraient utiliser sur ces produits afin de faciliter leur vente [24]. Les produits cosmétiques sont également soumis au respect des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), définies dans le *Journal officiel de l'Union Européenne* et décrites dans le standard qualité ISO 22716 : 2007 au niveau international [25, 26]. Ces BPF visent à assurer la reproductibilité et la qualité de fabrication des produits cosmétiques durant les étapes de production, de contrôle, de stockage et d'expédition. Comme défini dans l'article 3 du règlement (CE) n°1223/2009, le fabricant ou

distributeur est responsable du produit qu'il met sur le marché et doit s'assurer de présenter un produit sûr pour la santé humaine lorsqu'il est utilisé dans les conditions normales d'emploi ou raisonnablement prévisibles. Il se doit de tenir à disposition des autorités nationales de contrôle un dossier d'information sur le produit répondant aux exigences législatives réglementaires [25]. En France, le respect de ces réglementations est contrôlé par l'ANSM qui assure la sécurité des produits cosmétiques mis sur le marché et identifie les problèmes pouvant advenir lors de leur utilisation.

### 1.1.3. Le marché des cosmétiques

La constante évolution du mode de vie des consommateurs est la raison principale de la profonde transformation de l'industrie cosmétique mondiale observée ces vingt dernières années [27]. De récentes études de marché prévoient que le chiffre d'affaire du secteur cosmétique au niveau mondial atteigne 429,8 milliards de dollars US d'ici 2022, enregistrant ainsi un taux de croissance annuel composé (TCAC) de 4,3 % entre 2016 et 2022 [28]. Cette croissance est dynamisée par la demande forte des consommateurs pour les soins pour la peau, un fleuron de l'industrie cosmétique. Il est prévu que ce segment des soins pour la peau atteigne un chiffre d'affaire de 177,15 milliards de dollars US d'ici 2024, avec un TCAC de 4,7 % de 2016 à 2024 [29, 30]. Les produits anti-âge particulièrement plébiscités par les consommateurs, représentaient 39,6 % de parts du marché en 2015 [29]. Cette prédominance devrait perdurer ces prochaines années en raison du vieillissement de la population mondiale. Une étude présentée lors de l'édition 2018 de la *Anti-Ageing Skin Care Conference* indique que d'ici 2020, 13,2 % de la population mondiale (elle-même estimée à près de 7,6 milliards d'individus) sera âgée de plus de 60 ans, une proportion atteignant même plus de 25 % dans les pays développés [31].

Le marché de la cosmétique est placé sous l'influence des leaders mondiaux tels que L'Oréal S.A., Lancôme, Estée Lauder, Johnson & Johnson, etc. [29, 32]. La France est le leader mondial du secteur de l'industrie cosmétique [33, 34]. Son chiffre d'affaire à l'export est estimé à 13,9 milliards d'euros pour 2019, puisque ses produits sont distribués à travers plus de 200 pays [35]. Synonyme de savoir-faire et de haute technicité, le « Made in France » séduit les consommateurs à l'échelle internationale, notamment en Asie où les produits cosmétiques représentent 20 % des produits français exportés en 2017 [33]. Cette notoriété s'explique par l'image de qualité que véhicule la cosmétique française en matière de sécurité et d'authenticité des produits, d'irréprochabilité des matières premières ainsi que d'innovation [34, 35].

Sous l'influence des nouvelles préoccupations des consommateurs, on observe depuis quelques années, l'émergence d'un marché de la cosmétique naturelle [28–30, 36]. Ce secteur valant 34,12 milliards de dollars US en 2018, présente un TCAC estimé à 5,01 % entre 2019 et 2025 [37]. Cet essor s'explique principalement par le choix des consommateurs qui se tournent davantage vers des produits composés principalement d'ingrédients naturels et accordent une attention particulière à la transparence des fabricants en matière d'ingrédients (provenance, moyens de fabrication, etc.) [38]. Ainsi, 68 % des consommateurs achètent

principalement des produits naturels, qu'ils considèrent comme meilleurs pour leur santé et moins nocifs pour l'environnement [39]. En 2018, 76 % des consommateurs affirment avoir déjà acheté des produits naturels, contre 49 % en 2008 [39]. La traçabilité des ingrédients et la transparence des entreprises quant à leur provenance sont des facteurs déterminants dans le choix des consommateurs [36]. Cette vague du naturel s'accompagne d'une forte croissance du marché des produits cosmétiques biologiques dont la croissance annuelle est comprise entre 8 et 10 % entre 2016 et 2022 [36].

De nombreuses confusions demeurent toutefois dans l'esprit des consommateurs concernant les produits naturels et les produits biologiques [40]. Afin d'être transparent avec le consommateur, l'Allemagne a défini en 2001, une charte des cosmétiques naturels, qui sont certifiés à travers le label BDIH [41]. Cette association BDIH, créée en 1951, a ainsi défini un cahier des charges reposant sur une liste « positive » de composés autorisés : il n'exige pas de pourcentage précis d'ingrédients biologiques dans un produit fini mais impose que certains ingrédients de base proviennent obligatoirement de l'agriculture biologique. La France a également légiféré en ce qui concerne les termes « naturels » et « biologiques » associés aux produits cosmétiques. Selon les règles de l'ARPP, un produit cosmétique est qualifié de « naturel » si le produit fini contient un minimum de 95 % (m/m) d'ingrédients définis comme « naturels » ou d'origine naturelle [22]. Afin d'harmoniser au niveau international les principes et les critères du naturel et du biologique en cosmétique, l'organisation de standardisation internationale ISO 16128 a publié une norme en deux parties en 2016 et 2017 [42, 43], visant à définir « *les lignes directrices relatives aux définitions techniques et aux critères applicables aux ingrédients et produits cosmétiques naturels et biologiques* ». Elle permet d'attribuer à chaque ingrédient cosmétique un indice naturel, un indice d'origine naturelle ou un indice biologique. D'après les définitions du référentiel COSMOS, les ingrédients naturels sont une catégorie regroupant l'eau, les ingrédients minéraux et les ingrédients cultivés ou issus de l'élevage. Les ingrédients d'origine naturelle correspondent quant à eux à tous les ingrédients qui ne sont pas obtenus à partir de dérivés de la pétrochimie ; ils regroupent tous les ingrédients naturels physiquement ou chimiquement transformés. Les ingrédients naturels sont donc une sous-catégorie des ingrédients d'origine naturelle. Les ingrédients biologiques correspondent quant à eux aux ingrédients naturels ou d'origine naturelle cultivés selon les principes de l'agriculture biologique ou issus de la cueillette sauvage si elle respecte les exigences fixées par les réglementations de l'agriculture biologique.

Les consommateurs accordent également une importance primordiale à l'efficacité des produits : ils souhaitent que les cosmétiques vers lesquels ils se tournent soient aussi efficaces que les cosmétiques conventionnels [36]. Une étude datant de 2018 révèle que bien que le prix reste le critère essentiel dans le choix de 73 % des consommateurs, les allégations associées aux produits constituent le deuxième motif de sélection d'un produit pour 69 % d'entre eux [44]. Afin de répondre à ces nouvelles exigences d'efficacité, les formulateurs ont recours à des produits innovants, obtenus grâce aux avancées de la recherche et aux nouvelles technologies [45].

Ces marchés de la cosmétique naturelle et biologique sont fortement dynamisés par les ingrédients naturels obtenus à partir de plantes [46, 47]. Bien que le marché des ingrédients naturels ne représentait que 7 % du marché global en 2015, sa croissance est stimulée par l'exploitation exponentielle de nouvelles ressources, l'usage de technologies innovantes et les nouveaux moyens de certification [48]. Selon les procédés utilisés, il est possible d'obtenir différentes typologies d'ingrédients naturels (huiles végétales, huiles essentielles, extraits, etc.) qui remplacent peu à peu les ingrédients de synthèse. Comme cela a été mentionné précédemment, différentes conventions ont été mises en place afin de réglementer l'exploitation des ressources naturelles [49]. L'exploitation des co-produits de l'agriculture ou de l'industrie (notamment le secteur agro-alimentaire), s'avère particulièrement intéressante puisqu'elle permet de valoriser ces « déchets », réduisant ainsi l'impact environnemental lié à leur destruction et diminuant l'utilisation de nouvelles matières premières parfois limitées [50, 51]. Dans ce sens, les matières premières cultivables sont préférées aux plantes directement extraites de leur habitat naturel pour le développement d'ingrédients naturels [52]. Cependant, le développement de ces ingrédients coûte parfois jusqu'à deux fois plus que celui de leurs pendants synthétiques, notamment en raison du coût plus élevé de la matière première, ce qui se répercute sur le prix des produits finis intégrant ces derniers [53]. Aujourd'hui, 61 % des consommateurs qui ne se tournent pas vers ce type de produits le font pour des raisons économiques, bien que 31 % d'entre eux sont convaincus que ces produits seraient bénéfiques pour leur santé [44].

Ces ingrédients naturels imposent de nouveaux défis aux entreprises de formulation cosmétique [54]. Soumis à des problèmes de solubilité, d'oxydation ou encore de stabilité, les formulateurs doivent repenser leurs formules et non simplement substituer les ingrédients synthétiques par ces alternatives naturelles afin d'obtenir un produit efficace et stable [55, 56]. Ils sont également confrontés aux odeurs très marquées ou à la coloration de certaines matières végétales, qui avant leur intégration dans des formulations cosmétiques nécessitent des étapes de décoloration et de désodorisation, puisque la préférence pour une « cosmétique blanche » est encore largement plébiscitée, que ce soit par les formulateurs ou par les consommateurs [55, 57].

#### 1.1.4. Produits dermocosmétiques

Le marché des produits dermocosmétiques est également en plein essor depuis quelques années, dynamisé par les préoccupations des consommateurs vis-à-vis des effets cutanés de nombreux facteurs environnementaux (pollution, UV, etc.) [10]. Une meilleure connaissance de la structure de la peau, et la compréhension des variations de son aspect suite à son exposition aux facteurs environnementaux, permet le développement de produits dermocosmétiques efficaces et ciblés [18].

Composés d'ingrédients actifs d'origine naturelle ou synthétique, ces produits présentent des propriétés novatrices véhiculant une image de haute qualité et de technicité qui a révolutionné le monde des cosmétiques [10]. Les activités de ces produits, revendiquées sur le packaging,

sont attestées à l'aide de tests d'activité réalisés *in silico\**, *in vitro*, *ex vivo* ou encore *in vivo*, proches de ceux utilisés dans le domaine pharmaceutique [7, 18]. Ces produits dermocosmétiques permettent d'accélérer le mécanisme de réparation cutanée et améliorer l'apparence d'une éventuelle cicatrice résiduelle.

Ces formulations attractives et facilement utilisables par le consommateur (crèmes, sérums, lotions ou baumes) sont utilisées pour corriger ou soulager la peau suite à de légères interventions, de petites coupures, brûlures et plaies superficielles. Ces produits sont également efficaces contre les écorchures, les érythèmes fessiers, les irritations et éruptions cutanées, les gerçures, les dartres, les crevasses ou encore les perlèches.

La France est considérée comme le berceau de ce domaine, notamment par l'intermédiaire des groupes Pierre Fabre et L'Oréal, à travers leurs nombreuses marques distributrices telles qu'A-Derma et Avène d'une part, et La Roche Posay et Vichy d'autre part, qui dominent actuellement ce marché. Cependant, d'autres laboratoires tels que Johnson & Johnson, Nuxe, Uriage, Rogé Cavallès ou encore Bioderma se font petit à petit une place d'importance en proposant de nouveaux actifs ou formulations (Tableau 1).

## 1.2 La réparation cutanée

### 1.2.1. Structure de la peau

La peau est un organe composé de trois couches complémentaires : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 1) [58]. Organe à part entière, elle sert de barrière protectrice contre les agressions extérieures (pathogènes, UV, etc.), participe à la perception de stimuli sensoriels, à la thermorégulation du corps et assure un rôle métabolique (réserve d'énergie et synthèse de la vitamine D) [59].

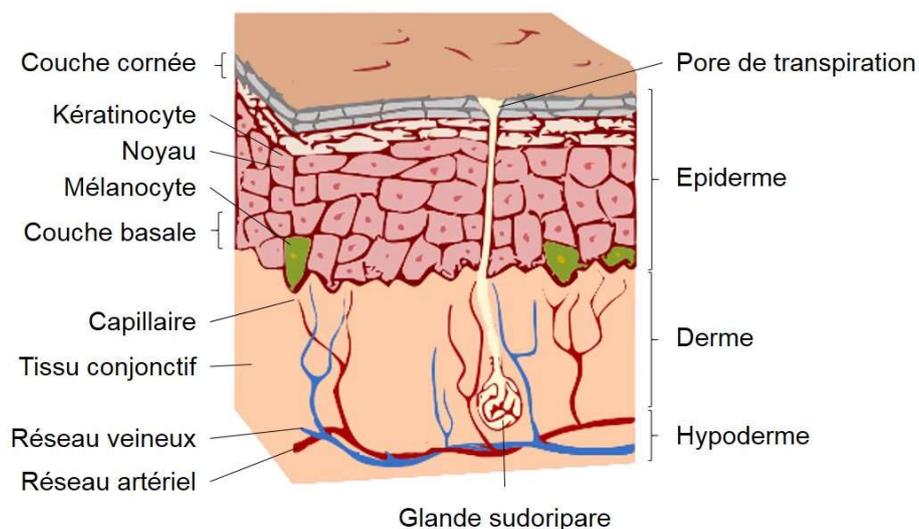


Figure 1 : Structure de la peau [60]

**Tableau 1** : Exemples de produits commerciaux favorisant la réparation cutanée

Nom commercial	Laboratoire	Formulation	Principes actifs
Aquaphor®	Eucerin	Baume	Panthénol, bisabolol, alcool de lanoline
Cicabio®	Bioderma	Crème ou lotion	Resvératrol (Vitis Vinifera Vine Extract <sup>1</sup> ), extrait de <i>Centella asiatica</i> , cuivre, zinc, antalgicine (Arnica Montana Flower Extract (and) Apigenin <sup>1</sup> ), acide hyaluronique
Cicactive®	Uriage	Gel hydrocolloïde	Extrait de consoude, panthénol, Eau thermale d'Uriage, acide salicylique
Cicalfate®	Avène	Crème ou lotion	Eau thermale d'Avène, sucralfate (Aluminium Sucrose Octasulfate <sup>1</sup> ), sulfate de zinc, sulfate de cuivre
Cicaplast®	La Roche Posay	Baume ou crème	Madécassosside issu de <i>Centella asiatica</i> , manganèse, cuivre, zinc, panthénol
Epithéliale AH®	A-Derma	Crème	Acide hyaluronique, extrait de plantules d'avoine Rhealba® (Avena Sativa Kernel Extract <sup>1</sup> ), vitamine E (Tocopherol <sup>1</sup> ), vitamine A (Retinol <sup>1</sup> )
Stelatria®	Mustela	Crème	Complexe d'oligo-éléments cuivre-zinc-manganèse, Bioecolia® (Alpha-Glucan Oligosaccharide <sup>1</sup> )
Sérum visage Réparation Argent	Altearah	Sérum	Huile végétale de chanvre, huile végétale d'onagre, squalène, extrait de salicorne, extrait de romarin, extrait de chêne liège, extrait de pistachier, huile de germe de blé
Deep Repair Balm	Laboratoires Teoxane	Baume	RHA® Acide hyaluronique réticulé breveté, extrait d'arnica, Neutrazen™ (Water (and) Butylene Glycol (and) Dextran (and) Palmitoyl Tripeptide-8 <sup>1</sup> ), extrait d'immortelle
Soin pour le corps	La Chênaie	Baume	Extrait de chêne
Baume corps réparateur ultra riche	Mademoiselle Bio	Baume	Beurre de karité, extrait d' <i>Aloe vera</i> , extrait de bourgeons de cassis, huile d'amande douce, miel
Elixir Nuit	Patyka	Sérum	Huile de rose musquée, huile de germe de blé, huile de sésame
La fabuleuse (Pomissime)	Laboratoires Clémascience	Baume à lèvres	Huile de pépin de pomme, bave d'escargot, beurre de karité, huile de chia, extrait de fleurs de grenadier
Soin des mains réparateur	Fleurance nature	Crème	Huile d'amande douce, huile d'avocat, huile de rosier muscat, huile de bourrache, huile d'argan, huile de tournesol, beurre de karité, gelée royale, hydrolat d'anis
Baume réparateur	Codexial	Baume	Beurre de karité, provitamine B5

<sup>1</sup> nom INCI

L'épiderme, composé principalement de kératinocytes\*, joue le rôle de barrière imperméable en s'opposant à l'infiltration de substances exogènes ainsi qu'à la déshydratation du corps [61]. Formés dans la couche basale et organisés en couches superposées, les kératinocytes se différencient en s'éloignant de la jonction dermo-épidermique (membrane basale séparant le derme de l'épiderme) et en se chargeant de kératine pour devenir des cornéocytes\* du *stratum corneum\** [59]. L'épiderme est également composé de mélanocytes\* où sont synthétisées les mélanines\* (pigments cutanés), des cellules de Langerhans\* et des cellules de Merkel\* [59].

Le derme est constitué de cellules migratrices (leucocytes\*, mastocytes\* et macrophages\*), impliquées dans le mécanisme de réponse immunitaire, ainsi que de fibroblastes\* permettant la synthèse des composants de la matrice extracellulaire (MEC) [59]. Cette dernière est composée de collagène et d'élastine qui confèrent à la peau une résistance à la traction et au relâchement, et d'un gel colloïdal, appelé substance fondamentale, occupant les espaces entre tous les constituants du derme [63]. Les collagènes constituent une famille de macromolécules synthétisées par les fibroblastes sous forme de procollagène, et qui possèdent des caractéristiques structurales communes [64]. Dans le derme, le collagène est présent sous 3 formes (I, III et V) qui diffèrent par la combinaison des trois chaînes alpha-polypeptidiques qui la composent [65]. Les fibres de collagène sont responsables de la résistance aux forces d'étirement. La substance fondamentale renferme de l'eau, des sels minéraux, des glycosaminoglycanes (macromolécules glucidiques telles que l'acide hyaluronique) responsables de la compressibilité des tissus, et des glycoprotéines\* qui assurent l'adhésion des éléments de la MEC entre eux et avec les cellules [63]. Les protéoglycanes, macromolécules complexes caractérisées par la présence des chaînes glycosaminoglycanes liées de façon covalente à une protéine porteuse, assurent dans l'organisme un rôle primordial dans l'hydratation des tissus, la diffusion des métabolites et le maintien de la structure du derme [66]. Les acides hyaluroniques que l'on trouve principalement dans le tissu conjonctif, possèdent une capacité de rétention d'eau considérable [67]. Le derme confère ainsi à la peau sa fermeté et son élasticité, ainsi qu'une résistance à la compression [64]. Vascularisé et innervé, le derme assure également l'oxygénation et l'apport en nutriments des structures de la peau, et renferme les glandes annexes (glandes sudoripares, glandes sébacées, follicules pileux et ongles) [59].

L'hypoderme ou tissu adipeux sous-cutané, constitué de lobules graisseux et de trames fibreuses, contient des adipocytes\* emmagasinant l'énergie nécessaire au bon fonctionnement des muscles, ainsi que des fibroblastes et des macrophages tissulaires [68]. Frontière entre la peau et les membranes fibreuses entourant les organes plus profonds, muscles et os, il participe également à l'amortissement des chocs subis par le corps [61]. D'épaisseur variant de quelques millimètres à environ 1 cm, cette couche profonde est fortement vascularisée et innervée [61].

## 1.2.2. Mécanisme de la réparation cutanée

La réparation cutanée est un mécanisme physiologique naturel qui se met en place suite à une altération de la structure cutanée afin d'en assurer la restauration. Ce mécanisme très complexe faisant intervenir de nombreux types cellulaires (cytokines, etc.), se décompose en trois étapes principales se mettant en place en cascade : la phase inflammatoire, la phase de prolifération et la phase de remodelage (Figure 2) [9, 69].

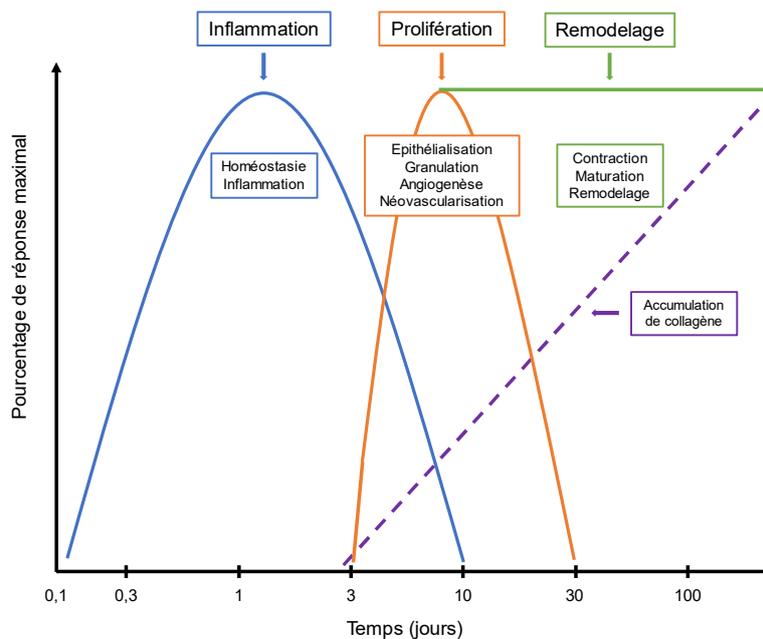


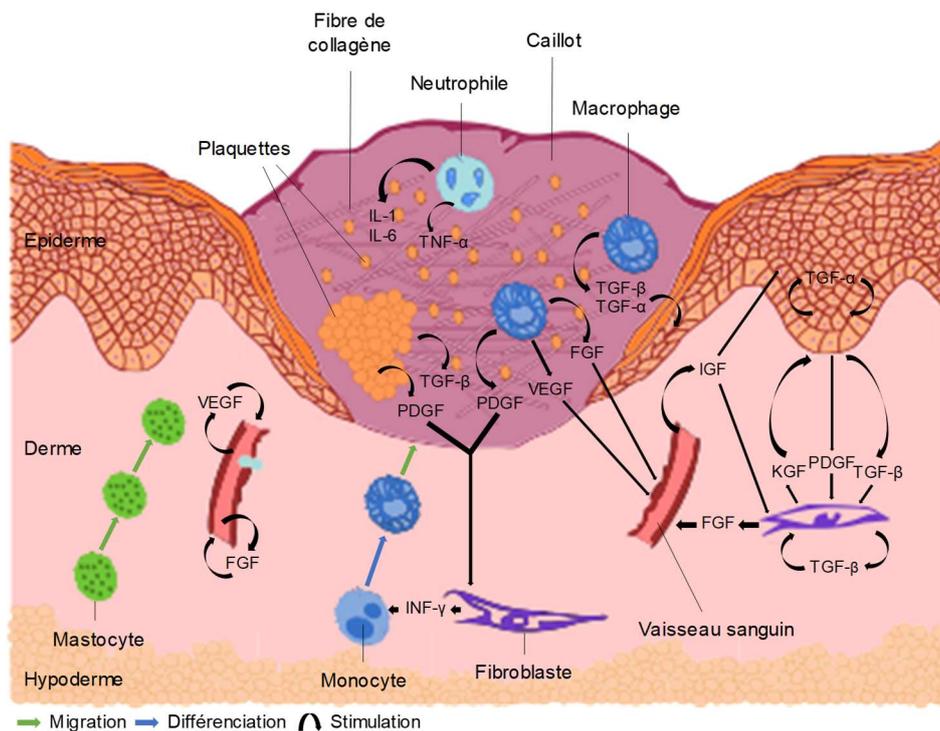
Figure 2 : Chronologie des 3 principales phases du processus de réparation cutanée (d'après Fournier *et al.* [69])

### 1.2.2.1. Phase inflammatoire

Suite à un traumatisme, le corps répond naturellement par homéostasie\*, un phénomène de régulation/stabilisation de certaines caractéristiques physiologiques permettant l'arrêt du saignement par constriction des vaisseaux sanguins, agrégation des plaquettes, dégranulation et formation de fibrine\* [70]. Ce réseau de fibrine, en synergie avec le phénomène d'homéostasie, permet l'organisation temporaire de la matrice nécessaire à la migration cellulaire et restaure la fonction barrière de la peau pour maintenir son intégrité [71]. La perméabilité cellulaire est augmentée par des médiateurs tels que la sérotonine et l'histamine, libérés par les plaquettes [72]. La vasoconstriction des vaisseaux est un phénomène très court, qui laisse place à la vasodilatation lorsque l'homéostasie est atteinte, permettant un flux de globules blancs et de thrombocytes, nécessaire à la mise en place de la phase inflammatoire [72]. Cette vasodilatation permet la libération des nutriments cellulaires et autres éléments bénéfiques pour promouvoir la réparation cutanée et stopper l'infection [9]. Le processus de thrombose, induit par le relargage d'adénosine diphosphate (ADP) lors de l'agrégation des plaquettes, consiste en la formation d'un caillot nécessaire à la réparation cornéocytaire assurée par la migration des kératinocytes [72].

Le caillot ainsi que les tissus endommagés libèrent des facteurs de croissance qui se lient à des récepteurs à la surface cellulaire, et des cytokines pro-inflammatoires (classe de protéines

de signalisation) qui vont réguler la phase inflammatoire [73]. Selon leur nature, les facteurs de croissance agissent sur différentes cellules en stimulant ou non leur survie et leur prolifération, en favorisant leur migration ou encore leur différenciation. Les cytokines agissent particulièrement sur les leucocytes additionnels et contribuent au nettoyage de la MEC [70]. Activées également par des signaux de danger émis par la blessure, les cytokines permettent de contrôler le saignement, favorisant ainsi l'activation du processus de différenciation et donc l'amorçage de la phase inflammatoire [58, 70]. Les cellules immunitaires (macrophages, mastocytes, neutrophiles et lymphocytes) migrent alors vers le site de la lésion, et jouent des rôles bien définis dans le processus inflammatoire (Figure 3) [9].



**Figure 3 :** Phase inflammatoire (d'après Singer *et al.* [58])

Les neutrophiles, leucocytes dominants dès le début de la phase inflammatoire, éliminent les agents pathogènes et les débris cellulaires de la zone endommagée en produisant des substances antimicrobiennes (espèces réactives de l'oxygène (ERO), protéases, peptides cationiques) [71] limitant ainsi une infection bactérienne [74]. Après quelques heures, les neutrophiles migrent à travers les cellules endothéliales présentes dans les capillaires sanguins qui sont activées par les cytokines pro-inflammatoires localisées près de la lésion et permettant l'expression de molécules d'adhésion [71]. Ils participent également à la prolifération des mastocytes dans la zone lésée et aident les monocytes\* présents dans les vaisseaux sanguins à entrer dans cette zone et à se différencier en macrophages sous l'action des substances chimiotactiques\* [71, 75]. Les monocytes préviennent l'infection des débris nécrosés dans un premier temps, puis jouent un rôle anti-inflammatoire et induisent la fibrose\* [74].

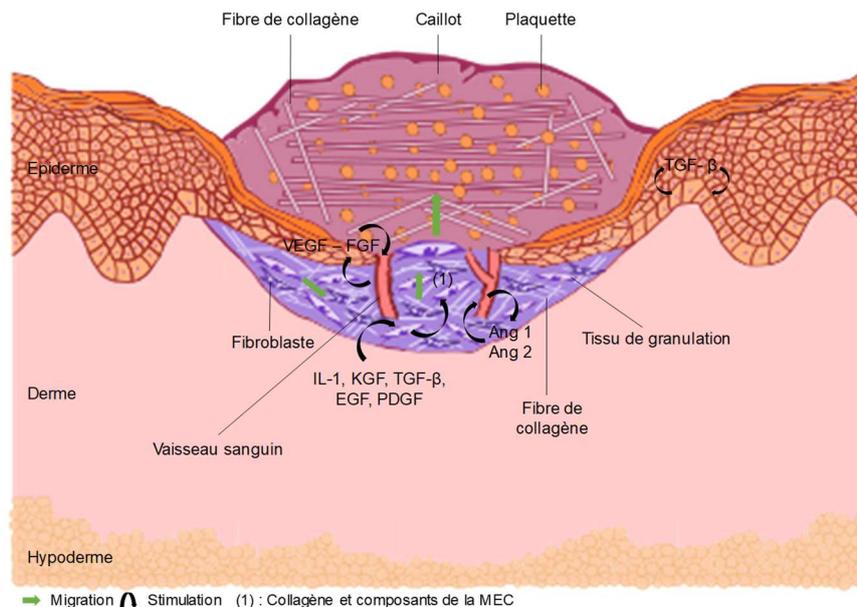
Les macrophages interviennent dans le processus de destruction des microorganismes et des cellules étrangères (phagocytose\*) grâce à la libération de cytokines. Recrutés dans les

plaquettes et le caillot, leur migration vers la blessure est favorisée par les chimioattractants [71]. Ils stimulent les kératinocytes, les fibroblastes, et ainsi l'angiogénèse, en produisant des facteurs de croissance nécessaires au déclenchement de la production et de la propagation de nouveaux tissus [71, 75]. Le facteur de croissance TGF- $\beta$  (facteur de croissance transformant\*) participe notamment au recrutement des fibroblastes présents à l'extérieur de la plaie (zone non lésée). La production de VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) permet la stimulation de la migration des cellules endothéliales vers la plaie, favorisant ainsi la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et l'hypervascularisation du tissu de granulation [74]. Tissu conjonctif sous-jacent se formant lors de la rétractation du caillot, le tissu de granulation est caractérisé par la présence de granulations roses apparaissant à la surface du nouveau derme et correspondant aux nombreux capillaires qui l'envahissent [58]. Avec l'activation des fibroblastes et grâce aux macrophages, la diffusion de l'interféron\* INF- $\gamma$  promeut la transformation des monocytes en macrophages, permettant ainsi d'atteindre le taux de macrophages nécessaire à une bonne réparation des tissus [58, 71]. Une insuffisance de ces derniers entraîne un retard de la fermeture de la blessure, ainsi qu'une diminution de l'épaisseur du tissu de granulation formé lors de la phase proliférative, car ils sont responsables de la transition de la première à la deuxième phase [9, 76].

Les lymphocytes apparaissant à la fin de la phase inflammatoire agissent sur le remodelage. Une insuffisance de ces derniers entraîne un délai de fermeture de la blessure et une diminution du nombre de kératinocytes sur le site endommagé [70]. Les mastocytes, présents dans le derme et caractérisés par la présence de granulations au sein de leurs cytoplasmes, libèrent par dégranulation différents médiateurs et cytokines pro-inflammatoires [77]. Ils agissent sur la vascularisation par libération d'histamine, et sont impliqués dans le recrutement des neutrophiles [77].

#### **1.2.2.2. Phase proliférative**

Lorsque la phase inflammatoire est terminée, la phase de prolifération se met en place, laissant apparaître le tissu de granulation à la surface du derme par rétractation du caillot [58]. Elle est caractérisée par l'action des fibroblastes et des cellules endothéliales lors de plusieurs étapes : l'épithélialisation, l'angiogénèse, la granulation, la formation de tissu et le dépôt de collagène (Figure 4) [72].



**Figure 4** : Phase de prolifération (d'après Singer *et al.* [58])

L'épithélialisation est initiée par les macrophages qui stimulent les fibroblastes par la production de l'interleukine IL-1 et du facteur de croissance des kératinocytes KGF-2 [78]. Grâce à différents facteurs de croissance, les fibroblastes renforcent le site endommagé et favorisent la migration des cellules vers le tissu de granulation, en produisant du collagène, des glycosaminoglycanes et des protéoglycanes [70, 72, 78, 79]. Les cellules migrent de la périphérie de la plaie vers l'intérieur pour former une couche de plus en plus épaisse, comblant ainsi la blessure [72]. Cette étape est également caractérisée par la diminution de la dégradation de la MEC, contrôlée par la production de TGF- $\beta$  par les kératinocytes [78], par la production de collagène par les cellules épidermiques [80] et par l'activation des plasmines influençant la migration cellulaire entre le derme et le caillot [81]. Lorsque la migration cellulaire cesse, les kératinocytes contenus dans les follicules pileux forment la membrane basale. Le processus de différenciation permet la formation du nouvel épiderme stratifié [71]. La synthèse de collagène de type III principalement, et d'élastine permet la création d'un réseau extracellulaire tridimensionnel de tissus [71]. L'épithélialisation est également favorisée par la production de la nouvelle MEC (fibronectine\*, etc.) par les fibroblastes [74].

Cette deuxième phase du mécanisme de réparation cutanée est aussi caractérisée par la formation du réseau vasculaire en deux étapes : la vascularisation et l'angiogenèse [72]. La vascularisation est caractérisée par la formation d'un réseau primitif de capillaires sanguins en remplacement du réseau endommagé. L'angiogenèse permet la création de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des cellules endothéliales progénitrices\*, et favorise ainsi l'extension du réseau vasculaire par élongation, bourgeonnement, division et remodelage des vaisseaux existants [58, 71]. Les principaux facteurs de croissance impliqués sont les molécules pro-angiogéniques VEGF et FGF, ainsi que les angiopoïétines\* Ang1 et Ang2 [58]. Une bonne irrigation étant essentielle pour la réparation cutanée, l'angiogenèse s'achève lorsque le réseau est suffisant pour véhiculer l'oxygène et les métabolites nécessaires [71].

### 1.2.2.3. Phase de remodelage

La dernière phase du processus de réparation cutanée est la phase de maturation et de remodelage qui permet d'augmenter la force tensile de la peau *via* le réarrangement et l'orientation des fibres de collagène [72]. Cette phase débute lorsque le tissu de granulation régresse, c'est-à-dire à la fermeture de la plaie, et peut durer jusqu'à deux ans. Vers le 21<sup>ème</sup> jour, lorsque le taux nécessaire de collagène est atteint, une contraction physique de la blessure est observée sous l'action de myofibroblastes\* [71, 74]. Sous l'influence de TGF- $\beta$  et des signaux mécaniques liés aux forces de résistance à la contraction, ces fibroblastes contractiles permettent la contraction et le rapprochement des berges de la plaie [82]. Les tissus néoformés lors de la phase proliférative se différencient, induisant ainsi des modifications qualitatives et quantitatives de leur structure. On note par exemple la synthèse d'élastine et la dégradation du collagène de type III en collagène de type I, fibres plus épaisses et prédominantes dans la structure de la peau saine ainsi que dans les cicatrices matures [82]. Les métalloprotéases matricielles (MMP), protéases capables de dégrader les composants de la MEC et de catalyser l'angiogenèse, ainsi que leurs inhibiteurs (TIMP), assurent la réorganisation des fibres de collagène afin d'obtenir une meilleure force tensile [74]. Une différenciation des cellules épithéliales a lieu lors de cette phase de maturation et de remodelage afin de rétablir la perméabilité de la peau [71]. Cette étape consiste en un équilibre entre la synthèse et la dégradation des protéines et autres composants de la MEC (diminution de la teneur en acide hyaluronique et en fibronectine) par les MMP produites par les leucocytes et régulées par les cytokines et les facteurs de croissance [58, 71]. On observe également la diminution de la production de cytokines anti-inflammatoires [71]. L'activité et la densité cellulaire, tout comme la vascularisation, diminuent au fur et à mesure pour atteindre leur niveau basal lorsque l'équilibre épidermo-conjonctif est rétabli [82]. La peau atteint sa force tensile maximale au bout de 11 à 14 semaines après la blessure, mais sa résistance restera 20 % plus faible que celle d'une peau normale [72].

### 1.2.2.4. Facteurs influençant la réparation cutanée

De nombreux facteurs chimiques et biologiques influencent la réparation cutanée (Tableau 2). Ils se divisent en deux catégories : les facteurs locaux, influençant directement les caractéristiques de la cicatrice, et les facteurs systémiques, agissant sur la santé de manière générale et donc sur la capacité de l'individu à guérir [70].

Tableau 2 : Facteurs influençant la réparation cutanée [70]

Facteurs locaux	Facteurs systémiques
Oxygénation	Age et genre
Infection	Hormones sexuelles
Corps étrangers	Stress
Insuffisance veineuse	Ischémie (diminution de l'apport sanguin artériel à un organe)
Pollution atmosphérique	Maladies (diabète, fibrose, etc.)
	Obésité
	Médicaments
	Alcoolisme et tabagisme
	Système immunitaire affaibli (cancers, radiothérapie, SIDA, etc.)
	Nutrition

L'oxygénation et l'infection sont les principaux paramètres locaux pouvant influencer sur la réparation cutanée. Indispensable au métabolisme cellulaire, un niveau d'oxygène adéquat à chaque étape du processus est nécessaire pour une réparation optimale. L'hyperoxie, correspondant à un excès d'oxygène, diminue le risque d'infection lors de la phase inflammatoire [83]. L'hypoxie, définie comme un manque d'oxygène, est nécessaire pour stimuler la réparation, en agissant sur la libération des facteurs de croissance et sur l'angiogenèse [70]. L'oxygénation agit également sur la régulation du taux de radicaux libres\* [70]. En parallèle, en cas de blessure, les micro-organismes normalement retenus à la surface de la peau, accèdent aux tissus sous-cutanés, pouvant induire une infection et provoquant ainsi un allongement de la phase inflammatoire jusqu'à ce que la décontamination soit totale. Les bactéries présentes dans les tissus infectés forment également un biofilm en s'agrégeant, rendant la peau plus résistante aux traitements [70].

Les facteurs systémiques, plus nombreux, jouent également des rôles plus ou moins directs sur la réparation cutanée. La structure de la peau changeant avec l'âge, ce dernier représente le facteur systémique dominant [70]. Avec le temps, la peau est caractérisée par des rougeurs, un dessèchement, des altérations de la pigmentation, un relâchement ou encore des rides [84]. Bien que l'épaisseur de l'épiderme reste constante avec l'âge, un aplatissement de la jonction dermo-épidermique est constaté et donne ainsi une impression d'atrophie. Cette réduction du contact entre ces deux couches, induit un temps de migration des kératinocytes de la couche basale à la surface de la peau deux fois plus long. Une diminution du taux de cellules dans le derme (fibroblastes, mastocytes, macrophages) ainsi que du taux de protéines (collagène notamment) est observée [84]. Le taux d'élastine reste quant à lui constant mais un désordre morphologique est constaté, tout comme pour le collagène. Le réseau de micro-vascularisation diminue également avec l'âge, affectant la capacité de la peau du sujet à s'adapter à une blessure et aux changements de température. La plupart de ces changements sont liés à l'exposition de la peau à de nombreux facteurs environnementaux, notamment les radiations UV. Ces changements de structure influencent la réparation cutanée : ils favorisent notamment l'agrégation des plaquettes, l'augmentation de la sécrétion de médiateurs inflammatoires, la diminution de la perméabilité vasculaire ou encore de la sécrétion des facteurs de croissance lors de la phase inflammatoire [84, 85]. Un retard de la ré-épithélialisation, de l'angiogenèse et du dépôt de collagène est observé durant la phase proliférative chez les sujets âgés. Pour finir, l'âge influence le taux de transformation du collagène, son remodelage tardif induisant ainsi un retard et une diminution de la force tensile de la peau [85].

La nutrition et l'hydratation sont des facteurs clés favorisant la bonne marche du processus de réparation cutanée, *via* l'apport de différents nutriments essentiels [70]. Les protéines et acides aminés fournissent la trame principale nécessaire à la croissance des tissus, le renouvellement cellulaire et la réparation consécutive à une blessure. Les graisses et les sucres fournissent l'énergie et les substrats nécessaires à la prolifération, la maturation et l'homéostasie dans les tissus du derme et de l'épiderme. Les vitamines (A, B, C et E notamment), les minéraux ainsi que le fer, le cuivre et le zinc sont également vitaux pour la

régénération à tous les niveaux [70, 86]. La cigarette, le diabète, l'alcool, l'obésité, le stress ou encore certains médicaments ont un impact néfaste non négligeable sur le processus de réparation [70].

## 1.3. Actifs cosmétiques

### 1.3.1. Définition

En cosmétologie, les actifs, qu'ils soient d'origine naturelle ou synthétique, sont les ingrédients responsables des propriétés des produits. Les ingrédients synthétiques, très utilisés dans les produits cosmétiques, sont de plus en plus réglementés, notamment dans le règlement européen n°1223/2009 [4]. Ces contraintes associées aux nouvelles exigences des consommateurs incitent les formulateurs à les remplacer par des actifs naturels [55]. Ces actifs synthétiques ne seront donc pas abordés dans ce travail bibliographique portant sur le développement d'actifs naturels.

### 1.3.2. Actifs naturels

Les actifs naturels d'origine végétale se composent d'un mélange de composés organiques possédant des structures chimiques diverses et des activités biologiques particulières agissant en synergie. Ils sont à différencier du principe actif naturel, molécule pure extraite à partir de la matière première naturelle et pouvant être intégrée telle que dans une formulation cosmétique. Selon la matière première et la méthode d'extraction utilisée, la nature des molécules extraites varie (composés volatils ou non, plus ou moins polaires, etc.) [87]. Les actifs naturels se présentent essentiellement sous trois formes : les huiles essentielles, les huiles végétales et les extraits [88].

#### 1.3.2.1. Matières premières

La nature de la matière première utilisée est une grande source d'innovation : bien que de nombreuses espèces soient déjà exploitées pour obtenir des actifs aux propriétés établies de longue date, la richesse de la biodiversité laisse place au développement de nouveaux ingrédients [56, 89]. Les végétaux, riches en composés bioactifs, sont les principales matières premières utilisées pour obtenir des actifs naturels. Toutes les plantes sont constituées de différents composés chimiques parmi lesquels on distingue les métabolites primaires, participant à la croissance et au développement des plantes (glucides, acides aminés, lipides, acides nucléiques) et les métabolites secondaires, sécrétés par la plante pour assurer entre autre, sa survie face aux conditions environnementales auxquelles elle est soumise [87, 90]. Ces métabolites secondaires sont impliqués dans de nombreuses interactions avec des enzymes, récepteurs et canaux ioniques [90]. Ils présentent le plus souvent des propriétés biologiques intéressantes, potentiellement valorisables [21, 87]. Ils sont classés selon leur structure chimique, leur solubilité ou encore leur voie de biosynthèse ; parmi ces derniers se trouvent principalement les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes,

anthocyanines, tanins, saponines, coumarines, stilbènes), les composés terpéniques et les alcaloïdes [91]. L'extraction de ces métabolites dépendant principalement de l'organe du végétal traité (fleurs, feuilles, racines, fruits, etc.) et des conditions d'extraction, les activités biologiques des extraits ainsi obtenus peuvent différer pour une même matière première [21].

### 1.3.2.2. Huiles essentielles

Selon la norme AFNOR T75-005, les huiles essentielles sont obtenues par trois techniques principales ne nécessitant pas de solvants organiques ou de produits chimiques [92]. Les huiles essentielles de plantes (fraîches ou sèches) sont principalement obtenues par hydrodistillation\* et entraînement à la vapeur d'eau\* ; les huiles essentielles de *Citrus* (péricarpe ou zeste d'agrumes) sont obtenues par expression à froid\* [93, 94].

Issues de plantes aromatiques, les huiles essentielles sont composées majoritairement de molécules volatiles, souvent très odorantes, qui sont principalement des terpènes [93, 95]. Les huiles essentielles peuvent poser des problèmes de compatibilité dans le cas de certaines applications cosmétiques, en raison de leur odeur parfois très marquée [96], ou de la présence de certaines substances classées comme allergènes et pouvant être responsables de réactions cutanées. La présence de ces allergènes est par conséquent règlementée par le règlement (CE) n°1223/2009 et est placée sous la surveillance du Comité scientifique pour la sécurité des consommateurs (CSSC) [4, 97]. L'utilisation de ces huiles essentielles en tant qu'actifs dans les produits cosmétiques peut s'avérer problématique puisqu'elles sont incorporées à des concentrations plus importantes que dans les parfums.

Les huiles essentielles présentent notamment des activités antimicrobiennes, antifongiques, ou encore antibactériennes, et peuvent également favoriser le mécanisme de réparation cutanée [98, 99]. Des exemples d'huiles essentielles utilisées pour leurs actions sur la réparation cutanée sont présentés dans le Tableau 3.

**Tableau 3** : Huiles essentielles présentant des actions sur la réparation cutanée

Nom commun	Nom latin	Principaux composés	Actions	Références
Arbre à thé	<i>Melaleuca alternifolia</i> Maiden et Betche	Terpinèn-4-ol γ-terpinène α-terpinène	<ul style="list-style-type: none"> <li>accélère la cicatrisation ;</li> <li>diminue le risque d'infection des plaies.</li> </ul>	[96, 100]
Bergamote	<i>Citrus bergamia</i> Risso & Poit.	Limonène Acétate de linalyle Linalol γ-terpinène β-pinène	<ul style="list-style-type: none"> <li>participe à la désinfection des plaies ;</li> <li>utilisée principalement en cas de démangeaisons, d'herpès et de psoriasis.</li> </ul>	[93, 101]
Encens	<i>Boswellia caterii</i> Bird., <i>Boswellia frereana</i> Bird., <i>Boswellia bhandjiena</i> Bird.	Encensol Acétate d'incésyle	<ul style="list-style-type: none"> <li>favorise la réparation cutanée ;</li> <li>possède des propriétés immunostimulantes.</li> </ul>	[95, 101]

Genévrier cade et Genévrier de Phénicie	<i>Juniperus oxycedrus</i> L. et <i>Juniperus phoenicea</i> L.	$\alpha$ -pinène Limonène	<ul style="list-style-type: none"> <li>stimulent la synthèse d'hydroxyproline ;</li> <li>activent la production de collagène ;</li> <li>accélèrent le remodelage ;</li> <li>présentent des activités anti-inflammatoires.</li> </ul>	[96, 102]
Laurier vrai	<i>Laurus nobilis</i> L.	Eucalyptol Eugénol	<ul style="list-style-type: none"> <li>favorise la réparation cutanée.</li> </ul>	[98]
Lavande vraie	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	Acétate de linalyle Linalol	<ul style="list-style-type: none"> <li>présente des propriétés analgésiques.</li> </ul>	[93, 96, 101]
Orange	<i>Citrus x sinensis</i> (L.) Obsbeck	Limonène	<ul style="list-style-type: none"> <li>désinfecte les plaies ;</li> <li>limite le risque d'infection qui pourrait retarder la cicatrisation.</li> </ul>	[93, 101]
Romarin	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Eucalyptol Camphrol Bornéol Acétate de bornyle $\alpha$ -pinène Limonène	<ul style="list-style-type: none"> <li>réduit l'inflammation ;</li> <li>augmente la contraction de la peau ;</li> <li>stimule la ré-épithélialisation, la régénération du tissu de granulation, l'angiogenèse et le dépôt de collagène.</li> </ul>	[93, 96, 103]

### 1.3.2.3. Huiles végétales

Les huiles végétales proviennent de plantes oléagineuses qui présentent la particularité de contenir une quantité importante de lipides dans leurs fruits, noix ou graines. Composées principalement de triglycérides (95-99 %), acides gras et vitamines, elles peuvent être utilisées comme actifs dans une formulation cosmétique, notamment pour leurs propriétés hydratantes et protectrices [64, 104]. Ces huiles végétales sont obtenues par trituration, un processus regroupant différents procédés mécaniques et/ou chimiques nécessaires pour obtenir une huile de qualité, avec un rendement optimisé [104]. Lorsque l'huile est obtenue uniquement par un pressage mécanique à froid, elle est dite vierge [104]. Les graines peuvent être chauffées avant d'être mises sous pression afin d'augmenter le rendement d'extraction. Une étape d'extraction par solvant à partir des résidus de pression, appelés tourteaux de pression, peut être ajoutée à ce procédé [104]. Le choix du procédé d'obtention, notamment le chauffage lors du pressage, influence l'extraction des composés. Le chauffage favorise l'extraction des triglycérides simples, des phospholipides, des protéines, des gommes, de certains pigments indésirables et d'autres éléments non glycéridiques qui vont précipiter et provoquer l'apparition de troubles [64]. Pour des raisons de conservation, d'odeur et d'altération, une étape de raffinage est alors nécessaire afin d'éliminer toutes les impuretés extraites et ainsi de nettoyer l'huile. Cette étape de raffinage, qui peut être réalisée selon un procédé chimique ou physique, est indispensable lorsque l'huile est obtenue par extraction par solvant [104].

Différentes huiles végétales intégrées aux produits cosmétiques finis afin de favoriser le processus de réparation cutanée sont présentées dans le Tableau 4. Ces huiles végétales sont à distinguer des macérats huileux, qui sont obtenus par macération de matière première végétale dans une huile végétale vierge. Les macérats huileux correspondent donc à des huiles contenant des principes actifs de plantes non oléagineuses.

**Tableau 4 :** Huiles végétales utilisées comme réparateurs cutanés

Nom commun	Nom latin	Composés d'intérêt	Propriétés	Références
Amandier	<i>Prunus dulcis</i> Mill.	Acide oléique Acide linoléique Acide palmitique Acide stéarique Vitamine E	<ul style="list-style-type: none"> <li>favorise l'épithélialisation ;</li> <li>appliquée principalement sur des peaux sèches.</li> </ul>	[105]
Avocatier	<i>Persea americana</i> Mill.	Acide oléique Acide palmitique Acide linoléique Vitamines A, D et E	<ul style="list-style-type: none"> <li>favorise l'épithélialisation ;</li> <li>permet l'augmentation du poids du tissu de granulation ;</li> <li>augmente le taux d'hydroxyproline synthétisée.</li> </ul>	[106]
Canneberge à gros fruits	<i>Vaccinium macrocarpon</i> Aiton	Acide oléique Acide linoléique Acide palmitique Vitamine E	<ul style="list-style-type: none"> <li>possède des activités antimicrobiennes, anti-inflammatoires et antioxydantes.</li> </ul>	[107]
Jojoba	<i>Simmondsia chinensis</i> (Link) C.K.	Acide gadoléique Acide érucique Acide oléique Vitamine E	<ul style="list-style-type: none"> <li>accélère la fermeture des plaies en agissant sur les fibroblastes et les kératinocytes ;</li> <li>stimule la synthèse de collagène de type I dans les fibroblastes.</li> </ul>	[108]
Raisins (pépins)	<i>Vitis vinifera</i> L.	Acide oléique Acide linoléique Acide palmitique Vitamine E	<ul style="list-style-type: none"> <li>possède des activités antimicrobiennes, anti-inflammatoires et antioxydantes.</li> </ul>	[107]
Rosier des chiens	<i>Rosa canina</i> L.	Acide linoléique Acide linoléique Acide oléique Acide palmitique Acide rétinoïque	<ul style="list-style-type: none"> <li>présente les mêmes activités que l'acide rétinoïque ;</li> <li>inhibe l'activité des MMP ;</li> <li>favorise la synthèse de collagène.</li> </ul>	[105]
Sacha inchi	<i>Plukenetia volubilis</i> L.	Acide linoléique Acide linoléique Vitamine E	<ul style="list-style-type: none"> <li>permet la reconstitution de la barrière épidermique ;</li> <li>promeut le processus de kératinisation par la présence des acides gras, précurseurs de prostaglandines.</li> </ul>	[105]

### 1.3.2.4. Extraits naturels

Les extraits naturels, obtenus aux moyens de solvants, offrent des propriétés très intéressantes d'un point de vue cosmétique de par leur composition, souvent peu connue et présentant une grande complexité [47]. La mise en contact de la matière première avec un solvant organique ou aqueux permet de solubiliser des métabolites d'intérêt de différentes natures (polyphénols, tanins, flavonoïdes, terpènes, etc.) qui peuvent présenter des activités biologiques, en agissant en synergie [87].

Ces extraits constituent l'objet principal de cette étude ; les méthodes d'obtention, et d'analyse de ces derniers, à savoir les techniques de séparation et de caractérisation des molécules qu'ils renferment sont présentées dans ce chapitre. L'évaluation de différentes activités biologiques de ces extraits est également détaillée par la suite afin de comprendre et déterminer le rôle des enzymes testées dans le processus de réparation cutanée.

#### 1.3.2.4.1. Méthodes d'obtention

Le choix de la technique d'extraction est la première étape cruciale pour extraire de manière spécifique les métabolites d'intérêt à partir d'une matière première végétale complexe, dans le but de limiter les étapes de séparation ultérieures [21]. Cette technique est optimale si elle permet d'extraire le maximum de composés d'intérêt à partir du minimum de matière première, dont l'approvisionnement peut être un facteur limitant. Le procédé d'extraction doit également être reproductible et le plus vert possible [109]. La durée d'extraction, la température à laquelle elle est réalisée, le type d'agitation ou encore le solvant employé sont des paramètres essentiels à ajuster selon la matière première exploitée et l'activité biologique recherchée [87].

##### A. Méthodes classiques

Les extraits naturels sont obtenus par différentes méthodes reposant sur le principe de l'extraction solide-liquide, dont l'efficacité dépend surtout du choix du solvant en fonction de la polarité des composés à extraire [87]. Les solvants polaires organiques tels que l'éthanol ou un solvant aqueux sont utilisés pour l'extraction des composés hydrophiles ; l'hexane est quant à lui, préféré pour les composés lipophiles [110]. Le traitement de la matière végétale est essentiel en amont de l'extraction : il peut s'agir d'étapes de séchage ou de broyage de la matière première, ce dernier permettant d'obtenir un échantillon homogène et d'accélérer la cinétique d'extraction par augmentation de la surface de contact entre l'échantillon et le système de solvants [110].

La macération est une technique d'extraction consistant à mélanger un solide dans un solvant afin d'en extraire les composés d'intérêt. Le végétal, broyé ou non, peut se trouver en suspension ou sous agitation dans ce solvant [87]. Cette technique est très utilisée en cosmétique pour obtenir des macérats (ex. l'huile de monoï résulte de la macération des fleurs de tiaré dans l'huile de coco) et des extraits hydroalcooliques [88]. D'autres techniques d'extraction similaires à la macération sont parfois employées ; elles se distinguent par la

température du solvant et la méthode de mise en contact solvant/matière première [88]. On parle ainsi de digestion lorsqu'un chauffage est appliqué durant l'extraction ; la température est alors définie en fonction de la sensibilité des principes actifs, et doit être inférieure à la température d'ébullition du solvant. On parle de décoction lorsque l'extraction s'effectue dans un solvant porté à ébullition. L'infusion, elle, consiste à verser le solvant porté à ébullition sur le matériel végétal finement haché et à laisser tremper cette matière pour extraire les principes actifs. La lixiviation (ou percolation) est une autre technique d'extraction consistant en un écoulement lent et régulier du solvant à travers la plante préalablement humectée par le solvant. L'extraction au Soxhlet est également une technique d'extraction intéressante puisqu'elle permet d'épuiser la matière végétale par passages successifs du solvant fraîchement distillé au cours du procédé ; l'extrait s'enrichissant en composés jusqu'à ce que l'extraction soit complète [87].

Ces différentes méthodes sont simples à mettre en œuvre, performantes et peu coûteuses, étant donné que l'équipement nécessaire est réduit au minimum. Cependant, elles présentent quelques inconvénients : toxicité des solvants, temps d'extraction souvent longs, nécessité d'utiliser des solvants purs (coûts afférents), nécessité d'évaporer de grandes quantités de solvants, risque de décomposition thermique des composés thermolabiles [87].

### *B. Techniques d'éco-extraction*

La prise de conscience globale de l'urgence de préserver l'environnement engendre de nouveaux défis dans tous les domaines et le secteur de la cosmétique ne fait pas exception. Le concept de « chimie verte » a été introduit au début des années 1990 afin de « *concevoir des produits et des procédés chimiques permettant de réduire ou d'éliminer l'utilisation et la synthèse de substances dangereuses* ». Développé selon 12 principes, il donne les lignes directrices pour la conception de nouveaux procédés ou l'amélioration des procédés existants [111, 112]. Afin de pallier à certains inconvénients inhérents aux techniques conventionnelles présentées précédemment, de nouvelles techniques dites d'éco-extraction ont été développées selon deux grandes approches : le développement de procédés d'extraction innovants impliquant une réduction de la consommation énergétique ainsi que des volumes de solvants nécessaires, et l'utilisation de solvants alternatifs et de ressources végétales renouvelables [87, 113].

L'extraction par solvants organiques volatils est la technique la plus utilisée dans le domaine de l'extraction de substances naturelles [88]. Bien qu'étant très efficace pour extraire les composés d'intérêt, l'utilisation de ces solvants est de plus en plus décriée en raison de leur impact sur l'environnement (inflammabilité, toxicité, volatilité, etc.). Soumis à une réglementation toujours plus contraignante, des solvants alternatifs issus de la biomasse et plus respectueux de l'environnement, sont davantage utilisés pour réaliser ces extractions et ainsi développer des actifs cosmétiques plus naturels [52, 88]. Biodégradables, non toxiques, généralement non-inflammables et caractérisés par un fort pouvoir solvant, ils présentent cependant certaines limites, notamment leur forte viscosité, leur haut point d'ébullition, la

génération d'odeurs désagréables ou encore leur prix [52]. Parmi eux, on retrouve les agrosolvants, issus de la filière céréalière/sucrière (sorbitol, etc.) et notamment le bioéthanol (complètement biodégradable) qui est le plus fréquemment utilisé mais qui pose des problèmes d'explosivité ou d'inflammabilité. Les huiles végétales et le glycérol, co-produit de la transestérification des huiles végétales, bien qu'étant des ingrédients cosmétiques à part entière, sont également utilisés dans le secteur cosmétique comme solvants de macération. Les extraits obtenus à l'aide de ces huiles végétales constituent des macérats huileux bioactifs aux propriétés émoullissantes et adoucissantes pouvant ainsi être introduits directement dans une formulation cosmétique.

L'extraction par fluide supercritique, en particulier le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), est une technique utilisée pour l'obtention d'ingrédients pour les fragrances et les cosmétiques sans trace de solvant. A pression et température supérieures à 74 bar et 31 °C, le CO<sub>2</sub> se trouve dans un état dit « supercritique », caractérisé par une viscosité proche de celle d'un gaz, une densité proche de celle d'un liquide et une forte diffusivité, permettant l'extraction de composés de faible polarité et/ou de faible poids moléculaire [88]. Le CO<sub>2</sub>, solvant non toxique, est éliminé sous forme de gaz en fin d'extraction par simple retour à pression atmosphérique et peut même, dans une certaine mesure, être recyclé [114]. L'inconvénient majeur de cette technique étant le coût associé à l'achat de l'équipement [52]. Cette technique d'extraction a par exemple été utilisée pour l'extraction des polyphénols de cerises douces (*Prunus avium* L.) [115].

L'extraction à l'eau chaude pressurisée ou sub-critique est une méthode permettant l'extraction de composés de polarités faible et moyenne, par l'eau portée à haute température et maintenue sous pression contrôlée [114]. A des températures comprises entre 100 et 374 °C, et sous des pressions maintenues entre 10 et 60 bars, l'eau sous forme liquide devient un solvant moins polaire de par sa constance diélectrique qui diminue, lui permettant ainsi de dissoudre de nombreux métabolites habituellement extraits par des alcools [52, 114]. Dans ces conditions, la viscosité de l'eau diminue alors que sa diffusivité augmente, ce qui lui permet de pénétrer plus facilement dans la matrice végétale. Cette technique présente l'avantage d'utiliser un solvant non toxique et recyclable, tout en présentant un rendement d'extraction intéressant [114]. Cependant, la température de l'eau très élevée sous cette forme (supérieures à 100 °C) peut entraîner la dégradation de certains composés thermosensibles [93]. Cette technique a par exemple été utilisée pour améliorer l'extraction des composés aux propriétés antioxydantes du romarin (*Rosmarinus officinalis* L.), tels que les diterpènes et les flavonoïdes [114].

Les liquides ioniques comptent également parmi les solvants alternatifs en raison de leur pouvoir solvant, leurs stabilités thermique et chimique, leur non-volatilité et leur non-inflammabilité [52]. Cependant, leur utilisation est remise en question en raison de leur faible biodégradabilité et leur toxicité avérée [52, 94]. Ils sont par ailleurs fortement visqueux et par conséquent, difficiles à éliminer après extraction. A titre d'exemple, les liquides ioniques se sont révélés particulièrement efficaces pour extraire sélectivement l'artémisinine à partir des parties aériennes de l'armoise annuelle (*Artemisia annua* L.) [52].

Des technologies d'extraction ont également été développées en vue d'obtenir des actifs cosmétiques plus « verts » en réduisant, voire en supprimant l'utilisation de solvant lors de l'extraction [52]. Les ultra-sons appliqués à l'extraction et à l'hydrodistillation permettent d'améliorer l'efficacité de l'extraction tout en accélérant la vitesse d'extraction des composés en solution [52]. Cette méthode d'activation repose sur le phénomène de cavitation : les ultra-sons induisent la formation de bulles microscopiques dans le mélange, qui croissent jusqu'à devenir instables. Leur implosion induit des températures et des pressions élevées dans le milieu, qui favorisent la rupture des membranes cellulaires, et ainsi l'extraction des composés. Réalisée à plus faible température que les techniques d'extraction traditionnelles, l'extraction assistée par ultra-sons permet d'extraire des composés thermosensibles et de réduire l'énergie utilisée lors de l'extraction [88]. Une étape d'optimisation des paramètres tels que la température, la durée ou la fréquence des ultra-sons, est en revanche nécessaire. Cette technique d'activation a par exemple été utilisée pour extraire les polyphénols des parties aériennes du thym serpolet (*Thymus serpyllum* L.) [116].

Les micro-ondes sont également exploitées en éco-extraction, notamment à travers des techniques telles que l'extraction par solvant assistée par micro-ondes, la distillation par micro-ondes ou encore l'extraction par micro-ondes combinant l'hydrodiffusion et la gravité [88]. Les micro-ondes induisent de manière localisée un stress thermique et de fortes pressions qui favorisent la rupture plus rapide des membranes cellulaires végétales, accélérant ainsi le transfert de matière et la diffusion des métabolites dans le solvant environnant. A rendements comparables aux méthodes traditionnelles, elles présentent donc de multiples avantages : durée d'extraction réduite, diminution de la quantité de solvant et d'énergie nécessaires [88]. L'extraction activée par micro-ondes a par exemple permis d'améliorer l'extraction des polyphénols des pépins de raisins (*Vitis vinifera* L.) [117].

#### 1.3.2.4.2. Techniques de séparation et de concentration

Une fois l'extraction terminée, une étape de séparation de la matière végétale et du solvant est nécessaire afin de récupérer un extrait homogène [88]. La décantation et la centrifugation sont deux opérations de séparation mécanique reposant sur la différence de densité du liquide et des débris végétaux. La décantation consiste à laisser le matériel végétal, maintenu en suspension lors de l'extraction, tomber au fond du récipient sous l'action de la gravité. La centrifugation permet quant à elle, cette séparation par action de la force centrifuge : les particules, plus lourdes, forment un culot et le surnageant récupéré peut être déposé sur un filtre de porosité sélectionnée afin de séparer physiquement les débris végétaux restants, du liquide.

Une fois les résidus végétaux ôtés, le solvant peut être éliminé ou non, le plus souvent par évaporation sous pression réduite. Lorsque le solvant est évaporé, l'extrait résultant, généralement nommé « extrait sec », se trouve sous la forme d'une pâte plus ou moins visqueuse, selon sa composition [96]. Pour éviter la dégradation des produits thermosensibles, des procédés membranaires tels que l'ultrafiltration, la nanofiltration ou l'osmose inverse

peuvent être utilisés afin de concentrer les extraits. L'extrait ainsi obtenu par simple filtration se présente sous forme liquide.

#### 1.3.2.4.3. Formulabilité des extraits

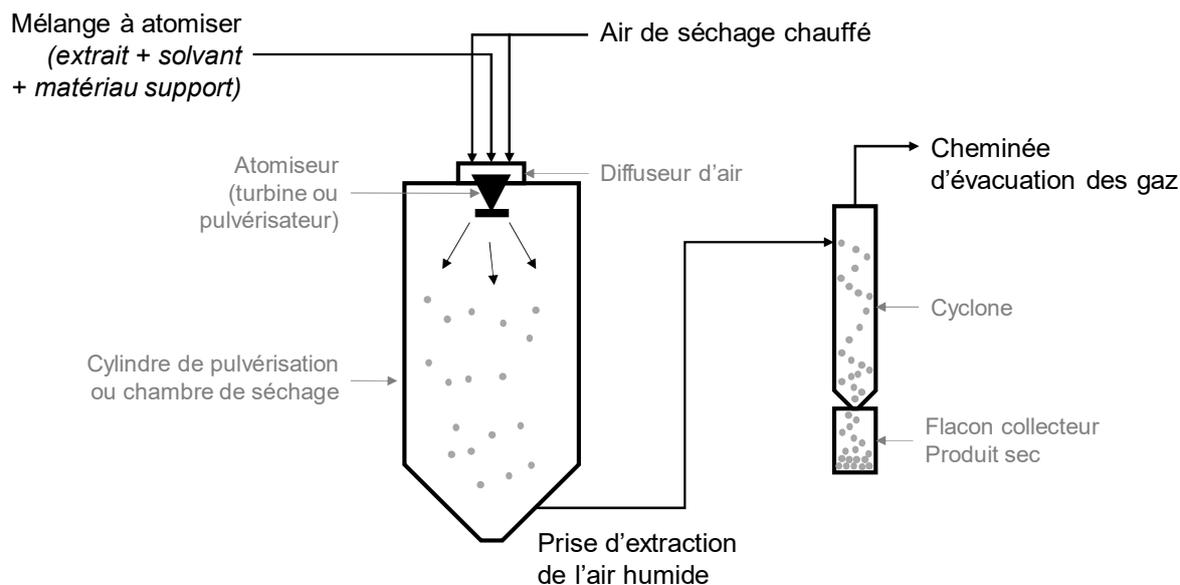
Si les extraits liquides sont directement incorporables à une formule cosmétique, la forme pâteuse de l'extrait sec le rend difficilement formulable (difficultés de prélèvement, de solubilité, hétérogénéité, etc.). Une étape de mise sur support liquide ou solide est alors nécessaire afin de faciliter son incorporation dans la formule cosmétique, selon le type de produit fini souhaité.

La mise sur support liquide consiste à diluer cet extrait sec dans un solvant compatible avec un usage cosmétique tel que le propylène glycol, la glycérine, l'eau ou bien différentes huiles végétales.

La mise sur support solide est quant à elle plus complexe, et nécessite parfois un équipement particulier afin d'adsorber l'extrait sur un support solide qui peut être de nature variée (polysaccharide, silice, amidon, méthylcellulose, etc.). De nombreuses techniques d'adsorption, reposant sur différents types de procédés, permettent cette mise sur support : le procédé peut être chimique (cas de la polymérisation en émulsion), physico-chimique (cas de l'évaporation du solvant) ou physico-mécanique (cas de l'atomisation par exemple) [118].

Le dépôt sur support solide par évaporation du solvant est utilisé en raison de sa facilité de mise en œuvre et de la possibilité d'utiliser différents types de support, hydrophiles ou lipophiles [118]. Cependant, l'extrait sous forme solide ainsi obtenu à l'aide d'un évaporateur rotatif n'est pas homogène.

L'atomisation est un procédé physico-mécanique qui permet également d'adsorber les extraits naturels sur un matériau support, qui présente l'avantage d'obtenir une poudre homogène lorsque les paramètres d'atomisation sont optimisés [118, 119]. Elle consiste à pulvériser un liquide à l'aide d'un flux d'air chaud, sous forme de fines gouttelettes qui sont ensuite séchées dans le cylindre de pulvérisation. La pulvérisation peut se faire au moyen d'un atomiseur pneumatique, d'une buse (à pression, à fluide ou sonique) ou d'un disque rotatif conduisant à l'obtention de microsphères solides précipitées (Figure 5) [118].



**Figure 5** : Processus d'atomisation (d'après Casanova *et al.* [118])

Le liquide à pulvériser contient l'extrait à atomiser et le matériau support, dissouts dans un solvant. L'eau est le solvant le plus couramment utilisé mais il est possible d'utiliser un solvant organique afin de favoriser la dissolution de l'extrait. Une large gamme de matériaux supports peut être utilisée : les polysaccharides (maltodextrine, amidon, sucrose, gomme arabique, etc.), les protéines (gélatine, caséine, etc.) ou encore les polymères synthétiques (polymère acrylique, etc.) sont particulièrement employés dans le domaine des cosmétiques [118]. Les matériaux inorganiques tels que le silicate ou les argiles peuvent également être utilisés. Le choix de ce matériau dépend principalement du type de produit fini dans lequel l'ingrédient sera incorporé. La maltodextrine est le polysaccharide couramment utilisé pour l'atomisation des extraits naturels, en raison de sa grande solubilité dans l'eau, de sa faible viscosité [118] ainsi que de sa capacité à former des émulsions stables [120]. Elle influe positivement sur la stabilité de l'ingrédient et diminue les risques d'agglomération de celui-ci pouvant apparaître durant son stockage [119]. Cependant, il faut veiller à utiliser la quantité minimale nécessaire de ce matériau support afin d'éviter de réduire les activités biologiques de l'ingrédient obtenu, puisque la mise sur support induit en quelque sorte une « dilution » de l'extrait [118].

La qualité du produit final et le rendement d'atomisation dépendent de la nature du matériau support, mais également des conditions d'atomisation. Ces dernières influent sur la morphologie de la poudre (taille des particules) et son taux d'humidité, deux paramètres pouvant impacter la solubilisation de l'ingrédient dans le produit fini. La température de l'air en entrée du cylindre de pulvérisation, le débit de ce flux d'air, l'aspiration, l'humidité du gaz de séchage, la concentration totale de solide (extrait + matériau support) dans le liquide à pulvériser, le ratio massique extrait/matériau support ou encore le solvant utilisé pour dissoudre le solide sont autant de paramètres à optimiser pour obtenir une poudre de qualité [119].

#### 1.3.2.4.4. Méthodes d'analyse

Les extraits naturels sont constitués d'une multitude de composés de polarités différentes. La complexité de ces extraits implique la nécessité de techniques de séparation efficaces afin d'identifier et caractériser les différentes molécules d'intérêt [121]. Il existe de nombreuses techniques pour analyser les composés, parmi lesquelles la chromatographie liquide haute performance (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC), la chromatographie gazeuse (*Gas Chromatography* - GC) et la chromatographie sur couche mince (CCM) ou chromatographie sur couche mince à haute performance (*High Performance Thin Layer Chromatography* - HPTLC) sont les plus utilisées dans le domaine des produits naturels [54, 122]. Elles reposent toutes sur l'affinité des métabolites entre deux phases non miscibles solides, liquides ou gazeuses. Le mélange de molécules retenu sur la phase stationnaire est séparé progressivement par élution grâce à la phase mobile. Cette séparation repose sur des interactions de différentes natures, telles que les interactions d'adsorption (interactions solide-liquide), ou de partition (interactions liquide-liquide), ou sur des différences de poids moléculaire [88, 123, 124]. L'efficacité de séparation des composés dépend ainsi du choix de ces phases stationnaire et mobile [124]. Ces différentes techniques de séparation et d'analyse permettent d'obtenir l'empreinte chromatographique de l'extrait [110]. La comparaison du profil chromatographique, caractéristique de l'extrait, avec les données disponibles dans la littérature, peut permettre d'identifier certaines familles de composés et de prédire certaines propriétés de l'extrait [110]. Lorsque l'extrait est très complexe, il est intéressant de combiner différentes techniques analytiques reposant sur des principes de séparation différents, afin de caractériser au mieux les composés présents [125]. Ces techniques sont également efficaces pour authentifier une plante et s'affranchir d'éventuelles adultérations [125].

La chromatographie de partage est une chromatographie liquide-liquide reposant sur l'affinité des solutés entre deux liquides non miscibles, l'un constituant la phase stationnaire, l'autre la phase mobile. Selon leur coefficient de partage entre ces deux phases, les molécules vont migrer plus ou moins rapidement dans l'une des deux [88].

La chromatographie d'adsorption ou chromatographie solide-liquide repose sur les interactions entre les composés à la surface du solide et les molécules du mélange, qui peuvent être de différentes natures : forces de Van der Waals, interactions dipôle-dipôle ou liaisons hydrogènes [123]. La phase stationnaire, composée d'une substance adsorbante (alumine, gel de silice, cellulose, etc.), permet des interactions intermoléculaires avec les composés du mélange à séparer. La phase mobile influe sur la rétention des composés par sa force éluante. Les composés à séparer sont donc soumis à une force de rétention exercée par la phase stationnaire et une force d'entraînement due à la phase mobile ; ils vont migrer différemment selon leur polarité, et être ainsi séparés [88]. La modification de la force éluante au cours du temps permet une variation de la sélectivité pour les molécules présentant des surfaces très différentes : elle est particulièrement efficace pour la séparation des isomères de position et des molécules présentant des groupements fonctionnels polaires différents [126].

## A. Chromatographie liquide haute performance

L'HPLC est une des techniques les plus utilisées pour la séparation et l'étude de composés non volatils et thermosensibles tels que les acides aminés, les sucres, les lipides, les acides nucléiques, les protéines, les stéroïdes, etc. [124]. Elle repose sur le partage différentiel des molécules à séparer entre une phase mobile liquide et une phase stationnaire solide. Cette phase stationnaire peut être polaire ou apolaire : on distingue alors l'HPLC en phase normale utilisée principalement pour la séparation des composés hydrophobes, de l'HPLC en phase inverse, utilisée pour la séparation des composés hydrophiles. Les composés trop hydrophiles pour être séparés efficacement en phase inverse, peuvent être séparés sur phase HILIC (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*), un mode de chromatographie à la frontière entre la phase inverse et la phase normale. L'hydrophobicité/hydrophilie recherchée de la phase mobile est obtenue par un mélange de solvants, souvent binaire, dans des proportions choisies, selon le mode de chromatographie sélectionné. On parle de mode isocratique, si la composition de la phase mobile n'est pas modifiée au cours du temps, et de mode gradient si les proportions relatives des solvants en présence varient [126].

Les colonnes les plus utilisées pour l'étude des extraits naturels sont les colonnes en phase inverse C18, de longueur comprise entre 150 et 250 mm constituées d'un gel de silice greffé de groupements octadécyle et dont la granulométrie est comprise entre 4 et 5  $\mu\text{m}$  [54]. Des colonnes constituées de phases greffées avec des groupements alkyles C4, C6, C8, phényle ou encore cyano sont également utilisées pour ce type d'étude [126]. Les phases mobiles sont principalement des mélanges eau-méthanol ou eau-acétonitrile, qui peuvent être acidifiés (acide formique, acide acétique, etc.) afin d'obtenir une meilleure résolution de pics. D'autres solvants hydrophiles tels que le propanol, l'éthanol, le dioxane ou le tétrahydrofur peuvent également être utilisés comme phase mobile [126].

La chromatographie en phase inverse repose sur des interactions hydrophobes : les composés hydrophobes, retenus sur la phase stationnaire, sont élués lorsque la phase mobile présente une hydrophobicité suffisante pour les entraîner avec elle. Le gradient d'éluion utilisé est constitué de solvants de polarité décroissante [121]. Une fois les composés séparés, ils sont détectés grâce à un ou plusieurs détecteurs en sortie de la colonne. En fonction du type de détecteur utilisé, il est possible d'obtenir des informations sur la nature des composés présents dans l'extrait, voire même de les identifier.

La détection par absorbance dans l'UV-visible est possible grâce à un détecteur UV ou un détecteur à barrette de diodes (*Diode Array Detection* - DAD). Elle repose sur la capacité des molécules à absorber des radiations électromagnétiques de longueurs d'onde du domaine de l'UV-visible (entre 200 et 900 nm) [121]. Elle est particulièrement adaptée pour l'analyse des chromophores (composés possédant des insaturations) [127]. Ce type de détection, rapide, sensible et quantitative [121], s'avère cependant limité pour l'analyse de certains composés présentant une faible absorbance (saponines par exemple) [125]. Le DAD est un détecteur combinant des diodes au tungstène ou au deutérium en réseau qui permet une meilleure résolution des spectres UV.

Le détecteur évaporatif par diffusion de lumière (DEDL) est un détecteur dit universel, particulièrement intéressant pour l'analyse des composés non volatils [121]. L'échantillon est vaporisé à l'entrée d'un tube permettant l'évaporation du solvant. Les molécules non volatiles, en entrant dans le tube, vont disperser la lumière passant dans ce dernier et induire un signal proportionnel à leur abondance dans le mélange [121]. Le DEDL est compatible avec tout type de solvant volatil et est aussi sensible que l'UV, mais il n'est pas utilisable pour la détection des composés volatils.

Le couplage de l'HPLC à un spectromètre de masse (*Mass Spectrometry* - MS) ou spectromètre de masse haute résolution (*High Resolution Mass Spectrometry* – HRMS) permet d'obtenir la masse molaire (exacte dans le cas de la HRMS) des molécules présentes dans un extrait, ainsi que leurs fragmentations [121]. La spectrométrie de masse repose sur la capacité d'ionisation des molécules contenues dans le mélange grâce à différentes sources d'ionisation. Les molécules organiques, par application d'une énergie d'ionisation, sont converties en ions très énergétiques. On observe alors une fragmentation des molécules qui dépend de l'énergie fournie à l'ion pour dépasser l'énergie de liaison et induire la formation d'ions fragments qui seront visibles sur un spectre en fonction de l'analyseur utilisé. Le spectre de masse obtenu est une visualisation de l'abondance relative de ces ions par rapport à leurs rapports masse/charge, selon deux modes positif ou négatif. Ce type de détection permet d'apporter des informations significatives sur la structure des molécules ionisées dans les conditions de l'étude. En revanche, plusieurs composés (notamment les isomères) peuvent présenter une même fragmentation, et ces données ne sont donc pas suffisantes pour les discriminer. Bien que certaines bibliothèques de spectres existent, les conditions analytiques non standardisées ne facilitent pas l'identification de ces composés par cette technique.

D'autres détecteurs sont également utilisés pour l'étude des composés présents dans les extraits naturels [121]. Le détecteur électrochimique repose sur la capacité des substances à être réduites ou oxydées par l'application d'une tension alternative ou spécifique. Le détecteur par fluorescence repose sur la mesure de la fluorescence des composés présents dans un mélange. Ce type de détection est plus sensible que la détection UV mais reste spécifique.

L'HPLC associée à un ou plusieurs détecteurs adaptés est donc particulièrement intéressante pour l'étude des composés non volatils majoritaires dans les extraits naturels. Elle présente en revanche quelques inconvénients : prix des colonnes, utilisation conséquente de solvants. L'optimisation des conditions de séparation peut également s'avérer fastidieuse : il s'agit de trouver le bon compromis entre une résolution de pics suffisante, et les contraintes pratiques que sont la durée de la séparation, la perte de charge, la détectabilité des composés, etc. [126].

### *B. Chromatographie gazeuse*

La GC est employée pour l'analyse et l'identification des composés facilement volatilissables par nature ou après une étape de dérivation [128]. Les composés du mélange à séparer sont vaporisés avant d'entrer dans la colonne et transportés par la phase mobile gazeuse (les gaz utilisés étant l'hélium, l'hydrogène et l'azote). Lorsque la phase stationnaire liquide est

immobilisée sur un support inerte et que celui-ci est une colonne tubulaire ouverte de diamètre interne inférieur à 1 mm, on parle de colonne capillaire. Les métabolites se séparent en fonction de leur affinité avec chacune des phases, ceux présentant le plus d'affinité avec la phase liquide étant davantage retenus par la colonne [123]. La GC est une méthode de séparation sensible et efficace, même pour les composés présents à l'état de traces [128].

Différents types de détecteurs universels ou spécifiques, sont utilisés pour l'identification des composés séparés par GC. Parmi les détecteurs universels, c'est-à-dire pratiquement sensibles à tous les composés, le détecteur à ionisation de flamme (FID) et le spectromètre de masse sont très utilisés dans le domaine des substances naturelles. La GC-MS permet l'identification simple et rapide des molécules grâce à l'utilisation de banques de données de spectres de masse (Nist, Wiley, etc.) compilées grâce à des conditions d'ionisation standardisées (à condition que la molécule soit présente dans ces bases). Un indice de rétention (RI) peut être calculé pour chaque composé détecté, par interpolation logarithmique à partir des temps de rétention d'une série d'alcane analysés dans les mêmes conditions et qui servent de référence. Ces indices de rétention apportent des informations plus fiables que les temps de rétention qui sont dépendants des conditions expérimentales (nature de la phase stationnaire, programme de température, etc.) [128].

### C. Chromatographie sur couche mince à haute performance

La CCM et l'HPTLC sont des techniques particulièrement intéressantes pour identifier les familles de composés présentes dans un extrait. La phase mobile (mélange de solvants organiques) migre à travers la phase stationnaire qui est généralement une plaque de verre recouverte d'une substance adsorbante telle que l'alumine, un gel de silice ou la cellulose [124]. Les composés déposés sur la plaque sont entraînés par capillarité par la phase éluante ; ils vont migrer plus ou moins rapidement en fonction de leurs interactions avec les deux phases. Le choix de la phase mobile est donc essentiel pour séparer au mieux les composés présents dans les extraits à analyser (Tableau 5).

**Tableau 5** : Phases mobiles utilisées selon la nature des composés à séparer [129]

Types de composés	Phase mobile
Composés polaires	Acétate d'éthyle/eau/méthanol (100/13,5/10 v/v/v)
Flavonoïdes	Acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique glacial/eau (100/11/11/26 v/v/v/v)
Terpènes	Chloroforme/méthanol/eau (65/25/4 v/v/v)
Triterpènes	Toluène/chloroforme/éthanol (40/40/10 v/v/v)

Lorsque les composés sont colorés ou absorbent sous radiation UV, aucun traitement de visualisation n'est nécessaire, ils sont détectés à la lumière blanche ou à l'aide de lampes UV émettant à 254 nm et 366 nm [129]. Pour les autres composés, une révélation par dérivation est possible : elle consiste à immerger la plaque ou la vaporiser à l'aide d'un réactif chimique. De nombreux révélateurs sont utilisés pour mettre en évidence les composés présents dans les extraits naturels, donnant une coloration spécifique des bandes en fonction de la nature

des composés présents (Tableau 6) [129, 130]. Plusieurs révélations peuvent être combinées afin d'augmenter le nombre de classes de composés détectés sur la même plaque.

**Tableau 6 :** Principaux révélateurs utilisés pour l'analyse des extraits naturels

Révélateur	Composés chimiques	Révélation	Couleurs	Références
Réactif de Dragendorff	Alcaloïdes	Lumière blanche	Brun-rouge	[129]
Réactif de Neu	Flavonoïdes, polyphénols	366 nm	Dérivés d'acide caféique : jaune verdâtre ; flavones, flavonols : jaune à orange vif ; flavonones : rouge orangé ; acides phénoliques, coumarines : bleu	[130, 131]
PEG 400	Flavonoïdes (et leur glycosides)	366 nm	Quercétine, myricétine : jaune orangé ; lutéoline : orange ; kaempférol, isorhamnétique, apigénine : jaune verdâtre	[130]
Ninhydrine	Acides aminés, peptides et amines	Lumière blanche	Jaune, marron à rose et violet	[129, 130]
Orcinol - acide sulfurique	Glucides	Lumière blanche	Marron à violet	[132]
Diphénylamine – aniline - acide phosphorique (DAPA)	Glucides	Lumière blanche	Disaccharides : brun-vert pâle ; aldohexoses : bleu-gris ; cétohexoses : brun-rouge	[133–135]
<i>p</i> -Anisaldéhyde - acide sulfurique	Composés non polaires	Lumière blanche	Monoterpènes : bleu ; triterpènes : violet ; stéroïdes : gris	[136]
Sel Fast blue B (Chlorure de di- <i>o</i> -anisidinetétrazolium)	Proanthocyanidines, alcaloïdes	Lumière blanche ; 254 nm	Proanthocyanidines : rouge ; alcaloïdes : noir (254 nm)	[137]

La mesure du rapport frontal permet d'identifier les composés présents [124], et la lecture du chromatogramme par un densitomètre permet de les quantifier, et ce de manière aussi précise que par HPLC [129]. L'HPTLC est donc particulièrement intéressante pour l'étude des composés naturels puisqu'elle permet d'analyser plusieurs extraits en parallèle et d'identifier les familles de composés présentes grâce à l'utilisation de différents révélateurs et phases mobiles.

#### *D. Autres techniques chromatographiques*

De nombreuses autres techniques chromatographiques reposant sur différents phénomènes de séparation, sont également intéressantes pour l'étude des composés naturels [124].

La chromatographie à échange d'ions permet la séparation des composés en fonction de leur charge nette : ceux-ci migrent à travers la matrice chargée selon leur capacité à former des liaisons ioniques avec cette dernière (la charge de la matrice devant être opposée à celle des composés à séparer) [124, 138]. On distingue la chromatographie échangeuse d'anions,

lorsque la phase stationnaire est chargée positivement, de la chromatographie échangeuse de cations, lorsque la phase stationnaire est chargée négativement. Les molécules retenues sur la phase stationnaire par ces liaisons ioniques sont éluées à l'aide d'une phase mobile dont la concentration en ions, la nature ou encore le pH varient afin de séparer sélectivement les composés. Cette technique, particulièrement utilisée pour les macromolécules telles que les acides aminés ou les protéines, présente l'avantage d'une forte capacité de rétention, une bonne sélectivité et une résolution intéressante [138].

La chromatographie d'exclusion stérique permet la séparation des molécules en fonction de leurs masses moléculaires et de leurs formes, par migration à travers une phase stationnaire inerte (par exemple, un gel réticulé de dextrane) [124, 139]. Les molécules dont la taille est plus petite que celles des pores de la phase stationnaire, passent à travers ces derniers et sont ainsi ralenties. Les molécules trop grosses pour entrer dans ces pores vont migrer plus rapidement en passant entre ces particules [139]. L'éluion des macromolécules retenues dans les pores est possible grâce à une phase mobile dont la concentration de sels en solution varie (solution tampon). Cette technique de séparation est particulièrement intéressante pour déterminer le poids moléculaire des composés séparés. Cependant, elle n'est pas sélective pour les composés dont les caractéristiques sont proches.

La caractérisation des extraits naturels est donc possible en combinant différentes techniques d'analyse présentant chacune ses particularités, afin d'obtenir des informations complémentaires sur la composition de l'extrait.

#### 1.3.2.4.5. Techniques de séparation et d'isolement

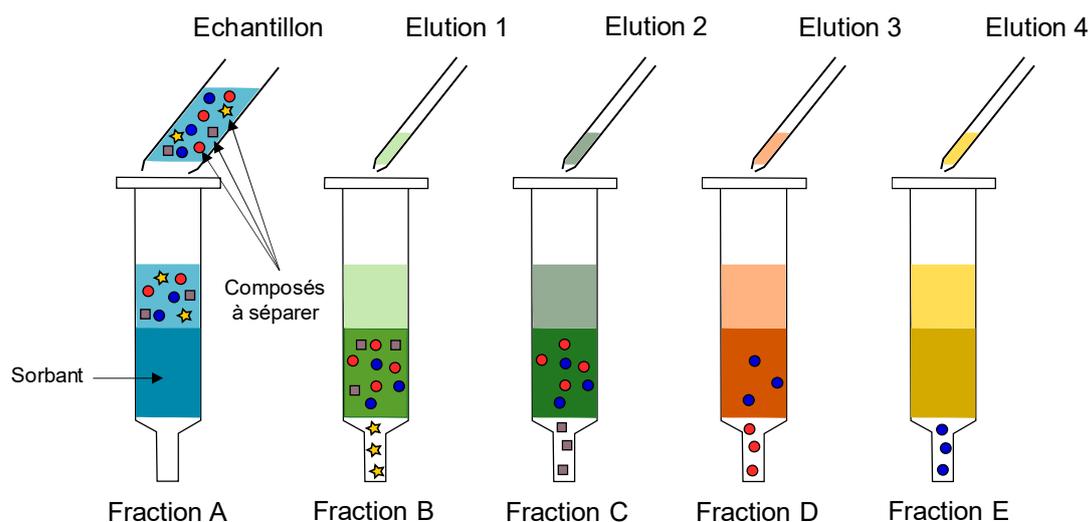
Afin d'approfondir la caractérisation phytochimique des extraits naturels et d'identifier de nouveaux composés, des étapes de séparation et d'isolement sont nécessaires. La complexité des extraits naturels impose parfois le retrait de certains composés, afin de concentrer les extraits de manière artificielle en composés d'intérêt (dans le cas présent, il s'agit de composés présentant potentiellement des activités intéressantes pour des applications cosmétiques) afin de les isoler dans un second temps pour en faciliter l'identification [140]. Les composés de l'extrait brut peuvent ainsi être séparés en différentes fractions, principalement selon leur polarité ou leur taille, à l'aide de techniques de séparation telles que l'extraction liquide-liquide, la chromatographie sur colonne ouverte, la chromatographie flash, l'extraction sur phase solide (*Solid Phase Extraction* - SPE), l'HPLC semi-préparative ou encore la chromatographie de partage centrifuge (CPC) [140].

L'extraction liquide-liquide est une technique séparative reposant sur la différence de solubilité des composés d'un mélange (ici, l'extrait brut) dans deux phases liquides non miscibles [141]. Le mélange des deux phases est réalisé par agitation afin de faciliter la diffusion des composés à séparer vers l'une ou l'autre de ces phases. Après un certain temps, l'équilibre de partage entre les deux phases est atteint. L'efficacité de cette séparation est déterminée par le coefficient de partage des composés : les composés à séparer se répartissent dans ces deux

phases dans des proportions définies qui dépendent de leur coefficient de partage entre ces phases [142]. L'extraction d'un composé sera d'autant plus efficace que son coefficient de partage est grand.

La chromatographie sur colonne ouverte repose sur le principe de la chromatographie d'adsorption [140]. La phase stationnaire, principalement de la silice ou de la silice greffée C18, est placée dans une colonne ouverte à travers laquelle différents solvants/mélanges de solvants de polarités différentes sont élués. L'extrait à séparer est placé en tête de la colonne, et les molécules constituant le mélange passent au travers de la colonne en fonction de leur polarité et de celle du solvant d'élué. Des fractions de polarités différentes sont alors collectées en sortie de colonne ; elles sont enrichies en composés présentant des affinités avec le solvant d'élué utilisé. Différents solvants tels que l'hexane, l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle, le méthanol ou des mélanges de ces solvants sont principalement utilisés pour l'enrichissement des fractions en composés d'intérêt. Il est possible d'accélérer le débit du solvant élué par application d'une pression au système de séparation. Cette technique appelée chromatographie flash, présente l'avantage de réduire le temps de séparation puisque les composés sont élués plus rapidement avec le solvant [143].

L'extraction sur phase solide (SPE) repose sur le même principe que l'extraction liquide-liquide, à l'exception que le solvant d'extraction est remplacé par une surface solide, à savoir, la phase stationnaire de la cartouche [142]. L'échantillon à extraire est chargé sur la phase stationnaire qui retient les composés en fonction de leurs affinités avec cette dernière (Fraction A, Figure 6). La nature de cette phase, la taille des particules qui la constituent ou encore sa porosité sont autant de paramètres à déterminer selon la nature des composés à extraire [142, 144]. Différents solvants sont élués à travers la phase stationnaire afin de faire migrer les composés retenus. Les fractions obtenues sont concentrées en molécules de polarités similaires, et qui présentent des affinités avec le solvant d'élué (Fractions B, C, D et E, Figure 6).



**Figure 6 :** Principe de la SPE pour la concentration des fractions en composés d'intérêt

En fonction de l'échantillon à concentrer/séparer, des solvants d'élué choisis et de la phase stationnaire, la SPE peut être employée pour 3 raisons : concentrer l'échantillon en composés

d'intérêt, éliminer des impuretés dans un échantillon ou éliminer la matrice/solvant support de l'échantillon [142]. La concentration de l'échantillon en composés d'intérêt et la purification de l'échantillon reposent sur la capacité de la phase stationnaire à retenir ces composés d'intérêt plutôt que les autres composés. Une étape de rinçage peut être nécessaire afin de faire éluer ces composés retenus par la phase stationnaire entre l'étape de charge de l'échantillon et celle d'élution des composés d'intérêt. Ces derniers sont ensuite recueillis dans les différentes fractions par élution avec des solvants adaptés.

Certains extraits naturels sont obtenus par macération directe de la matière végétale dans des solvants non volatils tels que le propylène glycol. Afin de caractériser ces extraits par les techniques d'analyses usuelles telles que l'HPLC, la GC ou encore l'HPTLC, il est nécessaire d'éliminer ce solvant perturbant les signaux des métabolites. Lors de la charge d'un tel échantillon, le solvant support passe à travers la phase stationnaire sans être retenu (Fraction A, Figure 6). Les composés présents dans l'échantillon sont quant à eux, retenus par la phase stationnaire et sont ensuite élués avec un/des solvants adaptés (Fractions B, C, D et E). Les fractions obtenues sont ainsi concentrées en composés d'intérêt et comme le solvant support a été éliminé, il est possible de les caractériser par des techniques analytiques usuelles.

En plus d'être une méthode de séparation et d'analyse, l'HPLC peut également être une méthode de purification. Il est possible d'isoler des molécules présentes dans un extrait lorsque les conditions de séparation sont optimisées (choix de la phase mobile, débit, détecteur ou encore type de colonne semi-préparative ou préparative, etc.) [110, 142]. Cette technique est généralement utilisée pour isoler des molécules à partir de fractions, plutôt qu'à partir de l'extrait brut. Elle permet d'isoler un composé majoritaire, identifié comme composé d'intérêt, et a pour but sa caractérisation structurale.

La chromatographie de partage centrifuge (CPC) est une technique de chromatographie liquide-liquide reposant sur la différence de partage des composés entre deux phases liquides non miscibles [145]. La colonne CPC peut être représentée par un empilement de disques en acier inoxydable dans lesquels sont gravées des cellules de partage reliées entre elles par des capillaires [146]. Lors de la mise en rotation de la colonne, le champ de force centrifuge maintient la phase stationnaire liquide au sein de la colonne, au travers de laquelle circule la phase mobile ; on obtient alors deux phases, dites légère et dense. Lorsque la phase stationnaire est la plus dense, la phase mobile est pompée à contre sens du champ de force centrifuge ; on parle de CPC en mode ascendant. Dans le cas contraire, on parle de CPC en mode descendant. Différents systèmes de solvants contenant jusqu'à 5 solvants différents peuvent être utilisés lors de la séparation d'extraits naturels [147]. La sélection du système biphasique repose sur les valeurs de coefficients de distributions adaptés à la séparation des molécules cibles. Cette technique présente les avantages liés à la non-utilisation de phase stationnaire solide : pas d'adsorption irréversible des composés, ou de perte de matière, forte capacité de charge, etc. [145]. En revanche, elle présente une faible efficacité de séparation et implique une excellente étanchéité du système afin d'éviter des fuites lors de la mise en rotation.

Le choix de la technique de séparation dépend des composés présents dans l'extrait, ainsi que de l'objectif de la séparation (isolement d'un composé en particulier ou fractionnement).

Hormis la SPE, ces techniques présentent toutes l'inconvénient d'utiliser des quantités de solvants considérables [142].

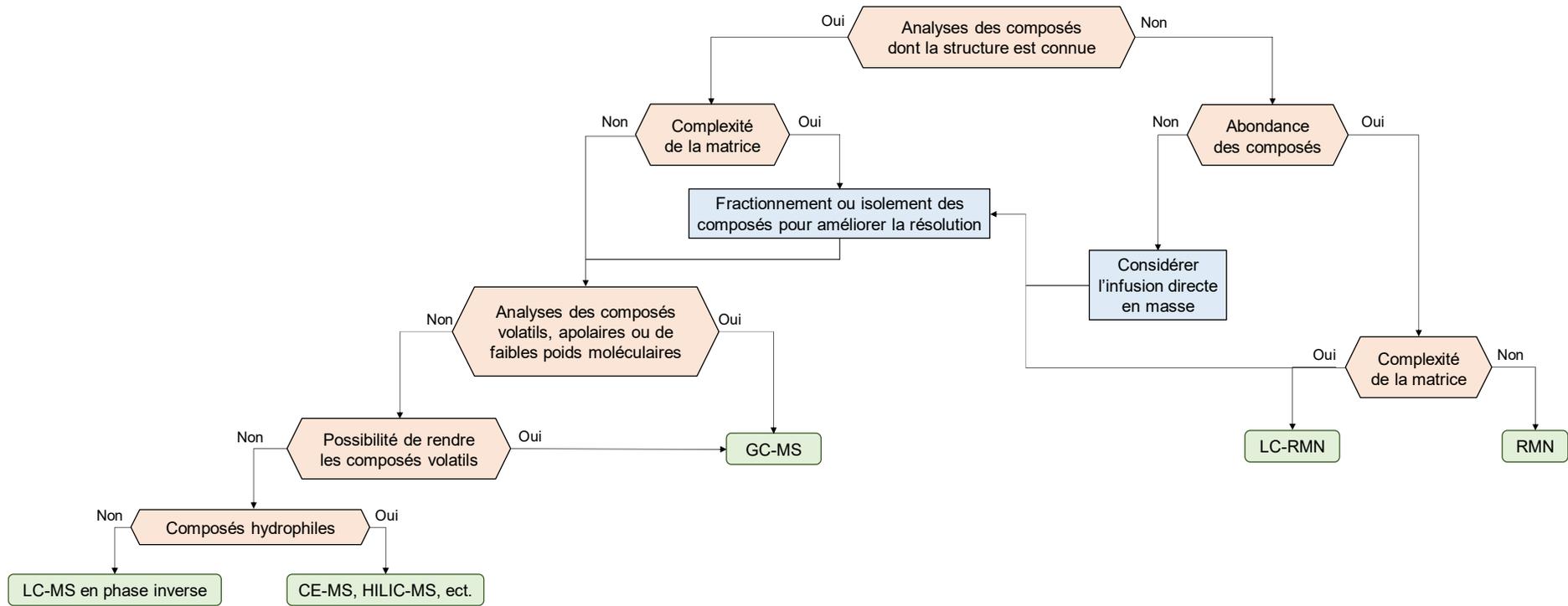
#### 1.3.2.4.6. Techniques de caractérisation structurale

Différentes techniques de caractérisation telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectrométrie de masse ou encore la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) sont ensuite utilisées pour identifier les métabolites isolés d'un extrait [54, 122]. Le choix de ces techniques dépend de la nature des molécules à caractériser, ainsi que du degré de caractérisation souhaité. Le principe de la spectrométrie de masse ayant été développé précédemment, il ne sera pas abordé ici.

La FTIR, technique de spectroscopie vibrationnelle, sert à caractériser et identifier les composés ou groupes fonctionnels (liaisons chimiques) présents dans un extrait, par comparaison avec les données disponibles dans la littérature [110, 127]. Les molécules organiques absorbent le rayonnement infra-rouge auxquelles elles sont soumises, ce qui engendre une variation de leur énergie de vibration. Chaque liaison possédant une fréquence de vibration qui lui est propre, il est possible d'identifier les groupements fonctionnels en présence. Le spectre infra-rouge d'un composé pur est caractéristique de sa structure [110].

La RMN est une technique permettant de caractériser des composés inconnus en se basant sur les propriétés magnétiques de certains noyaux, notamment l'hydrogène et le carbone 13 [127]. A partir des déplacements chimiques et de la multiplicité des signaux obtenus sur les spectres RMN 1D et 2D (couplages H-H courte distance ou longue distance, couplage H-C, etc.), il est possible de déterminer la structure d'une molécule ainsi que sa stéréochimie [148]. Les analyses par RMN peuvent être réalisées sur de très faibles quantités de matière (de l'ordre du milligramme), ce qui représente un avantage considérable pour l'analyse des molécules isolées (notamment par HPLC semi-préparative, une méthodologie souvent fastidieuse). De telles analyses peuvent également être réalisées pour caractériser des mélanges, sans purification préalable [149].

L'analyse des extraits naturels peut donc s'avérer complexe selon le mélange à caractériser et notamment la nature des molécules qu'il contient. Il est essentiel de sélectionner les techniques de séparation et de caractérisation adaptées afin d'optimiser cette étape d'identification des molécules. Pour cela, il est possible d'employer le schéma général de sélection de méthodes d'analyse présenté sur la Figure 7, bien que certains ajustements puissent être nécessaires selon l'extrait et les molécules à analyser.



**Figure 7 :** Sélection des méthodes d'analyse pour l'étude des extraits naturels (d'après Osbourn *et al.* [121])

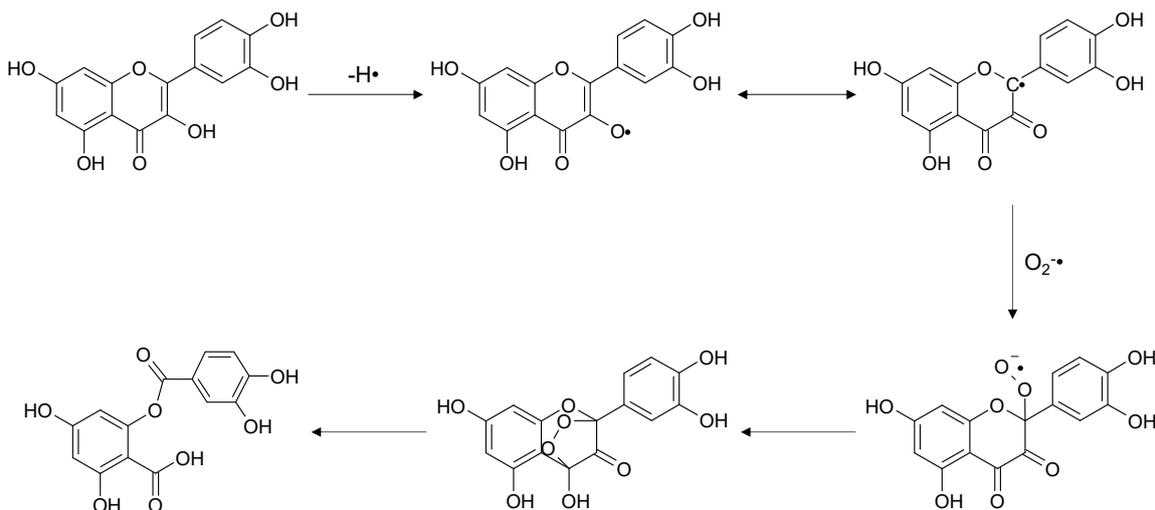
#### 1.3.2.4.7. Evaluation des activités biologiques

Les métabolites secondaires présents dans les matières premières (terpénoïdes, terpènes, composés phénoliques, tanins, saponines, etc. [150]) présentent diverses activités biologiques (antioxydante, anti-inflammatoire, blanchissante, anti-élastase, antifongique, antibactérienne, antimicrobienne, etc.) qui peuvent être valorisées dans différents secteurs, notamment celui de la cosmétique. A l'aide de méthodes d'extraction adaptées, les extraits de plantes, et donc les ingrédients qui seront développés à partir de ces extraits, sont concentrés en métabolites et ce sont ces derniers qui sont responsables des propriétés du produit cosmétique fini.

La capacité des extraits naturels à moduler l'activité de différents facteurs impliqués dans le processus de réparation cutanée a été évaluée dans le cadre de cette étude, à l'aide de tests *in vitro*. Pour cela, le pouvoir antioxydant des extraits naturels a été déterminé à l'aide du test au DPPH. La capacité de ces extraits à inhiber 5 enzymes, à savoir la lipoxygénase (évaluation de leur pouvoir anti-inflammatoire), la tyrosinase (évaluation de leur activité blanchissante), ainsi que l'élastase, la collagénase et la hyaluronidase (évaluation de leur activité anti-âge), a également été testée.

##### A. *Activité antioxydante*

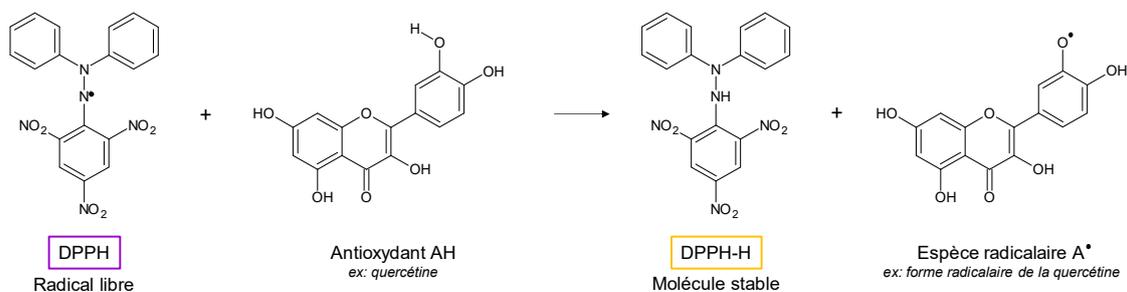
Le stress oxydatif est un des mécanismes majeurs impliqué dans le vieillissement cutané et les affections dermatologiques [54]. Une exposition à des facteurs environnementaux tels que les rayons UV entraîne l'altération des tissus conjonctifs par la formation excessive de peroxydes lipidiques et d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), et impacte l'activité de certaines enzymes, induisant ainsi des problèmes cutanés [151]. Les ERO sont des espèces très toxiques mais essentielles pour la signalisation et la régulation cellulaire. Leur concentration est régulée par le maintien d'un équilibre entre leur production, lors de la réduction de l'oxygène dans le métabolisme normal, et leur élimination par les systèmes antioxydants intrinsèques des cellules d'un organisme [152]. Une rupture de l'homéostasie, traduite par une production excessive d'ERO que les systèmes antioxydants ne peuvent gérer, entraîne l'apparition d'un stress oxydatif non spécifique et irréversible, et notamment la perte de fonctions de certaines molécules biologiques [151, 152]. Les acides aminés, les protéines ou encore les acides gras qui assurent de nombreuses fonctions biologiques, sont des cibles majeures de ces attaques radicalaires menées par les ERO. Les applications topiques de produits présentant un pouvoir antioxydant sont alors préconisées pour prévenir ou combattre ces dommages [151]. De nombreux composés naturels sont des antioxydants efficaces pour lutter contre ces ERO (quinones, composés phénoliques : tanins, acides phénoliques, acides cinnamiques, lignines, stilbènes, flavonoïdes, etc.) [150, 153]. Ils peuvent prévenir les effets de ces radicaux libres en les neutralisant ou en favorisant leur décomposition, et interviennent, selon leur nature, à différents stades des chaînes de réactions oxydatives (Figure 8) [151, 154].



**Figure 8** : Mécanisme d'action anti-radicalaire de la quercétine pour le piégeage d'anion superoxyde [154]

De nombreux tests *in vitro* permettent d'évaluer le pouvoir antioxydant d'un composé ou d'un mélange de molécules : test au DPPH, test ORAC (test de piégeage des radicaux dérivés de l'oxygène), test du piégeage de l'oxyde nitrique, test FRAP (test de réduction du fer), test de décoloration ABTS, etc. [155].

Lors de cette étude, le test au DPPH a été sélectionné pour évaluer l'activité antioxydante des extraits. Il permet de déterminer la capacité de l'extrait à réduire le radical chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH•), par transfert d'un hydrogène sur ce dernier et à former la molécule stable de DPPH-H (Figure 9) [156]. Le DPPH• absorbant majoritairement à 520 nm et le DPPH-H à 330 nm, la réaction est aisément suivie par spectroscopie UV/visible.

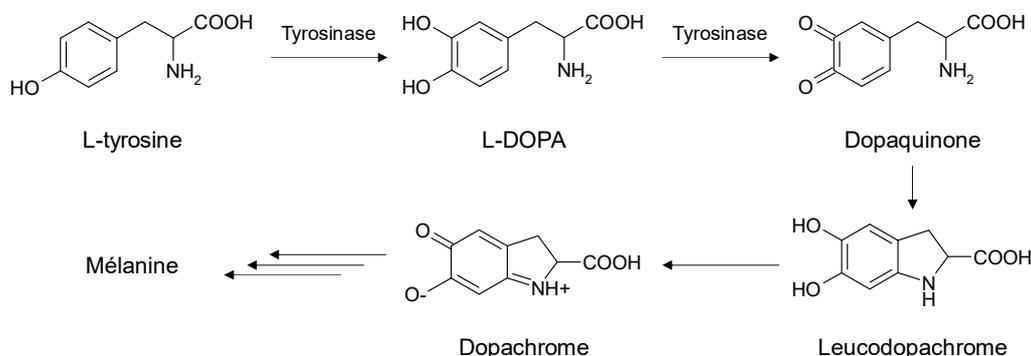


**Figure 9** : Mécanisme réactionnel mis en jeu lors du test au DPPH [155]

### B. Activité blanchissante

La mélanogénèse est le processus physiologique de synthèse des mélanines, les pigments responsables de la coloration de la peau, et qui la protègent des radiations UV (absorption de 50 à 75 % des radiations UV [157]). Ces pigments favorisent également le piégeage des radicaux libres [158]. La mélanine est produite et sécrétée dans les mélanocytes de l'épiderme, et plus particulièrement dans des organites cytoplasmiques spécifiques appelés mélanosomes\*. La biosynthèse de ce biopolymère se fait en deux étapes : l'hydroxylation de la L-tyrosine (dont la concentration dépend de la conversion de l'acide aminé L-phénylalanine par la phénylalanine hydroxylase) en L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) sous l'action de

la tyrosinase, puis oxydation de la L-DOPA en dopaquinone sous l'action de cette même enzyme [158]. La dopaquinone se transforme alors en leucodopachrome, lui-même oxydé en dopachrome qui sera converti *in fine* en mélanine à l'issue d'une série de réactions.



**Figure 10** : Voie de synthèse de la mélanine [151]

La tyrosinase, glycoprotéine de la famille des monooxygénases qui utilise le cuivre comme cofacteur, joue ainsi un rôle clé dans la synthèse de mélanine [159]. Sa synthèse est régulée par le facteur  $\alpha$ -MSH (*alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone*) qui se fixe sur un récepteur spécifique porté par les mélanocytes [158].

Une production ou une distribution anormale de mélanine, sous l'influence de facteurs externes (radiations UV, médicaments, etc.) ou internes (hormones, inflammation, etc.) provoque des effets dermatologiques tels que des mélasmas\* [151]. Des agents blanchissants sont utilisés pour traiter les phénomènes d'hyperpigmentation chez les personnes souffrant de lentigo\* (solaire ou sénile), ou souhaitant réduire les taches de rousseurs ou les taches de naissance [160]. Ces agents blanchissants sont également très utilisés pour traiter des cicatrices, afin d'uniformiser leur apparence et les rendre moins pigmentées [159]. Il existe de nombreuses molécules de synthèse présentant un fort pouvoir blanchissant (corticoïdes, dérivés mercuriens, rétinoïdes, etc.), mais leur utilisation, très controversée, est contrainte par la réglementation européenne [4]. C'est alors qu'est apparue la nécessité d'identifier des alternatives naturelles (molécules ou extraits) à ces actifs blanchissants de synthèse. De nombreux métabolites secondaires possédant un effet dépigmentant ont alors été identifiés par leur capacité à inhiber *in vitro* l'activité de la tyrosinase (acide kojique, arbutine, acide ascorbique, etc.) [160, 161]. La majorité d'entre eux appartiennent à la famille des polyphénols, et notamment des flavonoïdes (pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles) [151, 160].

La tyrosinase est une oxydase qui catalyse les premières étapes limitantes de la mélanogénèse, à savoir l'hydroxylation de la L-tyrosine en L-DOPA (activité monophénolase), puis l'oxydation de celle-ci en dopaquinone (activité diphénolase). Cette dernière est ensuite convertie en leucodopachrome, puis en dopachrome, un composé de couleur rouge quantifiable par spectrophotométrie à 475-480 nm [158, 159].

### C. Activité anti-élastase

L'élastine est une protéine fibreuse structurale responsable de la résistance et de l'élasticité des tissus, en particulier de la peau. L'élastase est l'unique protéase capable de dégrader le réseau de fibres d'élastine du derme [157]. Elle permet également de cliver une large gamme de substrats tels que le collagène, la fibronectine et d'autres protéines de la MEC [162]. Tout comme d'autres MMP, dans des conditions normales, l'élastase est essentielle dans le processus de réparation cutanée afin de dégrader les protéines exogènes [162]. Cependant, une surexpression de l'activité de l'élastase, induite avec l'âge ou suite à une surexposition aux radiations UV ou aux dommages oxydatifs, entraîne l'apparition de rides et le relâchement de la peau. L'utilisation d'ingrédients cosmétiques inhibant l'activité de l'élastase permet donc de prévenir cette perte d'élasticité. De nombreux extraits de plantes renfermant notamment des composés phénoliques (catéchine, épigallocatechine gallate (EGCG), etc.) ou des acides triterpéniques (acides boswelliques, etc.) permettent de réguler l'activité de cette enzyme [162].

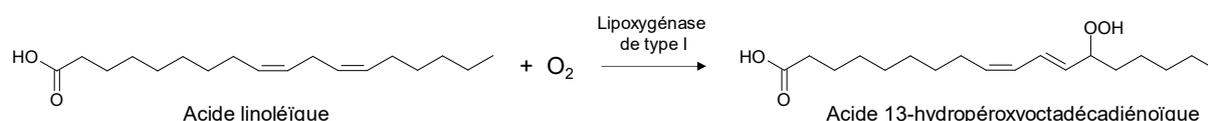


**Figure 11** : Réaction d'hydrolyse du peptide Suc-AAA-pNA par l'élastase

L'élastase présente la particularité de pouvoir hydrolyser une large variété de substrats peptidiques tels que le N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilide (Suc-AAA-pNa). Le clivage de ce substrat par cette enzyme permet la libération du chromophore pNA qui entraîne l'apparition d'une coloration jaune (Figure 11). Par mesure de l'absorbance à 410 nm, il est alors possible de suivre cette hydrolyse et ainsi de déterminer le pouvoir anti-élastase de l'extrait ou du composé [157, 162].

### D. Activité anti-inflammatoire

Comme présenté dans le paragraphe 1.2.2.1, la phase inflammatoire est la première étape à se mettre en place suite à une altération de la structure cutanée. Les lipoxgénases, protéines enzymatiques capables de catalyser la dioxygénation des acides gras polyinsaturés constituant les lipides, sont très impliquées dans ce processus. Elles participent activement à la biosynthèse des leucotriènes\*, principaux médiateurs du processus inflammatoire [163], et jouent un rôle important dans la croissance cellulaire, dans le développement de métastases, ou encore dans l'expression du facteur de croissance TNF (facteur de nécrose tumorale) [164]. Un ingrédient capable de moduler l'activité d'une/des lipoxgénases, est capable d'agir sur la phase inflammatoire du processus de réparation cutanée. Parmi les composés capables de moduler l'activité de ces enzymes, on peut citer les terpènes ou certains esters (salicylate de benzyle, acétate de citronellyle, etc.) [163].



**Figure 12** : Oxydation régiospécifique de l'acide linoléique par la lipoxygénase de type I [165]

La lipoxigénase catalyse l'incorporation régiospécifique et stéréospécifique de dioxygène sur le système pentadiénique d'un acide gras libre polyinsaturé tel que l'acide linoléique, pour générer un hydroperoxyde d'acide gras (Figure 12) [165]. La formation de cet hydroperoxyde peut être suivie par spectrophotométrie UV à 234 nm, et permet de déterminer le pouvoir anti-inflammatoire d'un extrait ou d'un composé [164].

#### E. Activité anti-collagénase

La collagénase (MMP-1) participe à la dégradation des fibres de collagène de types I, II, III, IV et X [162]. Un déséquilibre entre l'expression de cette MMP et de son inhibiteur endogène, en faveur d'une surexpression enzymatique, est observé dans des conditions pathologiques [166]. Il est alors nécessaire de contrôler son activité afin de rétablir un équilibre enzyme/inhibiteur, et de ralentir la destruction de la membrane basale, tout en préservant le collagène responsable de la force tensile de la peau [166–168]. Certains polyphénols tels que la catéchine et l'EGCG sont des inhibiteurs de la collagénase [162, 167].



**Figure 13** : Hydrolyse du FALGPA par la collagénase

L'action de la collagénase sur le collagène peut être déterminée à travers l'hydrolyse du 2-furanacryloyl-L-leucylglycyl-L-prolyl-L-alanine (FALGPA) (Figure 13). Le suivi de cette réaction peut se faire par mesure de l'absorbance qui décroît au cours du temps à 345 nm, proportionnellement à l'hydrolyse du FALGPA [162, 168]. Elle permet ainsi de déterminer le pouvoir anti-collagénase d'un extrait ou d'un composé.

#### F. Activité anti-hyaluronidase

Les acides hyaluroniques font partie de la famille des glycosaminoglycanes présents majoritairement dans la peau (près de la moitié de la teneur en acides hyaluroniques d'un organisme est localisée dans la peau) [169]. Constituants du derme, ils participent à l'hydratation naturelle de la peau grâce à leur forte capacité à retenir l'eau ; ils influent également sur sa tonicité et son élasticité, et jouent un rôle dans la réduction des rides [157]. Ils interviennent dans le processus de réparation cutanée en favorisant la migration et la prolifération cellulaire [170]. Avec l'âge ou sous l'influence de radicaux libres formés suite à l'exposition à des facteurs environnementaux, les acides hyaluroniques sont dégradés sous l'influence des hyaluronidases. Cette dégradation induit la rupture de l'intégrité structurale des tissus et une augmentation de leur perméabilité, et mène *in fine*, au dessèchement de la peau et l'apparition de rides [169]. La balance entre l'anabolisme et le catabolisme des acides hyaluroniques, nécessaire pour une organisation normale des tissus et des fonctions de la MEC, est assurée par les inhibiteurs des hyaluronidases [169, 171]. Un ingrédient cosmétique contenant un inhibiteur des hyaluronidases permet donc de prévenir la dégradation rapide de l'acide hyaluronique dans la MEC [169]. Ces inhibiteurs se présentent sous différentes

formes : protéines, polysaccharides, acides gras, polyphénols (acide tannique, curcumine, etc.), flavonoïdes (kaempférol, lutéoline, rutine, etc.), terpénoïdes, etc. [171].

La dégradation de l'acide hyaluronique par la hyaluronidase peut être déterminée par mesure de la turbidité générée par la formation de complexes insolubles entre l'acide hyaluronique et le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB) [172]. La turbidité correspond au trouble d'un liquide, obtenu par la formation de particules colloïdales (ici, les complexes insolubles) provoquant la diffraction de la lumière incidente et ainsi la diminution de la puissance de rayonnement. L'intensité de la lumière transmise, accessible par mesure de l'absorbance (400 nm), permet de déterminer la concentration en complexes colloïdaux dans le milieu et donc d'acide hyaluronique [173].

L'évaluation de ces différentes activités biologiques permet de sélectionner des extraits naturels favorisant la réparation cutanée (Tableau 7).

**Tableau 7** : Activités biologiques impliquées dans la réparation cutanée pouvant être modulées par des extraits naturels

Activité	Enzyme impliquée	Actions sur la réparation cutanée	Exemples de molécules naturelles modulant ces activités
Antioxydante	/	Élimination des radicaux libres en excès par neutralisation ou décomposition.	Quinones, composés phénoliques, etc.
Blanchissante	Tyrosinase	Diminution de la coloration de la peau néoformée.	Polyphénols, flavonoïdes, acide kojique, arbutine, acide ascorbique, etc.
Anti-inflammatoire	Lipoxygénase	Impliquée dans la synthèse de médiateurs inflammatoires, dans la croissance cellulaire ou encore dans l'expression de facteurs de croissance.	Terpènes, esters (salicylate de benzyle, acétate de citronellyle, etc.), etc.
Anti-âge	Elastase	Dégradation du réseau de fibres d'élastine, de collagène et d'autres protéines de la MEC.	Composés phénoliques (catéchine, EGCG, etc.), acides triterpéniques (acides boswelliques, etc.), etc.
	Collagénase	Impliquée dans la dégradation des fibres de collagène.	Polyphénols (catéchine, EGCG, etc.)
	Hyaluronidase	Impliquée dans la dégradation des acides hyaluroniques responsables de l'hydratation naturelle de la peau, sa tonicité et son élasticité.	Protéines, polysaccharides, acides gras, polyphénols, flavonoïdes, terpénoïdes, etc.

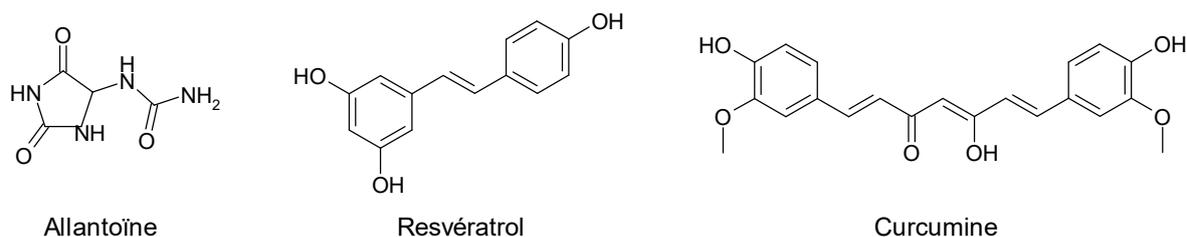
#### 1.3.2.4.8. Extraits naturels favorisant la réparation cutanée

Les actifs naturels cosmétiques favorisant la réparation cutanée se présentent sous deux formes : il s'agit soit d'extraits naturels, soit de molécules pures. Ils agissent pour la plupart spécifiquement au niveau des étapes finales du processus de réparation cutanée, lorsque la plaie est médicalement traitée et le risque d'infection écarté. Quelques exemples d'extraits particulièrement utilisés en cosmétique pour leurs propriétés anti-âge et favorisant la réparation cutanée sont présentés dans le Tableau 8.

Les actifs cosmétiques correspondant à des molécules pures, sont directement intégrables dans des produits finis. Ils sont responsables des activités revendiquées par le fabricant, notamment dans le domaine des dermocosmétiques. L'allantoïne est un principe actif très utilisé en cosmétique pour ses propriétés réparatrices : elle intervient dans la modulation de la réponse inflammatoire, la prolifération des fibroblastes et la synthèse de la matrice extracellulaire [174] (Figure 14). Elle peut être extraite à partir des racines de consoude (*Symphytum officinale* L.) ou du mucus de gastéropodes [175].

Le resvératrol, polyphénol de la classe des stilbènes, est présent dans de nombreux fruits (raisins, mûres, etc.). Ce puissant antioxydant stimule l'activité des enzymes de type oxyde nitrique synthétase (eNOS) exprimées au niveau de l'endothélium vasculaire, ainsi que l'expression du facteur de croissance VEGF impliqué dans la régulation de l'angiogenèse. Il favorise une meilleure force tensile et agit sur le processus inflammatoire [176].

La curcumine, pigment polyphénolique extrait des rhizomes de *Curcuma longa* L., présente un potentiel anti-inflammatoire favorisant la réparation cutanée. Elle inhibe l'expression du facteur de croissance TNF- $\alpha$ , des interleukines IL-1, IL-8 et IL-6, et régule l'expression des MMP [177]. Elle agit également au niveau de la formation du tissu de granulation, de la prolifération des fibroblastes, favorise la vascularisation et intervient lors du remodelage des tissus.



**Figure 14** : Exemple de principes actifs favorisant la réparation cutanée

**Tableau 8** : Exemples d'extraits naturels aux propriétés favorisant la réparation cutanée présents sur le marché de la cosmétique

Nom vernaculaire	Nom latin	Parties extraites	Composés d'intérêt	Actions	Références
Aloe vera	<i>Aloe vera</i> (L.) Burm. f.	Mucilages du centre des feuilles	Vitamines, enzymes, polysaccharides, acides aminés, minéraux, etc.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Participe à la synthèse de collagène dans le tissu de granulation ;</li> <li>favorise la prolifération et la migration cellulaires ;</li> <li>stimule la maturation du collagène et une meilleure force tensile ;</li> <li>participe au maintien de l'hydratation dans la blessure et à la réduction de l'inflammation.</li> </ul>	[178]
Avoine	<i>Avena sativa</i> L.	Parties aériennes	Vitamine E, flavonoïdes, avenanthramides (alcaloïdes spécifiques de l'avoine), polysaccharides ( $\beta$ -glucanes)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Présente des activités antioxydantes et antimicrobiennes ;</li> <li>stimule le dépôt de collagène, l'activation des cellules immunitaires et l'augmentation du taux de macrophages dans la blessure, favorisant ainsi la formation du tissu de granulation, la ré-épithélialisation et augmente la force tensile.</li> </ul>	[179]
Consoude	<i>Symphytum officinale</i> L.	Racines	Allantoïne et acide rosmarinique	<ul style="list-style-type: none"> <li>Réduit l'inflammation ;</li> <li>stimule le métabolisme cellulaire et la régénération tissulaire ;</li> <li>présente des activités antioxydantes (acide rosmarinique).</li> </ul>	[175, 180]
Ginseng	<i>Panax ginseng</i> C.A.Mey.	Parties aériennes	Ginsénoïdes (saponines)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Participe à la promotion de l'angiogenèse (stimulation de la production de VEGF et de la synthèse de certains facteurs d'hypoxie dans les kératinocytes) ;</li> <li>agit sur la synthèse de l'interleukine IL-1<math>\beta</math>, favorisant l'accumulation de macrophages dans la zone blessée.</li> </ul>	[181]
Herbe du tigre	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.	Parties aériennes	Flavonoïdes, composés triterpéniques (acide asiatique, asiaticoside, acide madécassique, madécassoside)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Participe à la stimulation des fibroblastes et à la synthèse de collagène de type III ;</li> <li>favorise la prolifération cellulaire (augmentation du taux d'ADN et de protéines dans le tissu de granulation) ;</li> <li>aide à augmenter la force tensile.</li> </ul>	[182, 183]
Romarin	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Parties aériennes	Terpénoïdes, polyphénols (acide carnosique, acide rosmarinique, carsonol)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Réduit l'inflammation ;</li> <li>améliore la contraction de la blessure ;</li> <li>stimule la ré-épithélialisation, la régénération du tissu, l'angiogenèse ainsi que le dépôt de collagène.</li> </ul>	[103]
Soja	<i>Glycine max</i> (L.) Merrill	Parties aériennes	Anthocyanines (cyanidine-3-glucoside, delphinine-3-glucoside)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Présente des activités antioxydantes, anti-inflammatoires et cytoprotectrices ;</li> <li>stimule l'angiogenèse.</li> </ul>	[184]
Souci officinal	<i>Calendula officinalis</i> L.	Fleurs	Flavonoïdes, triterpènes	<ul style="list-style-type: none"> <li>Favorise les activités angiogéniques et anti-inflammatoires ;</li> <li>participe à l'augmentation du taux de collagène en induisant la prolifération et la migration des fibroblastes.</li> </ul>	[185]

La peau constitue le plus grand organe de notre corps. Composée de 3 couches superposées, sa structure se renouvelle en permanence afin de lutter contre le vieillissement cutané et les agressions extérieures (rayonnements UV, plaies, coupures, etc.). L'altération de sa structure se caractérise par une diminution de son épaisseur, une perte de tonicité ou encore la formation de rides, de taches, de plaies ou de cicatrices. La population étant de plus en plus vieillissante, les soins anti-âges n'ont jamais été aussi plébiscités. De nombreux produits d'origine synthétique sont déjà présents sur le marché mais véhiculent une image de dangerosité pour la santé humaine et pour l'environnement. Les consommateurs portent de plus en plus leur choix vers les soins d'origine naturelle favorisant la restauration de la structure cutanée et limitant le vieillissement cutané, qui sont au moins aussi efficaces que les produits contenant des ingrédients de synthèse.

Pour répondre à ces nouvelles contraintes, les entreprises de formulation cosmétique tendent de plus en plus vers le développement d'ingrédients naturels innovants et efficaces. C'est dans cette démarche que s'inscrivent ces travaux de thèse financés par les Laboratoires JYTA, qui souhaitent développer une nouvelle gamme de produits cosmétiques intégrant des réparateurs cutanés ou ingrédients anti-âge naturels (concepts synonymes). Ils souhaitent plus particulièrement formuler des actifs à partir de matières premières végétales issues de la biodiversité locale, en l'occurrence méditerranéenne, afin de réduire leur impact environnemental tout en favorisant des circuits d'approvisionnements courts. Une attention particulière est portée à l'étude des co-produits et sous-produits de l'agriculture locale dans une démarche d'économie circulaire.

Ce travail bibliographique a fait l'objet d'une revue scientifique :

H. Plainfossé *et al.* Actifs cosmétiques pour la réparation cutanée, Techniques de l'ingénieur, **2017**, J3002 v1.

---

## Chapitre 2

Criblage de matières premières d'intérêt  
pour le développement d'ingrédients  
cosmétiques naturels favorisant la  
réparation cutanée

---

La stratégie adoptée dans le cadre de cette étude pour cribler des matières premières pour le développement d'ingrédients cosmétiques naturels et innovants favorisant la réparation cutanée, est présentée dans ce chapitre. De nombreux extraits obtenus à partir de différentes matières premières végétales ont été criblés afin d'identifier les plus intéressants pour ce type de développement. Cette sélection repose sur l'évaluation des activités biologiques de ces extraits, ainsi que sur différents critères définis lors de cette étude (toxicité de la plante, répartition géographique de l'espèce, littérature, brevets cosmétiques, ingrédients commercialisés sur le marché cosmétique, image « marketing » véhiculée par la plante, approvisionnement).

## 2.1. Provenance des matières premières

Les extraits criblés lors de cette étude sont de deux types. Une partie des extraits a été sélectionnée dans l'extractothèque du groupe MVBV (ICN), spécialisé dans l'étude et la valorisation des matières premières naturelles. Cette banque d'extraits de plantes méditerranéennes regroupe près de 200 échantillons qui ont été obtenus à partir de matières premières extraites à l'aide de différents solvants et au moyen de techniques d'extraction variées. L'étude de ces extraits a parfois été limitée lors de ce criblage, en raison de l'origine de la matière première, de sa disponibilité au laboratoire, ou encore du choix de la technique d'extraction qui n'était pas toujours adaptée à une application industrielle. Les autres extraits ont été obtenus par extraction directe de matières premières végétales sélectionnées avec les Laboratoires JYTA. Ces derniers ont à cœur de valoriser la biodiversité locale. Considérée comme un des principaux points chauds de biodiversité sur la Terre, la région méditerranéenne dispose d'une incroyable richesse en matière d'espèces végétales à exploiter de manière raisonnée [11–13]. Les matières premières végétales ainsi criblées ont été obtenues au travers de partenariats établis de longues dates avec le groupe MVBV ou mis en place durant ce projet avec différents acteurs locaux des filières agricoles ou de plantes à parfum, aromatiques et médicinales (PPAM).

La sélection des extraits issus de l'extractothèque et des matières premières végétales pour ce criblage repose sur une première étude bibliographique permettant d'identifier les matières premières locales les plus innovantes dont le potentiel marketing était intéressant. L'aspect innovant d'une matière première est évalué *via* une étude bibliographique portant sur les éventuels travaux déjà menés sur cette plante, la composition phytochimique des extraits correspondants et leurs activités biologiques. L'existence de brevets où sont revendiquées des applications cosmétiques de ces extraits est également recherchée afin de s'assurer de l'originalité de la plante sélectionnée et de l'ingrédient qui en sera extrait. Les espèces ayant déjà fait l'objet d'études conséquentes ne sont pas considérées prioritaires dans le cadre de cette étude visant à développer des ingrédients innovants. Dans une démarche intégrant les principes de l'économie circulaire, l'attention s'est portée tout particulièrement sur les co-produits de l'agriculture locale (feuilles, bois, etc.), qui sont généralement considérés comme des « déchets ». La revalorisation de ces co-produits, encore riches en composés actifs,

permet de diminuer les coûts associés à leur destruction, tout en s'assurant un approvisionnement régulier auprès d'une filière déjà existante et pérenne [50].

## 2.2. Extraction des matières premières végétales

En ce qui concerne les extraits nouvellement produits (c'est-à-dire non issus de l'extractothèque), les paramètres d'extraction de la matière végétale ont été définis de manière à être reproductibles et facilement transposables à l'échelle industrielle. L'impact environnemental d'un tel développement a également été pris en considération, à travers l'utilisation préférentielle de solvants d'extraction écoresponsables, et d'un processus d'extraction au coût énergétique minimisé, à savoir la macération sous agitation.

Deux solvants de nature différente (mélange hydroalcoolique et propylène glycol) ont été sélectionnés afin d'obtenir deux extraits chimiquement très différents : en effet, les propriétés physico-chimiques de ces deux solvants permettent d'extraire des molécules de nature et de polarité diverses à partir d'une même matière végétale. Ces deux solvants permettront par ailleurs de développer à terme deux types d'actifs distincts, l'un solide et l'autre liquide. Les extraits obtenus au moyen du mélange hydroalcoolique sont séchés par évaporation du solvant, et peuvent être ensuite resolubilisés dans un solvant compatible avec un usage cosmétique ou bien être déposés sur support solide afin de développer un ingrédient solide. Les extraits obtenus avec le propylène glycol, un solvant compatible avec un usage cosmétique, sont, quant à eux, directement formulables. Ainsi, plusieurs extraits de compositions différentes ont été obtenus à partir d'une même matière première et les activités biologiques de l'ensemble de ces extraits ont été criblées *in vitro*.

Les conditions d'extraction ont été déterminées pour ces deux types d'extraits en amont de cette étude et conservées, dans la mesure du possible, quelle que soit la matrice végétale (Tableau 9). De nombreux paramètres tels que le solvant d'extraction, la température, la durée ou encore le ratio massique matière végétale/solvant influencent l'extraction des composés d'intérêt tels que les polyphénols et les flavonoïdes, des métabolites secondaires largement reconnus pour leurs activités biologiques intéressantes [87, 110, 150, 186]. Le mélange hydroalcoolique (H<sub>2</sub>O/EtOH 50/50 m/m) sélectionné pour ces extractions, couvre une large gamme de polarités et présente l'avantage d'être respectueux de l'environnement et non toxique pour l'Homme, et donc par conséquent, compatible avec un usage cosmétique [187]. Une durée d'extraction de 2 h est sélectionnée, car cela permet d'extraire un maximum de composés, sans entraîner de dégradations importantes des composés *via* leur oxydation ou leur polymérisation, ce qui pourrait générer d'éventuels problèmes d'insolubilité par la suite [186, 188].

En raison des propriétés physiques du propylène glycol (viscosité, polarité, etc.), la durée des extractions réalisées avec ce solvant a été rallongée à 7 h afin d'extraire efficacement les composés d'intérêt. Pour des raisons économiques, le propylène glycol utilisé lors de ce criblage n'est pas biosourcé, mais des essais d'extraction ont été réalisés sur une matière

première avec différents glycols verts disponibles commercialement, afin de s'assurer de la transposition efficace du procédé de développement de l'ingrédient par simple substitution du solvant [189]. Les ratios massiques ont été définis de manière à immerger totalement la matière végétale avec la quantité minimale de solvant, toujours dans l'optique de minimiser les quantités employées. Une augmentation de la température d'extraction peut permettre d'améliorer l'efficacité d'une extraction par augmentation de la solubilité et du taux de diffusion des analytes dans le solvant, mais elle peut également entraîner la dégradation de certains composés thermosensibles [186]. Afin d'éviter ce genre de dégradation, mais surtout de réduire l'impact environnemental de ces extractions, ces dernières ont été réalisées à température ambiante.

**Tableau 9** : Conditions d'extraction sélectionnées dans le cadre de cette étude

Forme de l'extrait	Solvant	Ratio massique matière végétale/solvant	Température	Durée
Extrait sec	H <sub>2</sub> O/EtOH 50/50 m/m	1/5	Ambiante	2 h
Extrait liquide	Propylène glycol	1/10	Ambiante	7 h

L'ensemble des extraits analysés lors de ce criblage est présenté dans le Tableau 10. Différents codes leurs ont été associés en fonction de la provenance de la matière première et de la technique d'extraction utilisée ; ces codes sont explicités en détail au bas du Tableau 10.

Seuls les rendements des extraits secs sont présentés. En effet, les rendements des extraits liquides ne sont pas significatifs à l'échelle laboratoire en raison de la viscosité importante du propylène glycol. Un pressage de la matière végétale est en effet nécessaire afin de récupérer le solvant retenu par la matière végétale. Il n'a pas été pris en compte lors de cette première étape de criblage puisqu'il n'est pas discriminant.

**Tableau 10** : Extraits et matières végétales analysés lors du criblage

Nom vernaculaire	Nom botanique	Provenance	Organe extrait	Technique d'extraction	Rendement
Absinthe	<i>Artemisia absinthium</i> L.	P1	PA	ES-SX	n.d.
Angélique sauvage	<i>Angelica sylvestris</i> L.	P1	PA	ES-SX	19,9 %
Anthyllide vulnéraire	<i>Anthyllis vulneraria</i> L.	P1	PA	ES-SX	17,7 %
Aphyllanthe de Montpellier	<i>Aphyllanthes monspeliensis</i> L.	P3	PA	ES-M	10,2 %
				EL	n.d.
Armoise commune	<i>Artemisia vulgaris</i> L.	P1	PA	ES-SX	n.d.
Busserole	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (L.) Spreng.	P4	PA	ES-M	28,6 %
				EL	n.d.
Café	<i>Coffea</i> spp.	P5	Pelures	ES-M	2,3 %
				EL	n.d.
			Poudre	ES-M	11,5 %
				EL	n.d.
Cassis	<i>Ribes nigrum</i> L.	P6	Marc	ES-M	5,2 %
				EL	n.d.
Cerfeuil musqué	<i>Myrrhis odorata</i> (L.) Scop.	P1	PA	ES-SX	n.d.
Charme-houblon	<i>Ostrya carpinifolia</i> Scop.	P6	Feuilles	ES-M	6,1 %
			Tiges	ES-M	9,9 %
				ES-M (EtOAc)	0,9 %
Fruits	ES-M	1,3 %			
Chêne	<i>Quercus robur</i> L.	P1	PA	ES-M	2,9 %
Chêne pubescent	<i>Quercus pubescens</i> Willd.	P3	PA	ES-M	5,4 %
				EL	n.d.
Chêne vert	<i>Quercus ilex</i> L.	P1	PA	ES-ASE	19,7 %
Ciste cotonneux	<i>Cistus albidus</i> L.	P1	PA	ES-SX	19,1 %
		P3		ES-M	8,5 %
				EL	54,4 %
Ciste de Corse	<i>Cistus creticus</i> L. subsp. <i>corsicus</i>	P1	PA	ES-M	n.d.
Ciste de Montpellier	<i>Cistus monspeliensis</i> L.	P1	PA	ES-SX	22,4 %
Clématite vigne-blanche	<i>Clematis vitalba</i> L.	P1	PA	ES-SX	14,9 %
Coronille	<i>Coronilla emerus</i> L.	P1	PA	ES-M	17,7 %
Cynorhodon	<i>Rosa canina</i> L.	P1	PA	ES-M	22,8 %

Eupatoire à feuilles de chanvre	<i>Eupatorium cannabinum</i> L.	P1	PA	ES-SX	12,3 %
Figuier	<i>Ficus carica</i> L.	P1	PA	ES-ASE	16,0 %
Gallet	<i>Galium verum</i> L.	P1	PA	ES-SX	15,3 %
Garance des teinturiers	<i>Rubia tinctorum</i> L.	P1	PA	ES-ASE	2,0 %
Genévrier	<i>Juniperus communis</i> L.	P1	RD	ES-ASE	10,1 %
			PA	ES-SX	13,0 %
Germandrée lisse	<i>Teucrium lucidum</i> L.	P1	PA	ES-SX	25,3 %
		P8		ES-M	17,6 %
Germandrée petit chêne	<i>Teucrium chamaedrys</i> L.	P4	PA	ES-M	6,5 %
				EL	n.d.
Impératoire	<i>Peucedanum ostruthium</i> (L.) W.D.J.Koch	P1	PA	ES-SX	12,5 %
Indigo	<i>Persicaria tinctoria</i> (Aiton) Spach	P1	PA	ES-ASE	20,0 %
Iris des garrigues	<i>Iris lutescens</i> Lam.	P1	PA	ES-SX	7,1 %
Laurier noble	<i>Laurus nobilis</i> L.	P1	PA	ES-M	16,8 %
Mélilot officinal	<i>Melilotus officinalis</i> (L.) Lam	P1	PA	ES-SX	< 30 %
Millepertuis officinal	<i>Hypericum perforatum</i> L.	P1	PA	ES-M	19,7 %
Myrte commune	<i>Myrtus communis</i> L.	P1	PA	ES-M	5,6 %
Nerprun alaterne	<i>Rhamnus alaternus</i> L.	P1	PA	ES-M	9,2 %
				ES-M	13,4 %
				EL	n.d.
Olivier	<i>Olea europaea</i> L.	P1	PA	ES-M	30,3 %
Ornithogale en ombelle	<i>Ornithogalum umbellatum</i> L.	P1	PA	ES-SX	3,2 %
Pimprenelle	<i>Sanguisorba minor</i> Scop.	P1	PA	ES-M	20,6 %
				ES-M	7,9 %
				EL	n.d.
Pin d'Alep	<i>Pinus halepensis</i> Mill.	P1	PA	ES-SX	14,3 %
Pin sylvestre	<i>Pinus sylvestris</i> L.	P1	PA	ES-ASE	12,0 %
Pistachier lentisque	<i>Pistacia lentiscus</i> L.	P8	PA	EL	n.d.
				ES-M	77,6 %
Pistachier térébinthe	<i>Pistacia terebinthus</i> L.	P1	PA	ES-M	29,1 %
Primevère officinale	<i>Primula veris</i> L.	P1	PA	EL	28,7 %
Pomme	<i>Malus domestica</i> 'Golden delicious'	P10	Moût	ES-M	33,2 %
Prune de Brignoles	<i>Prunus domestica</i> L.	P2	Peaux	ES-ASE	66,7 %

Prunier de Brignoles	<i>Prunus domestica</i> L.	P1	Feuilles	ES-ASE	18,1 %
		P2		ES-M (EtOH)	12,3 %
				EL	n.d.
Raisin	<i>Vitis vinifera</i> L.	P1	PA	ES-ASE	2,6 %
Réglisse	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	P1	PA	ES-SX	n.d.
Reine des prés	<i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim	P1	PA	ES-SX	10,4 %
Réséda des teinturiers	<i>Reseda luteola</i> L.	P1	PA	ES-SX	1,9 %
Romarin	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	P1	PA	ES-SX	17,8 %
Rosier cent-feuilles	<i>Rosa x centifolia</i> L.	P9	Tiges	ES-M	5,8 %
				EL	n.d.
Rue de Chalep	<i>Ruta chalepensis</i> L.	P1	PA	ES-ASE	24,8 %
Rue officinale	<i>Ruta graveolens</i> L.	P1	PA	ES-M	n.d.
Santoline petit cyprès	<i>Santolina chamaecyparissus</i> L.	P1	PA	ES-M	n.d.
Sauge à feuilles de verveine	<i>Salvia verbenaca</i> L.	P1	PA	ES-M	18,6 %
Sauge sclarée	<i>Salvia sclarea</i> L.	P1	PA	ES-M	35,0 %
Silène blanc	<i>Silene latifolia</i> subsp <i>alba</i> (Mill.) Greuter & Brudet	P1	PA	ES-SX	18,0 %
Silène d'Italie	<i>Silene italica</i> (L.) Pers.	P1	PA	ES-SX	11,1 %
Souci des champs	<i>Calendula arvensis</i> M.Bieb.	P1	PA	ES-SX	13,6 %
Thym	<i>Thymus vulgaris</i> L.	P1	PA	ES-SX	13,7 %
Truffe noire du Périgord	<i>Tuber melanosporum</i> Vittad.	P10	PA	ES-M	7,1 %
				EL	n.d.
Tulipier de Virginie	<i>Liriodendron tulipifera</i> L.	P3	PA	ES-M	22,6 %
				EL	n.d.
Urosperme de Daléchamps	<i>Urospermum dalechampii</i> (L.) Scop. ex F.W.Schmidt	P3	PA	ES-M	4,3 %
				EL	n.d.
Valériane rouge	<i>Centranthus ruber</i> L.	P8	PA	ES-M	11,8 %
				EL	n.d.
Vipérine commune	<i>Echium vulgare</i> L.	P1	PA	ES-ASE	9,1 %

n.d. : non déterminé, PA : parties aériennes, RD : résidu de distillation.

Provenance : P1 : extraits provenant de l'extractothèque - P2 : approvisionnement via l'association « La Prune de Brignoles » - P3 : approvisionnement via l'association « Fleurs d'Exception du Pays de Grasse » - P4 : approvisionnement via l'association Biophyto - P5 : approvisionnement via la société GMR (Green Molecular Response) - P6 : récolte réalisée dans le Parc Valrose (Nice) - P7 : récolte réalisée dans différents lieux de la région Sud - P8 : achat de la matière végétale auprès de l'herboristerie Cailleau - P9 : approvisionnement par la société Malongo - P10 : autres sources sporadiques d'approvisionnement (achats, fournisseurs, etc.).

Types d'extrait et méthodes d'extraction : EL : extrait liquide - ES : extrait sec - M : macération – SX : soxhlet – ASE : extraction accélérée par solvant.

## 2.3. Evaluation des activités biologiques des extraits

Les activités biologiques des extraits ont été évaluées à l'aide de différents tests *in vitro* afin de déterminer leur(s) action(s) sur le mécanisme de réparation cutanée (Tableau 12). Comme explicité dans le chapitre 1, différentes enzymes et facteurs de croissance interviennent lors de ce mécanisme très complexe. Un extrait présentant des pouvoirs d'inhibition sur différents facteurs intervenant lors de ce processus est ainsi particulièrement intéressant pour le développement d'un ingrédient cosmétique favorisant la réparation cutanée. Afin de cibler ce mécanisme, les activités antioxydantes, anti-inflammatoires, blanchissantes, anti-hyaluronidase, anti-élastase et anti-collagénase (présentées dans le chapitre 1 paragraphe 1.3.2.4.7) de ces extraits ont été évaluées (Tableau 11).

Hormis pour les activités blanchissantes et anti-collagénase pour lesquelles des composés purs servent de témoins positifs afin de s'assurer de la fiabilité du test, les témoins positifs utilisés lors de ce criblage sont des extraits commerciaux reconnus pour leurs activités dans le domaine des cosmétiques. L'utilisation de tels témoins permet également de confronter les extraits développés dans le cadre de ce travail, à des extraits disponibles sur le marché, et de comparer leurs activités biologiques.

**Tableau 11** : Tests d'activité *in vitro* réalisés pour le criblage des extraits d'intérêt

Activité évaluée	Réactif/enzyme	Témoin positif	Activité témoin
Antioxydante	DPPH	Extrait commercial de romarin ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	+++
Blanchissante	Tyrosinase	Phényléthyl résorcinol (4-(1-phényléthyl) 1,3-benzènediol)	++++
Anti-inflammatoire	Lipoxygénase	Extrait commercial d'arnica ( <i>Arnica montana</i> L.)	+++
Anti-élastase	Elastase	Extrait commercial de framboisier ( <i>Rubus idaeus</i> L.)	++
Anti-hyaluronidase	Hyaluronidase	Extrait commercial de framboisier ( <i>Rubus idaeus</i> L.)	++++
Anti-collagénase	Collagénase	Acide bétulinique	+

(-) : inhibition < 30 %, (+) : 30 % < inhibition < 50 %, (++) : 50 % < inhibition < 70 %, (+++) : 70 % < inhibition < 90 %, (++++) : inhibition > 90 %

Les activités biologiques des 91 extraits obtenus à partir de 77 matières végétales sont présentées dans le Tableau 12. Selon le solvant d'extraction utilisé, les extraits obtenus à partir d'une même matière première peuvent présenter des activités plus ou moins intéressantes, ce qui démontre l'intérêt d'utiliser plusieurs solvants pour ce type de criblage.

Tableau 12 : Activités biologiques des extraits

Matière première	Code	Activité						
		anti-oxydante	anti-inflammatoire	blanchissante		anti-élastase	anti-hyaluronidase	anti-collagénase
				L-DOPA	L-Tyrosine			
<i>Angelica sylvestris</i> L.	ES-SX	++++	++++	-	-	-	++	-
<i>Anthyllis vulneraria</i> L.	ES-SX	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aphyllanthes monspeliensis</i> L.	ES-M	-	-	-	-	-	-	-
	EL	-	-	-	-	-	-	-
<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (L.) Spreng.	ES-M	++++	++++	-	-	+++	++++	-
<i>Artemisia absinthium</i> L.	ES-SX	+	-	-	-	-	-	-
<i>Artemisia vulgaris</i> L.	ES-SX	++	-	-	-	-	-	-
<i>Calendula arvensis</i> M.Bieb.	ES-SX	-	-	-	-	-	-	-
<i>Centranthus ruber</i> L.	ES-M	++++	+++	-	-	-	-	-
	EL	+	-	-	-	-	+	-
<i>Cistus albidus</i> L.	ES-SX	+++	-	-	-	++	++	-
	ES-M	++++	++++	-	-	-	++++	-
	EL	++	++++	-	-	-	++++	++++
<i>Cistus creticus</i> L. subsp. <i>corsicus</i>	ES-M	+++	-	-	-	+++	++++	++
<i>Cistus monspeliensis</i> L.	ES-SX	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clematis vitalba</i> L.	ES-SX	-	-	-	-	-	-	-
<i>Coffea</i> spp. (pelures)	ES-M	+	-	-	-	+	-	-
	EL	-	-	-	-	-	-	-
<i>Coffea</i> spp. (poudre)	ES-M	++	-	-	-	-	-	-
	EL	++++	++	-	-	-	+	-
<i>Coronilla emerus</i> L.	ES-M	-	-	-	-	-	-	-
<i>Echium vulgare</i> L.	ES-ASE	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eupatorium cannabinum</i> L.	ES-SX	+	-	-	-	-	+	-
<i>Ficus carica</i> L.	ES-ASE	+	+	-	-	-	+	-
<i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim	ES-SX	+++	-	-	-	-	+++	-
<i>Galium verum</i> L.	ES-SX	+	-	-	-	-	++	-
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	ES-SX	+++	++++	++++	+++	+	++++	-
<i>Hypericum perforatum</i> L.	ES-M	++	+	-	-	+	++++	-
<i>Iris lutescens</i> Lam.	ES-SX	-	+++	-	+	-	-	-
<i>Juniperus communis</i> L. (PA)	ES-SX	+++	+	-	-	+++	+++	++
<i>Juniperus communis</i> L. (RD)	ES-ASE	+	-	-	-	++	-	-

<i>Laurus nobilis</i> L.	ES-M	-	-	-	-	-	-	-
<i>Liriodendron tulipifera</i> L.	ES-M	++	-	-	-	-	-	-
	EL	++++	-	-	-	-	++	-
<i>Malus domestica</i> 'Golden delicious'	ES-M	-	-	-	-	-	-	-
<i>Melilotus officinalis</i> (L.) Lam	ES-SX	-	-	-	-	-	-	-
<i>Myrrhis odorata</i> (L.) Scop.	ES-SX	++	-	-	-	-	++	-
<i>Myrtus communis</i> L.	ES-M	+++	+	-	-	++	++++	-
<i>Olea europaea</i> L.	ES-M	++	-	-	-	-	+	-
<i>Ornithogalum umbellatum</i> L.	ES-SX	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ostrya carpinifolia</i> Scop. (feuilles)	ES-M	+	++	-	-	-	+	-
<i>Ostrya carpinifolia</i> Scop. (fruits)	ES-M	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ostrya carpinifolia</i> Scop. (tiges)	ES-M (EtOAc)	-	++++	-	-	++++	+	-
	ES-M (EtOH)	++++	+++	-	-	-	+++	-
<i>Persicaria tinctoria</i> (Aiton) Spach	ES-ASE	+	-	++++	++++	+++	+	-
<i>Peucedanum ostruthium</i> (L.) W.D.J.Koch	ES-SX	+++	-	-	-	+	+	-
<i>Pinus halepensis</i> Mill.	ES-SX	-	+	-	-	-	-	-
<i>Pinus sylvestris</i> L.	ES-ASE	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pistacia lentiscus</i> L.	ES-M	+++	-	-	-	-	-	-
	EL	++++	-	-	-	-	++++	-
<i>Pistacia terebinthus</i> L.	ES-M	++++	+	-	-	-	-	-
<i>Primula veris</i> L.	EL	-	-	-	-	-	-	-
<i>Prunus domestica</i> L. (feuilles)	ES-ASE	+++	+	-	-	++	+	-
	EL	++++	++	-	-	++++	-	-
	ES-M (EtOH)	+++	+	-	+	+++	+	-
<i>Prunus domestica</i> L. (peaux)	ES-M	-	-	-	-	-	-	-
	EL	++	-	-	-	-	-	-
<i>Quercus ilex</i> L.	ES-ASE	+++	+++	-	-	++	+	-
<i>Quercus pubescens</i> Willd.	ES-M	++++	+	-	-	-	++++	-
	EL	++++	+++	-	-	+	++++	-
<i>Quercus robur</i> L.	ES-M	+++	+	-	-	++	++++	++++
<i>Reseda luteola</i> L.	ES-SX	++	+	-	-	-	+	-
<i>Rhamnus alaternus</i> L.	ES-M	-	-	-	-	-	++++	-
	ES-M	+	++	-	-	-	+++	-
	EL	++++	++++	+	-	++	++++	+++
<i>Ribes nigrum</i> L. (décongelé)	ES-M	++++	-	++	+++	-	+	++
	EL	+++	-	-	-	-	++++	-

<i>Ribes nigrum</i> L. (lyophilisé)	ES-M	+++	-	+	-	-	-	++
	EL	+	-	-	-	-	-	-
<i>Rosa canina</i> L.	ES-M	++	-	-	-	-	++	-
<i>Rosa x centifolia</i> L.	ES-M	++++	-	-	-	-	-	-
	EL	++++	+++	-	-	-	++++	-
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	ES-SX	+++	+	-	-	-	++	-
<i>Rubia tinctorum</i> L.	ES-ASE	+++	+	-	-	-	++	-
<i>Ruta chalepensis</i> L.	ES-ASE	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ruta graveolens</i> L.	ES-M	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salvia sclarea</i> L.	ES-M	++	+	-	-	-	++	-
<i>Salvia verbenaca</i> L.	ES-M	++	+++	-	-	-	-	-
<i>Sanguisorba minor</i> Scop.	ES-M	++++	++++	-	-	-	++++	-
	ES-M	++++	+++	-	+	++++	++	++
	EL	++++	+++	++	+++	++++	++	++
<i>Santolina chamaecyparissus</i> L.	ES-M	+	+	-	-	-	+	-
<i>Silene italica</i> (L.) Pers.	ES-SX	-	-	-	-	-	-	-
<i>Silene latifolia</i> subsp <i>alba</i> (Mill.) Greuter & Brudet	ES-SX	-	-	-	-	-	-	-
<i>Teucrium chamaedrys</i> L.	ES-M	+++	-	-	-	-	-	-
	EL	+++	-	-	-	-	-	-
<i>Teucrium lucidum</i> L.	ES-SX	++++	++	-	-	-	++++	-
<i>Thymus vulgaris</i> L.	ES-SX	+++	++++	-	-	+	+	-
<i>Tuber melanosporum</i> Vittad.	ES-M	-	-	-	-	-	-	-
	EL	-	-	-	-	-	-	-
<i>Urospermum dalechampii</i> (L.) Scop. ex F.W.Schmidt	ES-M	-	+	-	-	-	-	-
	EL	+	++	-	-	-	-	-
<i>Vitis vinifera</i> L.	ES-ASE	-	+	-	-	-	-	-

(-) : inhibition < 30 %, (+) : 30 % < inhibition < 50 %, (++) : 50 % < inhibition < 70 %, (+++) : 70 % < inhibition < 90 %, (++++) : inhibition > 90 %

PA : parties aériennes ; RD : résidu de distillation

Types d'extrait et méthodes d'extraction : EL : extrait liquide - ES : extrait sec - M : macération – SX : soxhlet – ASE : extraction accélérée par solvant.

## 2.4. Sélection des matières premières d'intérêt

Le premier critère de sélection défini pour identifier les extraits d'intérêt concerne leurs activités biologiques : quelle que soit l'activité en question, une valeur de 1 a été attribuée pour chaque « + » observé dans le Tableau 12, et la somme des valeurs constitue le score d'activité de chaque l'extrait. Lorsque le score est supérieur à 5, l'extrait est considéré comme intéressant et d'autres critères de sélection sont alors pris en compte. Ce premier score a permis de sélectionner 28 matières végétales parmi les 77 étudiées.

Cette sélection a ensuite été affinée par l'ajout de 7 critères définis dans le cadre de cette étude, selon les points clés considérés comme indispensables pour le développement d'ingrédients en vue d'une commercialisation future :

- Critère 1 : toxicité de la plante
- Critère 2 : répartition géographique de l'espèce
- Critère 3 : étude de la littérature (phytochimie et activités biologiques des extraits)
- Critère 4 : étude des brevets cosmétiques
- Critère 5 : ingrédients commercialisés sur le marché cosmétique
- Critère 6 : image « marketing » véhiculée par la plante
- Critère 7 : approvisionnement

Le premier critère concerne la toxicité de la plante : ce critère est discriminant. Si l'espèce végétale s'avère présenter un risque pour la santé humaine, elle est alors écartée. Un code N est associé lorsque cette toxicité est nulle et TA lorsque l'espèce peut présenter une certaine toxicité pour les animaux.

Le deuxième critère concerne la répartition géographique de la plante. Une échelle de score a été définie afin d'évaluer l'intérêt de l'espèce en fonction de sa répartition géographique : un score de 1 est attribué si l'espèce est présente à l'échelle nationale ; un score de 2 si l'espèce est présente à l'échelle régionale et un score de 3 pour les espèces endémiques puisqu'il s'agit ici de valoriser la biodiversité méditerranéenne.

Les critères 3, 4 et 5 sont plus particulièrement liés au caractère innovant de l'espèce pour un usage cosmétique. Le critère 3 tient compte de la bibliographie existante sur l'espèce, sur sa composition phytochimique, ainsi que sur les activités cosmétiques des extraits correspondants. Un score de 0 correspond à une plante dont la phytochimie est bien connue et pour laquelle de nombreuses activités cosmétiques sont décrites ; un score de 1 lui est attribué s'il existe des informations sur sa composition phytochimique et qu'il existe quelques données concernant des activités cosmétiques ; un score de 2 lui est attribué si aucune activité n'est décrite, et un score de 3 lui est attribué si la composition phytochimique est très peu connue et que les activités ne semblent pas avoir été étudiées.

Le critère 4 concerne les brevets cosmétiques existants : un score de 0 correspond à des extraits pour lesquels des applications cosmétiques ont été brevetées et un score de 2 est attribué aux extraits pour lesquels aucun brevet n'a été identifié dans le domaine cosmétique.

Le critère 5 concerne les ingrédients cosmétiques développés à partir de l'espèce d'intérêt et déjà disponibles sur le marché des cosmétiques. Lorsque des ingrédients sont déjà

commercialisés à partir de l'espèce étudiée, un score de 0 est attribué à l'espèce, alors qu'un score de 2 signifie qu'aucun ingrédient développé à partir de cette espèce n'est disponible sur le marché. Un score de 1 est attribué à l'espèce lorsque des ingrédients obtenus à partir d'un autre organe (fruit, écorce, etc.) de la même espèce, sont disponibles sur le marché.

L'aspect marketing joue un rôle particulièrement important dans le domaine des cosmétiques. Il est évalué grâce au critère 6 qui concerne l'attrait véhiculé par la plante en elle-même, son esthétique, son nom (vernaculaire ou botanique), ses utilisations traditionnelles ou encore l'histoire qui lui est associée, qui convaincra aussi bien le formulateur que le client. Ce critère primordial est défini par une échelle de valeurs comprises entre 0 et 5 afin d'impacter fortement le score final. Un score de 0 correspond à une espèce qui ne véhicule pas une image positive (mauvaise odeur de la plante, utilisation dans un autre domaine, etc.) et un score de 4 est attribué aux plantes présentant un intérêt particulier. Un score de 5 est attribué aux co-produits, en raison de l'image vertueuse qu'ils véhiculent à travers les notions d'économie circulaire, etc.

Le dernier critère concerne la facilité d'approvisionnement de la matière végétale en vue d'une production à l'échelle industrielle. Un score de 0 est attribué à l'espèce lorsqu'aucune filière d'approvisionnement n'est identifiée (pas de culture de cette espèce, collecte compliquée en raison de la faible abondance de l'espèce ou de difficulté d'accès, etc.). Le score de 1 est attribué aux matières végétales dont la récolte est possible ou pour lesquelles des filières d'approvisionnement existent. En revanche, un score de 3 est attribué à celles pour lesquelles une filière d'approvisionnement bien établie est identifiée.

La somme de ces 7 scores, additionnée au score attribué aux activités biologiques, permet de définir un score final associé à chacune des matières végétales.

Les scores des 28 espèces sélectionnées précédemment sont présentés dans le Tableau 13. Les espèces végétales présentant les meilleurs scores finaux et se distinguant par des caractéristiques particulières sont les suivantes :

- La **petite pimprenelle** présente le meilleur score général, notamment grâce au score associé à ses activités biologiques. Elle n'est pas endémique de la région méditerranéenne mais présente un potentiel marketing intéressant, et aucun ingrédient n'est commercialisé à partir de cette plante.
- Le **ciste cotonneux** et le **ciste de Corse** se démarquent également, notamment en ce qui concerne leurs répartitions géographiques. Le ciste cotonneux présente de meilleures activités, ainsi qu'un caractère plus innovant que le ciste de Corse.
- Le **nerprun alaterne** présente de très bonnes activités et est typique de la région méditerranéenne.
- Les tiges de **rosier cent-feuilles** sont particulièrement remarquables. Emblématique de la région de Grasse, cette espèce de rosier est cultivée pour ses fleurs, très prisées dans le domaine de la parfumerie. Les tiges sont considérées comme un co-produit de cette filière plus que bien établie dans la région.
- Le **charme-houblon** se distingue par son aspect innovant puisque la composition phytochimique et les activités cosmétiques des extraits ont été très peu étudiées.

- La **germandrée lisse** se démarque par son caractère endémique et son aspect très innovant.
- Le **chêne pubescent** présente de bons scores pour plusieurs critères. La valorisation des parties aériennes de chêne truffier est intéressante car il s'agit d'un co-produit de la trufficulture régionale qu'il est extrêmement avantageux de valoriser. D'autre part, cette espèce est très intéressante d'un point de vue marketing en raison de la notion de puissance véhiculée par le chêne et de celle de noblesse véhiculée par la truffe.
- Le **prunier de Brignoles** est une variété principalement rencontrée dans la commune de Brignoles (Var). Il s'agit ici de valoriser les feuilles, co-produit de la fruiticulture. La filière d'approvisionnement est sécurisée grâce à l'instauration d'un partenariat avec l'association « La Prune de Brignoles ».

Parmi ces espèces végétales mises en évidence, 3 ont été sélectionnées pour cette étude : la germandrée lisse, le chêne pubescent et le prunier de Brignoles. Criblées au début de cette étude, ces matières végétales ont été sélectionnées préférentiellement par rapport à certaines autres espèces dont l'intérêt s'est révélé plus tardivement lors de la continuité de ces travaux. La germandrée lisse a été sélectionnée comme matière première principale de cette étude, en raison de ses caractères innovant et endémique. Ne faisant l'objet de presque aucune étude scientifique, elle s'est avérée être une candidate idéale pour une étude phytochimique complète. Elle fait l'objet du chapitre 3 de cette étude.

Le prunier et le chêne ont été sélectionnés principalement pour leurs origines géographiques et du fait qu'il s'agisse de deux co-produits de l'agriculture. Leurs études ont permis la mise en place de la méthodologie complète de développement d'un ingrédient, de l'approvisionnement en matière première jusqu'à l'étude de sa formulabilité. Ces études font l'objet du chapitre 4 de ce manuscrit.

D'autres matières premières que ces 3 sélectionnées ont également été étudiées selon la méthodologie présentée dans le chapitre 4 afin de développer d'autres ingrédients cosmétiques favorisant la réparation cutanée. Cependant, elles ne feront pas l'objet de cette étude.

Ce criblage a permis d'étudier les activités biologiques de 91 extraits obtenus à partir de 77 matières premières végétales. Parmi ces dernières, 28 se sont révélées intéressantes du point de vue de leurs activités biologiques. La sélection réalisée grâce à 7 critères définis dans cette étude a permis d'identifier 9 matières végétales particulièrement remarquables, parmi lesquelles 3 ont été sélectionnées pour développer des ingrédients cosmétiques.

Ce criblage a été réalisé tout au long de ce travail de doctorat, et sera poursuivi afin d'identifier d'autres matières d'intérêt qui feront l'objet de développements futurs.

Tableau 13 : Scores associées aux matières végétales d'intérêt selon les critères définis

Nom vernaculaire	Activités	Toxicité	Caractère local	Littérature	Brevets	Ingrédients	Marketing	Approvisionnement	Score final
<b>Petite pimprenelle</b>	<b>20</b>	<b>N</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>30</b>
<b>Ciste cotonneux</b>	<b>14</b>	<b>N</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>28</b>
<b>Nerprun alaterne</b>	<b>17</b>	<b>N</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>26</b>
<b>Rosier cent-feuilles (tiges)</b>	<b>11</b>	<b>N</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>25</b>
<b>Charme-houblon</b>	<b>10</b>	<b>N</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>24</b>
<b>Germandrée lisse</b>	<b>10</b>	<b>N</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>24</b>
<b>Chêne pubescent</b>	<b>11</b>	<b>N</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>23</b>
<b>Ciste de Corse</b>	<b>12</b>	<b>N</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>23</b>
<b>Prunier de Brignoles</b>	<b>10</b>	<b>N</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>22</b>
Busserole	15	N	2	0	0	0	4	1	21
Genévrier	11	N	2	1	2	1	4	1	21
Chêne	14	TA (glands)	1	0	0	1	4	1	20
Réglisse	18	N	2	0	0	0	0	0	20
Angélique sauvage	10	N	2	1	0	2	4	1	19
Chêne vert	9	TA (glands)	2	0	2	1	4	1	18
Cassis	12	N	1	0	0	0	5	3	18
Garance des teinturiers	6	N	3	1	2	2	4	1	18
Myrte commune	10	N	3	0	0	0	4	1	17
Pistachier térébinthe	5	N	3	1	2	2	4	1	17
Pistachier lentisque	8	N	3	1	0	0	4	1	16
Tulipier de Virginie	6	N	1	1	2	2	4	1	16
Sauge à feuilles de verveine	5	N	1	1	2	2	4	1	15
Reine des prés	6	N	2	0	0	2	4	1	14
Valériane rouge	7	N	2	0	2	2	0	1	13
Indigo	12	N	0	0	0	0	0	0	12
Millepertuis officinal	7	TA	1	0	0	0	4	1	12
Sauge sclarée	5	N	1	0	0	0	4	1	10
Thym	8	N	2	0	0	0	0	1	10
Romarin	6	N	2	0		0	0	1	8



---

## Chapitre 3

Etude phytochimique et caractérisation de  
l'extrait de *Teucrium lucidum* L.

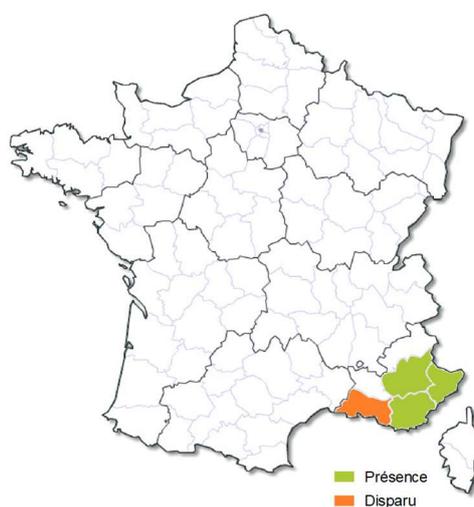
---

Le criblage des extraits naturels réalisé lors de cette thèse et présenté dans le chapitre 2 a permis de sélectionner la germandrée lisse (*Teucrium lucidum* L.) comme matière première d'intérêt pour le développement d'un ingrédient cosmétique naturel favorisant la réparation cutanée. Son caractère innovant, son aspect local, ainsi que les activités biologiques intéressantes que présentent les extraits de cette plante, font de celle-ci une matière première de choix pour cette étude selon les critères définis lors du criblage. Cette espèce ayant fait l'objet de peu d'études jusqu'à présent, sa caractérisation phytochimique a été approfondie. Pour cela, différents extraits de germandrée ont été réalisés à partir de différents solvants. Leurs appellations tout au long de ce chapitre suivront la dénomination suivante : TL (*Teucrium lucidum*)\_solvant. Un suffixe sous la forme « Fn° » est ajouté pour dénommer les fractions obtenues par fractionnement de l'extrait ; pour les autres fractions recueillies par d'autres méthodes de séparation, la dénomination est précisée au cas par cas.

### 3.1. Etude bibliographique sur *Teucrium lucidum* L.

#### 3.1.1. Origine et description botanique

*Teucrium lucidum* L. (également dénommé *Chamaedrys lucida* (L.) Moench), est connue sous plusieurs noms vernaculaires dont les plus utilisés sont germandrée lisse et germandrée brillante [190]. C'est une plante vivace de la famille des Lamiacées, endémique du bassin méditerranéen [191–193]. Elle se trouve naturellement sur les rochers, éboulis et coteaux arides, des montagnes du Sud-Est (Basses-Alpes, Var et Alpes-Maritimes) (Figure 15) [194].



**Figure 15** : Répartition géographique de la germandrée lisse (liste départementale des plantes de France) [196]

La germandrée est une plante glabrescente\* et cespiteuse\* qui mesure entre 20 et 60 cm. Elle se développe à des altitudes comprises entre 200 et 2200 mètres, mais peut se retrouver jusqu'à 3000 mètres [192]. Elle possède des feuilles opposées et lobées, et des fleurs purpurines et claires, groupées en un épi terminal lâche que l'on observe entre juin et août (Figure 16). Elle affectionne particulièrement les pelouses rocailleuses et les forêts claires. Cette espèce endémique de la région méditerranéenne est qualifiée de « préoccupation mineure » dans la liste rouge des espèces

menacées en France, catégorie dans laquelle sont incluses les espèces largement répandues et abondantes [197], et pour lesquelles le risque de disparition en métropole est faible.



Figure 16 : Germandrée lisse (Entraunes, Alpes-Maritimes, source : Marie Portas) [195]

### 3.1.2. Utilisation traditionnelle et toxicité

Contrairement à d'autres espèces de germandrée, la germandrée lisse n'est pas considérée comme toxique pour l'Homme et les animaux [198]. Elle ne semble pas connue pour des utilisations traditionnelles particulières. La germandrée petit chêne (*T. chamaedrys* L.), l'espèce la plus connue du genre, présente une hépatotoxicité liée en partie à la présence de la teucrine A, un diterpénoïde furanoclérodane (Figure 17) [198, 199]. Elle est toutefois utilisée traditionnellement comme adjuvant dans des traitements amaigrissants, dans le traitement symptomatique des diarrhées légères ou encore pour l'hygiène buccale [198]. La germandrée tomenteuse (*T. polium* L.) et la germandrée à têtes (*T. capitatum* L.), utilisées pour leurs propriétés antidiabétiques en médecine traditionnelle, sont également hépatotoxiques, en raison de la présence de *néo-clérodanes* [198]. Également appelés *ent-clérodanes*, ces composés sont des diterpénoïdes bicycliques composés de 20 carbones, retrouvés de manière abondante dans les espèces du genre *Teucrium* [199].

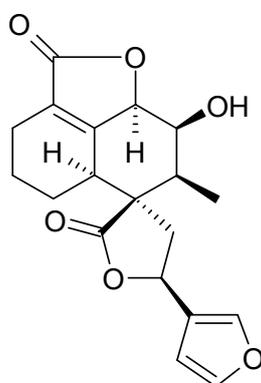
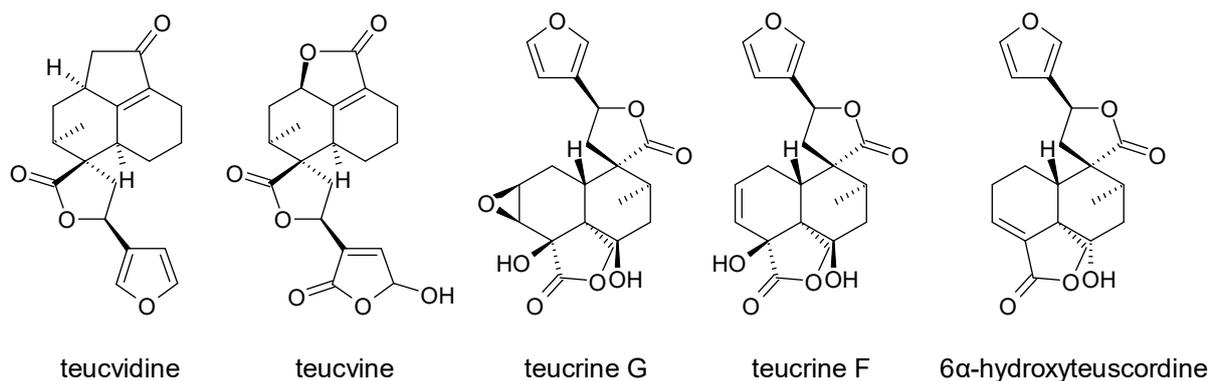


Figure 17 : Structure de la teucrine A

### 3.1.3. Phytochimie et activités biologiques de l'extrait de germandrée

Jusqu'à présent, la composition phytochimique de la germandrée lisse a fait l'objet de très peu d'études scientifiques. Une seule étude porte sur la composition en diterpénoïdes d'un extrait obtenu par macération à l'acétone de parties aériennes de germandrée lisse collectées dans les Alpes-Maritimes. Elle met en évidence la présence de 5 *néo*-clérodanes : la teucvidine, la teufline, la teucrine G, la teucrine F et la 6- $\alpha$ -hydroxyteuscordine [200] (Figure 18). D'autre part, une seule publication mentionne le pouvoir anti-inflammatoire d'un extrait de germandrée lisse obtenu par macération au dichlorométhane [201].



**Figure 18 :** Structures des *néo*-clérodanes identifiés dans *Teucrium lucidum* [200]

Le peu de bibliographie existante sur cette plante lui confère un caractère original, qui, associé à son aspect endémique et aux activités biologiques de l'extrait éthanolique, ont confirmé l'intérêt de sélectionner cette matière première pour le développement d'un réparateur cutané naturel d'origine méditerranéenne.

Une étude approfondie de la phytochimie de l'extrait a été réalisée dans le cadre de ce projet afin d'identifier les familles d'actifs responsables des activités biologiques observées.

La démarche suivie pour l'analyse phytochimique a été la suivante : un premier fractionnement bioguidé de l'extrait TL\_EtOH (extrait éthanolique présenté dans le chapitre 2) a été réalisé afin de confirmer son intérêt (activités biologiques et richesse en composés). Un nouvel extrait brut, nommé TL\_ha, a ensuite été réalisé à partir de la même matière première que celle utilisée pour l'extrait TL\_EtOH afin de disposer de l'extrait en quantité suffisante pour sa caractérisation phytochimique. Un solvant hydroalcoolique a été sélectionné pour ce nouvel extrait, présentant une polarité plus importante que celle de l'éthanol. La composition chimique de cet extrait brut a dans un premier temps été étudiée à l'aide de différentes techniques analytiques telles que l'HPTLC, la GC-MS, la GC/FID et l'HPLC-DAD/DEDL.

Différentes techniques de séparation ont ensuite été utilisées afin d'isoler les grandes familles de composés présentes dans cet extrait et de déterminer lesquelles sont responsables des activités observées.

Dans un troisième temps, une étude approfondie des principaux composés de l'extrait TL\_ha a été menée après avoir réalisé un fractionnement bioguidé de ce dernier. Une stratégie de caractérisation reposant sur une étude de dérégulation a été appliquée aux fractions d'intérêt afin d'évaluer

l'efficacité d'une telle méthodologie en comparaison d'une stratégie de caractérisation plus conventionnelle, reposant sur des étapes d'isolement, puis de caractérisation par spectrométrie de masse et par RMN. L'objectif de la déréplication est d'identifier dans un mélange complexe de molécules (fraction, extrait, etc.) et sans isolement, les composés déjà décrits dans la littérature, et de proposer des identifications, ou *a minima* des informations structurales pour les composés jamais décrits auparavant. Les activités biologiques des extraits/fractions ont été évaluées à l'aide des tests *in vitro* présentés dans le chapitre 5 (paragraphe 5.5). Pour des raisons de disponibilité de matériel végétal, les extraits n'ont pu être réalisés en triplicat.

## 3.2. Etude phytochimique de la germandrée

### 3.2.1. Etude de l'extrait TL\_EtOH

#### 3.2.1.1. Profil phytochimique

Les parties aériennes de germandrée ont été récoltées en 2016 à Valdebore-La Colmiane, à une altitude de 1500 m. L'extrait TL\_EtOH a été obtenu par extraction à l'éthanol de ces parties aériennes à l'aide d'un montage Soxhlet, avec un rendement de 25,3 %. Il présente des activités antioxydantes, anti-hyaluronidase et anti-inflammatoires intéressantes.

Afin d'identifier les actifs ou familles d'actifs responsables de ces activités, la composition phytochimique de cet extrait a été étudiée par HPLC-DAD/DEDL. Deux groupes de composés sont principalement mis en évidence dans cet extrait (Figure 19) :

- des composés polaires regroupés dans le groupe A, correspondant selon leurs temps de rétention, à des composés de types glucides, acides aminés, etc.;
- des composés plus lipophiles, rassemblés dans le groupe B, appartenant à la famille des polyphénols d'après leurs spectres UV et leurs temps de rétention.

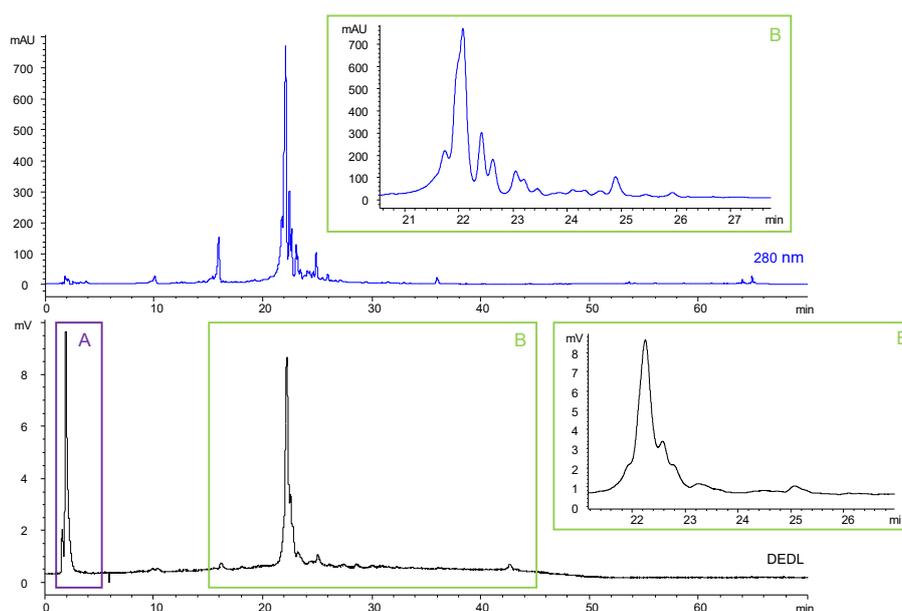
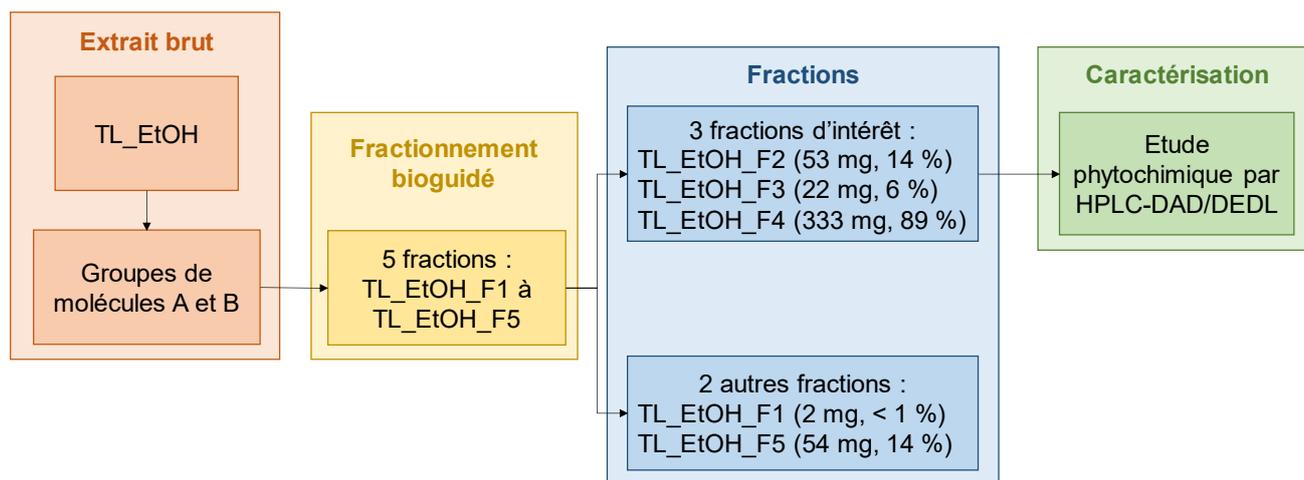


Figure 19 : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 280 nm de l'extrait TL\_EtOH

### 3.2.1.2. Fractionnement bioguidé de l'extrait TL\_EtOH

Afin de séparer ces deux groupes de composés majoritaires, un fractionnement bioguidé a été réalisé à l'aide d'un gradient d'élution composé de 5 solvants ou mélanges de solvants de polarité croissante (Figure 20, Tableau 14). L'extrait a préalablement été déposé sur support solide afin d'être homogénéisé et de faciliter son dépôt sur la colonne. Le fractionnement, réalisé sur colonne ouverte de silice en phase normale, a permis d'obtenir 5 fractions dont 3 présentent des activités intéressantes : TL\_EtOH\_F2, TL\_EtOH\_F3 et TL\_EtOH\_F4 (Tableau 14, Figure 21).



**Figure 20** : Fractionnement bioguidé de l'extrait TL\_EtOH sur colonne ouverte de silice en phase normale

Les profils HPLC/DEDL de ces trois fractions d'intérêt sont présentés sur la Figure 22. La fraction TL\_EtOH\_F2, obtenue par élution du mélange hexane/éther diéthylique est caractérisée par la présence de composés lipophiles, non identifiés dans l'extrait brut. D'après leurs spectres UV, ces composés correspondent à des terpénoïdes, des acides gras, etc. ; ils sont rassemblés dans le groupe de molécules C. Le faible rendement obtenu pour cette fraction (14 %) met en évidence la présence minoritaire de ce groupe de composés dans l'extrait brut, justifiant leur absence sur le chromatogramme HPLC-DAD/DEDL (Figure 19). Ce groupe de composés est responsable de la forte activité anti-élastase de cette fraction, non mise en évidence pour l'extrait brut. Ils contribuent également aux activités anti-hyaluronidase et anti-inflammatoires de la fraction TL\_EtOH\_F2, légèrement supérieures à celles de l'extrait brut.

La fraction TL\_EtOH\_F3, éluee avec de l'éther diéthylique, est composée des groupes de molécules B et C. Elle présente principalement une forte activité anti-élastase.

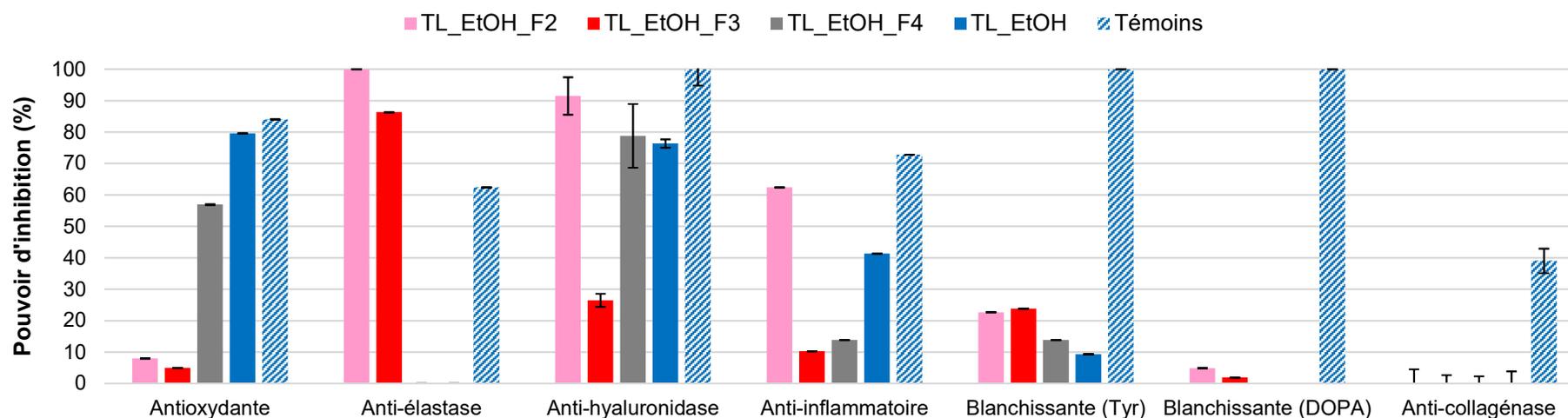
La fraction TL\_EtOH\_F4, obtenue par élution au méthanol présente un profil HPLC proche de celui de l'extrait brut : il est caractérisé par la présence des groupes de molécules A et B. Cette fraction présente des activités antioxydantes et anti-hyaluronidase comparables à celles de l'extrait brut mais ne présente pas d'activité anti-inflammatoire.

**Tableau 14** : Activités biologiques et rendements des fractions obtenues par fractionnement de l'extrait TL\_EtOH

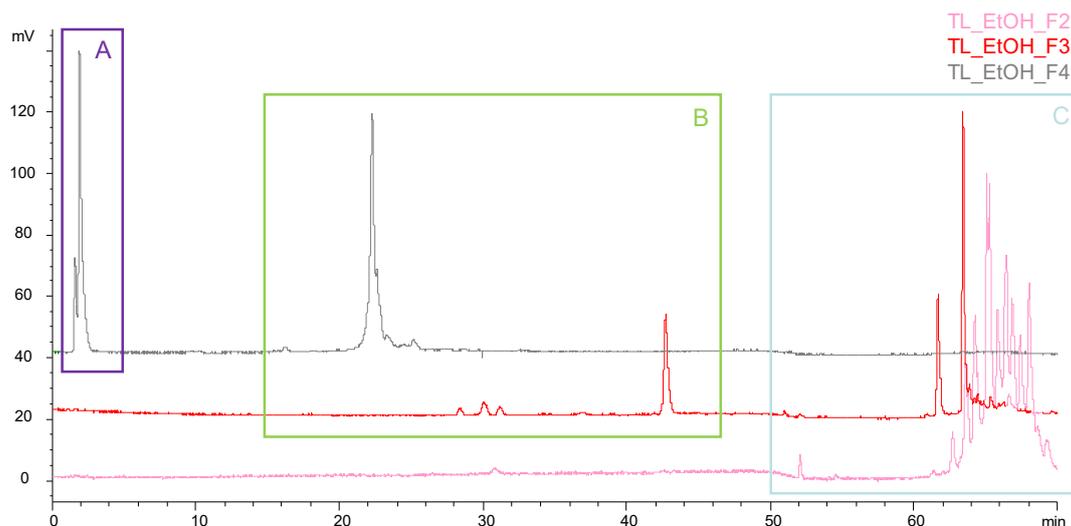
Fractions	Solvant	Masse	Rendement	Activité antioxydante	Activité anti-inflammatoire	Activité blanchissante		Activité anti-élastase	Activité anti-hyaluronidase	Activité anti-collagénase
						Tyr	DOPA			
TL_EtOH	/	373 mg	/	++++	-	-	-	-	+++	-
TL_EtOH_F1	Hexane	2 mg	< 1 %	-	-	-	-	-	-	-
TL_EtOH_F2	Hexane/éther diéthylique (50/50 v/v)	53 mg	14 %	-	++	-	-	++++	++++	-
TL_EtOH_F3	Ether diéthylique	22 mg	6 %	-	-	-	-	+++	-	-
TL_EtOH_F4	MeOH	333 mg	89 %	++	+	-	-	-	+++	-
TL_EtOH_F5	MeOH/H <sub>2</sub> O (50/50 v/v)	54 mg	14 %	-	-	-	-	-	-	-

(-) : inhibition < 30 %, (+) : 30 % < inhibition < 50 %, (++) : 50 % < inhibition < 70 %, (+++) : 70 % < inhibition < 90 %, (++++) : inhibition > 90 % ; Tyr = L-tyrosine ; DOPA = L-DOPA

Les faibles masses obtenues pour certaines fractions induisent des incertitudes de pesées pouvant expliquer un rendement total supérieur à 100 %.



**Figure 21** : Activités biologiques des fractions d'intérêt obtenues par fractionnement sur colonne ouverte de silice de l'extrait TL\_EtOH



**Figure 22** : Chromatogrammes HPLC/DEDL des fractions d'intérêt obtenues par fractionnement de l'extrait TL\_EtOH

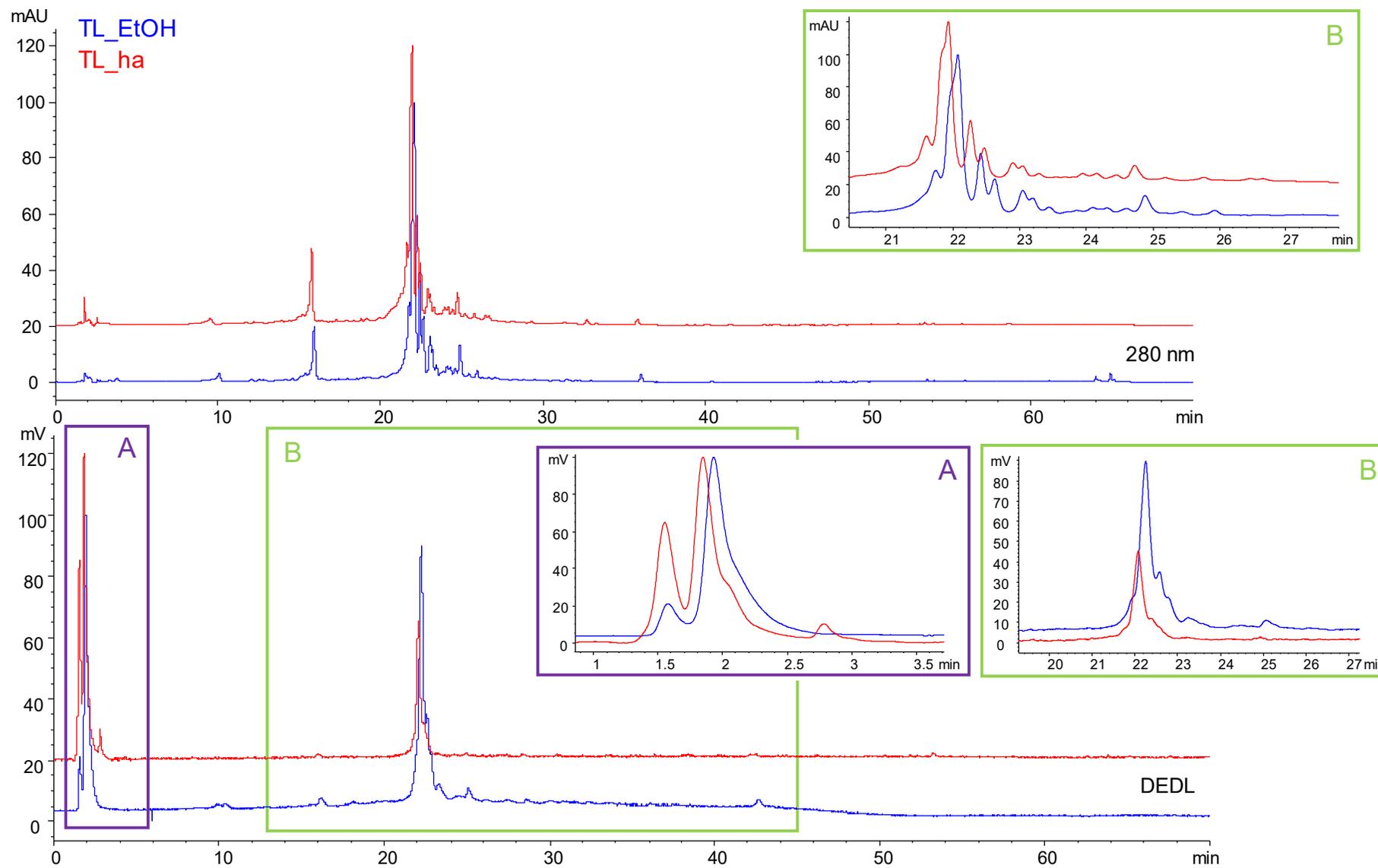
L'extrait TL\_EtOH est principalement caractérisé par la présence de composés des groupes A et B. Il présente des activités antioxydantes, anti-hyaluronidase et anti-inflammatoires notables. Son fractionnement a permis d'obtenir 3 fractions d'intérêt présentant des compositions et activités diverses. Des composés du groupe C sont mis en évidence dans les fractions TL\_EtOH\_F2 et TL\_EtOH\_F3, ils contribueraient aux activités anti-élastase, anti-inflammatoires et anti-hyaluronidase.

### 3.2.2. Etude de l'extrait TL\_ha

#### 3.2.2.1. Conditions d'extraction

Un nouvel extrait de germandrée TL\_ha a été obtenu par macération hydroalcoolique eau/éthanol (50/50 m/m) des parties aériennes de germandrée, préalablement séchées et broyées. Cette matière végétale est la même que celle utilisée pour l'extrait TL\_EtOH. L'extraction a été réalisée par macération plutôt qu'à l'aide d'un montage Soxhlet en raison de la facilité de transposition de cette technique à l'échelle industrielle. De la même manière, un mélange hydroalcoolique a été utilisé comme solvant d'extraction, plutôt que de l'éthanol pur, afin d'extraire une plus large gamme de composés. Les conditions d'extraction sont celles utilisées dans le chapitre 2 pour le criblage des matières premières d'intérêt.

Après macération sous agitation pendant 2 h à température ambiante, l'extrait a été filtré et concentré par évaporation du solvant : 13,7 g d'extrait sec ont été obtenus, ce qui représente un rendement de 17,6 %. Ce rendement, plus faible que celui obtenu pour l'extrait TL\_EtOH (25,3 %), s'explique principalement par la technique d'extraction utilisée. En effet, contrairement à la macération, l'extraction avec un montage Soxhlet permet d'épuiser la matière végétale par des cycles d'extraction successifs réalisés avec du solvant « frais ». Ces rendements d'extraction restent informatifs, et sont à confirmer par des extractions réalisées en triplicat.



**Figure 23** : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 280 nm des extraits TL\_EtOH (bleu) et TL\_ha (rouge)

### 3.2.2.1. Etude comparative avec l'extrait TL\_EtOH

La modification des conditions d'extraction (solvant, méthode d'extraction) peut induire des différences de composition phytochimique des extraits, pouvant impacter sur les activités biologiques. Avant de poursuivre cette caractérisation, le profil phytochimique de l'extrait TL\_ha et ses activités biologiques ont été comparés avec ceux de l'extrait TL\_EtOH. Ces deux extraits présentent des profils comparables, caractérisés par la présence des deux groupes de composés A et B (Figure 23). L'extrait TL\_ha présente des activités antioxydantes et anti-inflammatoires similaires à celles de l'extrait TL\_EtOH mais une activité anti-hyaluronidase inférieure (Figure 24).

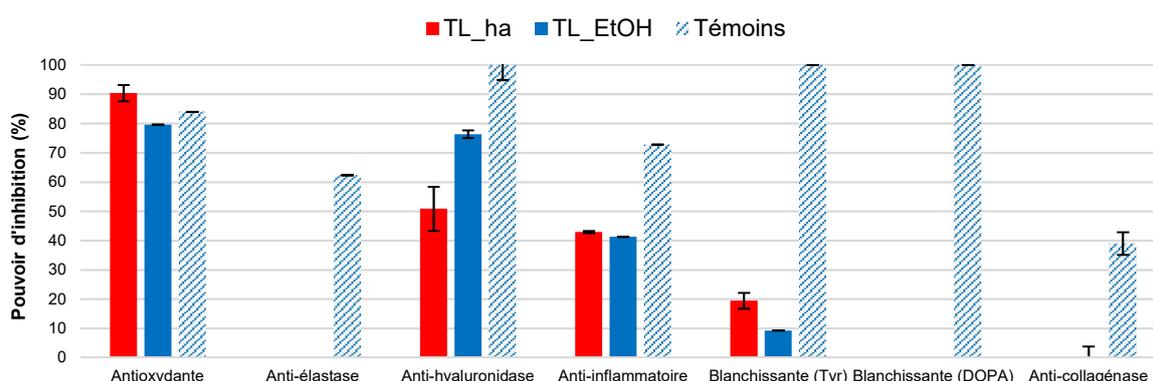


Figure 24 : Activités biologiques des extraits TL\_EtOH et TL\_ha de germandrée lisse

Les profils phytochimiques étant comparables, les différences d'activités biologiques observées sont certainement dues aux teneurs différentes en composés actifs de ces extraits. La différence de polarité des solvants d'extraction utilisés doit influencer le taux d'extraction de ces composés : le mélange hydroalcoolique, plus polaire, semblerait extraire davantage de composés du groupe A.

### 3.2.2.2. Caractérisation phytochimique de l'extrait TL\_ha

Parmi les composés du groupe B observés sur le profil HPLC-DAD/DEDL de l'extrait TL\_ha, 7 composés principaux, numérotés 1 à 7, sont mis en évidence (Figure 26). Une méthodologie de caractérisation de l'extrait TL\_ha selon 3 étapes principales a été mise en place afin d'identifier ces composés (Figure 25). Dans un premier temps, la composition phytochimique de l'extrait brut TL\_ha a été étudiée par différentes techniques d'analyses telles que l'HPTLC, la GC-MS/FID et l'HPLC-DAD/DEDL. Afin d'évaluer séparément les activités des deux groupes de composés majoritaires A et B, et d'identifier lesquels sont responsables des activités observées, différentes purifications ont été réalisées à partir de l'extrait TL\_ha selon 3 techniques séparatives : l'extraction liquide-liquide, la séparation sur phase solide et la séparation par HPLC semi-préparative. Pour finir, un fractionnement bioguidé de l'extrait TL\_ha a été réalisé afin de compléter cette caractérisation et d'identifier les actifs.

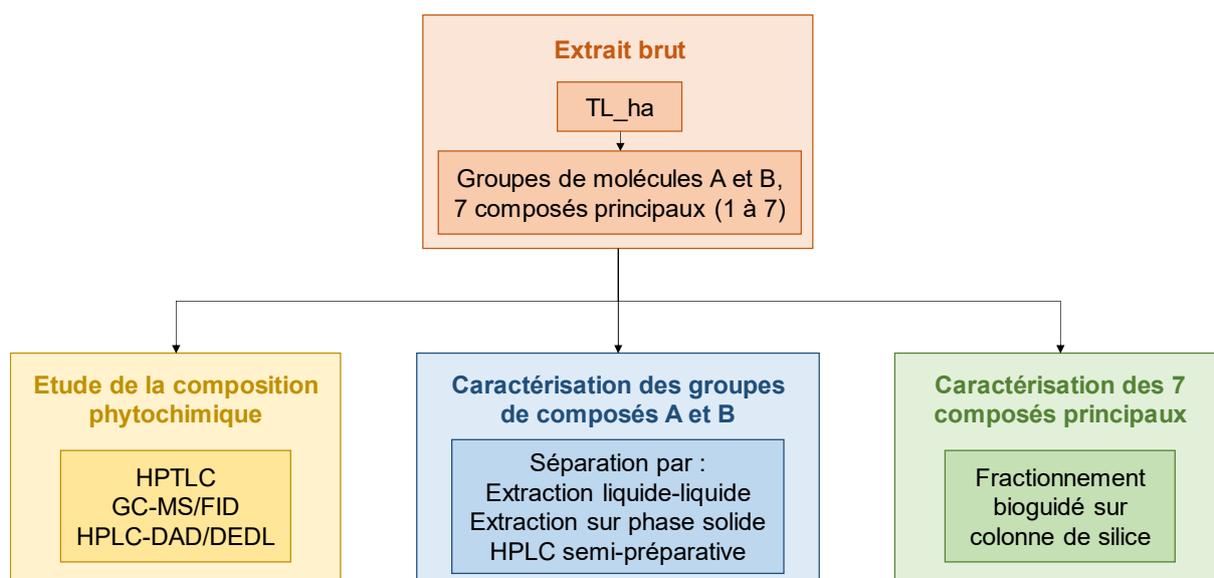


Figure 25 : Méthodologie utilisée pour caractériser l'extrait TL\_ha

### 3.2.2.2.1. Caractérisation par HPTLC

Afin de caractériser les familles de composés présentes dans l'extrait TL\_ha, des analyses par HPTLC ont été réalisées. Cet outil d'identification phytochimique est rapide et facile à mettre en œuvre pour l'étude des extraits naturels [129]. Pour cela, différents réactifs couramment employés pour la révélation post-chromatographique des extraits naturels ont été utilisés. Certains ont été combinés lors des séquences de révélation, afin d'accroître le nombre de classes de composés détectées sur une même plaque (Tableau 15). Des plaques de silice 60 F<sub>254</sub> ont été utilisées comme phase stationnaire pour ces différentes analyses.

Tableau 15 : Composés mis en évidence selon le révélateur post-chromatographique employé

Révélateur post-chromatographique	Composés identifiés
Ninhydrine	Acides aminés
Orcinol - acide sulfurique	Glucides
Diphénylamine - aniline - acide phosphorique (DAPA)	Glucides
Réactif de Neu	Polyphénols et flavonoïdes
PEG 400	Flavonoïdes
<i>p</i> -Anisaldéhyde - acide sulfurique	Composés peu polaires
Sel Fast blue B	Proanthocyanidines et alcaloïdes

#### A. Caractérisation des acides aminés

Les acides aminés sont des composés polaires retrouvés dans différents extraits naturels. Leur présence dans cet extrait a été recherchée par HPTLC avec un mélange ACN/H<sub>2</sub>O (75/25 v/v) pour phase mobile et la ninhydrine comme révélateur [130, 202]. L'extrait TL\_ha semble composé de quelques acides aminés présents en faible concentration d'après les intensités observées (Figure 27). Les faibles intensités des signaux ne permettent pas de déterminer la nature de ces acides aminés, ni d'être affirmatif quant à la présence dans l'extrait des acides aminés standards utilisés.

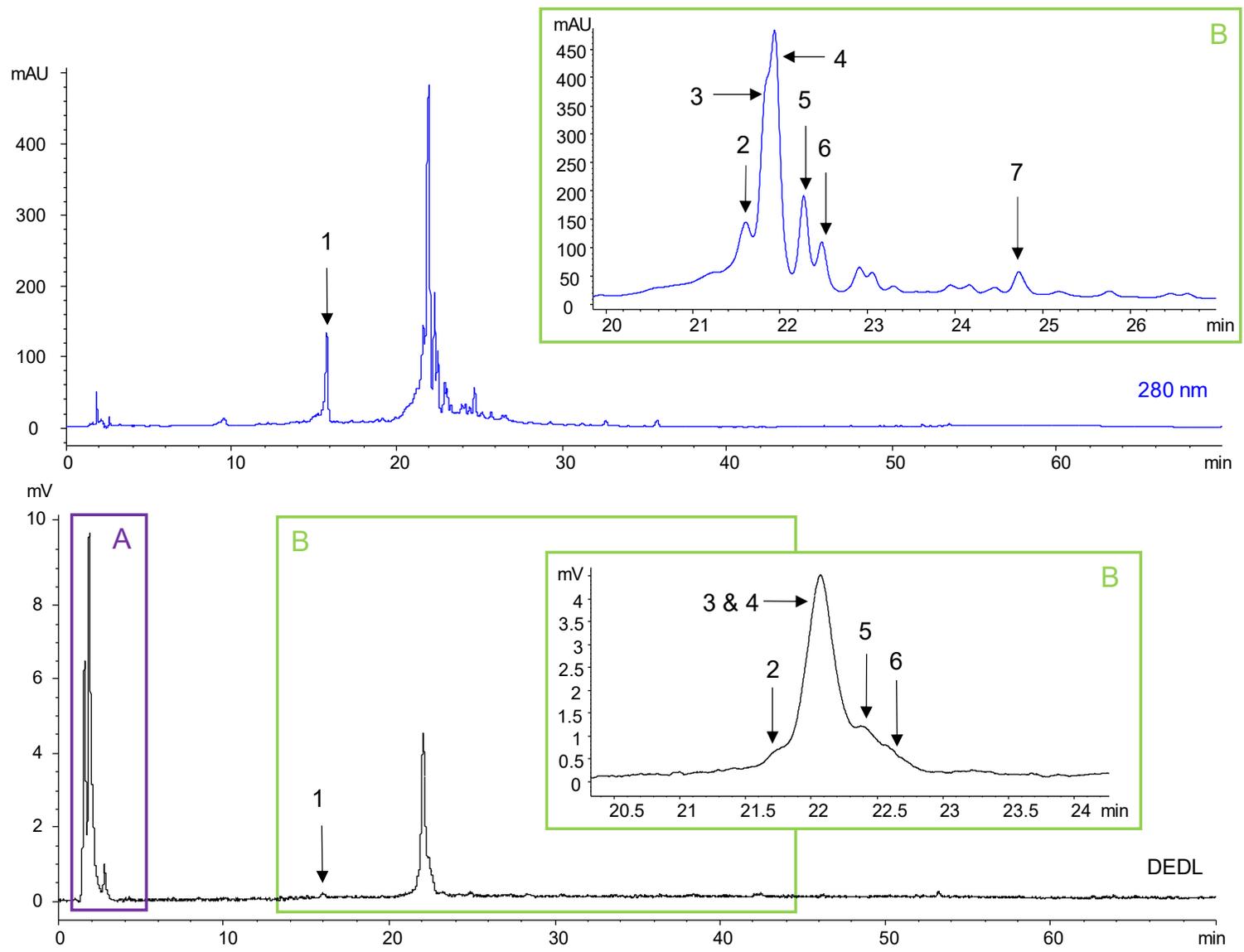
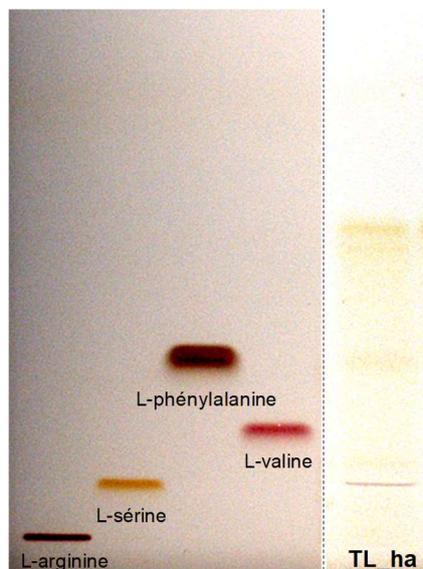


Figure 26 : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 280 nm de l'extrait TL\_ha



**Figure 27** : Etude des acides aminés de l'extrait TL\_ha par HPTLC (révélation à la lumière blanche après dérivatisation avec la ninhydrine)

### B. Caractérisation des glucides

Une seconde dérivatisation post-chromatographique a été réalisée avec un mélange orcinol-acide sulfurique sur la plaque précédente, afin de révéler la présence d'éventuels glucides dans cet extrait [132]. Ce dernier a été choisi préférentiellement au réactif de Molich pour des raisons de disponibilités au laboratoire [202]. L'orcinol a permis de révéler la présence de trois glucides principaux, dont l'un a été identifié comme étant le glucose, par comparaison avec le standard utilisé pour attester de la validité de cette analyse (Figure 28).



**Figure 28** : Etude des glucides de l'extrait TL\_ha par HPTLC (révélation à la lumière blanche après dérivatisation avec l'orcinol)

Afin de poursuivre la caractérisation de ces glucides et notamment identifier les deux autres glucides majoritaires de cet extrait, une dérivation avec le révélateur diphénylamine-aniline-acide phosphorique (DAPA) a été réalisée, elle permet une étude sélective et plus sensible des glucides grâce à un seuil de détection bas [133]. Ce révélateur présente l'avantage de différencier spécifiquement les glucides selon leur nature par réactions colorimétriques : les bandes de couleur brun vert-pâle sont caractéristiques des disaccharides, les bandes de couleur bleu-gris, des aldohexoses, et les bandes de coloration brun-rouge correspondent aux cétohexoses [134, 135]. Selon les conditions expérimentales utilisées dans l'étude de Ruppel *et al.* [134], le glucose, le saccharose et le fructose ont été identifiés comme étant les 3 principaux sucres présents dans l'extrait TL\_ha (Figure 29). Un autre glucide, de rapport frontal plus important que les trois glucides identifiés semble également présent dans cet extrait.



**Figure 29** : Etude des glucides de l'extrait TL\_ha par HPTLC (révélation à la lumière blanche après dérivation avec la DAPA)

Grâce à un dosage par HPTLC, les teneurs de ces 3 composés dans l'extrait TL\_ha ont été estimées (Tableau 16). Le glucose est le sucre majoritaire et les deux autres sucres sont présents en quantités équivalentes ; ces sucres représentent à eux trois,  $17,6 \pm 0,7$  % de l'extrait brut.

**Tableau 16** : Teneurs des sucres identifiés dans l'extrait TL\_ha par dosage par HPTLC

Composé	Fructose	Glucose	Saccharose
Teneur ( $\text{mg}_{\text{composé}} / \text{g}_{\text{extrait}}$ )	$50 \pm 3$	$80 \pm 1$	$46 \pm 3$

Les composés du groupe A, mis en évidence sur le profil HPLC de l'extrait TL\_ha correspondent principalement aux sucres et acides aminés révélés par ces analyses par HPTLC.

### C. Caractérisation des polyphénols et des flavonoïdes

Afin de caractériser les composés du groupe B, une séquence de révélation combinant une première dérivation avec le réactif de Neu, suivie d'une seconde révélation avec une solution de polyéthylène glycol (PEG 400) a été réalisée. Elle permet de révéler la présence de polyphénols et de flavonoïdes, avec une meilleure sensibilité [203]. Le réactif de Neu, composé d'un sel borique (diphénylborate d'aminoéthanol), forme des complexes avec certains groupes de composés phénoliques présents dans les extraits naturels, donnant ainsi lieu à des fluorescences spécifiques en fonction de la nature des composés (Tableau 17) [130, 131]. La seconde révélation au PEG 400 permet d'obtenir des précisions sur la nature des flavonoïdes présents (flavones, flavonols, etc.) (Tableau 18) [130, 203]. Le mélange acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau (100/11/11/26 v/v/v/v) fréquemment utilisé pour l'éluion de ce type de composés a été sélectionné comme phase mobile pour cette étude [129].

**Tableau 17** : Fluorescence spécifique des composés phénoliques en présence du réactif de Neu [130, 131]

Composé	Lumière bleue
Dérivés d'acide caféique	Jaune verdâtre
Dérivés d'acide gallique	+/- visible
Flavones-flavonols	Jaune à orange vif
Flavanones	Rouge orangé
Acides phénoliques	Bleu
Coumarines	Bleu

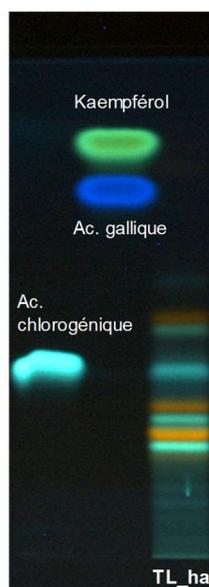
**Tableau 18** : Coloration spécifique des flavonoïdes par révélation avec le PEG 400 [130]

Composé	Lumière bleue
Quercétine, myricétine et leurs glycosides	Jaune orangé
Lutéoline et ses glycosides	Orange
Kaempférol, isorhamnétine et leurs glycosides	Jaune verdâtre
Apigénine et ses glycosides	Jaune verdâtre

Sous UV à 366 nm, l'extrait brut TL\_ha présente de nombreuses bandes de coloration bien distinctes, traduisant la présence de composés phénoliques de natures variées (Figure 30). La présence de flavones ou flavonols (colorations orange et verte) ainsi que des acides phénoliques et/ou des coumarines (coloration bleue) est mise en évidence dans cet extrait. Ces composés correspondent au groupe de molécules B observé sur le profil HPLC de l'extrait TL\_ha (Figure 26).

L'acide chlorogénique est identifié parmi ces composés, par comparaison du rapport frontal et de la coloration de la bande correspondante avec le standard utilisé pour attester de la validité de cette analyse. Cet acide phénolique a déjà été décrit dans le genre *Teucrium* : il a par exemple été identifié dans un extrait de *T. montanum* [204] ou de *T. chamaedrys* [205]. Par co-injection du standard analytique par HPLC-DAD/DEDL, l'**acide chlorogénique** est identifié comme le composé **1** mis en évidence sur le profil HPLC de l'extrait TL\_ha. Sa teneur a été estimée à 1,0 % par dosage par étalonnage externe. Les activités biologiques de ce polyphénol ont fait l'objet de nombreuses études scientifiques, dont un certain nombre sont compilées dans la revue de Naveed *et al.* [206] : ses potentiels antioxydants et anti-inflammatoires ont déjà fait leurs preuves en cosmétique. Ces activités ont été confirmées par

l'évaluation des activités du standard analytique seul testé dans les mêmes conditions expérimentales que l'extrait brut. Il présente en effet des activités antioxydantes ( $94,38 \pm 0,01$  %) et anti-inflammatoires ( $76,19 \pm 0,01$  %), ainsi qu'une activité anti-hyaluronidase ( $100,00 \pm 1,00$  %) qui semble avoir été mise en évidence pour la première fois. Il contribue ainsi aux activités observées pour cet extrait.



**Figure 30** : Etude des polyphénols et flavonoïdes de l'extrait TL\_ha par HPTLC (révélation à 366 nm après dérivations avec le réactif de Neu et le PEG 400)

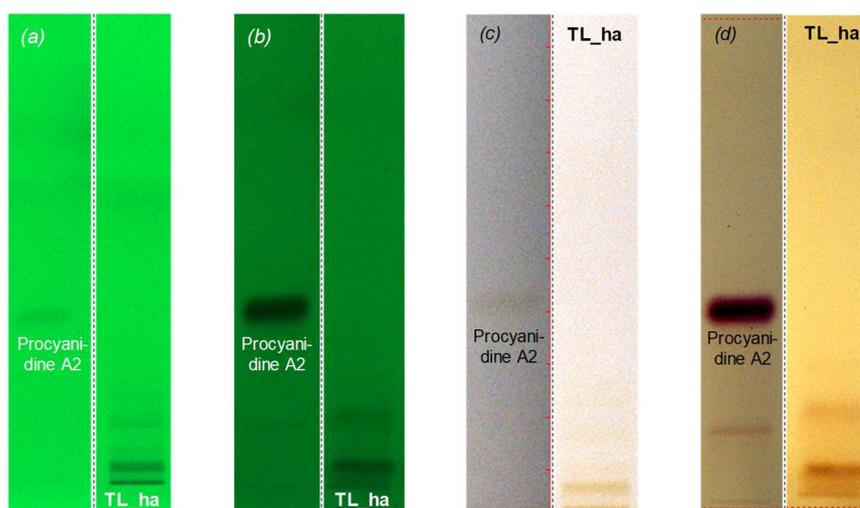
#### D. Caractérisation des composés peu polaires

Bien que l'extrait TL\_ha semble composé majoritairement de molécules polaires (groupes A et B), sa composition en molécules plus lipophiles a été étudiée en utilisant le mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (90/20/1,5 v/v/v) comme phase mobile et par révélation avec le mélange *p*-anisaldéhyde-acide sulfurique [202]. Ce révélateur permet de différencier trois principales classes de composés en fonction de la coloration des bandes : une coloration bleue traduit la présence de monoterpènes, une coloration violette, celle de triterpènes, et une coloration grise, celle de stéroïdes [136]. Les bandes de coloration noire correspondent quant à elles, à des composés de type glucose [130]. Aucune bande caractéristique de ce type de composés n'a été mise en évidence par cette révélation, confirmant la très faible présence de composés lipophiles dans cet extrait (composés du groupe C). En revanche, on peut noter la présence de quelques dérivés de chlorophylle, mis en évidence par des bandes de coloration rouge sous UV à 366 nm sans révélation, dont l'élution est possible avec cette phase mobile.

#### E. Caractérisation des proanthocyanidines, alcaloïdes et anthocyanes

Pour terminer la caractérisation de l'extrait TL\_ha par HPTLC, le réactif sel Fast Blue B a été utilisé afin de révéler la présence des alcaloïdes sous UV à 254 nm (bandes noires) et celles des proanthocyanidines à la lumière blanche (bandes rouges) [137]. Le mélange toluène/acétone/acide formique (45/45/10 v/v/v) a été utilisé comme phase mobile [207]. Il

permet de révéler la présence d'anthocyanes : elles apparaissent sous forme de bandes rouges à la lumière blanche avant dérivatisation [137]. Selon les résultats présentés dans la Figure 31, l'extrait TL\_ha ne semble pas contenir d'alcaloïdes, ce qui est cohérent avec le fait que la famille des Lamiacées n'est pas réputée pour contenir ce type de composés. D'après ces mêmes résultats, l'extrait ne semble pas non plus contenir d'anthocyanes, mais il est plus difficile de conclure quant à la présence de proanthocyanidines. En effet, quelques colorations sont observées sur la plaque (d), mais elles sont peu marquées en comparaison de celle du standard analytique utilisé, la procyanidine A2. Des analyses supplémentaires (autre révélateur ou phase mobile) seraient alors nécessaires afin de confirmer ces hypothèses. Cependant, en raison de la faible teneur de ces composés dans l'extrait TL\_ha, la poursuite de cette étude n'a pas semblé prioritaire.



**Figure 31** : Etude des proanthocyanidines, des alcaloïdes et des anthocyanes de l'extrait TL\_ha par HPTLC (révélation à 254 nm avant et après dérivatisation avec le sel Fast blue B - plaques (a) et (b) et à la lumière blanche - plaques (c) et (d))

### 3.2.2.2.2. Caractérisation par GC-MS et GC/FID

L'étude des composés volatils et semi-volatils présents dans l'extrait TL\_ha a été réalisée par GC-MS. Elles ont permis d'identifier 4 composés : le gaïacol, le pyrocatechol, l'hydroquinone et le 4-vinyl gaïacol (Tableau 19). Ce dernier est le seul composé à avoir été décrit dans le genre *Teucrium* [208]. Leurs teneurs ont été estimées par étalonnage externe par GC/FID : le gaïacol et le pyrocatechol représentent chacun 0,20 % de l'extrait brut ; les deux autres composés représentent quant à eux, moins de 0,10 %. Le gaïacol contribue aux activités antioxydantes de cet extrait, et le 4-vinyl gaïacol, bien que présent en faible proportion, contribue aux activités anti-inflammatoires.

**Tableau 19** : Composés identifiés par GC-MS/FID dans l'extrait TL\_ha

Composés identifiés	RI calculé <sup>(1)</sup> / RI littérature	Teneur estimée <sup>(3)</sup>	Références	Activités biologiques <sup>(4)</sup>
Gaïacol	1086/1089 <sup>(2)</sup>	0,20 %	Non décrit dans le genre <i>Teucrium</i>	Antioxydante (75,48 ± 0,01 %)

Pyrocatechol	1498/1497 <sup>(2)</sup>	0,20 %	Non décrit dans le genre <i>Teucrium</i>	Aucune
Hydroquinone	1271/1241	0,03 %	Non décrite dans le genre <i>Teucrium</i>	Non évaluées
4-vinyl gaïacol	1300/1328 <sup>(2)</sup>	0,08 %	Décrit dans l'huile essentielle de <i>T. flavum</i> spp. <i>flavum</i> [208]	Anti-inflammatoire (58,58 ± 0,01 %)

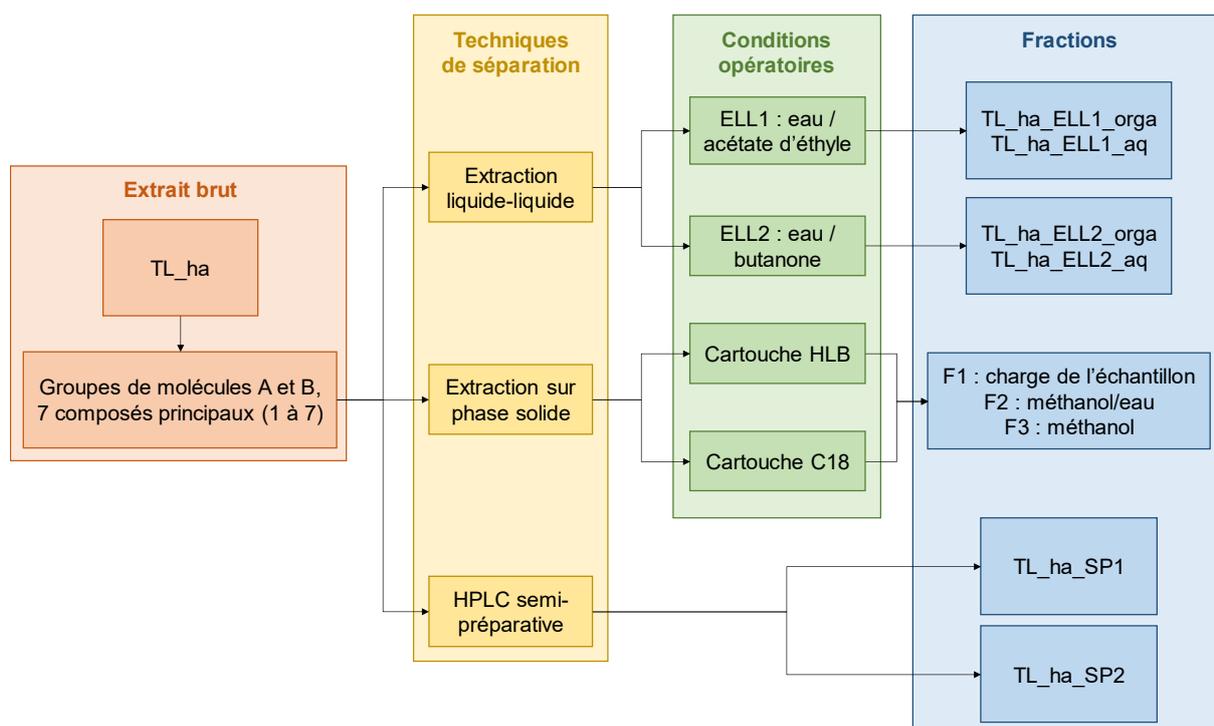
RI = indice de rétention déterminé sur colonne HP-1 à l'aide d'une série d'alcane (C8-C24) et comparé aux RI disponibles dans la littérature - <sup>(2)</sup> Identification validée par comparaison de RI avec le RI d'un standard analysé dans les mêmes conditions - <sup>(3)</sup> Teneur déterminée par étalonnage externe avec une solution étalon de gaïacol - <sup>(4)</sup> évaluées selon les tests in vitro

L'extrait TL\_ha présente des activités antioxydantes, anti-hyaluronidase et anti-inflammatoires intéressantes. Il est caractérisé par la présence de deux groupes de composés A et B. Parmi les composés du groupes B, 7 composés principaux ont été mis en évidence sur le chromatogramme HPLC. La caractérisation par HPTLC a permis d'identifier les grandes familles de composés présents dans l'extrait brut TL\_ha. Le groupe de composés A est principalement constitué de glucides, parmi lesquels le glucose, le saccharose et le fructose ont été identifiés comme composés majoritaires. Ils représentent à eux trois, 17,6 ± 0,7 % de la masse de l'extrait. Les composés du groupe B sont quant à eux, des polyphénols et des flavonoïdes de natures très variées (flavones, flavonols, acides phénoliques, etc.). L'acide chlorogénique a été identifié dans cet extrait : il correspond au composé 1 mis en évidence sur le profil HPLC de l'extrait TL\_ha, et sa teneur a été estimée à 1,0 %. Enfin, 4 composés volatils (le gaïacol, le pyrocatechol, l'hydroquinone et le 4-vinyl gaïacol) présents en faible proportion (< 0,20 %) ont été identifiés dans cet extrait par GC-MS.

### 3.2.2.3. Caractérisation des groupes de composés A et B

#### 3.2.2.3.1. Séparation des groupes de composés A et B

Afin de poursuivre la caractérisation de cet extrait et d'identifier le(s) groupe(s) de composés responsable(s) des activités, il est nécessaire de séparer les deux groupes de composés A et B, majoritaires dans l'extrait TL\_ha. Pour cela, les performances de trois techniques séparatives ont été évaluées : l'extraction liquide-liquide (LLE), l'extraction sur phase solide (SPE) et l'HPLC semi-préparative. Cette étude comparative a été menée afin de déterminer la technique la plus adaptée en termes d'efficacité de séparation, de temps et de quantité de solvants utilisée pour être ensuite employée plus largement pour le développement d'autres ingrédients cosmétiques naturels. Les différentes fractions obtenues lors de cette étude sont représentées sur la Figure 32.



**Figure 32** : Séparation et caractérisation des groupes de composés A et B à partir de l'extrait TL\_ha selon trois techniques séparatives

#### A. Séparation par extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide est une technique séparative reposant sur la différence de solubilité des composés dans deux phases liquides non miscibles [140]. L'efficacité de séparation des groupes de composés A et B a été testée avec deux systèmes de solvants : eau/acétate d'éthyle (ELL1) et eau/butanone (ELL2). Ces solvants ont été sélectionnés pour leurs polarités différentes : l'acétate d'éthyle présente un moment dipolaire plus faible que l'eau, à l'inverse de la butanone (Tableau 20).

**Tableau 20** : Moments dipolaires des solvants utilisés [209]

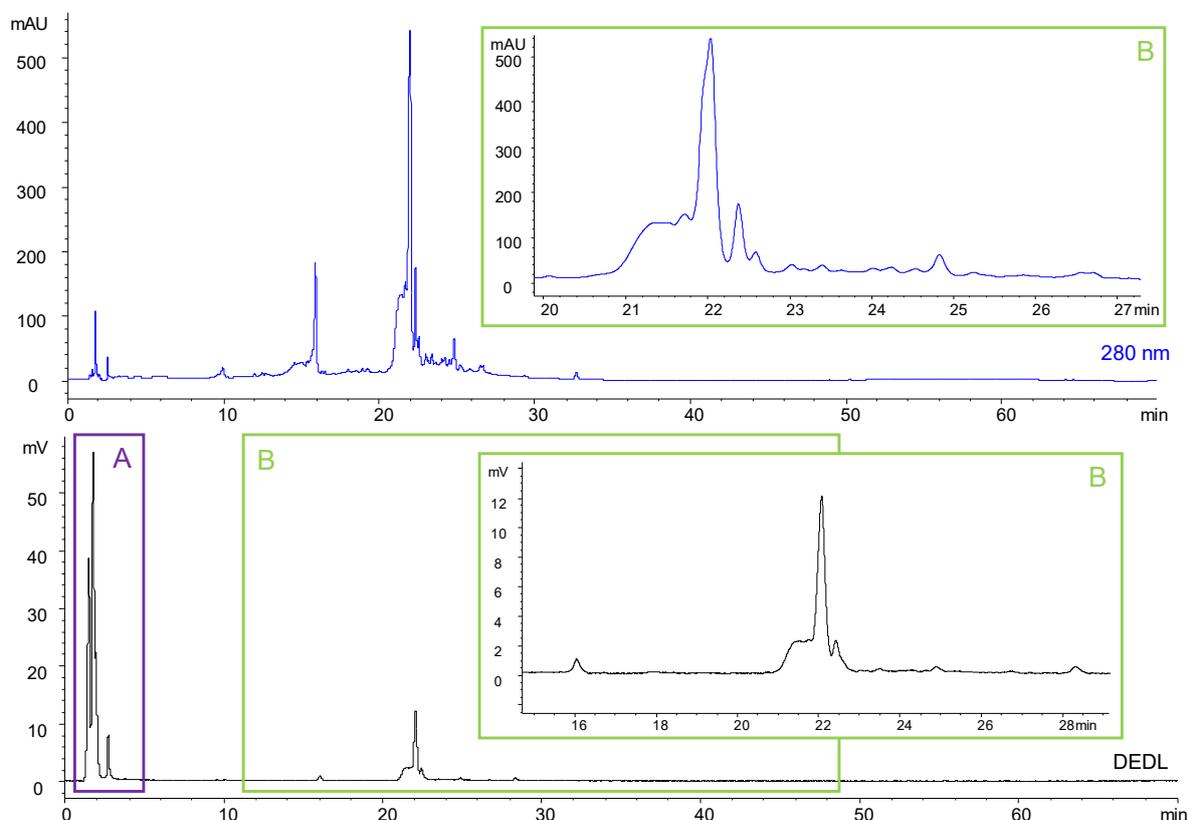
Solvant	Moment dipolaire
Eau	1,85 D
Acétate d'éthyle	1,78 D
Butanone	2,76 D

Les conditions opératoires et les rendements obtenus lors de ces deux extractions sont présentés dans le Tableau 21. La quantité de solvants utilisée lors de la seconde extraction a délibérément été diminuée afin d'optimiser les conditions d'extraction, tout en conservant le ratio phase organique/phase aqueuse utilisé lors de la première extraction. Les suffixes *\_aq* et *\_orga* correspondent respectivement aux fractions aqueuses et organiques obtenues après extraction liquide-liquide. Dans ces conditions d'étude, l'extraction liquide-liquide présente l'avantage de ne pas perdre de matière, elle est également rapide à mettre en place. Les composés présents dans l'extrait TL\_ha présentent des affinités plus fortes pour l'eau, que pour les solvants organiques, puisque les fractions aqueuses sont obtenues avec un rendement plus important.

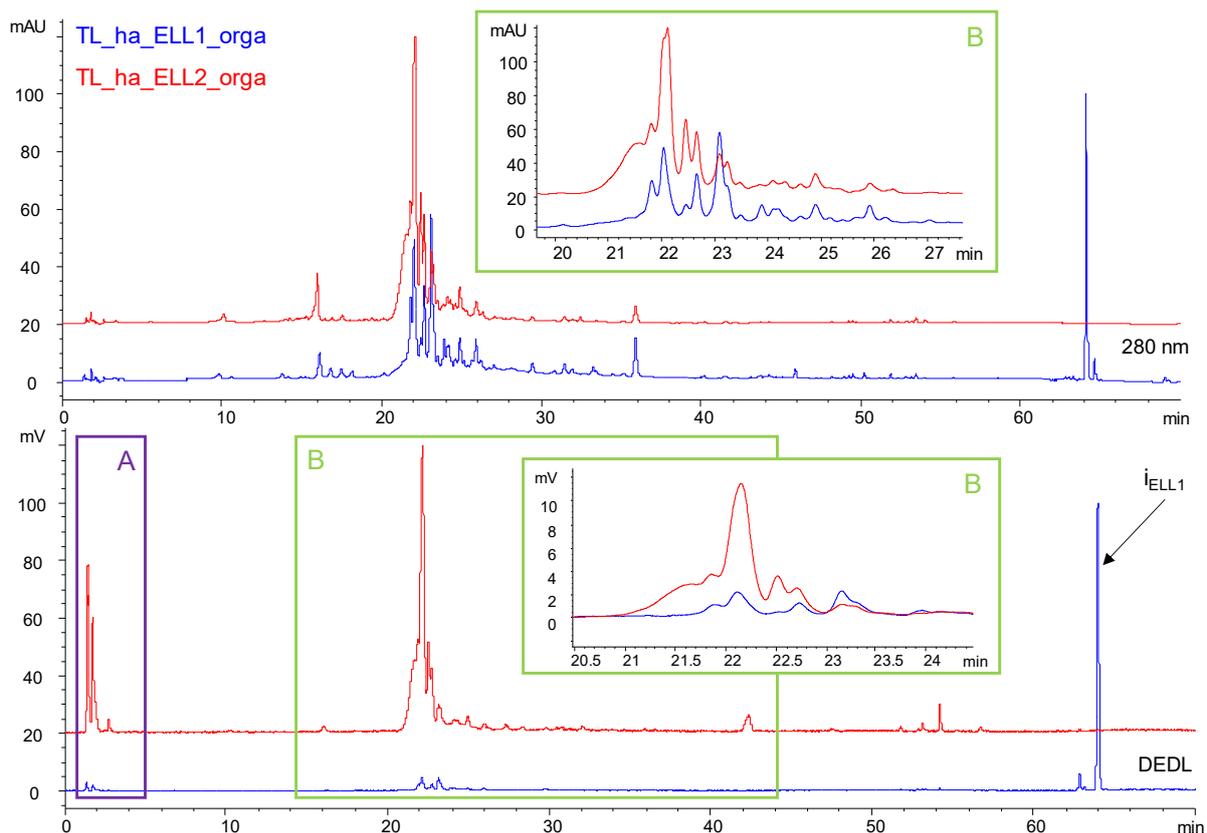
**Tableau 21** : Conditions expérimentales et rendements obtenus pour les extractions liquide-liquide

Paramètres	TL_ha_ELL1_organique	TL_ha_ELL1_aqueuse	TL_ha_ELL2_organique	TL_ha_ELL2_aqueuse
Solvant organique	Acétate d'éthyle		Butanone	
Masse d'extrait TL_ha	114 mg		104 mg	
Volume solvant	125,0 mL	45,0 mL	20,0 mL	7,5 mL
Masse obtenue	33 mg	92 mg	47 mg	69 mg
Rendement	26 %	74 %	41 %	59 %

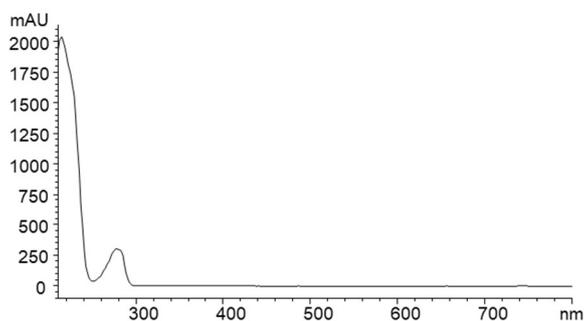
Quel que soit le système de solvant utilisé, les fractions aqueuses et organiques sont composées des deux groupes de molécules A et B (Figure 33, Figure 34). Cette séparation n'a donc pas permis d'isoler ces deux groupes de composés ; elle a seulement permis d'enrichir les fractions organiques en composés du groupe B. La principale différence entre les deux fractions organiques est la présence du composé  $i_{ELL1}$  dans la fraction TL\_ha\_ELL1\_organique obtenue avec l'acétate d'éthyle, qui, d'après son spectre UV, correspond à un composé phénolique (Figure 35). L'hypothèse d'une impureté retenue dans la colonne ou la pré-colonne analytique et qui serait responsable de la présence de ce composé a été éliminée d'emblée par une injection de méthanol seul au préalable. Des analyses par HPLC-ESI-MS et par GC-MS de cette fraction ont été réalisées, mais aucune information n'a pu être obtenue sur ce composé dans les conditions d'analyse utilisées. Un isolement de ce composé serait nécessaire afin de le caractériser d'un point de vue structural par RMN. Un tel isolement est envisagé par la suite, lorsque des quantités suffisantes de matière première seront disponibles pour de telles analyses.



**Figure 33** : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 280 nm de la fraction TL\_ha\_ELL2\_aq (similaires à ceux de la fraction TL\_ha\_ELL1\_aq)



**Figure 34 :** Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 280 nm des fractions TL\_ha\_ELL1\_organ (bleu) et TL\_ha\_ELL2\_organ (rouge)



**Figure 35 :** Spectre UV du composé  $i_{ELL1}$

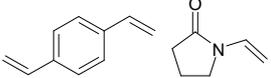
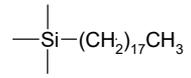
L'extraction liquide-liquide n'a pas permis de séparer efficacement les deux groupes de composés A et B dans les conditions utilisées.

### B. Séparation par extraction sur phase solide

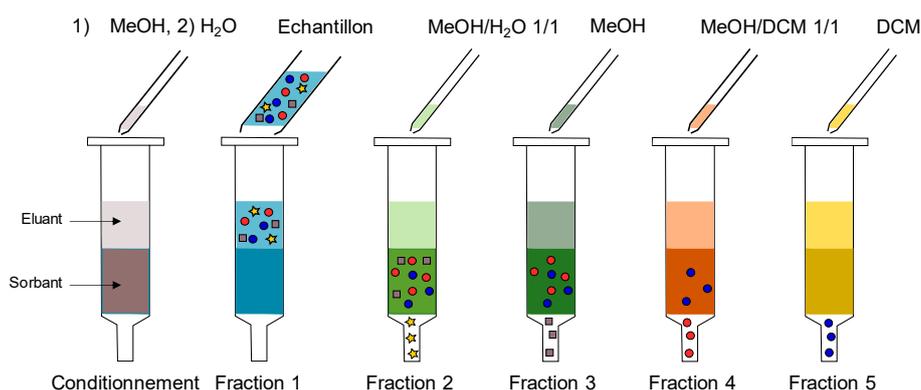
L'extraction sur phase solide est une technique largement utilisée pour la séparation des composés polaires (notamment les glucides) et des composés phénoliques, qui repose sur la différence d'affinité de ces composés avec la phase stationnaire contenue dans la cartouche [210, 211]. En comparaison à l'extraction liquide-liquide, la SPE est plus sélective, et peut éventuellement être automatisée. Le choix de la phase stationnaire est le paramètre déterminant pour une séparation optimale. Dans le cas d'extraits composés de molécules

polaires (groupe A) et de composés phénoliques (groupe B), il est intéressant d'utiliser le mode de chromatographie en phase inverse, avec l'emploi d'une silice greffée C18 [210] ou d'une phase polymérique comme phase stationnaire [211]. Les composés polaires, très hydrophiles, ne sont pas retenus par la phase stationnaire, et sont directement élués lors de la charge de l'échantillon. Les composés phénoliques, présentant des affinités avec ce type de phase, sont quant à eux retenus, et sont élués par la suite à l'aide de solvants organiques. Afin de sélectionner la phase stationnaire la plus adaptée pour la séparation des composés des groupes A et B, l'efficacité de séparation de ces deux types de phases a été évaluée (Tableau 22).

**Tableau 22** : Caractéristiques des phases stationnaires utilisées

Cartouche	OASIS HLB 6cc (Waters)	Discovery C18 (Supelco)
Phase stationnaire	Co-polymère 	Silice greffée C18 
Masse de sorbant	500 mg	1 g
Capacité de charge (par rapport à la masse de sorbant)	10 à 15 %	1 à 5 %
Taille des particules	60 µm	50 µm
Taille des pores	80 Å	70 Å
Volume de la cartouche	6 mL	12 mL

Après conditionnement de la phase stationnaire, l'extrait TL\_ha préalablement dilué à 5 mg/mL dans de l'eau (concentration déterminée selon les consignes des fournisseurs), est chargé sur cette dernière. Une masse d'extrait correspondant à 10 % de la masse du sorbant a été éluée afin de comparer l'efficacité de ces phases : 50 mg d'échantillon ont été chargés sur la phase polymérique HLB et respectivement, 100 mg pour la phase C18. Bien que la capacité de charge de la phase C18 soit plus faible que celle de la phase polymérique, cette masse d'échantillon permet de concentrer les composés d'intérêt sans saturer la phase stationnaire puisque les composés polaires, non retenus par ce type de phase, représentent au minimum 17 % de la masse de l'extrait (d'après le dosage par HPTLC des 3 sucres majoritaires). Les composés retenus sur la phase stationnaire sont ensuite élués graduellement par 4 solvants/mélanges de solvants de polarité décroissante : MeOH/H<sub>2</sub>O (50/50 v/v), MeOH, MeOH/DCM (50/50 v/v) et DCM, comme représenté sur la Figure 36. Les rendements des fractions obtenues sont présentés dans le Tableau 23.



**Figure 36** : Protocole expérimental de séparation des composés des groupes A et B par SPE

**Tableau 23** : Comparaison des phases stationnaires et masses obtenues

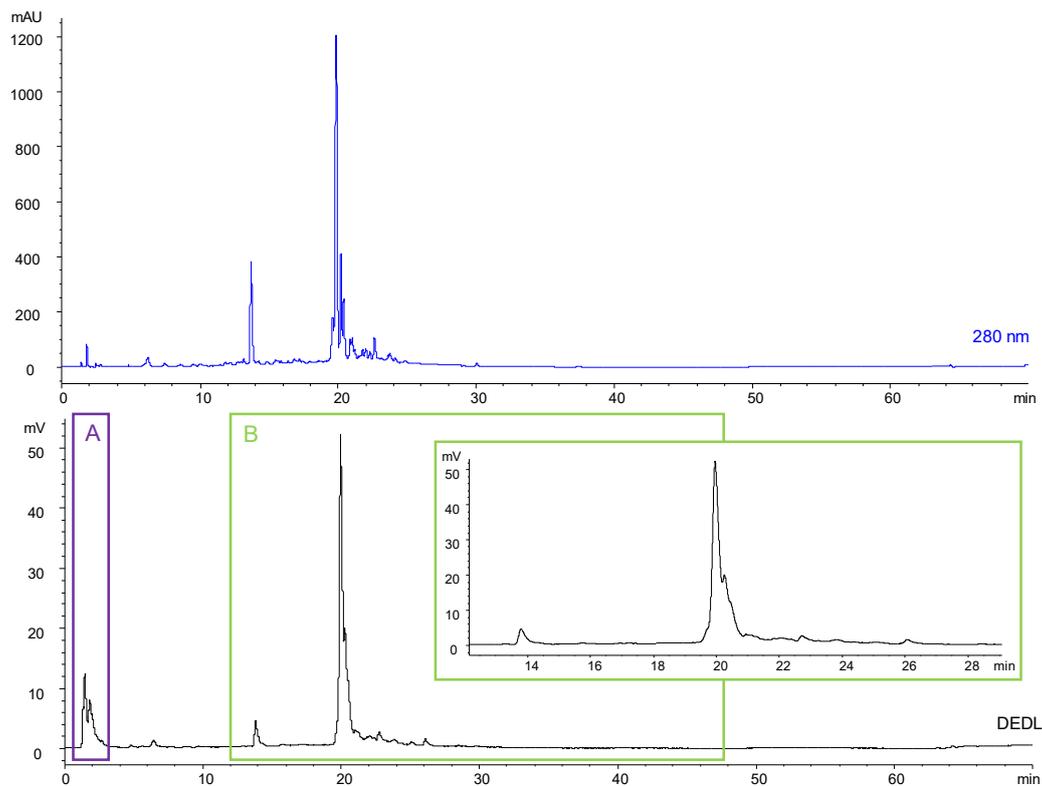
Phase stationnaire			OASIS HLB 6cc		Discovery C18	
Masse extrait TL_ha			50 mg		100 mg	
Résultats		Volume	Masse	Rendement	Masse	Rendement
Fraction 1	Charge de l'échantillon	10 mL / 20 mL	19 mg	34 %	43 mg	41 %
Fraction 2	MeOH/H <sub>2</sub> O	10 mL	29 mg	51 %	53 mg	51 %
Fraction 3	MeOH	10 mL	8 mg	14 %	8 mg	7 %
Fraction 4	MeOH/DCM	10 mL	1 mg	2 %	n.s.	n.s.
Fraction 5	DCM	10 mL	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

*n.s.* : non significatif

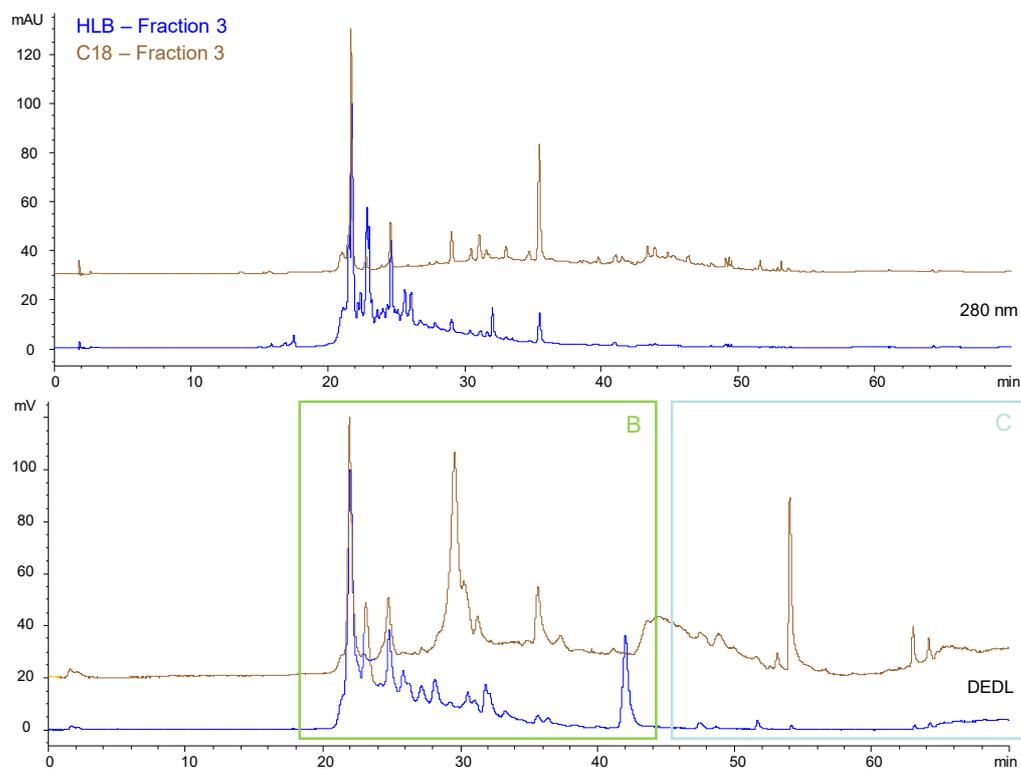
Comme supposé, les fractions 1, correspondant à la charge de l'échantillon (extrait TL\_ha dilué dans l'eau), sont composées de molécules du groupe A, trop hydrophiles pour être retenues par la phase stationnaire. Ce groupe de composés représente une part importante de l'extrait brut TL\_ha, puisque ces fractions sont obtenues avec un rendement de 34 % pour la phase polymérique et de 41 % pour la phase C18. Les fractions 2, obtenues après élution avec un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O, sont composées d'un mélange de molécules des groupes A et B (Figure 37). Obtenues avec un rendement de 51 %, ces fractions sont enrichies en composés du groupe B, puisqu'une part importante des composés du groupe A est retrouvée dans les fractions 1.

Les fractions 3, obtenues après élution avec le méthanol, présentent des rendements plus faibles : 14 % pour la phase polymérique et 7 % pour la phase C18. Elles sont composées de molécules du groupe B, ainsi que de composés plus lipophiles du groupe C (Figure 38). Ce groupe de composés, mis en évidence dans les fractions TL\_EtOH\_F2 et TL\_EtOH\_F3, a été identifié comme responsable d'une partie des activités observées. D'après le chromatogramme HPLC, la composition du groupe de composés B entre ces deux fractions 3 n'est pas identique ; ils ne correspondent pas non plus à ceux de l'extrait brut TL\_ha, ni des fractions 2. En effet, de nombreux composés éluant à des temps de rétention compris entre 20 et 45 min sont observés pour ces deux fractions 3, alors que des composés éluant entre 20 et 25 min étaient observés pour les fractions 2 et l'extrait brut. Des différences notables en termes de composés présents et d'intensité des signaux (visibles par la détection DEDL) sont

observables pour ces deux fractions 3. Les composés du groupe B sont donc retenus différemment par ces deux phases stationnaires.



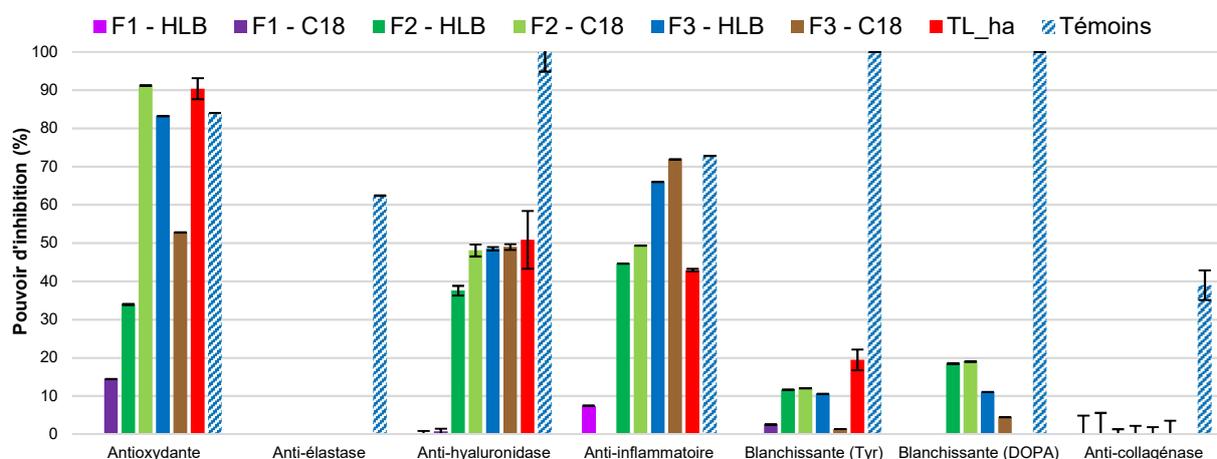
**Figure 37** : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 280 nm de la fraction 2 obtenue par élution au MeOH/H<sub>2</sub>O avec la phase polymérique (comparables à ceux obtenus avec la phase C18)



**Figure 38** : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 280 nm des fractions 3 obtenues par élution au MeOH

Les fractions 4 et 5, obtenues respectivement par élution avec le mélange MeOH/DCM et le DCM ne contiennent pas ou peu de composés. Les éluions réalisées avec le méthanol et le mélange MeOH/H<sub>2</sub>O permettent ainsi de recueillir tous les composés retenus.

Contrairement à l'extraction liquide-liquide, la SPE permet donc de séparer une partie des composés des groupes A et B, puisque les fractions 1 sont composées uniquement de composés du groupe A, et les fractions 3, de composés des groupes B et C. Afin d'identifier quel groupe de composés est responsable des activités observées, les activités biologiques des 3 principales fractions (F1 : charge de l'échantillon ; F2 : élution MeOH/H<sub>2</sub>O ; F3 : élution MeOH) ont été évaluées à l'aide de tests d'activité *in vitro* (Figure 39).



**Figure 39** : Activités biologiques des 3 principales fractions obtenues par SPE

Les fractions 1 ne présentent aucune activité biologique, ce qui permet de conclure que les molécules du groupe A ne sont pas responsables des activités observées pour l'extrait brut TL\_ha.

Les fractions 2, contenant un mélange des composés des groupes A et B, présentent des activités anti-hyaluronidase et anti-inflammatoire comparables à celles de l'extrait brut. Des différences sont observables pour les activités antioxydantes : la fraction obtenue avec la phase polymérique présente des activités plus faibles que celle obtenue avec la phase C18, qui présente des activités comparables à celles de l'extrait brut.

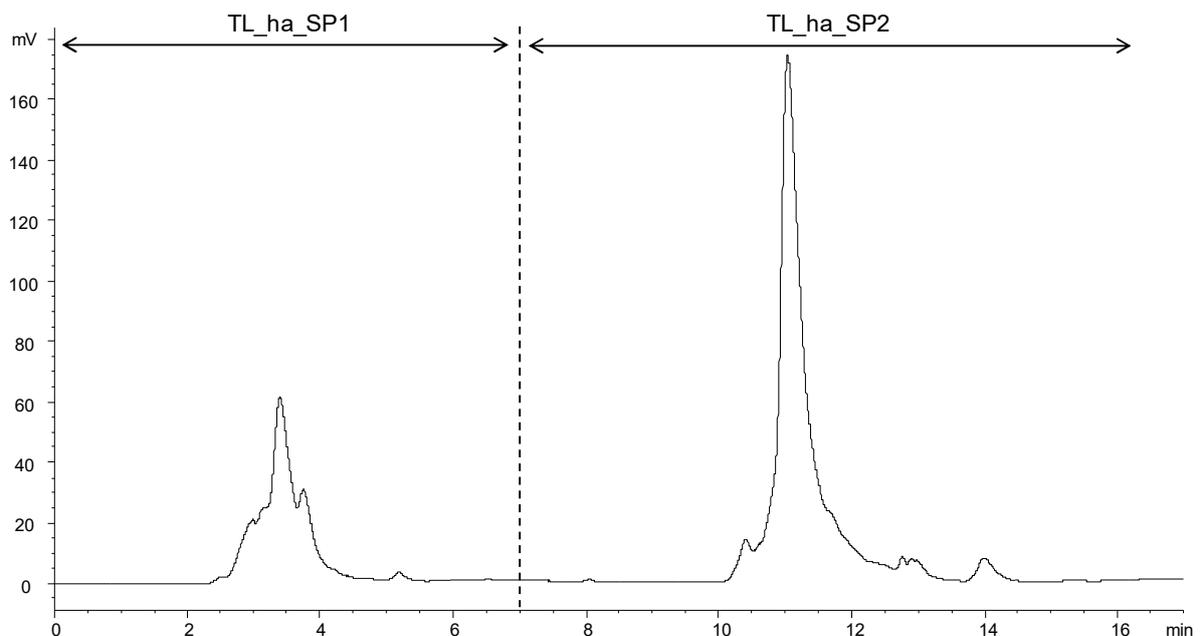
La tendance s'inverse pour les fractions 3 : la fraction obtenue avec la phase polymérique présente une activité antioxydante similaire à celle de l'extrait brut, contrairement à la fraction obtenue avec la phase C18. Les autres activités de ces fractions 3 sont semblables quelle que soit la phase stationnaire employée : leurs activités anti-hyaluronidase sont similaires à celles de l'extrait brut et des fractions 2, et leurs activités anti-inflammatoires sont meilleures.

Ces observations ont permis d'identifier les deux groupes de composés B et C comme étant responsables des activités observées. Les différences d'activités antioxydantes observées pour les fractions 2 et 3 en fonction de la phase stationnaire utilisée s'expliquent par leurs compositions variées dues aux caractéristiques de rétention propres à chacune des phases stationnaires utilisées.

La SPE a permis de séparer une partie des composés des groupes A et B, et d'enrichir une fraction en composés du groupe C. Cette étude a permis de conclure que les composés du groupe A ne sont responsables d'aucune activité, contrairement aux composés des groupes B et C, qui s'avèrent donc être les composés d'intérêt. L'efficacité des deux phases stationnaires utilisées lors de cette étude est comparable ; les principales différences concernent la rétention de certains composés, notamment ceux qui sont responsables des activités antioxydantes. Rapide et facile à mettre en œuvre, la SPE s'est révélée particulièrement efficace pour ce type de séparation.

### C. Séparation par HPLC semi-préparative

La troisième technique de séparation utilisée pour isoler les composés des groupes A et B est l'HPLC semi-préparative, une technique très utilisée pour l'isolement de composés naturels. Les fractions TL\_ha\_SP1 et TL\_ha\_SP2 ont été collectées en utilisant les conditions de séparation optimisées (Figure 40).



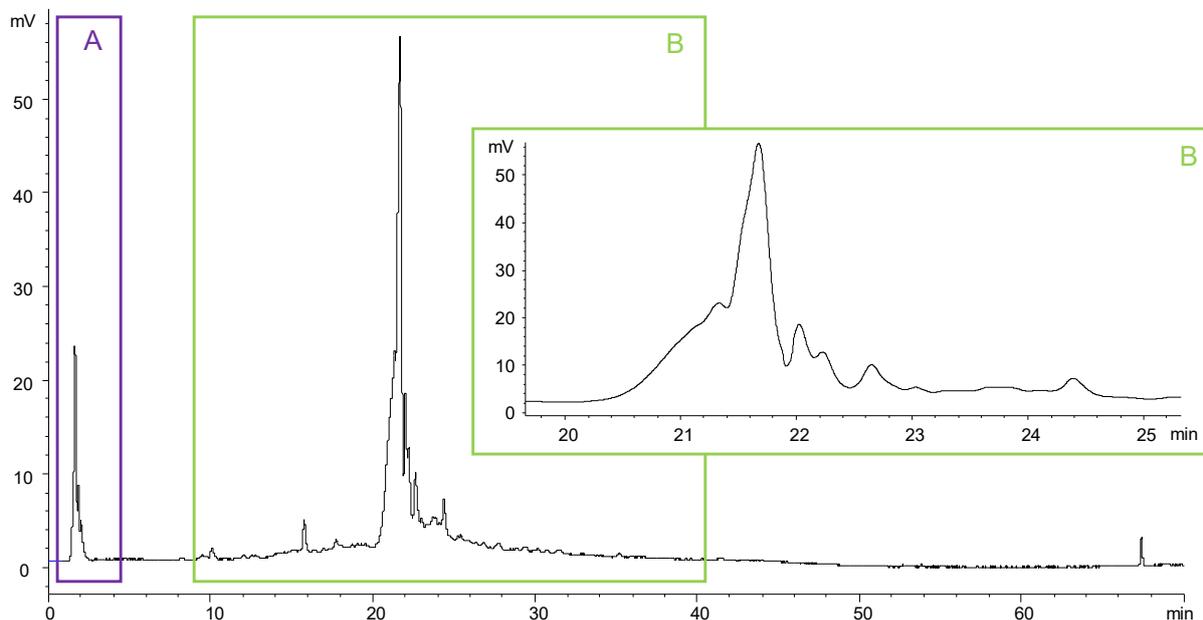
**Figure 40** : Chromatogramme HPLC/DEDL obtenu sur colonne semi-préparative C18 Luna® dans le but de séparer les groupes de composés A et B de l'extrait TL\_ha (gradient A, paragraphe 5.2.1.3)

Les deux fractions ont été obtenues avec des rendements proches : 49 % pour la fraction TL\_ha\_SP1 et 43 % pour la fraction TL\_ha\_SP2 (Tableau 24), soit un rendement total de 92 %. Ainsi, contrairement aux techniques précédentes, l'HPLC semi-préparative entraîne une légère perte de matière qui peut s'expliquer par la rétention de certains composés sur la colonne ou encore par des incertitudes sur les masses des fractions récupérées qui sont relativement faibles. L'HPLC semi-préparative nécessite par ailleurs des volumes et des temps d'analyse considérables pour séparer seulement quelques milligrammes d'extrait.

**Tableau 24** : Masses obtenues et conditions d'analyse par HPLC semi-préparative

Masse extrait	Volume de solvant	Temps	Masses obtenues		Rendement
35 mg	750 mL	4 h	TL_ha_SP1	17 mg	49 %
			TL_ha_SP2	15 mg	43 %

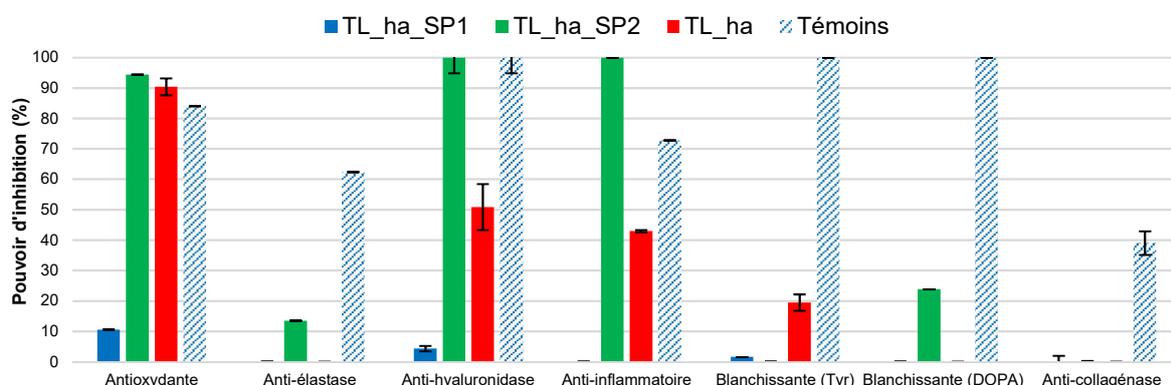
L'HPLC semi-préparative a permis d'isoler spécifiquement les composés du groupe A dans la fraction TL\_ha\_SP1, alors que la fraction TL\_ha\_SP2 est composée des deux groupes de molécules A et B (Figure 41). Dans les conditions de séparation utilisées (Figure 40), cette dernière ne devrait pas contenir de composés du groupe A. Plusieurs hypothèses ont été envisagées afin d'expliquer ce phénomène. L'hypothèse de composés retenus dans la colonne ou la pré-colonne analytique a été éliminée d'emblée par une injection de méthanol seul au préalable. L'hypothèse de composés retenus sur la colonne semi-préparative lors des injections répétées et élués par la suite avec un gradient de solvant moins polaire a également été écartée par une injection de méthanol seul après analyse. La dernière hypothèse envisagée implique la dégradation de certains composés, et notamment des dérivés glycosylés, par méthanolyse acide par exemple. En effet, les échantillons sont dilués dans le méthanol et sont par conséquent en contact avec une phase mobile acide pouvant induire ce type de dégradation. Les sucres résultants se retrouveraient alors dans le groupe de composés A très polaires.



**Figure 41** : Chromatogramme HPLC/DEDL de la fraction TL\_ha\_SP2

L'évaluation des activités biologiques de ces deux fractions confirme les conclusions obtenues à la suite de l'étude par SPE de l'extrait TL\_ha (Figure 42). La fraction TL\_ha\_SP1, composée uniquement de composés du groupe A, ne présente aucune activité biologique. En revanche, la fraction TL\_ha\_SP2, composée majoritairement de molécules du groupe B, présente des activités très intéressantes : son activité antioxydante est similaire à celle de l'extrait TL\_ha et ses activités anti-hyaluronidase et anti-inflammatoires sont deux fois plus importantes que

celles de l'extrait brut. L'enrichissement de cette fraction en composés du groupe B permet d'expliquer ces observations.



**Figure 42 :** Activités biologiques des fractions obtenues par HPLC semi-préparative

La séparation par HPLC semi-préparative permet de séparer la majorité des composés du groupe A, de ceux du groupe B, elle permet également de confirmer que les composés d'intérêt sont ceux du groupe B. En revanche, elle nécessite des temps d'analyses importants pour séparer de faibles quantités d'extrait.

En conclusion de cette étude, la SPE et l'HPLC semi-préparative ont toutes les deux permis de séparer en partie les composés des groupes A et B (Tableau 25). La SPE s'avère être la technique la plus efficace pour ce type d'étude : elle est plus rapide que l'HPLC semi-préparative et permet de séparer des quantités plus importantes d'extrait en utilisant moins de solvants. Il faut compter presque 6 h de séparation (contre 30 min) et 6 L de solvants (contre 60 mL) pour séparer une quantité équivalente d'extrait par HPLC semi-préparative en comparaison à la SPE. La diversité des phases stationnaires et la large gamme de masses de sorbant disponibles pour ces différentes cartouches (de centaines de milligrammes à des dizaines de grammes) permettent de sélectionner les paramètres les plus adaptés en fonction de la séparation à réaliser. L'extraction liquide-liquide, avec les mélanges de solvants utilisés, a seulement permis d'enrichir les fractions organiques en composés d'intérêt. D'autres mélanges de solvants pourraient être testés afin d'améliorer cette séparation. Cette technique présente l'avantage de pouvoir séparer rapidement des quantités importantes d'extrait avec de faibles quantités de solvants.

**Tableau 25 :** Comparaison des techniques de séparation utilisées pour isoler les composés des groupes A et B présents dans l'extrait TL\_ha

Technique séparative	Qualité de l'isolement	Temps	Masse engagée	Solvant	Rendement
Extraction liquide-liquide	Mélange des groupes de composés A et B	15 min	100 mg	30 mL	100 %
Extraction sur phase solide	Séparation des groupes de composés A et B	30 min	50-100 mg	60 mL	100 %
HPLC semi-préparative	Séparation des groupes de composés A et B	4 h	35 mg	4 L	~ 90 %

Cette étude comparative de techniques de séparation a permis d'établir que les composés du groupes B sont les principaux composés d'intérêt dans le cadre de cette étude : ils sont responsables des activités biologiques de l'extrait TL\_ha. Les composés du groupe C, présents en proportions moins importantes, contribuent également à ces activités. Ces deux groupes de composés sont donc à caractériser en priorité.

La comparaison de ces trois techniques de séparation a permis d'établir que l'extraction sur phase solide est la technique la plus efficace pour ce type de séparation ; elle sera donc utilisée par la suite pour l'analyse d'autres extraits végétaux.

### 3.2.2.4. Fractionnement bioguidé de l'extrait TL\_ha

Afin de caractériser les composés des groupes B et C et d'identifier plus précisément les composés actifs, l'extrait brut TL\_ha a été fractionné. Ce dernier a été réalisé à partir de 12,51 g d'extrait brut, déposés préalablement sur silice avec un ratio massique extrait/silice 1/2. Les composés ont été élués sur colonne ouverte de silice en phase normale, à l'aide de 7 solvants/mélanges de solvants de polarité croissante. Sept fractions, nommées TL\_ha\_F1 à TL\_ha\_F7, ont ainsi été collectées avec un rendement total de 77,5 % (Tableau 26).

**Tableau 26** : Rendements des fractions collectées lors du fractionnement sur colonne de l'extrait TL\_ha

Fraction	Solvant	Masse	Rendement
TL_ha_F1	Cyclohexane/éther diéthylique (50/50 v/v)	38 mg	0,3 %
TL_ha_F2	Ether diéthylique	116 mg	0,9 %
TL_ha_F3	Ether diéthylique/MeOH (80/20 v/v)	170 mg	1,4 %
TL_ha_F4	Ether diéthylique/MeOH (50/50 v/v)	526 mg	4,2 %
TL_ha_F5	Ether diéthylique/MeOH (20/80 v/v)	4068 mg	32,5 %
TL_ha_F6	MeOH	3259 mg	26,1 %
TL_ha_F7	MeOH/H <sub>2</sub> O (50/50 v/v)	1510 mg	12,1 %

Les profils chromatographiques par HPLC/DEDL de ces fractions ainsi que leurs activités biologiques sont présentées sur les Figure 44 et Figure 45. Une relation de causalité entre composition en métabolites et activité(s) biologique(s) est une fois de plus mise en évidence par ce fractionnement.

La fraction TL\_ha\_F1, obtenue avec un rendement très faible (0,3 %), ne présente pas d'activité intéressante.

Les fractions TL\_ha\_F2 et TL\_ha\_F3, également obtenues avec de faibles rendements (proches de 1 %), présentent des activités anti-élastase et anti-inflammatoires remarquables. La fraction TL\_ha\_F4 dont le rendement est de 4,2 %, présente des activités antioxydantes et anti-inflammatoires modérées.

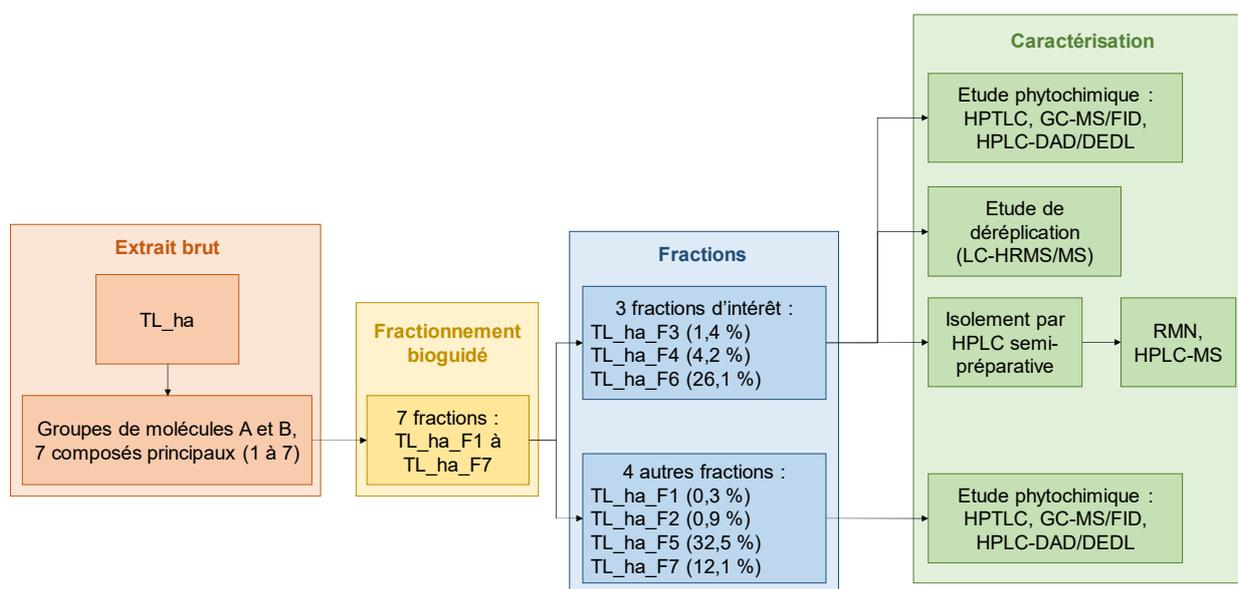
La fraction TL\_ha\_F5, obtenue avec le meilleur rendement (32,5 %), présente uniquement une faible activité antioxydante.

La fraction TL\_ha\_F6, recueillie avec un rendement intéressant (26,1 %), présente des activités antioxydantes et anti-hyaluronidase remarquables, ainsi qu'une activité anti-inflammatoire relativement intéressante.

La fraction TL\_ha\_F7, dont le rendement est de 12 %, présente comme la fraction TL\_ha\_F6 une forte activité antioxydante, ainsi que des activités anti-hyaluronidase et anti-inflammatoires modérées.

Les fractions TL\_ha\_F3, TL\_ha\_F4 et TL\_ha\_F6 ont été sélectionnées comme fractions d'intérêt en raison de leurs activités remarquables et de leurs profils phytochimiques intéressants. Elles ont par ailleurs été collectées en quantité suffisante pour réaliser une étude de caractérisation approfondie. Une caractérisation phytochimique de ces 3 fractions a été réalisée en employant différentes techniques d'analyse et différents détecteurs (HPTLC, GC-MS, GC/FID, HPLC-MS, HPLC-DAD/DEDL) (Figure 43). Les méthodes de déréplication ayant connues d'importants développements ces dernières années en phytochimie, leurs performances ont été évaluées dans le cadre de cette étude. Cette stratégie a été utilisée pour approfondir la caractérisation des trois fractions d'intérêt à l'aide d'analyses LC-HRMS/MS. En parallèle, afin d'évaluer l'efficacité de cette méthode, ces 3 fractions ont été étudiées de manière classique, par isolement des composés majoritaires par HPLC semi-préparative et caractérisation structurale des composés par RMN. Cette stratégie d'étude par déréplication est particulièrement détaillée pour la fraction TL\_ha\_F3 ; l'étude des fractions TL\_ha\_F4 et TL\_ha\_F6 ayant été menée de la même manière, seuls les résultats sont présentés dans ce chapitre (les détails de ces deux études sont développés en annexes 1 et 2).

Pour compléter cette étude, une caractérisation phytochimique des 4 autres fractions obtenues lors de ce fractionnement a été réalisée en employant différentes techniques d'analyse et différents détecteurs (HPTLC, GC-MS, GC/FID, HPLC-MS, HPLC-DAD/DEDL, RMN).



**Figure 43** : Stratégie d'étude utilisée pour caractériser les différentes fractions obtenues par fractionnement de l'extrait TL\_ha sur colonne ouverte de silice en phase normale

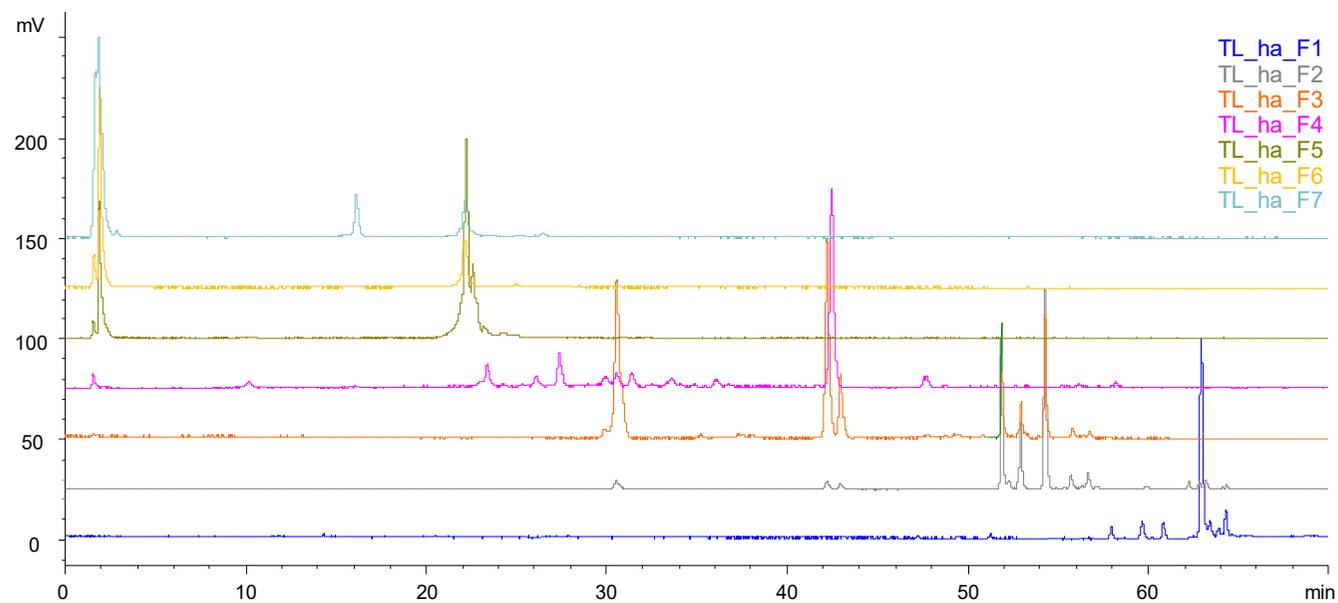


Figure 44 : Chromatogrammes HPLC/DEDL des fractions collectées par fractionnement sur colonne ouverte de silice en phase normale de l'extrait TL\_ha

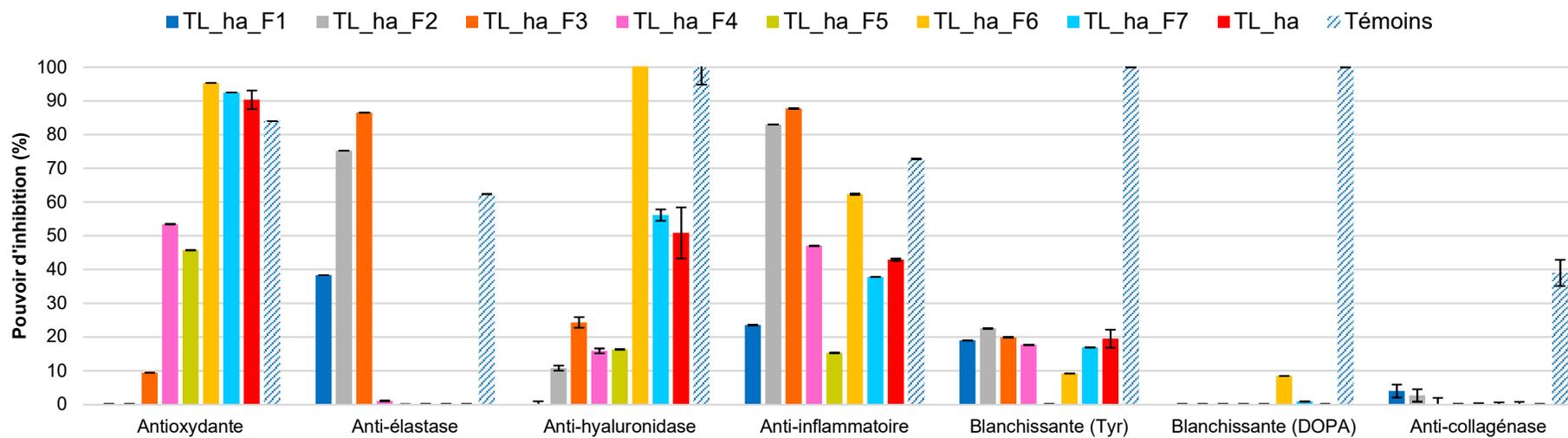


Figure 45 : Activités biologiques des fractions obtenues par fractionnement de l'extrait TL\_ha

### 3.2.2.4.1. Etude de la fraction TL\_ha\_F3

#### A. Caractérisation phytochimique par HPTLC, GC-MS, GC/FID et HPLC-DAD/DEDL

La fraction TL\_ha\_F3 présente des activités anti-inflammatoires et anti-élastase très intéressantes, supérieures à 80 %. L'analyse de cette fraction par HPTLC a été réalisée selon les mêmes conditions que celles utilisées lors de l'étude de l'extrait brut TL\_ha (paragraphe 3.2.2.3.1, Tableau 15). Les révélations avec le réactif de Neu et le PEG 400 ont mis en évidence la présence de quelques composés phénoliques dans cette fraction, notamment des acides phénoliques et/ou des coumarines, ainsi que des flavonoïdes de types flavonols ou flavones.

L'utilisation du *p*-anisaldéhyde a révélé la présence de composés peu polaires : l'acide oléanolique et/ou bétulinique, utilisés comme standards pour cette étude pourraient être présents dans cette fraction. Un composé de type chlorophylle, caractérisé par la présence d'une bande rouge sous UV à 366 nm avant dérivation, a également été mis en évidence dans cette fraction.

Les analyses par GC-MS de cette fraction ont permis d'identifier 3 composés volatils/semi-volatils : le 4-hydroxybenzène éthanol, l'acide palmitique et le palmitate de méthyle (Tableau 27). Ces deux derniers composés ont déjà été décrits dans les huiles essentielles de différentes espèces du genre *Teucrium* [212–214], contrairement au 4-hydroxybenzène éthanol.

Grâce à un dosage réalisé par GC/FID, par étalonnage externe avec une solution d'acide palmitique, la teneur en acide palmitique a été estimée à 9 % dans cette fraction alors que celles des deux autres composés sont inférieures à 1 %. Le palmitate de méthyle contribue à l'activité anti-inflammatoire de cette fraction, une activité déjà décrite dans la littérature pour ce composé [215]. L'acide palmitique contribuerait à la très faible activité anti-hyaluronidase présentée par cette fraction, une activité non décrite dans la littérature pour ce composé jusqu'à présent.

**Tableau 27** : Composés identifiés par GC-MS dans la fraction TL\_ha\_F3

Composés identifiés	RI calculé <sup>(1)</sup> / RI littérature	Teneur estimée <sup>(3)</sup>	Références	Activités biologiques <sup>(4)</sup>
4-hydroxybenzène éthanol	1423/1425	0,6 %	Non décrit dans le genre <i>Teucrium</i>	Non évaluées
Palmitate de méthyle	1923/1919 <sup>(2)</sup>	0,6 %	Décrit dans l'huile essentielle de <i>T. hyrcanicum</i> [212]	Anti-inflammatoire (30,73 ± 0,01 %)
Acide palmitique	1978/1970 <sup>(2)</sup>	9,4 %	Composé volatil de <i>T. chamaedrys</i> [213], décrit dans les huiles essentielles de différentes variétés de <i>T. orientale</i> [214]	Anti-hyaluronidase (52,00 ± 12,00 %)

<sup>(1)</sup> RI = indice de rétention déterminé sur colonne HP-1 à l'aide d'une série d'alcane (C8-C24) et comparé aux RI disponibles dans la littérature - <sup>(2)</sup> Identification validée par comparaison de RI avec le RI d'un standard analysé dans les mêmes conditions -

<sup>(3)</sup> Teneur calculée par étalonnage externe à l'aide d'une gamme étalon d'acide palmitique - <sup>(4)</sup> évaluées selon les tests in vitro

L'analyse par HPLC/DEDL montre que cette fraction est caractérisée par la présence de composés du groupe B appartenant à la famille des polyphénols, et de composés du groupe C correspondant à des terpénoïdes et des acides gras (Figure 46). Huit composés principaux, numérotés de F3A à F3H, ont été mis en évidence dans cette fraction.

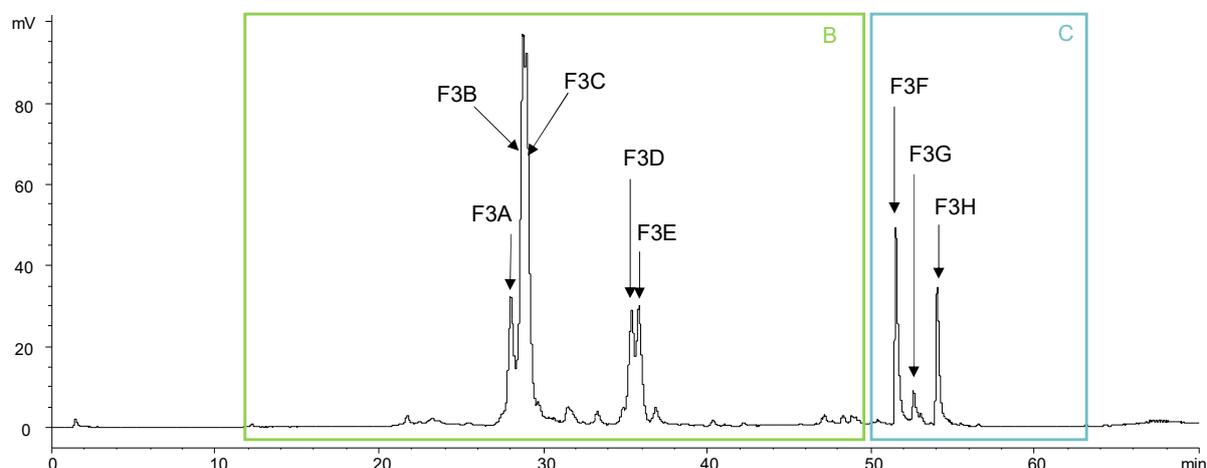


Figure 46 : Chromatogramme HPLC/DEDL de la fraction TL\_ha\_F3

Grâce aux analyses par HPTLC et GC-MS, et par co-injection des standards analytiques par HPLC-DAD/DEDL, 3 de ces 8 composés principaux ont été identifiés. L'**acide bétulinique** correspond au composé **F3F** et l'**acide oléanolique** au composé **F3G**. Ces triterpènes ont déjà été décrits dans le genre *Teucrium* : l'acide oléanolique a été décrit dans un extrait de *T. fruticans* [216], et l'acide bétulinique dans un extrait de *T. mascatense* [217], bien que le genre *Teucrium* ne soit pas connu pour être caractérisé par la présence de triterpènes [216]. Leurs teneurs ont été estimées par dosage par étalonnage externe : l'acide bétulinique représente 1,5 % de cette fraction, et l'acide oléanolique, 0,1 %. Les activités biologiques des standards analytiques ont été évaluées selon les tests *in vitro* utilisés lors de cette étude. L'acide oléanolique présente des activités anti-inflammatoires ( $53,93 \pm 0,01$  %) et anti-élastase ( $49,09 \pm 0,02$  %), deux activités déjà décrites dans la littérature [218, 219]. L'acide bétulinique présente quant à lui, de fortes activités anti-élastase ( $77,14 \pm 0,01$  %), anti-hyaluronidase ( $51,00 \pm 3,00$  %) et anti-collagénase ( $47,00 \pm 1,00$  %). Ses activités anti-élastase [220] et anti-collagénase [221] ont déjà été revendiquées dans la littérature, contrairement à son activité anti-hyaluronidase qui n'a jamais été mise en évidence auparavant. Ces composés contribuent donc aux activités de cette fraction.

L'**acide palmitique** a été identifié comme étant le composé **F3H**. En revanche, le palmitate de méthyle ne semble correspondre à aucun des composés majoritaires, les analyses par GC/FID ayant permis de mettre en évidence sa faible proportion dans la fraction.

La fraction TL\_ha\_F3 présente des activités anti-inflammatoires et anti-élastase importantes. Elle est caractérisée par la présence de deux groupes de composés B et C, parmi lesquels 8 composés sont majoritaires (F3A à F3H). Les analyses par HPTLC et par GC-MS ont permis d'identifier 3 de ces composés, qui correspondent respectivement à l'acide bétulinique (F3F), l'acide oléanolique (F3G) et l'acide palmitique (F3H).

## B. Etude de déréplication par UFLC-HRMS/MS

La stratégie habituellement utilisée pour identifier les 5 autres composés majoritaires de cette fraction, nécessiterait leur isolement et leur caractérisation structurale. Cependant, ces étapes s'avèrent être chronophages et onéreuses. Aujourd'hui, de nouvelles stratégies d'étude telle que la déréplication ont été développées afin de réduire ces étapes d'isolement. L'objectif de la déréplication est de distinguer directement dans un extrait, les composés déjà décrits dans la littérature sans les isoler, des composés encore non identifiés dans les bases de données et qui sont à isoler en priorité [90]. Cette stratégie d'étude se décompose en deux étapes principales : la première étape consiste à analyser l'extrait par des techniques de caractérisation adaptées. La spectrométrie de masse haute résolution et la RMN en mélange sont les deux techniques principales de caractérisation utilisées pour la déréplication [90]. Il s'agit ensuite de comparer les informations obtenues avec celles disponibles dans les bases de données et la littérature. Le Dictionnaire de Produits Naturels (DNP) est une base de données qui regroupe à ce jour les caractéristiques de plus de 250 000 produits naturels : masse molaire, lipophilie, classe du composé, topologie de la structure moléculaire, etc. [222]. Cette étude permet ainsi de prioriser les nouveaux composés à isoler afin de les caractériser, plutôt que de tous les isoler.

Avec cette nouvelle méthodologie, les 3 fractions d'intérêt obtenues par fractionnement bioguidé de l'extrait TL\_ha, à savoir les fractions TL\_ha\_F3, TL\_ha\_F4 et TL\_ha\_F6, ont été analysés par spectrométrie de masse haute résolution. Afin d'évaluer ses performances, cette stratégie de déréplication a été confrontée à la méthode plus conventionnelle de caractérisation, à savoir l'isolement des composés majoritaires par HPLC semi-préparative, suivi de leur caractérisation structurale par RMN et par spectrométrie de masse.

### **Méthode de déréplication**

Cette étude déréplicative a été réalisée à l'Université de Nantes avec l'équipe du Dr. Samuel Bertrand. Les fractions à caractériser ont été séparées par un système UFLC (*Ultra Fast Liquid Chromatography*). Ce système de chromatographie liquide haute performance, développé par Shimadzu, permet d'améliorer la résolution de l'HPLC par augmentation de son débit et donc de sa pression. Grâce à un couplage à un détecteur HRMS, il est possible d'obtenir la formule brute des composés à partir des données spectrales MS<sup>1</sup>. Des informations sur la composition chimique de ces composés sont également obtenues par analyse des données spectrales MS<sup>2</sup> acquises par fragmentation MS/MS.

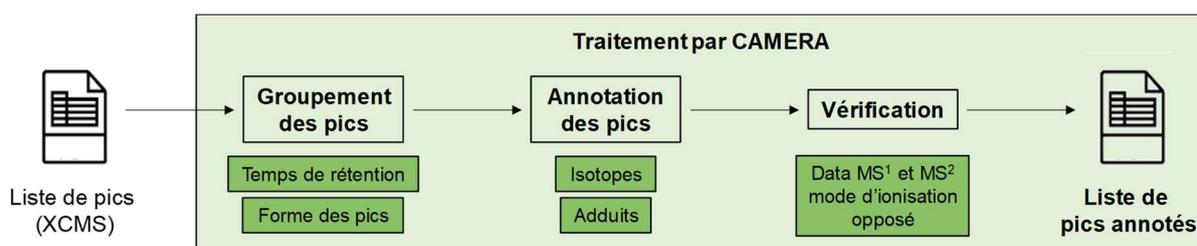
Lors de cette étude, les données spectrales MS<sup>1</sup> et MS<sup>2</sup> ont été traitées par la plateforme ThalassOMICS, selon la méthodologie présentée dans les études de Bertrand *et al.* [223, 224]. Elle repose sur la stratégie appelée « annotation des composés avec génération d'hypothèses structurales pour les composés inconnus » présentée dans l'étude de Wolfender *et al.* [90]. Elle se décompose en 6 étapes principales (Figure 48, voie a) au cours desquelles différentes hypothèses de structure sont proposées : elles sont appelées « annotations » dans ce processus. La comparaison des données spectrales obtenues par analyses UFLC-HRMS/MS, avec celles présentes dans les bases de données permet d'attribuer des « scores » aux

différentes propositions de structure ; plus un score est haut, plus l'hypothèse de structure est intéressante. L'analyse de ces différents scores permet d'avoir des informations de plus en plus précises sur la nature des composés présents, légitimant ainsi certaines hypothèses de structure [90].

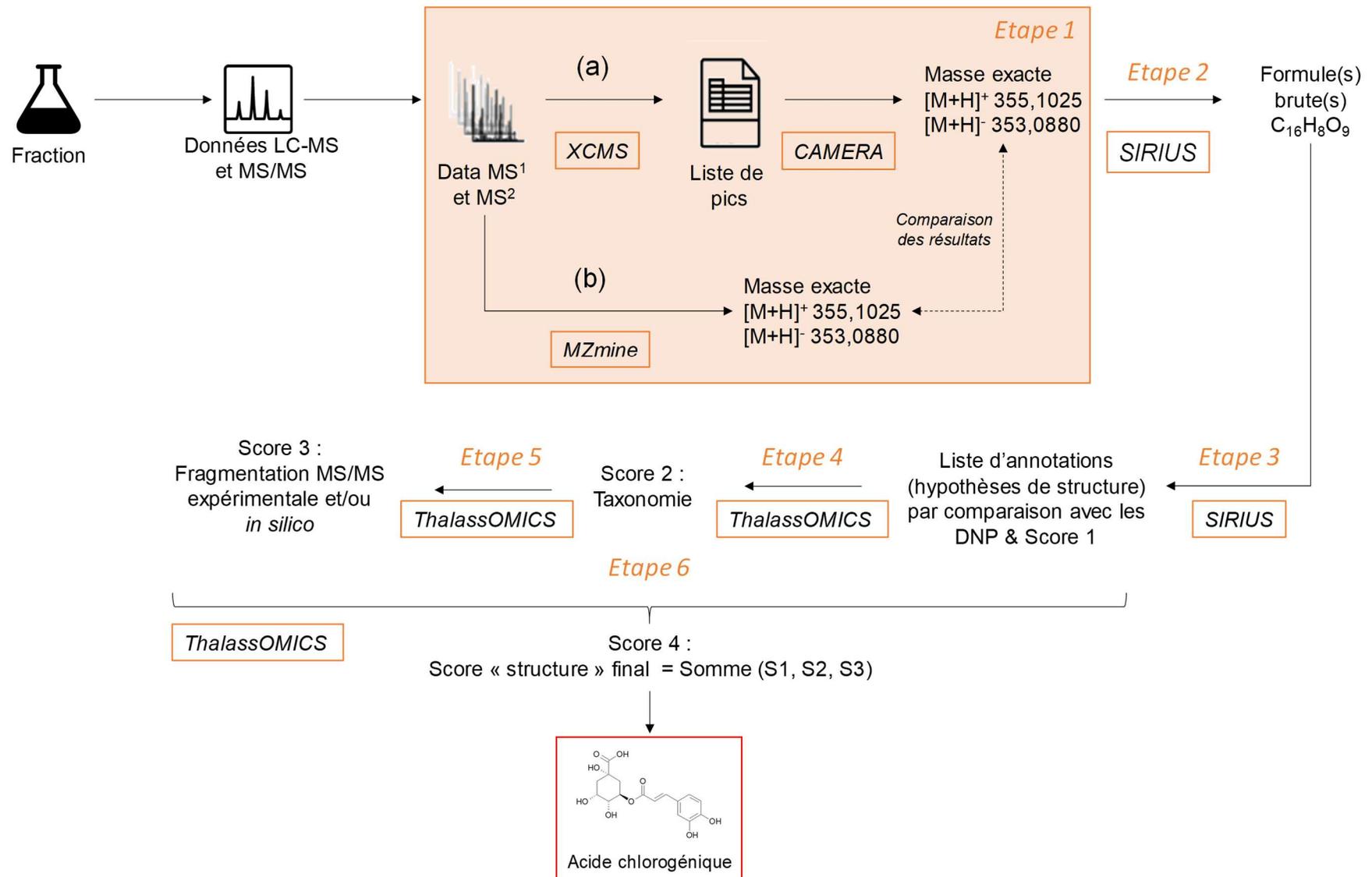
Chacune des étapes de cette méthodologie est détaillée par la suite afin de comprendre la stratégie employée pour le traitement des données spectrales et l'analyse des propositions de la plateforme. En parallèle, les données spectrales MS<sup>1</sup> et MS<sup>2</sup> ont été étudiées à l'aide du logiciel MZmine afin de comparer les résultats avec ceux obtenus par la plateforme ThalassOMICS (Figure 48, voie b).

- **Etape 1 : détermination de la masse exacte**

L'étude du spectre de masse haute résolution permet de déterminer la masse exacte du composé ionisé, notamment à l'aide de logiciels de traitement de données tels que MZmine (Figure 48). Elle est déterminée par la recherche de l'ion protoné [M+H]<sup>+</sup> en mode positif, déprotoné [M-H]<sup>-</sup> en mode négatif ou encore d'adduits obtenus par ionisation selon les deux modes positif et négatif. Lors de cette étude, il a été possible de définir la masse exacte à 5 ppm près, sauf pour les pics de faible intensité, où un écart allant jusqu'à 15 ppm a été considéré comme acceptable. Lorsque cette étape est réalisée « manuellement », elle peut s'avérer limitante et compliquée, notamment lorsque les extraits présentent des compositions très complexes [90]. Afin de faciliter cette étape, des outils d'analyses ont été développés afin d'étudier automatiquement les données spectrales [223]. La détection des pics a été réalisée à l'aide de l'algorithme XCMS dans le cadre de cette étude [225, 226]. La liste de pics ainsi générée, est alors traitée par le package R\* CAMERA selon les différentes étapes présentées sur la Figure 47 [227]. Dans un premier temps, les ions détectés par XCMS sont regroupés et analysés par CAMERA, en fonction de leurs temps de rétention et selon la forme des pics afin de distinguer d'éventuelles co-élutions de composés. La détection des isotopes permet de définir l'état de charge de l'ion présent. L'annotation d'au moins deux ions correspondant à des adduits formés selon les conditions d'ionisation permet de calculer la masse exacte, nécessaire pour la recherche des composés dans les bases de données ou pour déterminer la formule brute correspondante. Ces différentes annotations sont ensuite confrontées aux données spectrales obtenues dans le mode d'ionisation opposé afin de confirmer ces informations ; une liste de pics annotés est alors obtenue grâce à ce logiciel.



**Figure 47** : Flux de tâches de CAMERA pour le traitement des analyses LC/MS [227]



**Figure 48** : Présentation de la méthodologie utilisée lors de l'étude de déréplication (identification de l'acide chlorogénique à titre d'exemple)

- **Etape 2 : détermination des formules brutes**

Pour chaque ion mis en évidence lors de cette première étape d'analyse, une liste de formules brutes est proposée par SIRIUS (*Sum formula Identification by Ranking Isotope patterns Using mass Spectrometry*) [228, 229]. Ce logiciel combine différents algorithmes générant les compositions élémentaires pour une masse donnée, et les erreurs associées. Il calcule également les motifs isotopiques pour toutes les compositions chimiques correspondantes. Par comparaison des données obtenues avec le spectre de masse, il hiérarchise les molécules candidates en fonction de leur correspondance. La plateforme ThalassOMICS associe alors à chaque formule brute, un score SIRIUS pour les discriminer entre elles, après comparaison avec les adduits. Un score négatif est attribué lorsque la correspondance est faible, et un score supérieur à 10 est synonyme de correspondance « parfaite ».

- **Etape 3 : détermination de la structure avec les bases de données**

Chaque formule brute proposée par SIRIUS est ensuite recherchée dans les bases de données de produits naturels (ChEBI [230], Dictionary of Natural Products [222], KNApSAcK [231], Universal Natural Product Database [232], etc.) afin de proposer une liste de structures potentielles. Le nombre de bases de données disponibles étant considérable, cette étape de recherche de structures potentielles constitue l'étape limitante dans le processus d'identification en termes de temps. La liste de propositions obtenues peut s'avérer très importante selon la formule brute recherchée.

Afin de réduire ce nombre de propositions, différents critères de comparaison, appelés « filtres orthogonaux », sont appliqués. Lors de cette étude, deux approches ont été utilisées pour affiner ces propositions : le premier critère repose sur la taxonomie (phylogénie) de l'espèce [233], et le second est basé sur la fragmentation MS/MS. Pour chaque paramètre étudié, un score est attribué à chaque hypothèse de structure en fonction des correspondances observées entre les données spectrales obtenues lors de l'analyse de l'extrait et les informations présentes dans les bases de données. Pour finir, un score « structure » final est calculé en sommant les différents scores obtenus par application de ces filtres orthogonaux. L'évaluation de ces scores permet alors de sélectionner les hypothèses de structure les plus pertinentes, voire même d'identifier certains composés dans le cas où ces scores sont suffisamment élevés.

- **Etape 4 : réduction du nombre d'hypothèses de structure grâce aux informations taxonomiques (phylogénie)**

Cette première approche repose sur l'étude phylogénique de la matière première à partir de laquelle l'extrait a été obtenu. Il met en évidence la probabilité de présence d'une molécule en fonction de la matière première dans laquelle elle a été décrite dans la littérature. La prise en compte de ce critère permet ainsi de légitimer certaines hypothèses de structure [233] : à titre d'exemple, pour un extrait obtenu à partir d'une plante, un score phylogénique plus faible est attribué à des propositions de métabolites retrouvés dans les champignons, qu'à des

propositions de métabolites identifiés dans des plantes. La plateforme ThalassOMICS attribue un score compris entre -10 et 10 pour chaque proposition, en fonction des données chimiotaxonomiques de la germandrée et des matières premières dans lesquelles les molécules ont été décrites. La comparaison de ces données repose sur les informations récupérées dans des bases de données taxonomiques dédiées par le package R Taxize [234]. La comparaison des données taxonomiques permet de définir un score taxonomique : un score de -10 est synonyme de règnes différents, 0 de même règne, 5 de même embranchement, 8 de même famille et 10 de même espèce. Cette échelle, définie arbitrairement, permet d'influencer le score « structure » final de la même manière que le score SIRIUS puisqu'ils sont développés sur une échelle similaire (allant de -10 à 10). Pour cette étude, ce score s'avère limitant puisque la germandrée lisse a fait l'objet de peu d'études concernant sa composition phytochimique. D'autres espèces du genre *Teucrium* ont été davantage étudiées mais ces données restent limitées en comparaison d'autres familles de plantes.

- **Etape 5 : étude des données spectrales MS/MS**

Le deuxième critère de sélection permet de comparer les données de fragmentation MS/MS obtenues lors des analyses UFLC-HRMS/MS avec celles disponibles dans les bases de données. Ces données MS<sup>2</sup> peuvent provenir de deux sources différentes : soit elles ont été obtenues expérimentalement par fragmentation du composé isolé, soit elles ont été calculées grâce à des modèles *in silico*. Selon le mode d'obtention de ces données spectrales, deux scores distincts sont déterminés. Pour les données de fragmentation calculées par des modèles *in silico*, la plateforme compare les informations obtenues selon la méthode CFM-ID (*Competitive Fragmentation Modeling for metabolite IDentification*) [235]. L'autre score repose sur la comparaison des données MS<sup>2</sup> obtenues expérimentalement et disponibles dans les bases de données. Une valeur comprise entre 0 et 50 est attribuée à chacune des propositions pour ces deux scores en fonction des correspondances observées. Pour le score obtenu à partir des données expérimentales, une valeur de 0 signifie une faible probabilité, et une valeur supérieure à 40 traduit une identification très satisfaisante bien qu'elle reste à confirmer. La valeur du score obtenu par analyse des données *in silico* est, quant à elle, plus difficile à estimer : un score de 0 correspond à une faible probabilité et un score supérieur à 20 rend la proposition crédible. Cette valeur est toutefois considérée comme neutre, elle ne valide pas la proposition de structure, mais ne l'invalide pas non plus.

- **Etape 6 : calcul du score « structure » final**

Afin de regrouper ces différents scores, la plateforme calcule un score « structure » final qui correspond à la somme du score SIRIUS, du score phylogénique et du meilleur score MS<sup>2</sup>. Compris entre 0 et 50, ce score est considéré comme intéressant lorsqu'il est supérieur à 30.

Afin de compléter cette étude, il peut également être intéressant d'étudier les spectres UV/visible des composés à caractériser, étant donné qu'ils peuvent apporter des informations

caractéristiques sur la nature des composés, notamment en ce qui concerne les chromophores [90].

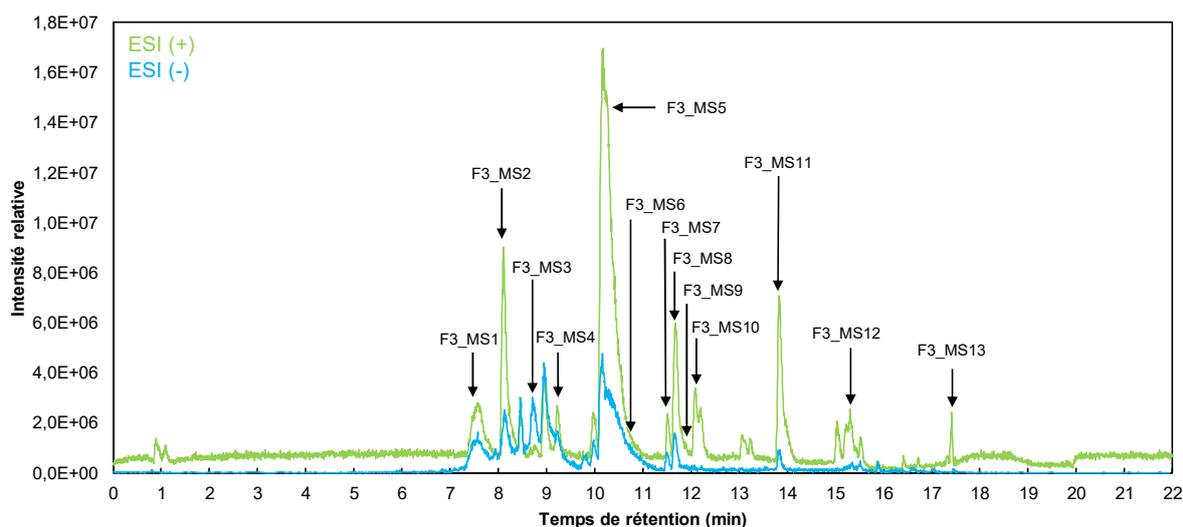
### ***Etude de la fraction TL\_ha\_F3 par déréplication***

Cette étude déréplicative repose sur l'analyse des fractions par un système UFLC-HRMS équipé d'une source d'ionisation par électrospray (ESI) utilisée selon les deux modes d'ionisation (positif et négatif). Il est combiné à deux types d'analyseurs : un analyseur à piège ionique (ion trap) et l'autre à temps de vol (TOF). La gamme de  $m/z$  définie est comprise entre 100 et 1000, avec une précision de 5 ppm et une résolution de 10 000 à  $m/z$  500 [236]. Afin d'améliorer l'identification des composés, une fragmentation MS<sup>2</sup> est réalisée en mode positif.

Les chromatogrammes UFLC-ESI-HRMS obtenus par analyse de la fraction TL\_ha\_F3 présentent les composés qui s'ionisent selon les deux modes dans les conditions d'analyse utilisées (Figure 49). La stratégie de déréplication présentée précédemment a permis d'obtenir des informations spectrales pour 13 composés de cette fraction, numérotés F3\_MS1 à F3\_MS13 dans l'ordre croissant de leur temps de rétention (Tableau 28). Les propositions de structure présentant les scores les plus élevés ont été sélectionnées, car elles sont les plus probables. Lorsque deux hypothèses de structure présentent toutes les deux des scores intéressants, une étude plus détaillée de la fragmentation du composé correspondant a été réalisée à l'aide du logiciel MZmine. En fonction de la structure proposée, certains fragments s'avèrent discriminants et permettent alors de sélectionner préférentiellement une des hypothèses. Sinon, des analyses complémentaires seraient nécessaires afin de légitimer une de ces propositions de structure. Dans ce cas, les différentes hypothèses de structure ont été conservées.

En comparant les informations obtenues selon les deux méthodes d'analyses présentées précédemment (Figure 48, voies a et b), trois cas de figure se distinguent :

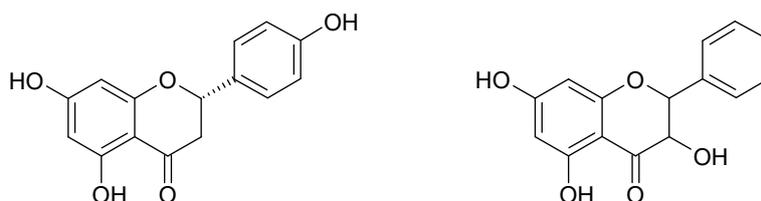
- Cas 1 : lorsqu'il y a corrélation des masses exactes déterminées avec le logiciel MZmine avec celles obtenues automatiquement (SIRIUS), une seule formule brute est définie et différentes propositions de structure sont suggérées.
- Cas 2 : lorsque pour un même temps de rétention, plusieurs masses exactes peuvent correspondre, plusieurs formules brutes, auxquelles sont associées différentes hypothèses de structure, sont envisagées.
- Cas 3 : aucune formule brute n'est proposée par le traitement automatique des données. La masse exacte a alors été déterminée à l'aide du logiciel MZmine, et a permis de calculer la formule brute correspondante. Une mention (\*) est ajoutée aux formules ainsi obtenues, afin de les différencier de celles obtenues par le logiciel SIRIUS lors du processus de déréplication. A partir de ces formules brutes, des hypothèses de structure auraient pu être proposées pour ces composés, par recherche « manuelle » dans les bases de données. Cependant, ce type de stratégie s'avère complexe et fastidieux, et l'étude s'est focalisée sur les composés pour lesquels des hypothèses de structure ont été proposées.



**Figure 49** : Chromatogrammes UFLC-ESI-HRMS de fraction TL\_ha\_F3 selon les modes d'ionisation positif et négatif (gradient HRMS, paragraphe 5.4.1.1)

Pour cette fraction, 9 composés se trouvent dans le cas 1, 1 composé se trouve dans le cas 2, et 3 composés dans le cas 3. Afin de simplifier l'étude, la démarche utilisée pour sélectionner en fonction des scores l'hypothèse de structure la plus probable est présentée pour le composé **F3\_MS7**, puisqu'elle a permis d'identifier ce composé. Une stratégie identique a été employée pour les autres composés.

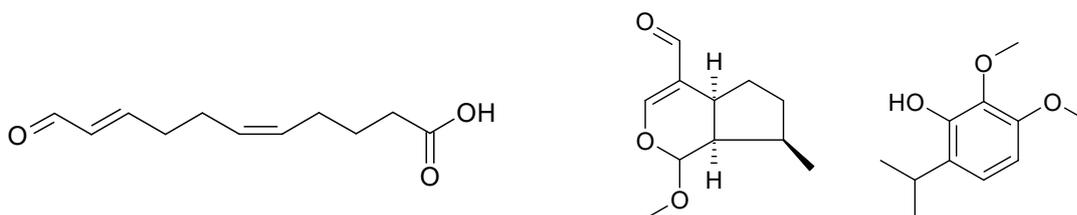
La formule brute  $C_{15}H_{12}O_5$  est la plus probable pour le composé **F3\_MS7**, elle permet d'émettre différentes hypothèses de structure de type « trihydroxyflavanone » parmi lesquelles deux propositions se distinguent particulièrement (Figure 50). Les scores SIRIUS de ces 2 composés sont supérieurs à 10, ce qui traduit une correspondance intéressante avec les bases de données. Du point de vue phylogénique, seule la proposition 1, correspondant à la naringénine, présente un score phylogénique intéressant de 8. La matière végétale dans laquelle ce composé a été retrouvé appartient à la famille des Lamiacées, comme la germandrée. Un score de fragmentation reposant sur les informations expérimentales est disponible pour cette proposition ; supérieur à 40, il traduit une identification satisfaisante. Selon l'étude des données *in silico*, aucune des 2 propositions ne se distingue, car elles présentent toutes les deux des scores intéressants ( $> 20$  : valeur à partir de laquelle la proposition n'est pas invalidée, mais n'est pas non plus validée). Ces 2 composés présentent des scores « structure » finaux supérieurs à 30, ce qui correspond à la valeur définie comme intéressante. Cette étude permet donc de considérer la proposition 1 correspondant à la **naringénine** comme l'hypothèse de structure la plus probable pour le composé **F3\_MS7** puisqu'elle présente les meilleurs scores. Cette flavanone a déjà été décrite dans différentes espèces de *Teucrium* telles que *T. chamaedrys* [237] ou encore *T. gnaphalodes* [238]. Cette hypothèse a été confirmée par co-injection du standard analytique par HPLC-DAD/DEDL. La naringénine est donc bien présente dans cet extrait de germandrée, mais elle ne correspond pas à l'un des 5 composés principaux restants à identifier (composés F3A à F3E).



**Figure 50** : Structures de la naringénine (gauche) et de la 3,5,7-trihydroxyflavone (droite) proposées pour le composé F3\_MS7

Une analyse similaire a été réalisée afin de sélectionner l'hypothèse de structure la plus probable pour les 7 autres composés du cas 1 ; ils sont présentés par ordre croissant selon leurs temps de rétention.

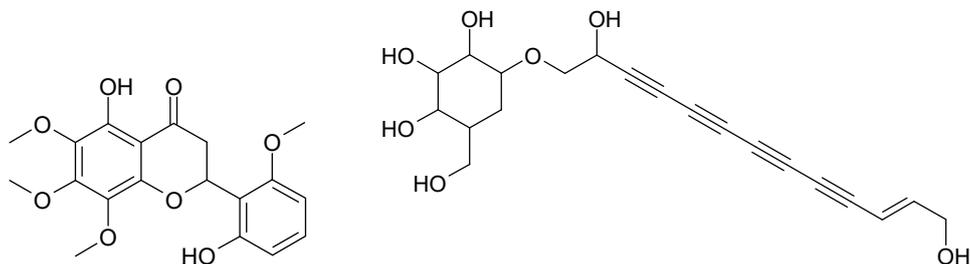
La formule brute  $C_{11}H_{16}O_3$  est la plus probable pour le composé **F3\_MS2**, et 3 hypothèses de structure aux scores intéressants sont proposées : l'acide-11-oxo-5,9-undécadiénoïque, l'artselaénine et le 6-isopropyl-2,3-diméthylphénol ; chacune de ces structures présente des correspondances plus ou moins fortes selon le score étudié (Figure 51). Aucune étude ne mentionne la présence d'un de ces composés dans le genre *Teucrium*. Le 6-isopropyl-2,3-diméthylphénol étant un composé volatil, il aurait potentiellement été identifié par GC-MS, c'est pourquoi l'une ou l'autre des deux autres propositions semble plus vraisemblable. L'analyse du spectre de masse du composé **F3\_MS2** ne permet pas de favoriser l'une ou l'autre des hypothèses restantes.



**Figure 51** : Structures proposées pour le composé F3\_MS2 : acide-11-oxo-5,9-undécadiénoïque, artselaénine et 6-isopropyl-2,3-diméthylphénol (de gauche à droite)

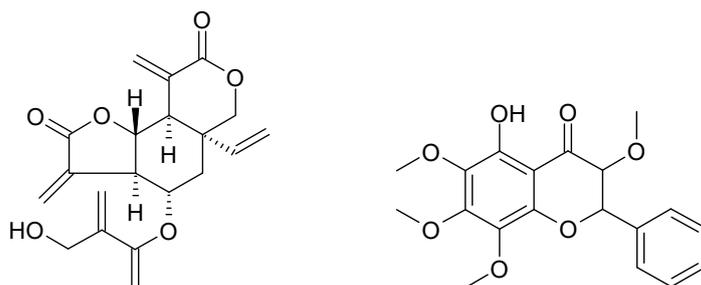
La formule brute  $C_{19}H_{20}O_8$  est la plus probable pour le composé **F3\_MS3**, et 2 hypothèses de structure aux scores intéressants sont proposées (Figure 52) : la 5,2'-dihydroxy-6,7,8,6'-tétraméthoxyflavanone qui présente un meilleur score phylogénique et le 1-O- $\beta$ -D-glucopyranoside-(*E*)-11-tridécène-3,5,7,9-tétrayne-1,2,13-triol qui se distingue par son score de fragmentation *in silico*. Aucun de ces deux composés n'a été décrit dans le genre *Teucrium*. La structure particulière du 1-O- $\beta$ -D-glucopyranoside-(*E*)-11-tridécène-3,5,7,9-tétrayne-1,2,13-triol permet d'envisager une fragmentation spécifique par rupture de la liaison C-O de l'éther, générant ainsi deux fragments caractéristiques : d'une part la chaîne aliphatique composée de 13 carbones et d'autre part, le cycle correspondant au glucopyranoside. Cependant, le spectre de masse MS/MS obtenu par fragmentation du composé F3\_MS3 ne met en évidence aucun pic pouvant correspondre à cette rupture, et l'hypothèse de la 5,2'-dihydroxy-6,7,8,6'-tétraméthoxyflavanone est ainsi favorisée. Le spectre UV du composé F3\_MS3 caractérisé par une bande absorbant majoritairement à 300 nm et d'un épaulement,

favorise également l'hypothèse de la flavanone. Ces observations restent toutefois provisoires et seraient à confirmer par des analyses complémentaires.



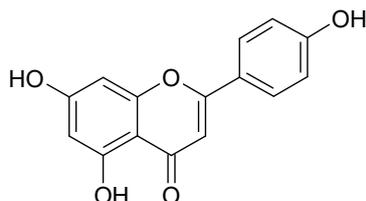
**Figure 52** : Structures du 5,2'-dihydroxy-6,7,8,6'-tétraméthoxyflavanone (gauche) et du 1-O-β-D-glucopyranoside-(E)-11-tridécène-3,5,7,9-tétraol (droite) proposées pour le composé F3\_MS3

La formule brute  $C_{19}H_{20}O_7$  est la plus probable pour le composé **F3\_MS6**, et 2 structures présentant des scores intéressants sont proposées (Figure 53) : la vernadoline qui présente un meilleur score de fragmentation *in silico* que la 5-hydroxy-2',6',7,8-tétraméthoxyflavanone, qui elle présente un meilleur score de phylogénie. Aucun de ces composés n'a jusqu'à présent été décrit dans le genre *Teucrium*. L'étude du spectre de masse correspondant à ce composé ne permet pas de sélectionner préférentiellement un de ces composés.



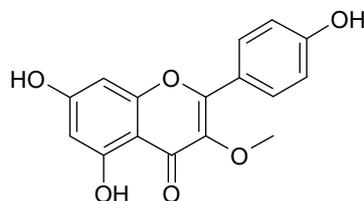
**Figure 53** : Structures de la vernadoline (gauche) et de la 5-hydroxy-2',6',7,8-tétraméthoxyflavanone (droite) proposées pour le composé F3\_MS6

La formule brute  $C_{15}H_{10}O_5$  est proposée pour le composé **F3\_MS8** : l'apigénine est la structure la plus probable, bien que ses scores ne soient pas tous les plus élevés (Figure 54). Elle a déjà été identifiée dans différentes espèces de *Teucrium*, notamment dans celles où la naringénine a également été décrite [237, 238] et dans *T. polium* [239]. Cependant, cette hypothèse a été réfutée par co-injection du standard analytique par HPLC-DAD/DEDL. Des isomères de l'apigénine, dont la structure de type « trihydroxyflavone » présente la même fragmentation pourraient correspondre à ce composé.



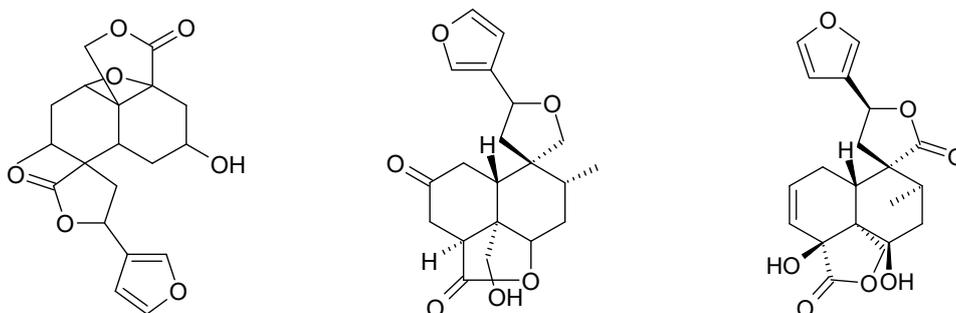
**Figure 54** : Structure de l'apigénine proposée pour le composé F3\_MS8

La formule brute  $C_{16}H_{12}O_6$  est la plus probable pour le composé **F3\_MS9** ; le kaempférol-3-O-méthyl éther et le kaempféride sont deux isomères proposés pour ce composé. Ni l'un ni l'autre n'ayant été décrit dans le genre *Teucrium*, l'hypothèse du kaempférol-3-O-méthyl éther est retenue car il présente de meilleurs scores (Figure 55).



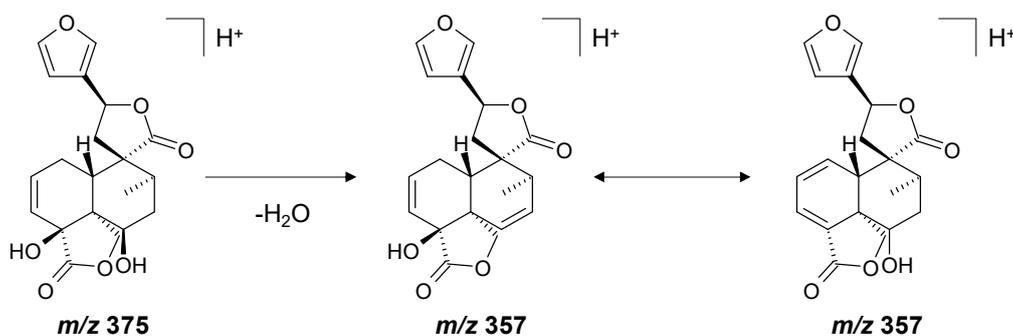
**Figure 55** : Structure du kaempférol-3-O-méthyl éther proposée pour le composé F3\_MS9

La formule brute  $C_{20}H_{22}O_7$  est proposée pour le composé **F3\_MS10** : le chamaedroxyde, la 2-kéto-19-hydroxyteuscordine et la teucrine F sont trois structures pouvant correspondre (Figure 56). Ces trois composés ont été décrits dans le genre *Teucrium* [240, 241] ; la teucrine F a notamment été décrite dans l'espèce *T. lucidum* [200].



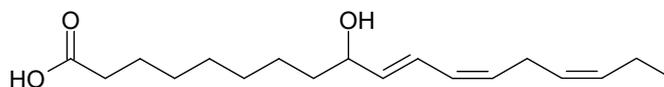
**Figure 56** : Structures du chamaedroxyde, de la 2-kéto-19-hydroxyteuscordine et de la teucrine F (de gauche à droite) proposées pour le composé F3\_MS10

Un pic de  $m/z$  357,1327 obtenu par fragmentation avec rétention de charge [242], est mis en évidence sur le spectre de masse : il doit correspondre à l'équivalent déshydraté du composé, une hypothèse compatible dans le cas des trois structures proposées. La caractérisation de ce pic permet toutefois d'avantager l'hypothèse de la teucrine F, composé pour lequel la déshydratation semble favorisée puisque le composé résultant est stabilisé par résonance (Figure 57). Cette hypothèse est toutefois provisoire, et serait à confirmer par des analyses complémentaires.



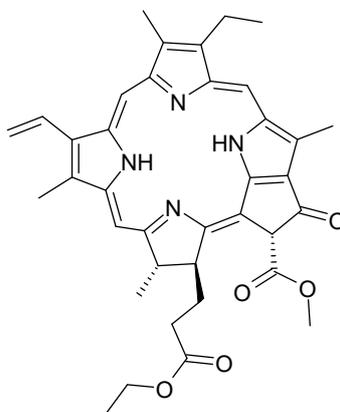
**Figure 57** : Proposition de fragmentation de la teucrine F

La formule brute  $C_{18}H_{30}O_3$  est proposée pour le composé **F3\_MS12** ; il s'agirait de l'acide 9-hydroxy-(10,12,15)-octadécatriénoïque, un lipide non décrit dans le genre *Teucrium* (Figure 58). La faible polarité de ce composé en comparaison de celles des autres structures proposées dans cette fraction, n'incite pas à conserver cette hypothèse de structure.



**Figure 58** : Structure de l'acide 9-hydroxy-(10,12,15)-octadécatriénoïque

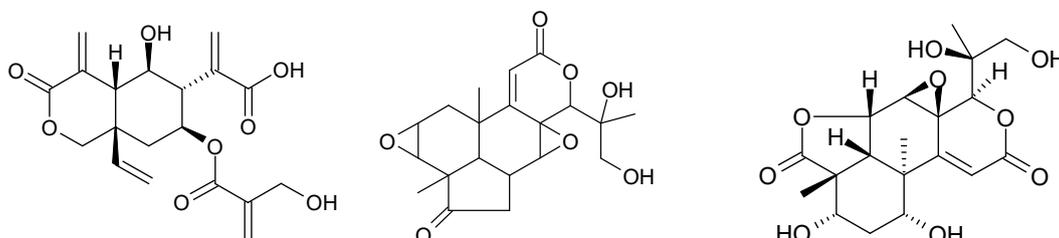
La formule brute  $C_{37}H_{40}N_4O_5$  et la structure de l'éthyl phéophorbide A, un dérivé de la chlorophylle, sont proposées pour le composé **F3\_MS13** (Figure 59). Ce composé jamais décrit dans le genre *Teucrium*, pourrait correspondre au dérivé de la chlorophylle mis en évidence dans cette fraction lors des analyses par HPTLC. L'étude du spectre UV ne permet pas de confirmer la validité de cette hypothèse.



**Figure 59** : Structure de l'éthyl phéophorbide A proposée pour le composé F3\_MS13

Deux masses peuvent correspondre pour le composé **F3\_MS1** qui se trouve dans le cas 2, ce qui complique son identification. Deux formules brutes ont ainsi été proposées :

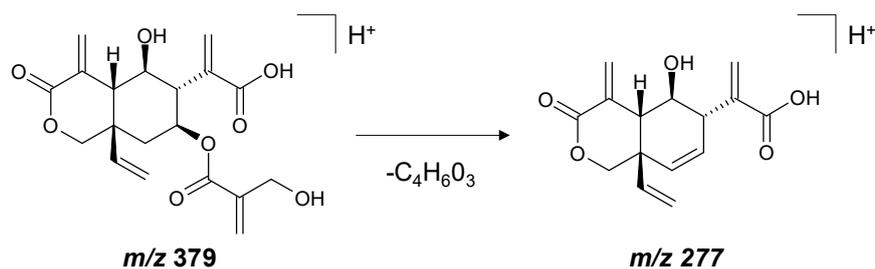
- $C_{19}H_{22}O_8$  : les 2 composés proposés, la vernodalinole et la podolactone A, pourraient correspondre ; aucun d'entre eux n'a été décrit dans le genre *Teucrium* (Figure 60).
- $C_{19}H_{24}O_9$  : le composé proposé est la makilactone K, non décrit dans le genre *Teucrium* jusqu'à présent.



**Figure 60** : Structures proposées pour le composé F3\_MS1 : vernodalinole, podolactone A et makilactone K (de gauche à droite)

L'analyse du spectre de masse correspondant confirme la co-élution de deux composés. Pour le composé de formule brute  $C_{19}H_{22}O_8$ , l'absence du pic correspondant au composé obtenu

par fragmentation avec rétention de charge pour la vernadolinole, a incité à favoriser l'hypothèse de la podolactone A (Figure 61) [242].



**Figure 61** : Proposition de fragmentation de la vernadolinole

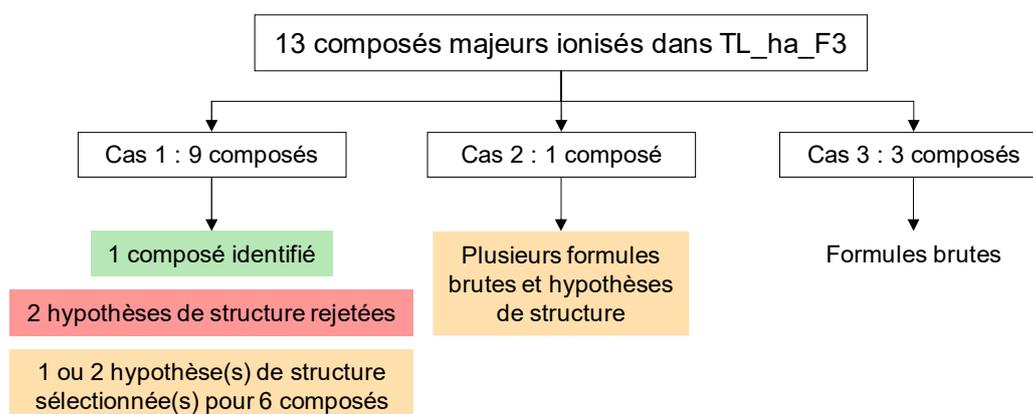
Pour les 3 autres composés ionisés se trouvant dans le cas 3, les masses exactes et les formules brutes associées ont été obtenues grâce au logiciel MZmine. Le composé **F3\_MS4** présenterait la formule brute **C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>**, **F3\_MS5**, la formule brute **C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>9</sub>** et **F3\_MS11**, la formule brute **C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>**.

Cette étude de déréplication a été entreprise afin d'en évaluer l'intérêt dans l'étude phytochimique de l'extrait peu connu de germandrée, en comparaison d'une étude plus conventionnelle. L'étude de déréplication a permis d'obtenir des informations sur la structure de 13 composés majeurs ionisés dans la fraction TL\_ha\_F3 (Figure 62).

Parmi ces 13 composés :

- seule l'hypothèse de structure émise pour un composé après déréplication a pu être validée,
- 2 hypothèses qui apparaissaient comme les plus probables après déréplication ont été réfutées,
- plusieurs structures restent probables pour 7 de ces composés,
- des formules brutes ont pu être déterminées pour les 3 composés restants.

En conclusion, peu d'informations sont obtenues par cette étude de déréplication, qui est décevante en comparaison du temps consacré à l'étude de ces données.



**Figure 62** : Bilan de l'étude déréplicative réalisée sur la fraction TL\_ha\_F3

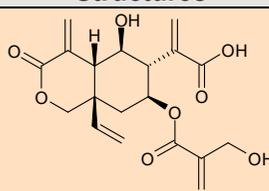
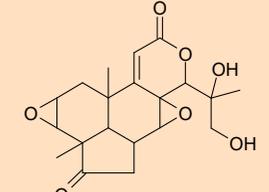
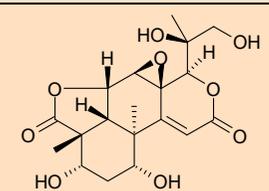
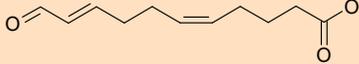
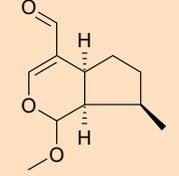
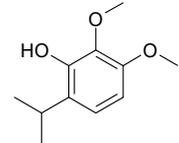
Il est également important de mentionner le caractère non exhaustif de cette étude puisque l'acide bétulinique (F3F), l'acide oléanolique (F3G) et l'acide palmitique (F3H), identifiés dans

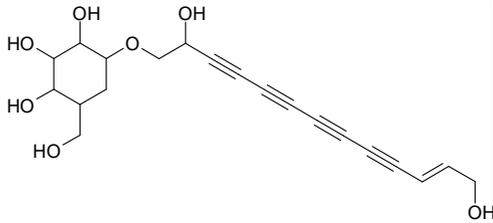
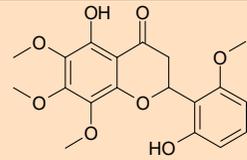
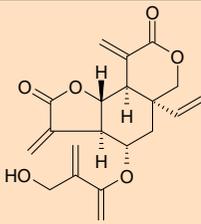
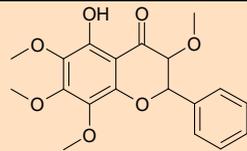
cette fraction par HPLC-DAD/DEDL, ne sont pas mis en évidence par déréplication. Ces composés ne doivent pas s'ioniser dans les conditions de l'étude. Ainsi, en raison de la complexité de la fraction TL\_ha\_F3, une optimisation préalable des conditions d'ionisation aurait été nécessaire afin d'améliorer les données obtenues. Le manque d'informations disponibles dans les bases de données pour des espèces peu étudiées comme la germandrée, peut également expliquer certaines limites de cette méthode. Plus la plante est innovante, plus les données obtenues par ce type d'étude peuvent s'avérer approximatives. La caractérisation de cette fraction par déréplication n'est donc pas intéressante dans ces conditions.

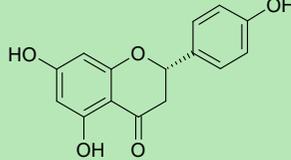
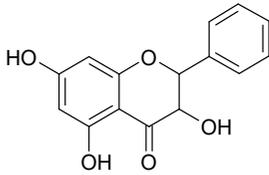
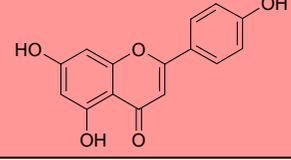
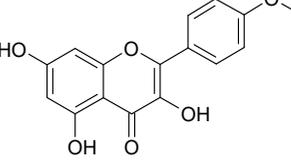
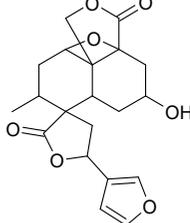
Les informations obtenues lors de cette étude de déréplication sont répertoriées dans le Tableau 28. Un code couleur est associé aux hypothèses de structure :

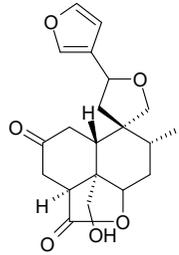
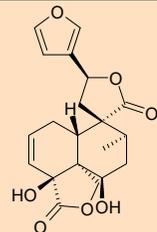
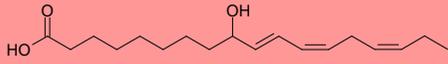
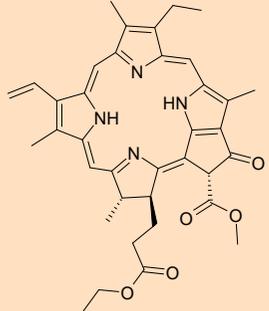
- la couleur verte signifie que l'hypothèse de structure émise lors de l'étude de déréplication a été validée par des analyses complémentaires,
- la couleur orange correspond aux hypothèses de structure les plus probables pour un composé, qui doivent être confirmées par des analyses supplémentaires,
- la couleur blanche correspond aux autres hypothèses de structure proposées,
- la couleur rouge signifie que l'hypothèse de structure émise lors de l'étude de déréplication a été réfutée.

**Tableau 28** : Hypothèses de structure des composés présents dans la fraction TL\_ha\_F3 par traitement des données UFLC-ESI-HRMS/MS avec la plateforme ThalassOMICS  
(vert : hypothèse confirmée, orange : hypothèse plus probable, rouge : hypothèse rejetée, blanc : autre hypothèse de structure potentielle)

Tr et n°	Masse exacte	Formule brute	Composés proposés	Structures
F3_MS1 7,56 min	ESI (+) <i>m/z</i> 379,1388 ESI (-) <i>m/z</i> 377,1245	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	Vernodalinole	
			Podolactone A	
	ESI (+) <i>m/z</i> 397,1478	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	Makilactone K	
F3_MS2 8,11 min	ESI (+) <i>m/z</i> 197,1183	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	Acide-11-oxo-5,9-undécadiénoïque	
			Artselaenine	
			6-isopropyl-2,3-diméthoxyphénol	

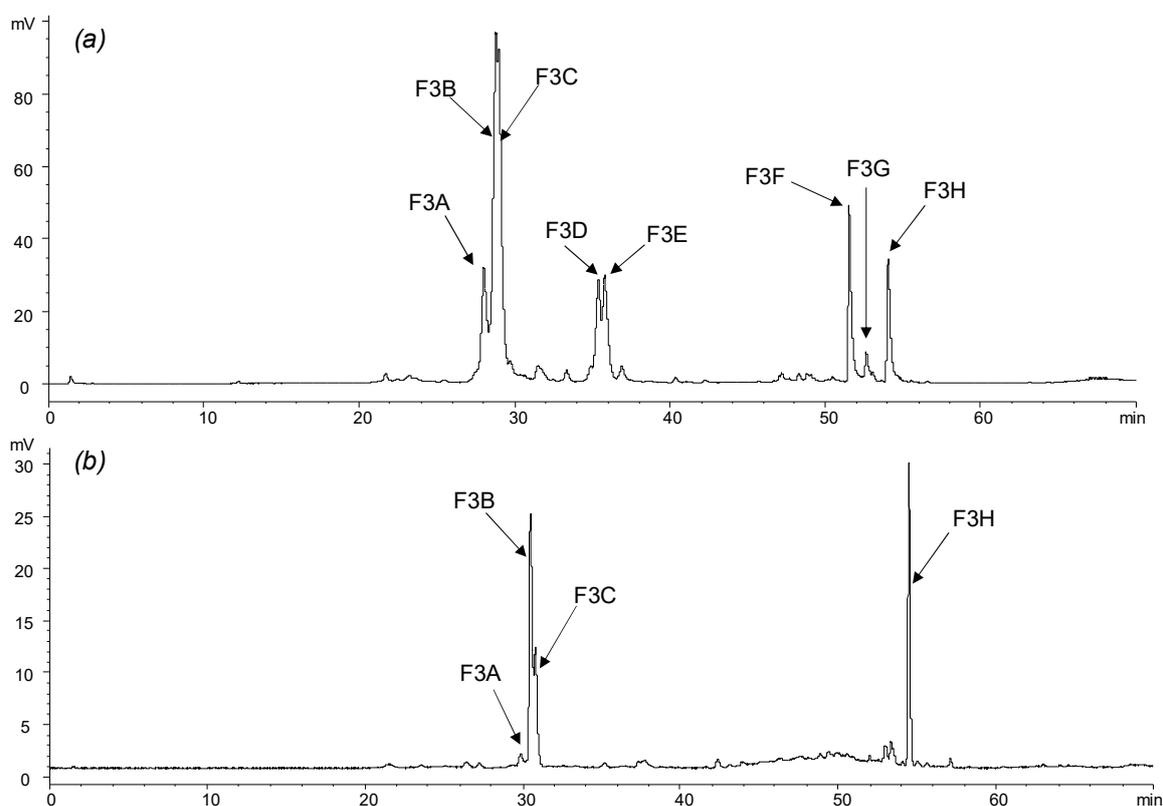
<b>F3_MS3</b> 8,67 min	ESI (+) <i>m/z</i> 377,1228 ESI (-) <i>m/z</i> 375,1105	$C_{19}H_{20}O_8$	1-O-β-D-glucopyranoside-(E)-11-tridécène-3,5,7,9-tétrayne-1,2,13-triol 
			5,2'-dihydroxy-6,7,8,6'-tétraméthoxyflavanone 
<b>F3_MS4</b> 9,23 min	ESI (+) <i>m/z</i> 379,1388 ESI (-) <i>m/z</i> 377,1245	$C_{19}H_{22}O_8$ (*)	-
<b>F3_MS5</b> 10,01 min	ESI (+) <i>m/z</i> 425,1796 ESI (-) <i>m/z</i> 423,1687	$C_{21}H_{28}O_9$ (*)	-
<b>F3_MS6</b> 10,97 min	ESI (-) <i>m/z</i> 359,1146	$C_{19}H_{20}O_7$	Vernodaline 
			5-hydroxy-2',6',7,8-tétraméthoxyflavanone 

<b>F3_MS7</b> 11,48 min	ESI (+) <i>m/z</i> 273,0762 ESI (-) <i>m/z</i> 271,0612	$C_{15}H_{12}O_5$	Naringénine 
			3,5,7-trihydroxyflavanone 
<b>F3_MS8</b> 11,68 min	ESI (+) <i>m/z</i> 271,0606 ESI (-) <i>m/z</i> 269,0462	$C_{15}H_{10}O_5$	Apigénine 
<b>F3_MS9</b> 11,89 min	ESI (+) <i>m/z</i> 301,0685 ESI (-) <i>m/z</i> 299,0580	$C_{16}H_{12}O_6$	Kaempférol-3-O-méthyl éther 
			Kaempféride 
<b>F3_MS10</b> 12,09 min	ESI (+) <i>m/z</i> 375,1433	$C_{20}H_{22}O_7$	Chamaedroxyde 

			2-Kéto-19-hydroxyteuscordine	
			Teucrine F	
<b>F3_MS11</b> 13,85 min	ESI (+) <i>m/z</i> 285,0763 ESI (-) <i>m/z</i> 283,0622	$C_{16}H_{12}O_5$ (*)	-	-
<b>F3_MS12</b> 15,27 min	ESI (+) <i>m/z</i> 295,2251 ESI (-) <i>m/z</i> 293,2121	$C_{18}H_{30}O_3$	Acide 9-hydroxy-(10,12,15)- octadécatriénoïque	
<b>F3_MS13</b> 17,39 min	ESI (+) <i>m/z</i> 621,3066	$C_{37}H_{40}N_4O_5$	Ethyl phéophorbide A	

### C. Isolement et caractérisation des composés majoritaires de la fraction TL\_ha\_F3

Avec l'objectif de confirmer les identifications proposées lors de l'étape de déréplication, les composés majoritaires présents dans la fraction TL\_ha\_F3 ont été isolés par HPLC semi-préparative. Avant d'optimiser le gradient de phase mobile afin d'améliorer la séparation des composés présents, la fraction TL\_ha\_F3 a été ré-analysée dans les mêmes conditions que précédemment ; des différences notables ont été observées entre les deux profils HPLC (Figure 63). Seuls 4 des 8 composés identifiés précédemment ont été repérés (F3A, F3B, F3C et F3H). Ces analyses ayant été réalisées à plus d'une année d'intervalle, une éventuelle dégradation des autres composés au cours du temps pourrait être la cause de ces différences. Les acides bétulinique (F3F) et oléanolique (F3G) sont des terpénoïdes, c'est-à-dire des composés volatils et thermolabiles, susceptibles de se réarranger, de s'oxyder ou encore de s'hydrolyser selon leur structure [243]. Des précautions particulières seraient donc à envisager pour éviter leur dégradation, ainsi que celle des 2 composés F3D et F3E lors de la préparation et du stockage d'un nouvel extrait.



**Figure 63** : Chromatogrammes HPLC/DEDL de la fraction TL\_ha\_F3 analysée après le fractionnement sur colonne (a) et avant optimisation du gradient en vue d'une séparation par HPLC semi-préparative (b)

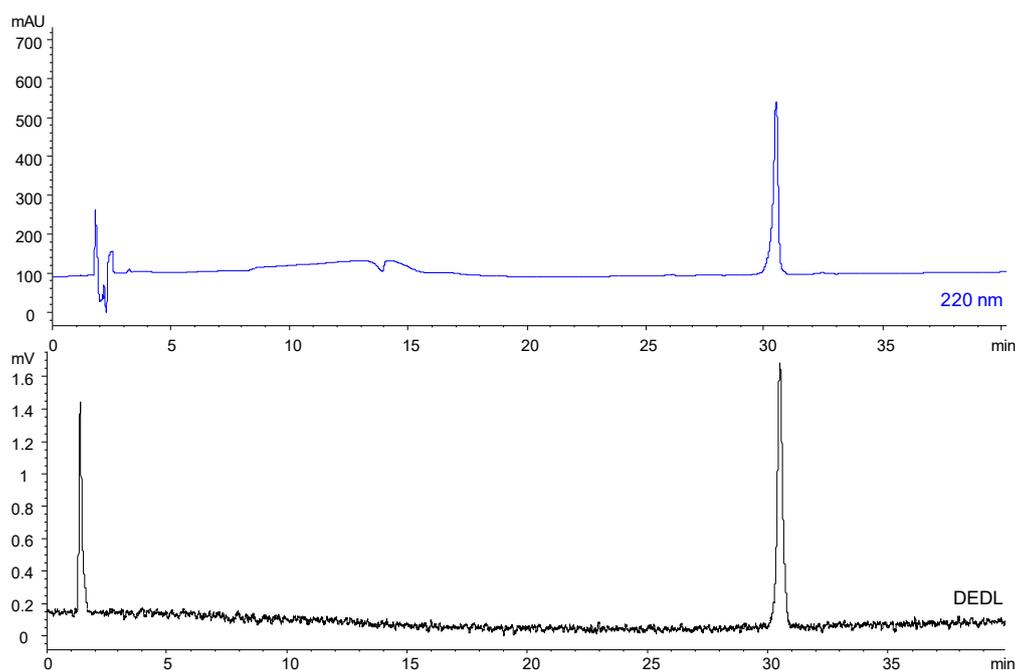
Afin de caractériser les 8 composés principaux mis en évidence lors de la première analyse de cette fraction, un nouvel extrait brut aurait pu être préparé, puis fractionné sur colonne dans les mêmes conditions. Cependant, pour des raisons de disponibilité de matériel végétal, une nouvelle extraction n'a pu être réalisée. Ainsi, les 2 composés principaux restants, F3B et F3C, ont été isolés en priorité. Le composé F3A, présent en faible proportion, a été écarté car un nombre considérable d'injections successives aurait été nécessaire afin d'obtenir une quantité

suffisante de produit pour réaliser une analyse structurale par RMN. Le composé F3H, identifié comme étant l'acide palmitique par GC-MS et par HPLC/DEDL, n'a pas non plus été collecté. Au terme de l'étape d'optimisation du gradient (6 conditions testées), les conditions de séparation des composés F3B et F3C ont été considérées comme satisfaisantes. Après 10 injections (gradient C, paragraphe 5.2.1.3), 2 mg de chacune des sous-fractions comprenant les composés souhaités ont été collectés ; ces deux sous-fractions représentent respectivement 9 % et 10 % en masse de la fraction TL\_ha\_F3 (Tableau 29).

**Tableau 29** : Masses des sous-fractions isolées par HPLC semi-préparative à partir de TL\_ha\_F3

Fraction	TL_ha_F3	TL_ha_F3B	TL_ha_F3C
Masse (mg)	22,0	1,9	2,1
Rendement (%)	/	9	10

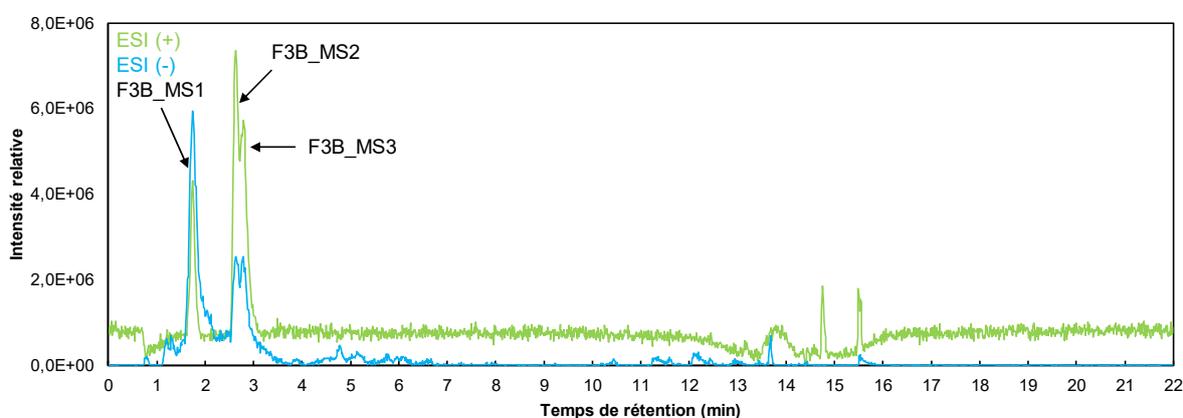
Les analyses par HPLC-DAD/DEDL de ces sous-fractions ont confirmé que le composé F3B a été isolé majoritairement dans la sous-fraction TL\_ha\_F3B (Figure 64). En revanche, la sous-fraction TL\_ha\_F3C contient un mélange des composés F3B et F3C. Comme observé lors de la séparation des groupes de composés A et B par HPLC semi-préparative de l'extrait brut TL\_ha (paragraphe 3.2.2.4.1), ces deux sous-fractions TL\_ha\_F3B et TL\_ha\_F3C contiennent des composés très polaires, non identifiés dans la fraction TL\_ha\_F3 (Figure 63). L'hypothèse de composés retenus sur la colonne a là encore été écartée par des injections de méthanol seul avant et après analyse. L'explication la plus probable à la présence de ces composés est qu'il s'agirait de sous-produits de dégradation (sucres).



**Figure 64** : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL de la sous-fraction TL\_ha\_F3B à 220 nm

### Analyses par UFLC-HRMS de la sous-fraction TL\_ha\_F3B

La sous-fraction TL\_ha\_F3B, composée principalement d'un pic d'après le profil HPLC-DAD/DEDL (Figure 64), a été analysée par UFLC-HRMS. Contrairement à ce qui avait été mis en évidence sur le profil HPLC, trois composés majeurs ont été ionisés dans ces conditions : F3B\_MS1, F3B\_MS2 et F3B\_MS3 (Figure 65). La différence de nature des colonnes (Luna/Kinetex), et des systèmes analytiques (HPLC/UFLC) utilisés pour ces séparations pourraient expliquer ces observations : la capacité de rétention de la colonne Kinetex utilisée lors des analyses UFLC-HRMS permettrait une meilleure séparation de ces composés qui co-éluent lorsque la colonne Luna est employée. Ces composés peuvent également être des composés minoritaires de cette sous-fraction, qui s'ionisent particulièrement bien dans les conditions de l'étude.

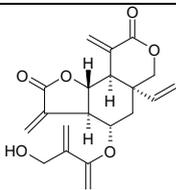


**Figure 65** : Chromatogrammes UFLC-ESI-HRMS de la sous-fraction TL\_ha\_F3B selon les modes d'ionisation positif et négatif (gradient MS3B, paragraphe 5.4.1.1)

L'analyse des données spectrales est réalisée selon la méthodologie de déréplication utilisée pour la fraction TL\_ha\_F3 (Tableau 30). Aucune proposition de structure n'a pu être proposée pour le composé **F3B\_MS1** lors de l'étude réalisée par la plateforme ThalassOMICS. L'étude du spectre de masse de ce composé par le logiciel MZmine permet de proposer la formule brute  $C_{19}H_{20}O_8$  (\*). Par comparaison des masses exactes et du temps de rétention, celui-ci pourrait correspondre au composé **F3\_MS3** mis en évidence dans la fraction TL\_ha\_F3 et pour lequel la structure de la 5,2'-dihydroxy-6,7,8,6'-tétraméthoxyflavanone avait été proposée (Figure 52).

Une seule formule brute  $C_{19}H_{20}O_7$  a été proposée pour les composés **F3B\_MS2** et **F3B\_MS3** ; il s'agirait donc d'isomères. Suite à l'étude déréplicative, la structure de la vernodaline présentant des scores intéressants selon l'étude des données spectrales obtenues dans les deux modes d'ionisation, semble être la plus vraisemblable (Figure 53). Par analogie avec l'étude réalisée pour la fraction TL\_ha\_F3, ce composé correspondrait au composé **F3\_MS6**, pour lequel la structure de la vernodaline faisait partie des structures proposées.

**Tableau 30** : Hypothèses de structure des composés ionisés dans la sous-fraction TL\_ha\_F3B par traitement des données UFLC-ESI-HRMS/MS avec la plateforme ThalassOMICS

Tr et n°	Masse exacte	Formule brute	Composé proposé	Structure	Correspondance avec TL_ha_F3
<b>F3B_MS1</b> 1,74 min	ESI (+) m/z 377,1219 ESI (-) m/z 375,2746	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub> (*)	-	-	<b>F3_MS3</b>
<b>F3B_MS2</b> ou <b>F3B_MS3</b> 2,63 min	ESI (+) m/z 361,1271 ESI (-) m/z 359,1128	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	Vernodaline		<b>F3_MS6</b>

### Caractérisation par RMN de la sous-fraction TL\_ha\_F3B

Afin de confirmer les hypothèses de structure émises lors des analyses par UFLC-HRMS/MS, cette sous-fraction TL\_ha\_F3B a été analysée par RMN à l'aide d'un système Bruker Avance 500®. Les différentes analyses ont été réalisées à partir d'environ 1 mg de sous-fraction dissout dans du CDCl<sub>3</sub>. Le spectre <sup>1</sup>H obtenu est présenté Figure 69, il met en évidence la présence majoritaire d'un composé, comme cela avait été observé sur le chromatogramme HPLC/DEDL. Les déplacements chimiques associés à ce composé sont présentés dans le Tableau 31.

Dans un premier temps, les données spectrales de RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé majoritaire ont été comparées avec celles de la vernodaline disponibles dans la littérature (Tableau 31) [244]. Malgré la forte probabilité avec laquelle cette structure a été proposée suite à l'étude de déréplication, ce composé ne correspond pas à la vernodaline.

La même observation a pu être réalisée en ce qui concerne la 5-hydroxy-2',6',7,8-tétraméthoxyflavanone, autre structure proposée pour le composé **F3\_MS6** par déréplication. L'étude de déréplication n'a donc pas été concluante pour ce composé.

Afin de poursuivre l'identification de ce composé, les données de RMN obtenues au laboratoire ont été comparées avec celles des 6 diterpénoïdes de formule brute C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub> identifiés dans la germandrée lisse [200]. Ce composé isolé pourrait en effet présenter un motif structural identique à celui de ces composés, avec deux atomes d'oxygène supplémentaires. De nombreuses similarités ont alors été observées entre les déplacements chimiques du composé isolé et de la teucvidine, exception faite des deux carbones marqués d'une étoile\* sur la Figure 66 [245].

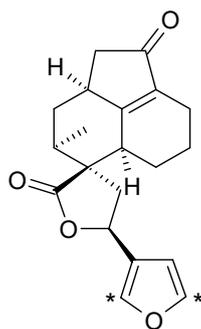


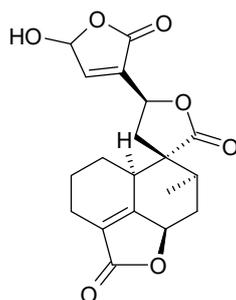
Figure 66 : Structure de la teuvidine

Tableau 31 : Données de RMN  $^1\text{H}$  (500MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125MHz) du composé F3B2 obtenues par analyses de la sous-fraction TL\_ha\_F3B dans le  $\text{CDCl}_3$  à 298 K

Atome	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1 a	1,34 ; m ; 1H	23,3
1 b	1,99 ; m ; 1H	
2 a	1,99 ; m ; 1H	21,2
2 b	1,60 ; m ; 1H	
3 a	2,33 ; m ; 1H	20,0
3 b	2,20 ; m ; 1H	
4	-	128,1
5	-	161,8
6	4,98 ; ddl (12,0 ; 7,5) ; 1H	75,9
7 a	2,34 ; m ; 1H	35,7
7 b	1,43 ; tdl (12,0 ; 3,8) ; 1H	
8	2,20 ; m ; 1H	38,7
9	-	51,5
10	3,24 ; tl (7,0) ; 1H	36,1
11 a	2,61 ; dd (14,1 ; 8,9) ; 1H	37,1
11 b	1,90 ; dd (14,1 ; 8,1) ; 1H	
12	5,10 ; t (8,5) ; 1H	71,0
13	-	n.d.
14	7,15 ; s ; 1H	144,3
15	6,23 ; s ; 1H	98,0
16	-	168,1
17	1,37 ; d (7,3) ; 3H	14,1
18	-	172,7
19	-	177,1

$\delta$  en ppm, s : singulet, d : doublet, t : triplet, m : multiplet, l : large, J en Hz, n.d. : non identifié

Le composé isolé pourrait alors être un dérivé de la teuvidine possédant d'après leurs déplacements chimiques plus déblindés, des groupements hydroxyle et/ou carbonyle sur ces deux positions. L'étude des différents composés présentant ce type de structure a conduit à identifier la teuponine (Figure 67) qui présente un spectre de RMN qui pourrait correspondre, bien que les données de RMN de référence aient été obtenues dans un autre solvant (pyridine- $d_5$ ) [246]. D'après la littérature, ce diterpène de type *néo*-clérodane a déjà été décrit dans un extrait éthanolique (95 %) de parties aériennes de *T. japonicum* [246]. Aucune étude des activités biologiques de cette molécule n'a été réalisée à ce jour.



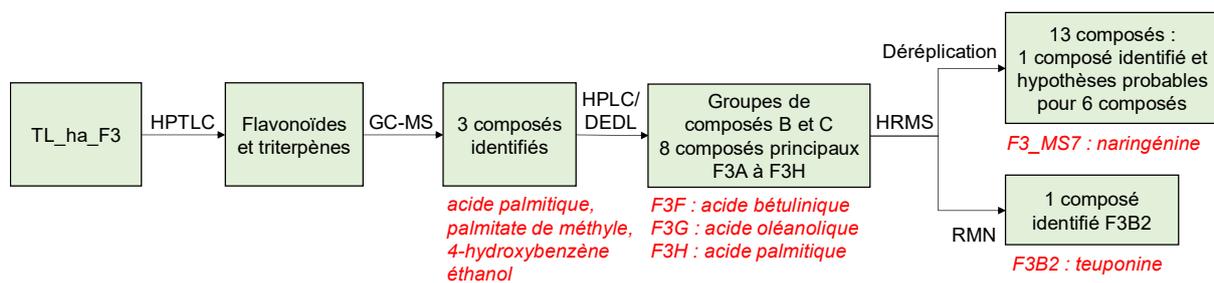
**Figure 67** : Structure de la teuponine

Afin de compléter cette caractérisation et évaluer les activités biologiques de ce composé, un isolement en quantité plus importante de la sous-fraction TL\_ha\_F3B est prévu.

La teuponine a été identifiée comme un des composés majoritaires de la fraction TL\_ha\_F3 par isolement du composé F3B par HPLC semi-préparative, suivi d'une analyse structurale par HRMS et par RMN. Cette identification contredit l'hypothèse de structure émise lors de l'étude de déréplication et met ainsi en évidence les limites d'une telle technique, notamment lorsque la matière végétale n'a été que peu ou pas étudiée au préalable (cas de la germandrée lisse).

Le manque de matière première, la difficulté de séparation des composés de cette fraction, ainsi que la dégradation de certains composés, n'ont pas permis de caractériser les composés F3A, F3C, F3D et F3E.

**Sept composés ont été identifiés dans la fraction TL\_ha\_F3, dont 4 sont majoritaires : la teuponine (F3B2), l'acide bétulinique (F3F), l'acide oléanolique (F3G) et l'acide palmitique (F3H) (Figure 68). Les autres composés identifiés sont la naringénine, le palmitate de méthyle et le 4-hydroxybenzène éthanol.**



**Figure 68** : Informations obtenues suite à la caractérisation phytochimique de la fraction TL\_ha\_F3 (rouge : composé identifié)

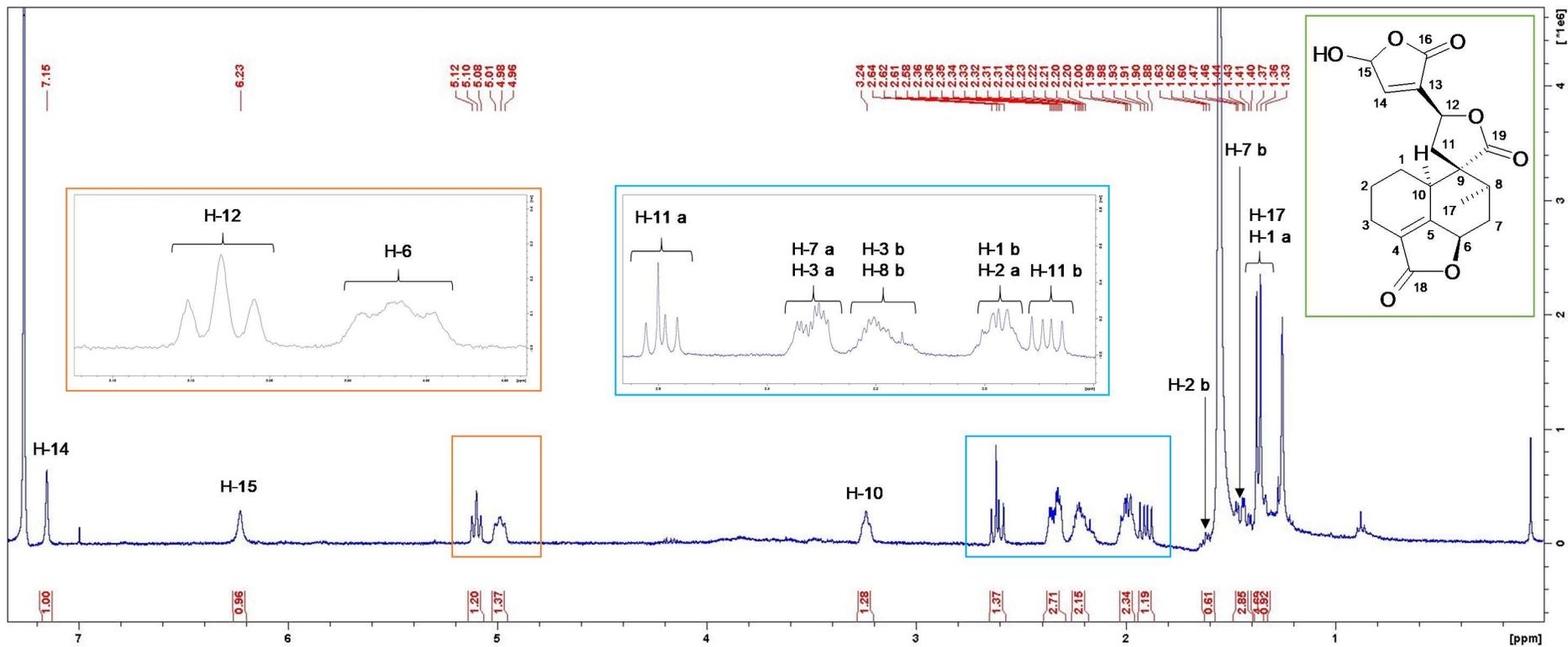


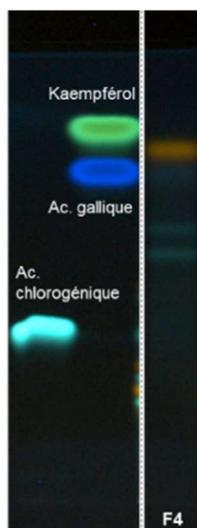
Figure 69 : Spectre de RMN  $^1\text{H}$  de la sous-fraction TL\_ha\_F3B ( $\text{CDCl}_3$  ; 500 MHz)

#### 3.2.2.4.2. Etude de la fraction TL\_ha\_F4

##### A. Caractérisation phytochimique par HPTLC, GC-MS, GC/FID et HPLC-DAD/DEDL

La fraction 4, obtenue par élution à l'aide du mélange éther diéthylique/méthanol (50/50) avec un rendement de 4,2 %, présente des activités antioxydantes et anti-inflammatoires modérées (Figure 45).

Différentes analyses par HPTLC ont été réalisées afin de caractériser les familles de molécules présentes. Les révélations au réactif de Neu et au PEG 400 ont mis en évidence la présence majoritaire d'une bande de coloration orange, caractéristique des flavonoïdes, et plus particulièrement des flavones (Figure 70). Elle pourrait correspondre à la lutéoline ou à l'un de ses dérivés glycosylés [130]. Sa présence a été confirmée par co-injection du standard analytique de la lutéoline par HPLC-DAD/DEDL (marqué par un astérisque, Figure 71). Cette flavone a déjà été identifiée dans le genre *Teucrium*, notamment dans *T. polium* [247]. Des composés de types acides phénoliques et/ou coumarines semblent également présents dans cette fraction (bandes de coloration bleue).



**Figure 70** : Etude des polyphénols et flavonoïdes de l'extrait TL\_ha\_F4 par HPTLC (révélation à 366 nm après dérivations avec le réactif de Neu et le PEG 400)

Quelques composés peu polaires ont été révélés avec le *p*-anisaldéhyde : la coloration grise des bandes semble indiquer qu'ils correspondraient à des stéroïdes [136]. Cette classe de composés a déjà été décrite dans les parties aériennes de *T. montanum* subsp. *pannonicum* [248], mais leur présence semble minoritaire.

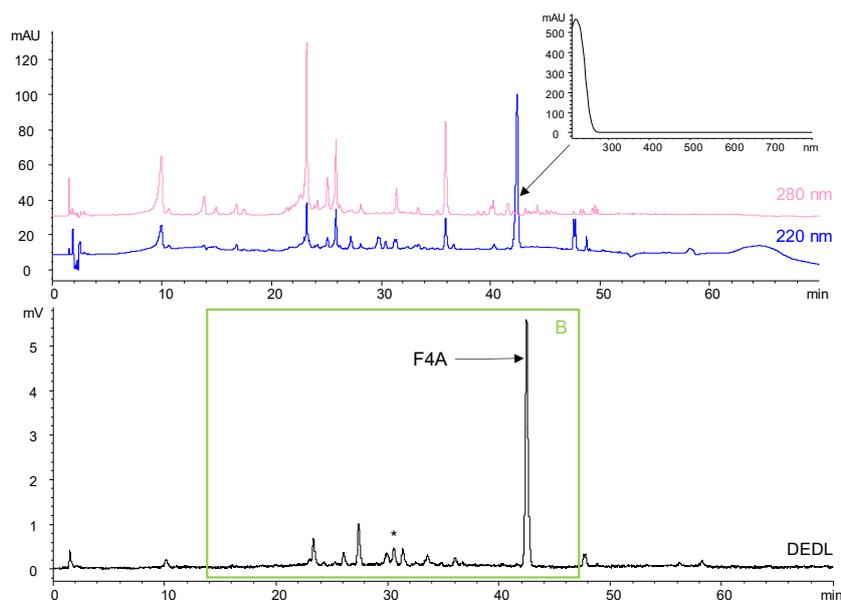
Les analyses par GC-MS de la fraction TL\_ha\_F4 ont permis d'identifier 4 composés (Tableau 32). La gaïacol, dont la teneur est estimée à 0,16 % dans cette fraction par GC/FID, est le composé majoritaire parmi ces 4 composés : il n'a jamais été décrit dans le genre *Teucrium* contrairement au tyrosol déjà décrit dans un extrait de feuilles de *T. polium* [249]. Les deux autres composés, présents à moins de 0,01 % dans cette fraction, seraient deux isomères appartenant à la famille des *néo*-clérodanes : la teufline et la 1,2-*épi*-teucvine, déjà décrits dans un extrait de *T. lucidum* [200].

**Tableau 32** : Composés identifiés par GC-MS dans la fraction TL\_ha\_F4

Composés identifiés	RI calculé <sup>(1)</sup> / RI littérature	Teneur estimée <sup>(4)</sup>	Références	Activités biologiques <sup>(5)</sup>
Gaïacol	1086/1089 <sup>(2)</sup>	0,16 %	Non décrit dans le genre <i>Teucrium</i>	Antioxydante (75,48 ± 0,01 %)
Tyrosol	1421/1427 <sup>(2)</sup>	0,09 %	Décrit dans un extrait de feuilles de <i>T. polium</i> [249]	Non évaluées
Teufline	2258/n.r. <sup>(3)</sup>	0,06 %	Décrite dans un extrait de <i>T. lucidum</i> [200]	Non évaluées
1,2- <i>epi</i> -Teucvine	2348/n.r. <sup>(3)</sup>	< 0,01 %	Décrite dans un extrait de <i>T. lucidum</i> [200]	Non évaluées

<sup>(1)</sup> RI = indice de rétention déterminé sur colonne HP-1 à l'aide d'une série d'alcane (C8-C24) et comparé aux RI disponibles dans la littérature – <sup>(2)</sup> Identification validée par comparaison de RI avec le RI d'un standard analysé dans les mêmes conditions - <sup>(3)</sup> Tentative d'identification - <sup>(4)</sup> Teneur calculée par étalonnage externe à l'aide d'une gamme étalon de gaïacol – n.r. : non renseigné - <sup>(5)</sup> évaluées selon les tests in vitro

Le profil phytochimique HPLC-DAD/DEDL de la fraction TL\_ha\_F4 est caractérisé par la présence de composés du groupe B, parmi lesquels le composé **F4A** semble majoritaire (Figure 71). D'après les études précédentes, ces composés du groupe B contribueraient aux activités de cette fraction. Le spectre UV du composé F4A n'apporte pas d'information caractéristique concernant la famille à laquelle appartient ce composé.



**Figure 71** : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL de la fraction TL\_ha\_F4 à 220 nm et 280 nm, et spectre UV du composé F4A (\* : lutéoline)

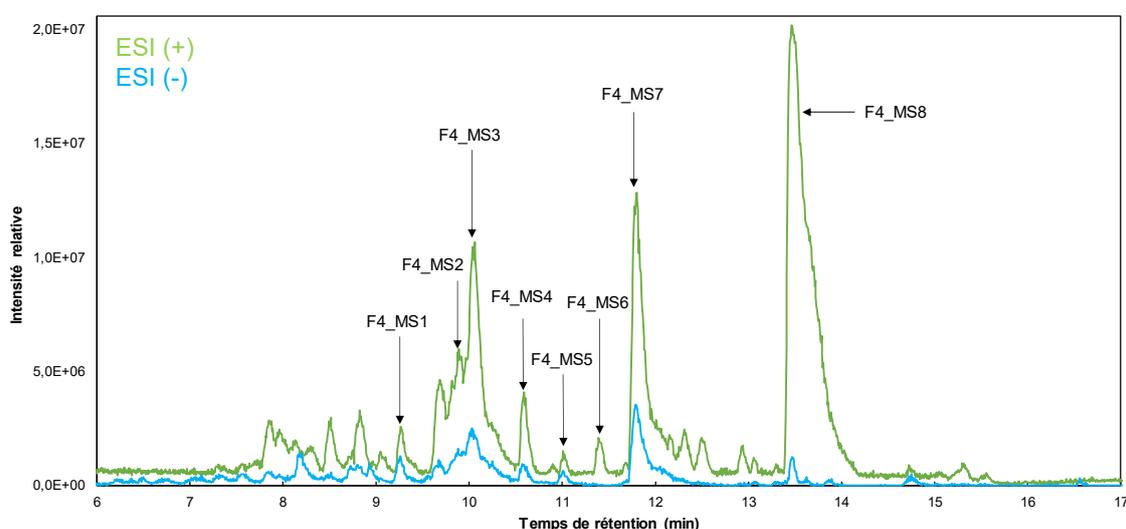
La co-injection des standards analytiques du tyrosol et du gaïacol par HPLC-DAD/DEDL permet de confirmer qu'ils ne correspondent pas aux composés principaux observés sur le profil HPLC.

La fraction TL\_ha\_F4 présente des activités antioxydantes et anti-inflammatoires modérées dues à la présence des composés du groupe B (polyphénols et flavonoïdes) parmi lesquels le composé F4A est majoritaire. Cinq composés présents en concentrations plus faibles ont été identifiés par GC-MS dans cette fraction ; deux d'entre eux pourraient correspondre à des néoclérodanes, une famille de composés caractéristique du genre *Teucrium*.

## B. Etude de la fraction TL\_ha\_F4 par déréplication

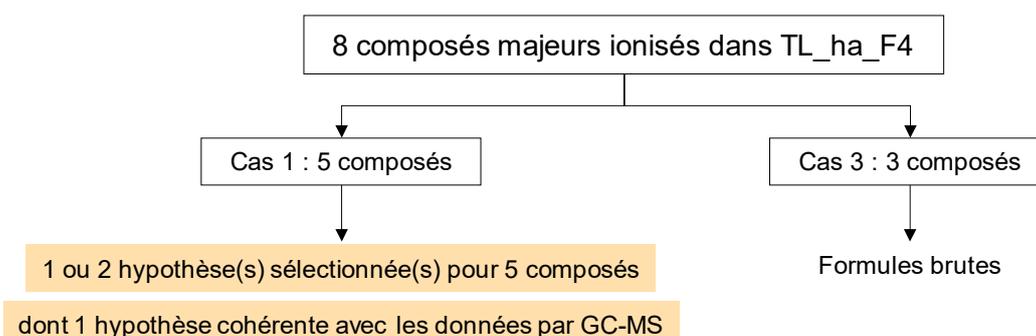
Bien que cette fraction ne présente pas les activités biologiques les plus intéressantes, sa caractérisation phytochimique a été approfondie afin d'identifier le composé majoritaire F4A, et de confirmer la présence de *néo*-clérodanes dans cette fraction.

Cette fraction a été analysée selon l'étude déréplicative présentée précédemment. Huit composés majoritaires ionisés dans ces conditions d'étude et dénommés F4\_MS1 à F4\_MS8, ont été mis en évidence dans cette fraction (Figure 72). Des hypothèses de structures ont été proposées pour 5 d'entre eux (cas 1, paragraphe 3.2.2.5.1) et les formules brutes des 3 autres composés ont été calculées à partir des masses exactes (cas 3). Les résultats de cette étude sont présentés dans le Tableau 33. La démarche utilisée, similaire à celle utilisée pour l'étude de la fraction TL\_ha\_F3, est présentée en détails en annexe 1.



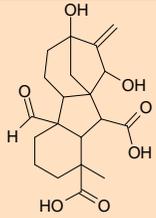
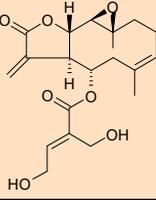
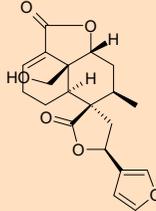
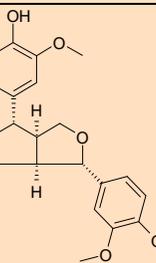
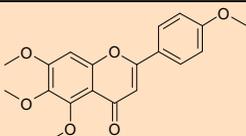
**Figure 72** : Chromatogrammes UFLC-ESI-HRMS de la fraction TL\_ha\_F4 selon les modes d'ionisation positif et négatif (gradient HRMS, paragraphe 5.4.1.1)

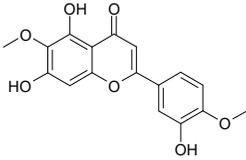
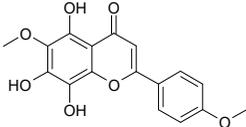
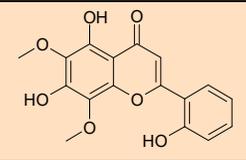
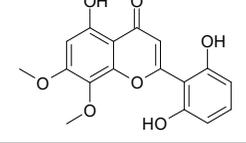
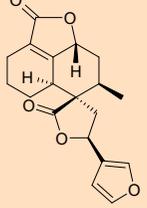
Des hypothèses de structure ont été obtenues pour 5 composés de cette fraction sans qu'aucun de ces composés n'ait pu être identifié de manière définitive (Figure 73). L'hypothèse émise quant à la structure du composé **F4\_MS8** semble particulièrement intéressante par comparaison avec les données obtenues par GC-MS ; ce composé correspondrait à la teufline, un *néo*-clérodane caractéristique du genre *Teucrium*.



**Figure 73** : Bilan de l'étude déréplicative réalisée sur la fraction TL\_ha\_F4

**Tableau 33** : Hypothèses de structure des composés présents dans la fraction TL\_ha\_F4 par traitement des données UFLC-ESI-HRMS/MS avec la plateforme ThalassOMICS  
 (vert : hypothèse confirmée, orange : hypothèse plus probable, rouge : hypothèse rejetée, blanc : autre hypothèse de structure potentielle)

Tr et n°	Masse exacte	Formule brute	Composés proposés	Structures
<b>F4_MS1</b> 9,30 min	ESI (+) <i>m/z</i> 379,1757 ESI (-) <i>m/z</i> 377,155	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>7</sub>	Gibbéreline A102	
			Stizolicine	
<b>F4_MS2</b> 9,77 min	ESI (+) <i>m/z</i> 359,1472	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	Teuscorodonine	
			Pinorésinol	
<b>F4_MS3</b> 10,06 min	ESI (+) <i>m/z</i> 343,1176	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	5-méthoxysalvigénine	

<b>F4_MS4</b> 10,60 min	ESI (+) <i>m/z</i> 287,0566 ESI (-) <i>m/z</i> 285,0415	$C_{15}H_{10}O_6$ (*)	-	-
<b>F4_MS5</b> 11,05 min	ESI (+) <i>m/z</i> 421,2071 ESI (-) <i>m/z</i> 419,1350	$C_{21}H_{24}O_9$ (*)	-	-
<b>F4_MS6</b> 11,43 min	ESI (+) <i>m/z</i> 361,1432 ESI (-) <i>m/z</i> 359,1046	$C_{23}H_{20}O_4$ (*)	-	-
<b>F4_MS7</b> 11,83 min	ESI (+) <i>m/z</i> 331,0816 ESI (-) <i>m/z</i> 329,0663	$C_{17}H_{14}O_7$	5,7,3'-trihydroxy-6,4-diméthoxyflavone	
			5,7,8-trihydroxy-4',6 diméthoxyflavone	
			5,7,2'-trihydroxy-6,8-diméthoxyflavone	
			2',5,6'-trihydroxy-7,8-diméthoxyflavone	
<b>F4_MS8</b> 13,54 min	ESI (+) <i>m/z</i> 311,1287 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	$C_{19}H_{20}O_5$	Teufline	

### C. Isolement et caractérisation du composé majoritaire de la fraction TL\_ha\_F4

Le composé F4A a été isolé par HPLC semi-préparative à partir de la fraction TL\_ha\_F4 afin de poursuivre son identification. Après 41 injections (gradient D, paragraphe 5.2.1.3), 4 mg de cette sous-fraction ont été isolés. Elle est composée majoritairement du composé F4A, bien que comme précédemment des composés très polaires sont observés, probablement liés à encore, à la dégradation éventuelle de certains composés (Figure 74).

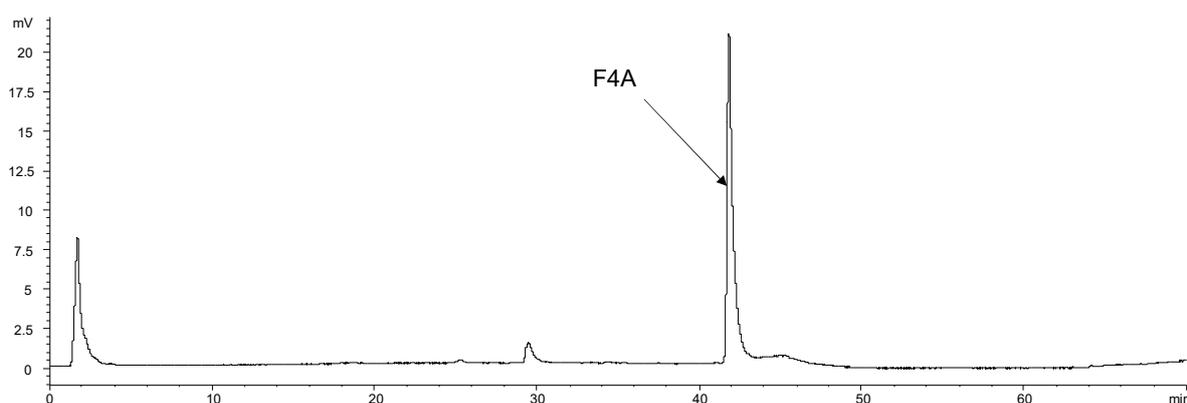


Figure 74 : Chromatogramme HPLC/DEDL de la sous-fraction obtenue par HPLC semi-préparative à partir de la fraction TL\_ha\_F4

D'après les analyses par HPLC-MS de cette sous-fraction, le composé F4A est caractérisé par un ion pseudo-moléculaire de  $m/z$  329 et un adduit de  $m/z$  679  $[2M+Na]^+$  (Figure 75). Par analogie avec l'étude déréplicative, le composé F4A pourrait correspondre au composé **F4\_MS8** de formule brute  $C_{19}H_{20}O_5$  pour lequel la structure de la teufline a été proposée.

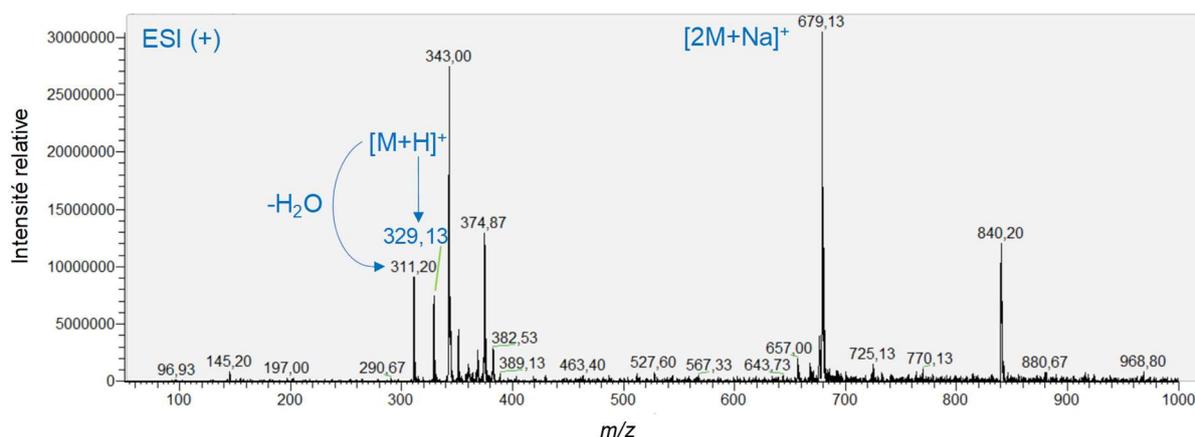


Figure 75 : Spectre HPLC-POS-ESI-MS du composé F4A

Cette sous-fraction a été analysée par RMN à l'aide d'un système Bruker Avance 600<sup>®</sup>. La comparaison des données de RMN  $^1H$  et  $^{13}C$  du composé F4A (Tableau 34, Figure 76, Figure 77) avec les données spectrales de la teufline présentes dans la littérature, a permis de confirmer cette identification [245, 250–252]. Ce diterpène également appelé 6-*epi*-teucline, a déjà été décrit dans l'espèce *T. lucidum* [200] et semble plus généralement caractéristique du genre *Teucrium*, puisqu'il a été décrit dans de nombreuses espèces telles que *T.*

*tomentosum* [253], *T. viscidum* var. *miquelianum* [253], *T. chamaedrys* [254], ou encore *T. flavum* [252]. Très peu d'études ont porté sur l'évaluation de ses activités biologiques, et notamment de ses potentielles applications cosmétiques. Kong *et al.* (2014) mentionnent son absence d'activité anti-inflammatoire (test d'inhibition des lipopolysaccharides) [255].

**Tableau 34** : Données de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) de la molécule F4A dans le  $\text{CDCl}_3$  à 300 K

Atome	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	HMBC $^3\text{J}_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$	NOESY
1 a	1,58 ; qdl (11,9 ; 3,0) ; 1H	23,8		
1 b	2,16 ; dql (11,9 ; 3,5) ; 1H			
2 a	2,24 ; ov ; 1H	23,4		
2 b	1,83 ; m ; 1H			
3 a	2,37 ; ov ; 1H	18,8	1	
3 b	2,23 ; ov ; 1H			
4	-	124,1		
5	-	166,3		
6	5,73 ; dm (14,1) ; 1H	76,8	18	7a, 17
7 a	2,08 ; ddl (12,0 ; 5,7) ; 1H	31,9	5, 9, 17	
7 b	1,80 ; dd (12,0 ; 9,3) ; 1H			
8	2,23 ; ov ; 1H	36,0		
9	-	51,1		
10	2,72 ; dm (11,9) ; 1H	43,3		2b, 1b, 3b, 11b
11 a	2,38 ; dd (13,8 ; 10,0) ; 1H	43,0	10, 13, 19	
11 b	2,66 ; dd (13,8 ; 7,3) ; 1H			
12	5,37 ; dd (10,0 ; 7,3) ; 1H	71,1	13, 14, 16	1a, 1b, 11b
13	-	124,3		
14	6,41 ; ddl (1,8 ; 0,8) ; 1H	107,9	13, 15, 16	11a, 17
15	7,46 ; tl (1,8) ; 2H	144,4	16, 13, 14	
16	7,48 ; m ; 2H	140,0	13, 14, 15	
17	1,22 ; d (7,3) ; 3H	17,7	7, 8, 9	6, 7a, 8b, 11a, 14
18	-	173,8		
19	-	176,0		

$\delta$  en ppm, s : singulet, d : doublet, t : triplet, q : quadruplet, m : multiplet, ov : signal superposé, l : large, J en Hz

Afin d'évaluer ses activités biologiques et déterminer s'il contribue aux activités anti-inflammatoires et antioxydantes de la fraction TL\_ha\_F4, le composé F4A a été isolé en quantité plus importante par séparation sur colonne ouverte de silice en phase normale. Cette technique de séparation permet d'obtenir rapidement des quantités plus importantes de produit, bien qu'elle s'avère moins efficace que l'isolement par HPLC semi-préparative (pureté généralement plus faible du composé isolé).

A partir de 510 mg de la fraction TL\_ha\_F4 déposés sur silice, 6 mg du composé F4A ont été isolés, avec une pureté suffisante pour en tester les activités biologiques. Selon les tests *in vitro*, la teufline présente des activités anti-inflammatoires intéressantes ( $59,74 \pm 0,01$  %) ; ainsi, sa présence majoritaire dans cette fraction TL\_ha\_F4 en explique l'activité anti-inflammatoire.

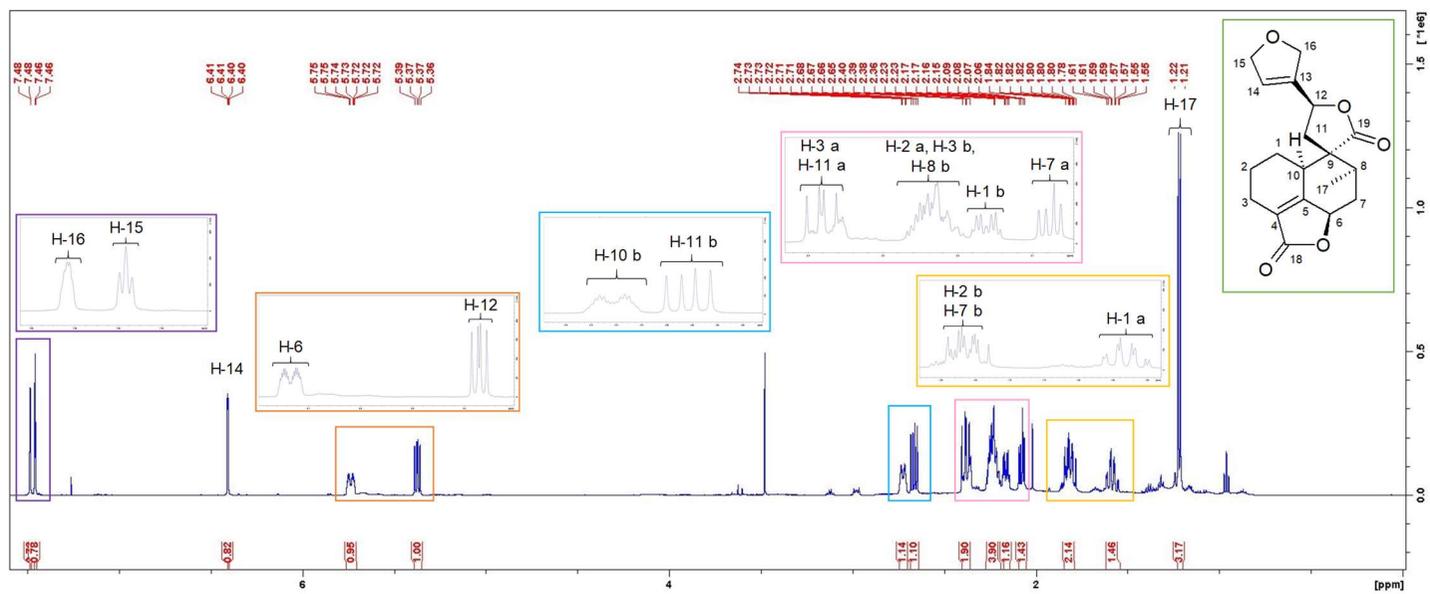


Figure 76 : Spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé F4A ( $\text{CDCl}_3$ ; 600 MHz)

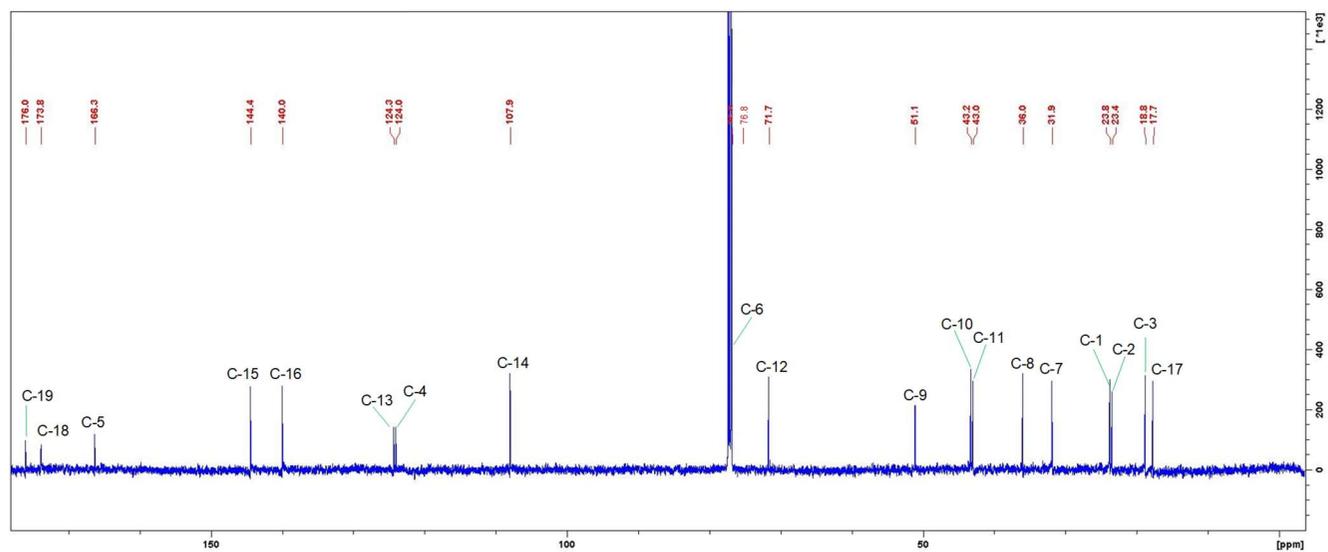
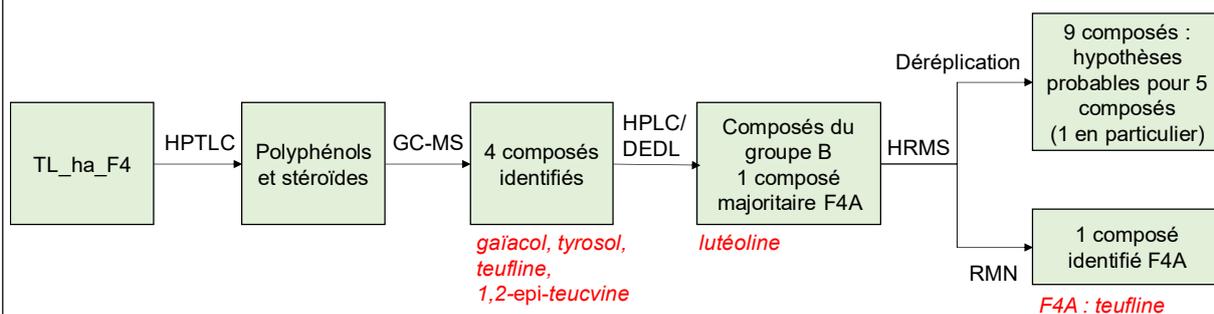


Figure 77 : Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  du composé F4A ( $\text{CDCl}_3$ ; 150 MHz)

Le composé FA4, majoritaire dans cette fraction, a été identifié comme étant la teufline par isolement et caractérisation structurale par RMN. Cette identification confirme les hypothèses de structure émises lors des analyses par GC-MS et à l'issue de l'étude de déréplication. Elle contribue aux activités anti-inflammatoires de cette fraction.

La fraction TL\_ha\_F4 est composée du groupe de molécules B, parmi lesquelles la teufline a été identifiée comme composé majoritaire F4A (Figure 78). La lutéoline, ainsi que le gaiacol, le tyrosol et la 1,2-*epi*-teucvine, ont également été identifiés dans cette fraction.

Contrairement à ce qui a été constaté pour la fraction TL\_ha\_F3, les informations obtenues lors de l'étude de déréplication ont abouti aux mêmes résultats que la méthode conventionnelle (isolement et caractérisation). Les hypothèses proposées lors de cette étude ont facilité la caractérisation structurale du composé majoritaire F4A.

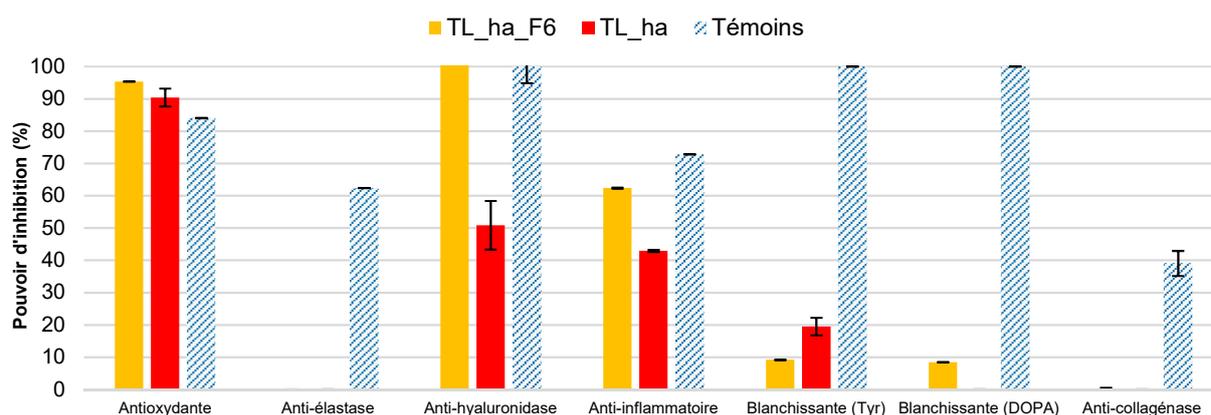


**Figure 78** : Informations obtenues suite à la caractérisation phytochimique de la fraction TL\_ha\_F4 (rouge : composé identifié)

### 3.2.2.4.3. Etude de la fraction TL\_ha\_F6

#### A. Caractérisation phytochimique par HPTLC, GC-MS, GC/FID et HPLC-DAD/DEDL

La fraction 6, obtenue par élution au méthanol, est la fraction la plus intéressante en termes de rendement (26 %) et d'activités biologiques. Elle présente des activités anti-hyaluronidase deux fois supérieures à celles de l'extrait brut TL\_ha ainsi que des activités antioxydantes et anti-inflammatoires légèrement plus intéressantes que ce dernier (Figure 79).

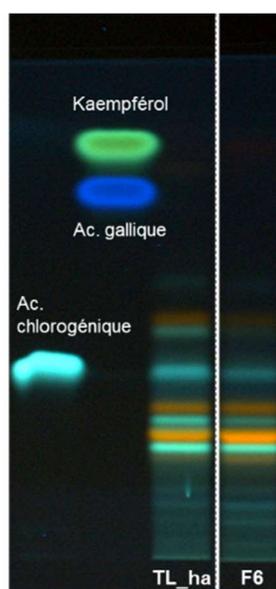


**Figure 79** : Activités biologiques de la fraction TL\_ha\_F6 en comparaison des activités de l'extrait TL\_ha

L'analyse de cette fraction par HPTLC a mis en évidence ses fortes similitudes avec l'extrait brut. La composition en glucides de cette fraction (révélations avec l'orcinol et la DAPA) est semblable à celle de l'extrait brut. Cette fraction se compose notamment de 3 sucres majoritaires, identifiés précédemment, à savoir le glucose, le saccharose et le fructose.

La révélation à la ninhydrine révèle la présence de quelques acides aminés.

Des observations similaires ont également été réalisées grâce à la séquence de dérivations au réactif de Neu et au PEG 400 (Figure 80). Cette fraction est composée des différents composés phénoliques mis en évidence dans l'extrait brut : il s'agit là encore de flavones ou flavonols, ainsi que d'acides phénoliques et/ou de coumarines. L'acide chlorogénique est également identifié parmi ces composés. Pour finir, des dérivés de la chlorophylle ont également été mis en évidence.



**Figure 80** : Etude des polyphénols et flavonoïdes de l'extrait TL\_ha\_F6 par HPTLC (révélation à 366 nm après dérivations avec le réactif de Neu et le PEG 400)

Les analyses par GC-MS de cette fraction ont permis d'identifier 4 composés : le gaïacol, le pyrocatechol, l'hydroxyméthylfurfural et le 4-vinyl gaïacol (Tableau 35). Exception faite de l'hydroxyméthylfurfural, ces composés ont déjà été identifiés dans l'extrait brut TL\_ha. Leurs

concentrations ont été déterminées par étalonnage externe avec une solution de gaïacol par GC/FID.

**Tableau 35** : Composés identifiés par GC-MS dans la fraction TL\_ha\_F6

Composés identifiés	RI calculé <sup>(1)</sup> / RI littérature	Teneur estimée <sup>(4)</sup>	Références	Activités biologiques <sup>(5)</sup>
Gaïacol	1086/1089 <sup>(2)</sup>	0,26 %	Non décrit dans le genre <i>Teucrium</i>	Antioxydante (75,48 ± 0,01 %)
Pyrocatechol	1198/1197 <sup>(2)</sup>	0,06 %	Non décrit dans le genre <i>Teucrium</i>	Aucune
Hydroxy-méthylfurfural	1221/1224 <sup>(2)</sup>	0,04 %	Non décrit dans le genre <i>Teucrium</i>	Aucune
4-vinyl gaïacol	1301/1315 <sup>(3)</sup>	0,03 %	Décrit dans l'huile essentielle de <i>T. flavum</i> spp. <i>flavum</i> [208]	Anti-inflammatoire (58,58 ± 0,01 %)

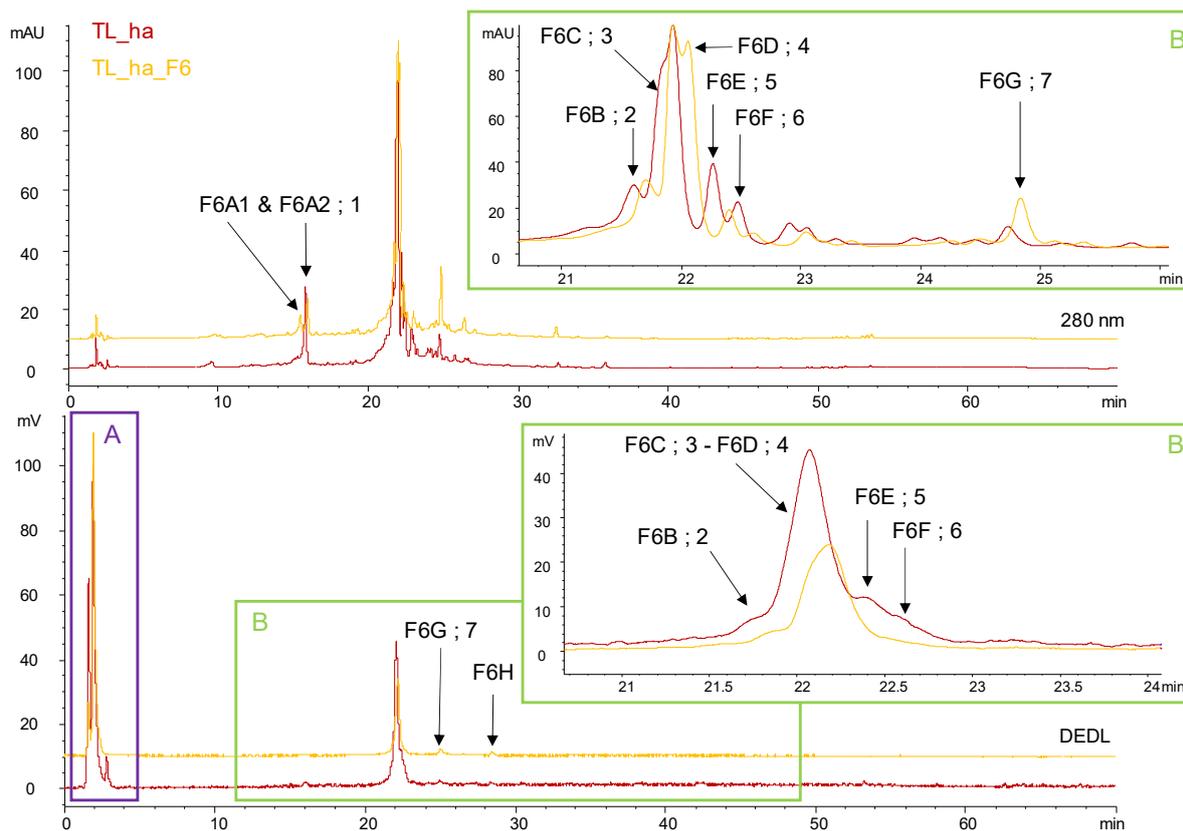
<sup>(1)</sup> RI = indice de rétention déterminé sur colonne HP-1 à l'aide d'une série d'alcane (C8-C24) et comparé aux RI disponibles dans la littérature – <sup>(2)</sup> Identification validée par comparaison de RI avec le RI d'un standard analysé dans les mêmes conditions – <sup>(3)</sup> Tentative d'identification – <sup>(4)</sup> Teneur calculée par étalonnage externe à l'aide d'une gamme étalon de gaïacol – <sup>(5)</sup> évaluées selon les tests in vitro

Le profil HPLC-DAD/DEDL de cette fraction met en évidence la présence des groupes de composés A et B (Figure 81). Leurs compositions sont comparables à celles des deux groupes correspondants dans l'extrait brut, comme observé lors de l'étude par HPTLC. Parmi les composés du groupe B, 9 composés principaux, nommés F6A1, F6A2, F6B, F6C, F6D, F6E, F6F, F6G et F6H, sont mis en évidence.

Par comparaison avec les composés principaux de l'extrait brut TL\_ha, il est possible de faire les analogies suivantes : le composé 1 pourrait correspondre au composé F6A1 ou F6A2, le composé 2 au composé F6B, le composé 3 à F6C, le composé 4 à F6D, le composé 5 à F6E, le composé 6 à F6F, et le composé 7 à F6G. Le composé F6H ne semble pas avoir été mis en évidence sur le chromatogramme HPLC/DEDL de l'extrait brut TL\_ha.

Par co-injection du standard analytique d'acide chlorogénique, et comparaison avec les spectres UV des composés F6A1 et F6A2, l'acide chlorogénique, qui correspondait au composé 1 dans l'extrait brut, a été identifié comme étant le composé F6A2 de la fraction TL\_ha\_F6.

Les 4 composés identifiés par GC-MS, également co-injectés ne correspondent à aucun des composés principaux mis en évidence par HPLC-DAD/DEDL ; ceci vient confirmer le fait qu'ils soient présents en très faible concentration comme cela avait été déterminé par GC/FID.



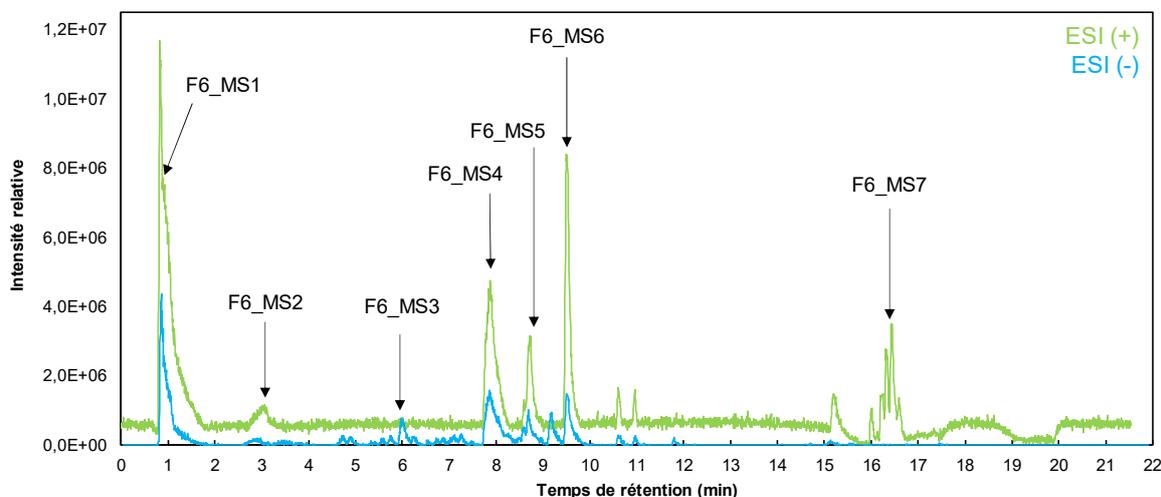
**Figure 81** : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 280 nm de la fraction TL\_ha\_F6 (orange) et de l'extrait brut TL\_ha (rouge)

La fraction TL\_ha\_F6 est particulièrement intéressante en termes de rendement et d'activités. Elle présente une composition phytochimique proche de celle de l'extrait brut, caractérisée par la présence des composés du groupe A et B. Le glucose, le saccharose et le fructose ont été identifiés dans cette fraction. Elle est caractérisée par la présence des 7 composés principaux mis en évidence dans le groupe B de l'extrait brut (composés F6A à F6G correspondant respectivement aux composés 1 à 7) et, parmi lesquels l'acide chlorogénique a été identifié (F6A2). La présence d'un composé supplémentaire, dénommé F6H, est également mise en évidence dans cette fraction. Quatre composés volatils ont été identifiés par GC-MS, dont 3 ont déjà été mis en évidence dans l'extrait brut.

### B. Etude de la fraction TL\_ha\_F6 par déréplication

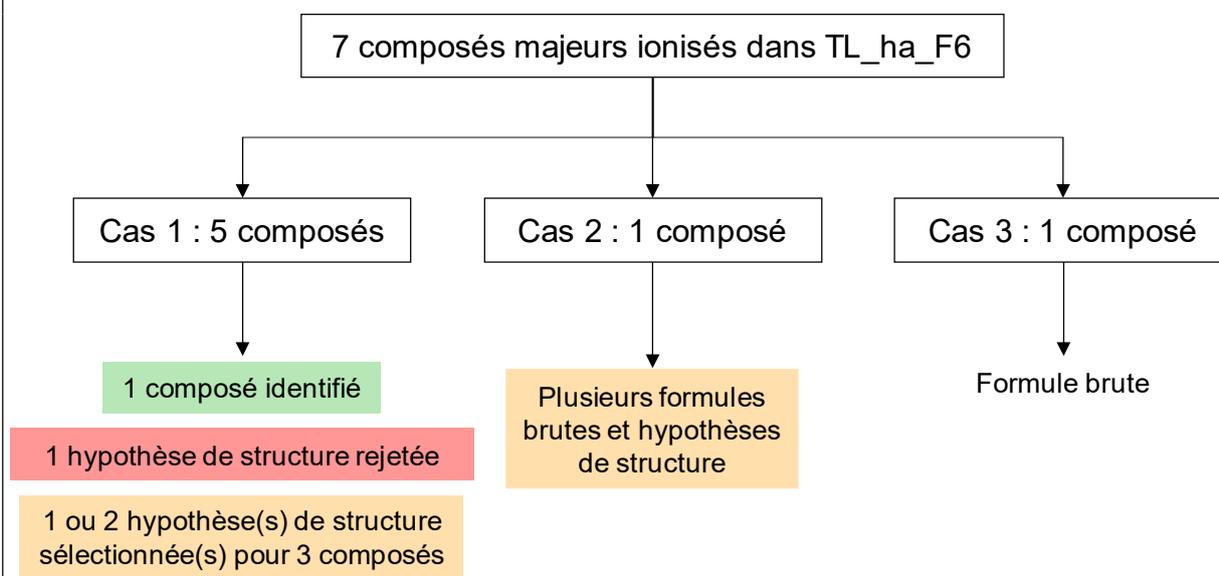
Au vu des activités intéressantes de la fraction TL\_ha\_F6, et des similarités de son profil phytochimique avec celui de l'extrait brut, il a semblé essentiel d'approfondir sa caractérisation par déréplication. Sept composés majoritaires, numérotés F6\_MS1 à F6\_MS7, ont ainsi été ionisés selon les conditions utilisées et mis en évidence lors des analyses par UFLC-HRMS/MS (Figure 82, Tableau 36). Des hypothèses de structure associées à une formule brute ont été proposées pour 5 composés (cas 1, paragraphe 3.2.2.5.1). Pour l'un des composés, deux formules brutes pouvant correspondre ont été mise en évidence (cas 2), et enfin, une formule brute a pu être prédite pour le dernier composé à partir de sa masse exacte

(cas 3). Les résultats de cette étude sont présentés dans le Tableau 36, et la démarche utilisée est détaillée en annexe 2.



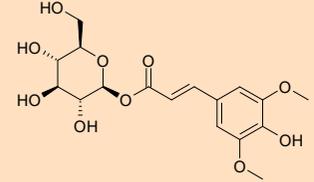
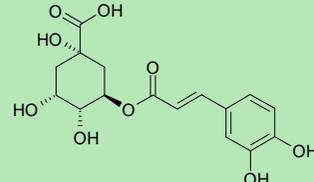
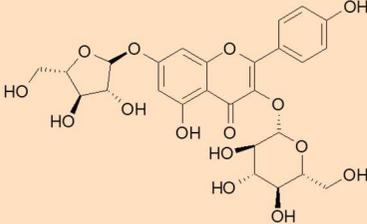
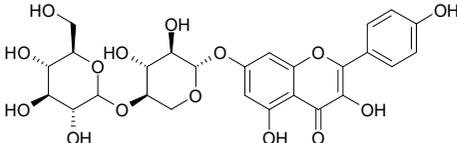
**Figure 82** : Chromatogrammes UFLC-ESI-HRMS de la fraction TL\_ha\_F6 selon les modes d'ionisation positif et négatif (gradient MS, paragraphe 5.4.1.1)

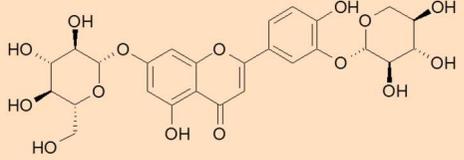
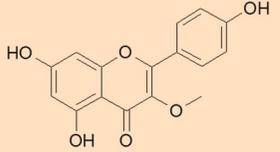
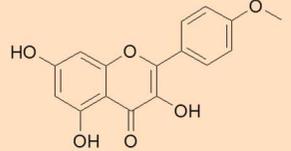
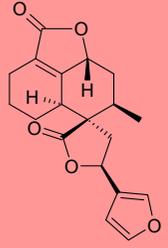
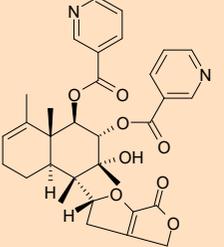
Cette étude a confirmé la présence d'acide chlorogénique dans cette fraction ; il correspond au composé F6A2 dans cette fraction, et au composé 1 de l'extrait brut (Figure 83). Cette étude avait également permis d'émettre l'hypothèse que le composé **F6\_MS6** correspondait à la teufline, or cette hypothèse a été réfutée puisque le temps de rétention du composé F4A identifié dans la fraction TL\_ha\_F4 comme correspondant effectivement à la teufline ne correspond pas à celui du composé **F6\_MS6**.



**Figure 83** : Bilan de l'étude déréplicative réalisée sur la fraction TL\_ha\_F6

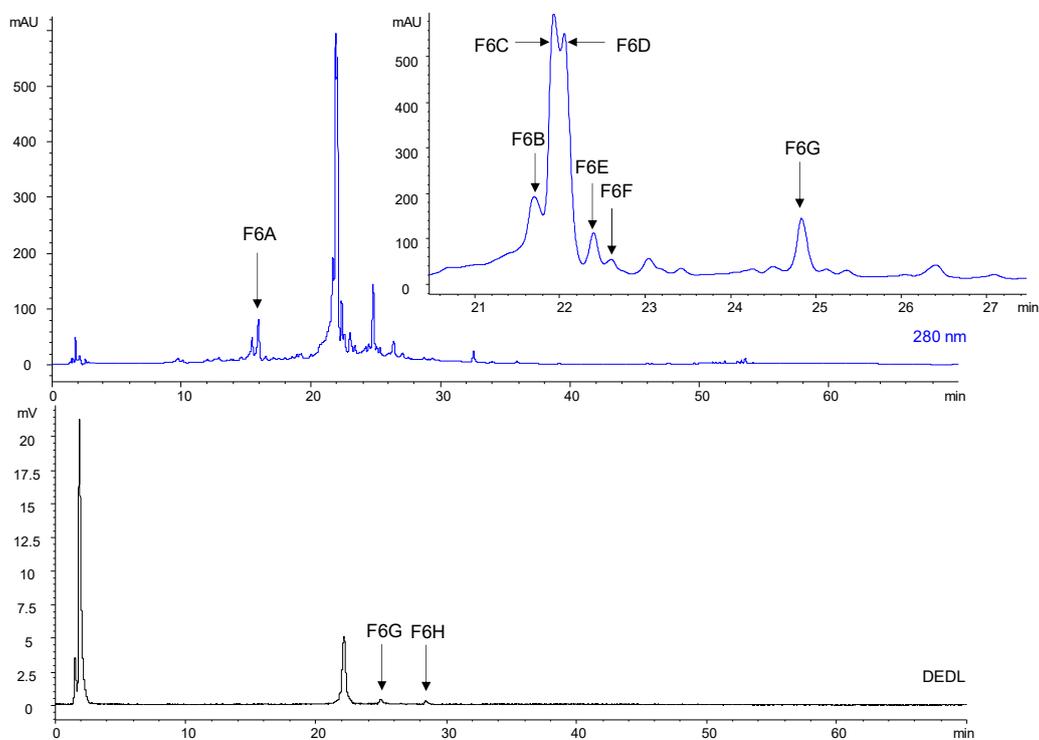
**Tableau 36** : Hypothèses de structure des composés présents dans la fraction TL\_ha\_F6 par traitement des données UFLC-ESI-HRMS/MS avec la plateforme ThalassOMICS  
(vert : hypothèse confirmée, orange : hypothèse plus probable, rouge : hypothèse rejetée, blanc : autre hypothèse de structure potentielle)

Tr et n°	Masse exacte	Formule brute	Composés proposés	Structures
<b>F6_MS1</b> 1,23 min	ESI (+) <i>m/z</i> 365,1057 [M+Na] <sup>+</sup> ESI (-) <i>m/z</i> 341,1091 [M-H] <sup>-</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	-	-
<b>F6_MS2</b> 2,88 min	ESI (+) <i>m/z</i> 387,1259	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	1-O-sinapoyl-β-D-glucopyranoside	
<b>F6_MS3</b> 6,02 min	ESI (+) <i>m/z</i> 355,1025 ESI (-) <i>m/z</i> 353,0880	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	Acide chlorogénique	
<b>F6_MS4</b> 7,89 min	ESI (+) <i>m/z</i> 581,1502 ESI (-) <i>m/z</i> 579,1352	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub>	Kaempférol 7-arabinofuranoside-3-glucoside	
			Kaempférol 7-(4-glucosylxyloside)	

			Lutéoline 3'-xyloside-7-glucoside	
<b>F6_MS5</b> 8,72 min	ESI (+) <i>m/z</i> 595,1653 ESI (-) <i>m/z</i> 593,1515	$C_{27}H_{30}O_{15}$	-	-
	ESI (+) <i>m/z</i> 301,0714	$C_{16}H_{12}O_6$	Kaempférol 3-O-méthyl éther	
			Kaempféride	
<b>F6_MS6</b> 9,53 min	ESI (+) <i>m/z</i> 311,1290 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	$C_{19}H_{20}O_5$	Teufline	
<b>F6_MS7</b> 16,48 min	ESI (+) <i>m/z</i> 592,2690 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	$C_{32}H_{34}N_2O_8$	7-O-nicotinoylscutebarbatine H	

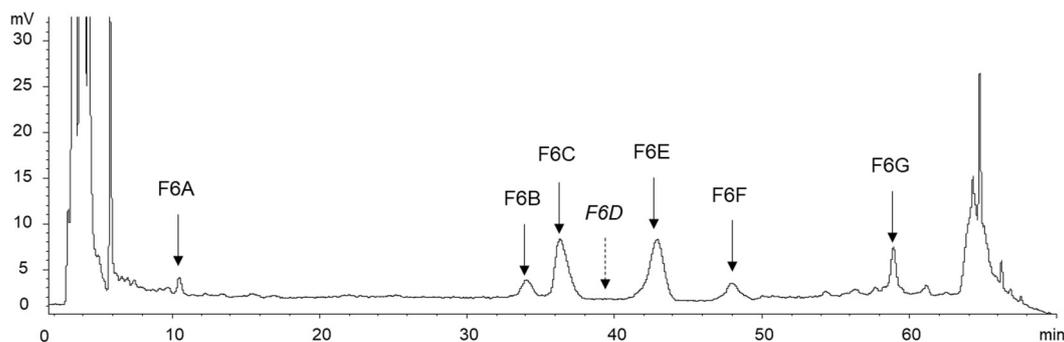
### C. Isolement et caractérisation des composés majoritaires de la fraction TL\_ha\_F6

Afin de confirmer les hypothèses proposées lors de l'étude de déréplication, un isolement des principaux composés mis en évidence sur le profil HPLC/DEDL est réalisé par HPLC semi-préparative (Figure 84).



**Figure 84** : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 280 nm de la fraction TL\_ha\_F6

Le gradient de la phase mobile a été ajusté de façon à améliorer la séparation de ces composés, comme cela est représenté sur la Figure 85. La composition de cette fraction étant très complexe, les composés F6A, F6B, F6C, F6E, F6F et F6G ont été isolés en priorité. Selon le profil HPLC/DEDL optimisé, les composés F6D et F6H semblent être présents en quantités plus faibles que les 4 autres composés. Ils nécessitent par conséquent un nombre considérable d'injections pour les obtenir en quantité suffisante en vue de les caractériser (Figure 85). Selon le gradient utilisé, le composé F6A correspondrait à un mélange des composés F6A1 et F6A2 (acide chlorogénique).



**Figure 85** : Chromatogramme HPLC/DEDL de la fraction TL\_ha\_F6 sur colonne semi-préparative C18 Luna® (gradient D, paragraphe 5.2.1.3)

Après 46 injections, 6 sous-fractions dénommées TL\_ha\_F6A à TL\_ha\_F6G ont été isolées ; elles correspondent respectivement aux composés isolés F6A à F6G. Les masses obtenues de chacune de ces sous-fractions restent faibles malgré le grand nombre d'injections réalisées (Tableau 37). La somme de ces masses représentant 25 % de la masse de la fraction initiale TL\_ha\_F6, elle confirme que les composés du groupe A sont majoritaires dans cette fraction.

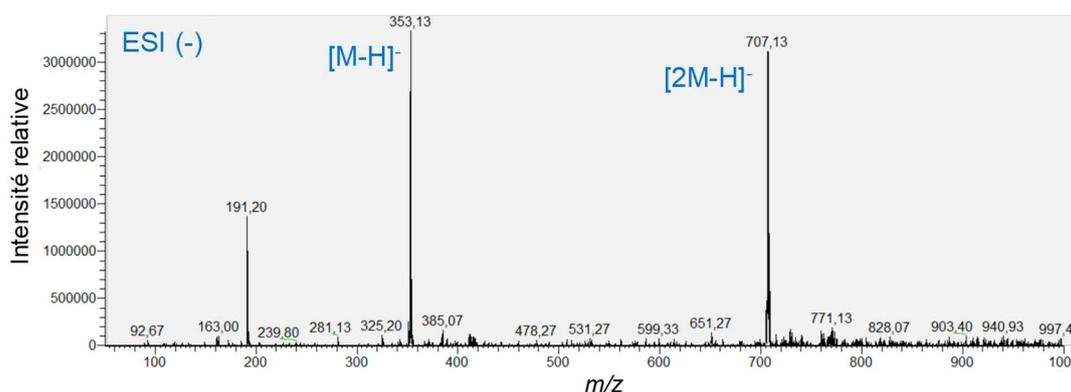
**Tableau 37** : Masses des composés isolés par HPLC semi-préparative de la fraction TL\_ha\_F6

Fraction	TL_ha_F6	TL_ha_F6A	TL_ha_F6B	TL_ha_F6C	TL_ha_F6E	TL_ha_F6F	TL_ha_F6G
Masse (mg)	69	3	3	4	4	1	3
Rendement (%)	-	4	4	6	6	1	4

Les différentes sous-fractions isolées ont été analysées par HPLC-DAD/DEDL afin de déterminer leur pureté, puis par HPLC-MS. Hormis la sous-fraction TL\_ha\_F6F pour laquelle seul 1 mg de matière a été obtenu, ces sous-fractions ont également été analysées par RMN (systèmes Bruker Avance 500 et 600<sup>®</sup> selon la sous-fraction). La caractérisation de ces sous-fractions n'est pas présentée selon l'ordre alphabétique, mais dans l'ordre dans lequel les identifications ont été réalisées, puisque la caractérisation du composé F6G a aidé à celle du composé F6C.

### Caractérisation de la sous-fraction TL\_ha\_F6A

La sous-fraction TL\_ha\_F6A, obtenue avec une masse de 3 mg, est majoritairement composée des deux molécules F6A1 et F6A2 d'après son profil HPLC-DAD/DEDL. La présence d'acide chlorogénique a été confirmée par analyse par HPLC-MS de cette fraction. Il correspond effectivement au composé **F6A2**, dont le spectre de masse est caractérisé par la présence d'ions caractéristiques de l'acide chlorogénique de  $m/z$  707  $[2M-H]^-$  et 353  $[M-H]^-$  selon le mode d'ionisation négatif (respectivement  $m/z$  355  $[M+H]^+$  selon le mode positif) [256].



**Figure 86** : Spectre HPLC-NEG-ESI-MS du composé F6A2

Le pic de  $m/z$  325 correspond à l'ion pseudo-moléculaire  $[M-H]^-$  du composé **F6A1**, ce qui a été confirmé par la présence de l'adduit  $[M+HCOO]^-$  de  $m/z$  371. L'ion de  $m/z$  163, fragment de l'ion pseudo-moléculaire, suggère la présence d'un groupement hexose greffé sur un aglycone de masse moléculaire égale à 163 g/mol.

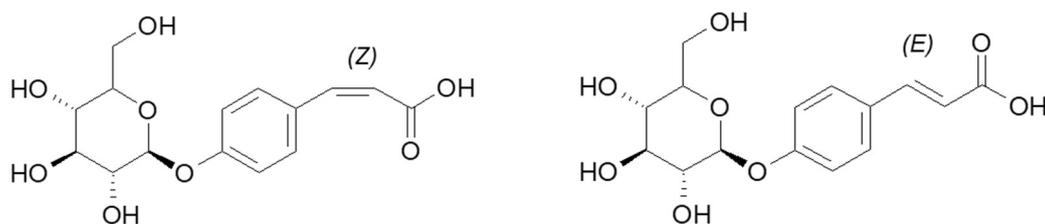
Les analyses de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de cette fraction mettent en évidence la présence de nombreux composés, parmi lesquels 3 sont majoritaires. L'acide chlorogénique **F6A2** est identifié comme étant l'un de ces 3 composés majoritaires. Ces analyses ont permis de déterminer sa configuration *trans*, par comparaison de ses données spectrales (Figure 88, Figure 89, Tableau 38) avec celles disponibles dans la littérature (constantes de couplage des protons H-7' et H-8') [257, 258]. Certains déplacements seront à confirmer par des analyses complémentaires de RMN lorsque cette fraction aura été isolée en quantité plus importante.

**Tableau 38** : Données de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) de l'acide *trans*-chlorogénique identifié dans la sous-fraction TL\_ha\_F6A dans la  $\text{D}_2\text{O}+\text{TMSP}$  à 300 K

Atome	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	-	n.d.
2 a	2,14 ; ov ; 1H	40,1
2 b	2,04 ; ov ; 1H	
3	4,25 ; m ; 1H	73,7
4	3,89 ; ov ; 1H	75,8
5	5,33 ; ddd (11,3 ; 10,0 ; 4,8) ; 1H	73,9
6 a	2,20 ; ov ; 1H	41,4
6 b	2,01 ; ov ; 1H	
7	-	n.d.
1'	-	127,7
2'	7,02 ; sl ; 1H	109,2
3'	-	n.d.
4'	-	n.d.
5'	6,71 ; d (7,8) ; 1H	112,0
6'	7,00 ; dl (7,8) ; 1H	125,9
7'	7,70 ; d (15,9) ; 1H	150,6
8'	6,35 ; d (15,9) ; 1H	115,5
9'	-	n.d.

$\delta$  en ppm, s : singulet, d : doublet, m : multiplet, l : large, ov : signal superposé, J en Hz, n.d. : non déterminé,  $\delta_{\text{C}}$  déterminés à partir des données de RMN 2D HSQC et HMBC

Les deux autres composés caractérisés dans cette fraction sont les isomères (**E**) et (**Z**) du **p-acide-4-O- $\beta$ -D-glucopyranoside coumarique** (Figure 87). Leurs structures ont pu être déterminées grâce aux informations obtenues par les analyses de spectrométrie de masse et par comparaison avec les données disponibles dans la littérature (Figure 88, Figure 89, Tableau 39) [259]. Aucun de ces isomères n'a été décrit dans le genre *Teucrium*. Ces composés correspondent au composé **F6A1** mis en évidence sur le profil HPLC-DAD. Leur structure ne différant que par l'arrangement de la double liaison, ils co-éluent lors des analyses par HPLC, ce qui explique le fait qu'un seul pic soit observé. Ces composés n'avaient pas été mis en évidence lors de l'étude déréplicative. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette absence, la principale étant le phénomène de « suppression des ions ». En effet, les ions obtenus lors de l'ionisation des composés peuvent être supprimés lorsqu'il y a co-élution de plusieurs composés (dans ce cas : co-élution de ces isomères avec l'acide chlorogénique) ; ce phénomène démontre une nouvelle fois les limites d'une telle étude de déréplication.



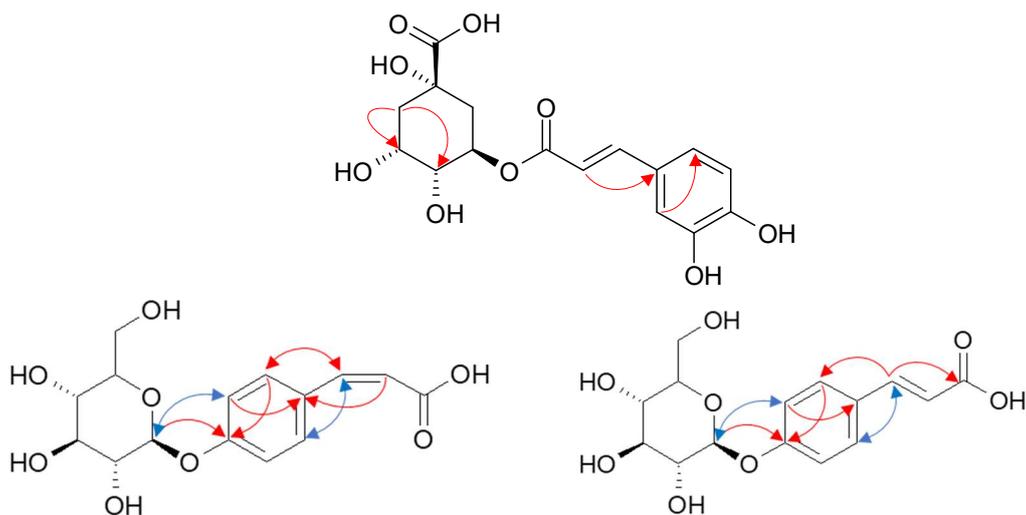
**Figure 87** : Structures des isomères (Z) et (E) du *p*-acide-4-O- $\beta$ -D-glucopyranoside coumarique

L'intégration des signaux par rapport au proton H-5 de l'acide chlorogénique, a permis d'estimer les teneurs relatives de ces 3 composés dans ce mélange : l'acide chlorogénique représente environ 50 % du mélange, le (Z)-*p*-acide-4-O- $\beta$ -D-glucopyranoside coumarique représente environ 33 %, et son isomère (E), environ 17 %. D'autres composés également présents en plus faible proportion (< 5 %), n'ont pu être identifiés d'un point de vue structural.

**Tableau 39** : Données de RMN  $^1\text{H}$  (600MHz) et  $^{13}\text{C}$  (150MHz) des isomères (Z) et (E) du *p*-acide-4-O- $\beta$ -D-glucopyranoside coumarique identifiés dans la sous-fraction TL\_ha\_F6A dans la D<sub>2</sub>O+TMSP à 300 K

Atome	(Z)- <i>p</i> -acide-4-O- $\beta$ -D-glucopyranoside coumarique		(E)- <i>p</i> -acide-4-O- $\beta$ -D-glucopyranoside coumarique	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	-	134,0	-	132,6
2	7,45 ; d (8,8) ; 1H	132,2	7,62 ; d (8,8) ; 1H	132,2
3	7,10 ; d (8,8) ; 1H	119,1	7,16 ; d (8,8) ; 1H	119,4
4	-	159,7	-	160,4
5	7,10 ; d (8,8) ; 1H	119,1	7,16 ; d (8,8) ; 1H	119,4
6	7,45 ; d (8,8) ; 1H	132,6	7,62 ; d (8,8) ; 1H	132,2
7	6,50 ; d (12,6) ; 1H	132,8	7,36 ; d (16,0) ; 1H	n.d.
8	6,02 ; d (12,6) ; 1H	128,7	6,44 ; d (16,0) ; 1H	n.d.
9	-	n.d.	-	178,9
1'	5,16 ; d (7,7) ; 1H	102,9	5,19 ; d (7,6) ; 1H	102,9
2'	3,59 ; ov ; 1H	75,8	3,59 ; ov ; 1H	75,8
3'	3,65 ; ov ; 1H	78,9	3,65 ; ov ; 1H	78,9
4'	3,52 ; ov ; 1H	72,4	3,52 ; ov ; 1H	72,4
5'	3,62 ; ov ; 1H	78,4	3,62 ; ov ; 1H	78,4
6'a	3,96 ; ov ; 1H	63,5	3,96 ; ov ; 1H	63,5
6 b	3,77 ; ov ; 1H		3,77 ; ov ; 1H	

$\delta$  en ppm, d : doublet, ov : signal superposé, J en Hz, n.d. : non déterminé,  $\delta_{\text{C}}$  déterminés à partir des données de RMN 2D HSQC et HMBC



**Figure 88** : Principales taches de corrélation  $^3J$  HMBC (flèches rouges) et NOESY (flèches bleues) observées pour l'acide *trans*-chlorogénique (en haut) et les isomères (*Z*) et (*E*) du *p*-acide-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside coumarique (de gauche à droite)

Il a été montré précédemment que l'acide chlorogénique présentait des activités antioxydantes et anti-inflammatoires intéressantes, et contribue donc aux activités de cette fraction. D'après la littérature, les deux autres composés présentent un pouvoir inhibiteur de la production d'oxydes d'azote, bien que l'isomère (*Z*) soit le plus efficace des deux [260]. D'autres études mentionnent les activités antioxydantes [261] et antibactériennes du composé (*E*) [262]. Ils représentent donc eux aussi des composés intéressants pour une utilisation en cosmétique. Un isolement de ces composés en quantités plus importantes est en cours afin de pouvoir évaluer leurs activités biologiques.

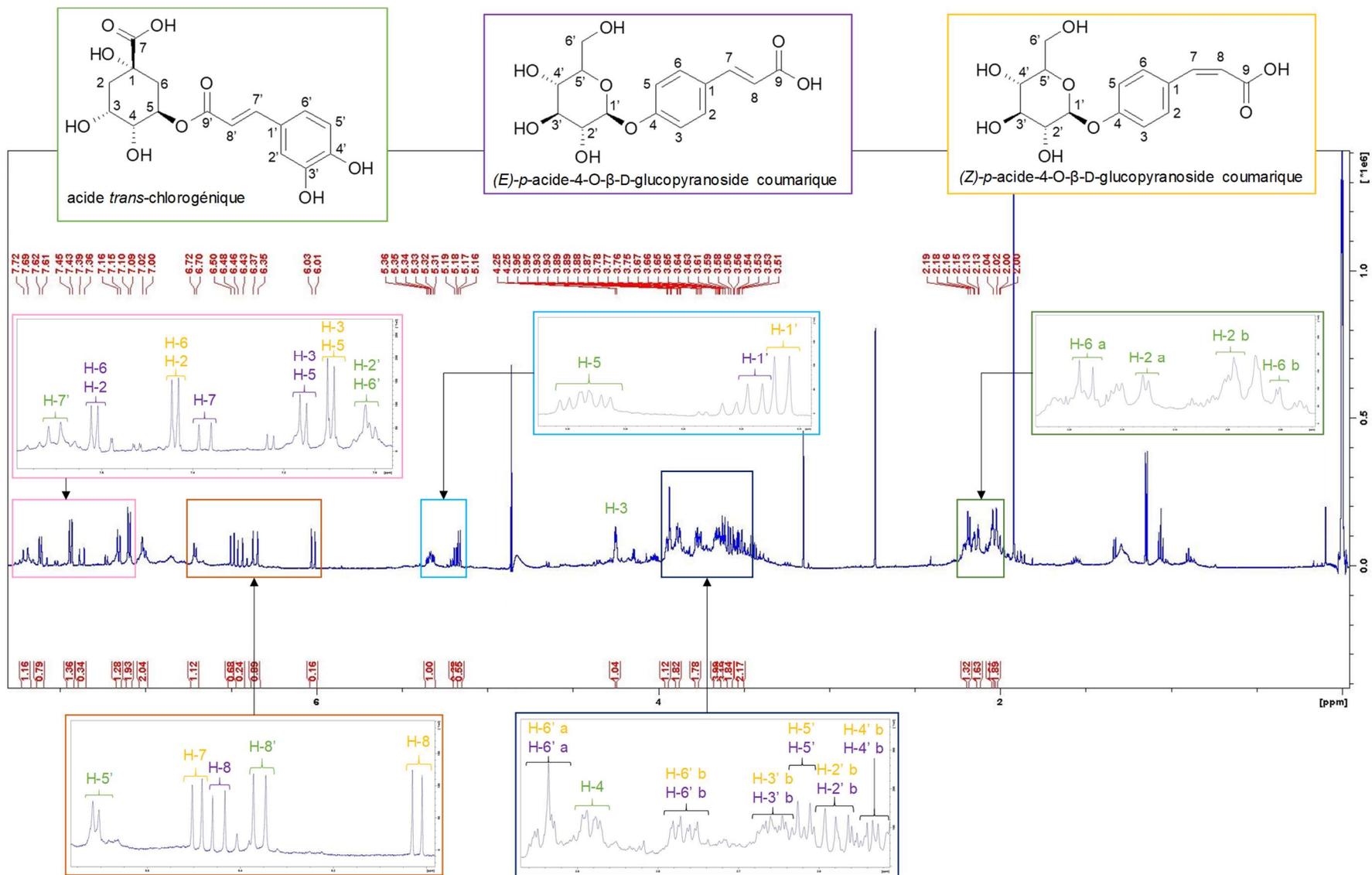
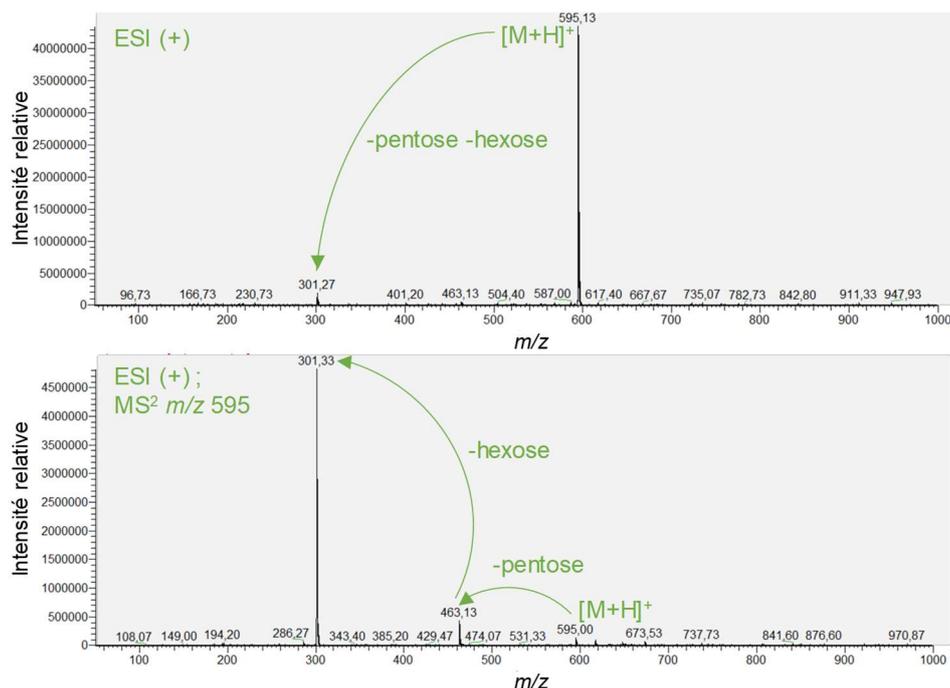


Figure 89 : Spectre de RMN  $^1\text{H}$  de la sous-fraction TL\_ha\_F6A contenant majoritairement 3 composés ( $\text{D}_2\text{O}$  + TMSP ; 600 MHz)

## Caractérisation de la sous-fraction TL\_ha\_F6G

La sous-fraction TL\_ha\_F6G contient majoritairement le composé **F6G** souhaité. Les analyses par HPLC-MS de cette sous-fraction ont permis de déterminer la masse du composé F6G comme étant de **594 g/mol** (Figure 90). D'après sa fragmentation MS/MS, cette molécule semble comporter deux groupements glycosylés, un de type pentose ( $m/z$  463), et un de type glucose ( $m/z$  301), tous deux greffés sur un aglycone de masse molaire 300 g/mol. Par analogie avec les données HRMS, la formule brute  $C_{27}H_{30}O_{15}$  proposée pour le composé F6\_MS5 pourrait correspondre. Il pourrait s'agir du kampférol-3-O-méthyl éther.



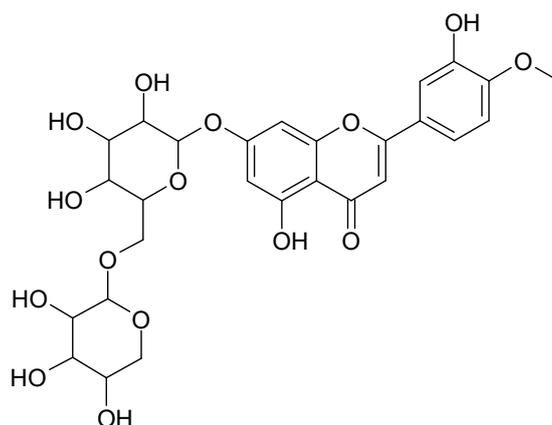
**Figure 90** : Spectres HPLC-POS-ESI-MS et MS/MS de l'ion de  $m/z$  595 correspondant au composé F6G

Différents solvants deutérés ont été testés pour dissoudre ce composé en vue de son analyse par RMN : seul le DMSO- $d_6$  s'est révélé efficace. Une pré-saturation du signal de l'eau a été réalisée pour l'analyse de RMN  $^1H$  afin d'affiner le signal de l'eau et améliorer la sensibilité de l'analyse (meilleur rapport signal/bruit). Cependant, cette pré-saturation entraîne la disparition de signaux observés aux mêmes déplacements chimiques que le signal de l'eau (entre 3 et 4 ppm). Les analyses de RMN 2D COSY et HSQC ont permis de compléter cette étude et ont révélé certains des signaux dissimulés lors de cette pré-saturation. Ces conditions d'analyse ont par la suite été utilisées pour l'analyse des autres sous-fractions isolées à partir de la fraction TL\_ha\_F6.

L'hypothèse proposée lors de l'étude de dérégulation concernant l'identification du composé F6G comme correspondant au kampférol-3-O-méthyl éther, a une fois de plus été réfutée par comparaison des données de RMN  $^1H$  du composé F6G avec les données de la littérature puisque les déplacements chimiques des protons caractéristiques ne sont pas observés (Tableau 40, Figure 92). Les données spectrales de RMN du composé F6G ont par la suite été comparées à celles disponibles dans la littérature pour différents isomères du kampférol-

3-O-méthyl éther : ainsi, le composé F6G a été identifié comme correspondant à la diosmetin-7-O- $\beta$ -D-xylosyl-(1''' $\rightarrow$ 6'')- $\beta$ -D-glucopyranoside [263, 264]. Les déplacements chimiques de ce composé correspondent à ceux décrits dans la littérature, hormis ceux des protons H-3 et H-8 qui sont inversés pour le composé F6G. D'après la littérature, ce composé n'a pas encore été décrit dans le genre *Teucrium* et n'a fait l'objet d'aucune étude portant sur la mise en évidence de ses potentielles activités biologiques. Ce composé correspond au composé 7 de l'extrait brut.

Un isolement en quantité plus importante est en cours afin de réaliser des analyses de RMN  $^{13}\text{C}$  et 2D, et ainsi de compléter la caractérisation de ce composé. Il permettra également d'évaluer ses activités biologiques afin de déterminer ses potentielles applications cosmétiques.



**Figure 91** : Structure de la diosmetin-7-O- $\beta$ -D-xylosyl-(1''' $\rightarrow$ 6'')- $\beta$ -D-glucopyranoside

**Tableau 40** : Données de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé F6G obtenues par analyses de la sous-fraction TL\_ha\_F6G dans le DMSO- $d_6$  à 298 K

Atome	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
2	-	164,07
3	6,79 ; s ; 1H	104,22
4	-	n.d.
5	-	161,7
6	6,48 ; d (2,3) ; 1H	100,23
7	-	164,7
8	6,80 ; d (2,0) ; 1H	95,18
9	-	n.d.
1'	-	123,4
2'	7,46 ; d (2,3) ; 1H	113,8
3'	-	147,4.
4'	-	151,7
5'	7,14 ; d (8,5) ; 1H	112,89
6'	7,57 ; dd (8,6 ; 2,3) ; 1H	119,5
O-Me	3,86 ; s ; 3H	56,60
1'''	5,05 ; d (7,7) ; 1H	100,47
6''a	3,64 ; m ; 1H	68,81
6''b	3,95 ; m ; 1H	
1'''	4,18 ; d (7,3) ; 1H	104,64
5'''a	3,01 ; m ; 1H	66,23
5'''b	3,71 ; m ; 1H	

$\delta$  en ppm, s : singulet, d : doublet, m : multiplet, J en Hz, n.d. : non déterminé,  $\delta_{\text{C}}$  déterminés à partir des données de RMN 2D HSQC et HMBC

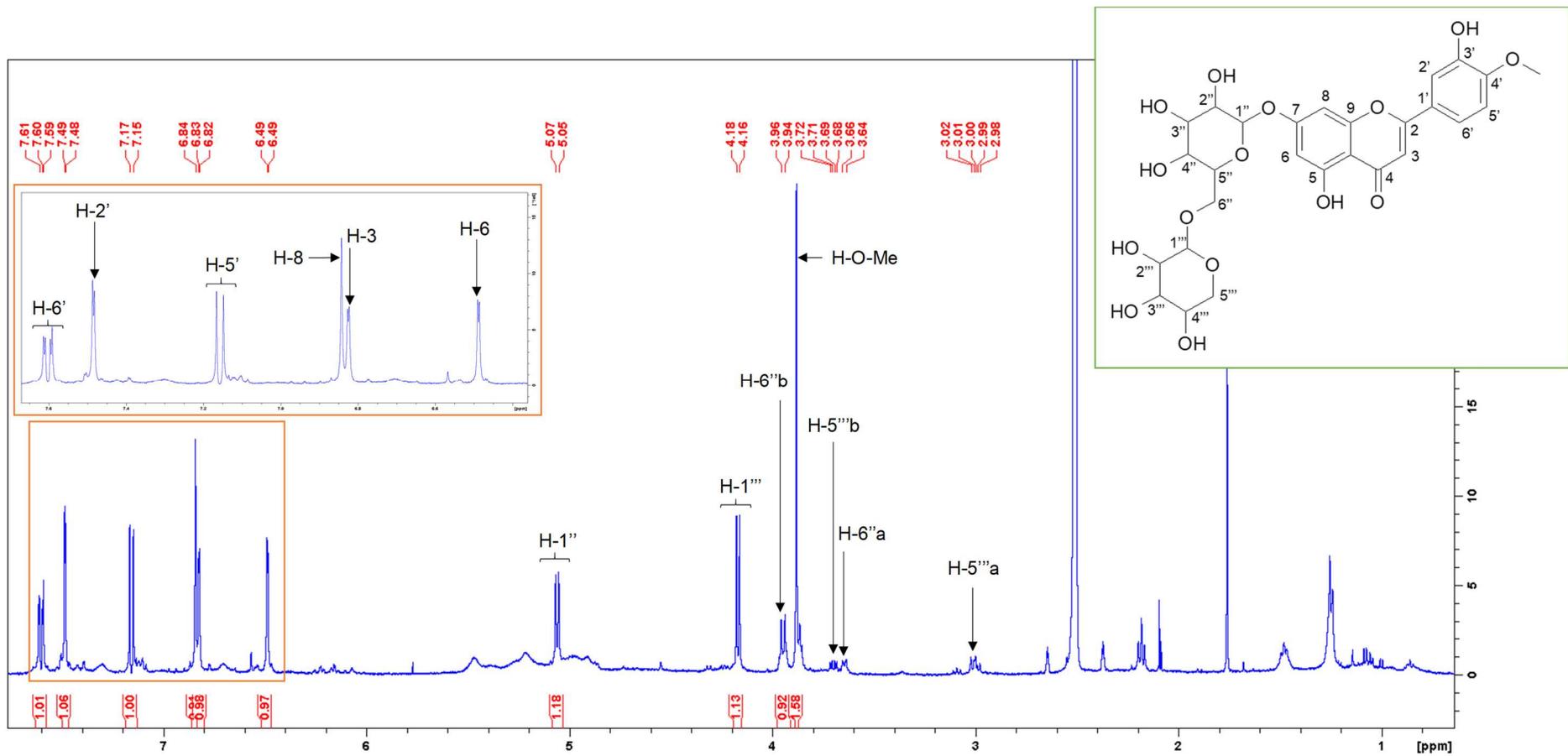


Figure 92 : Spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé F6G ( $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$  ; 500 MHz ; avec pré-saturation du signal de l'eau)

### Caractérisation des sous-fractions TL\_ha\_F6B et TL\_ha\_F6C

La sous-fraction TL\_ha\_F6B est majoritairement constituée du composé F6B, et la sous-fraction TL\_ha\_F6C, du composé F6C (Figure 93). Bien que de nombreuses optimisations de gradient aient été réalisées pour améliorer la séparation de ces composés, elles ont été collectées à des temps de rétention très proches, ce qui explique la présence du composé F6C dans la fraction TL\_ha\_F6B. D'après leurs spectres UV, ces deux composés appartiennent à la famille des flavones (Figure 94).

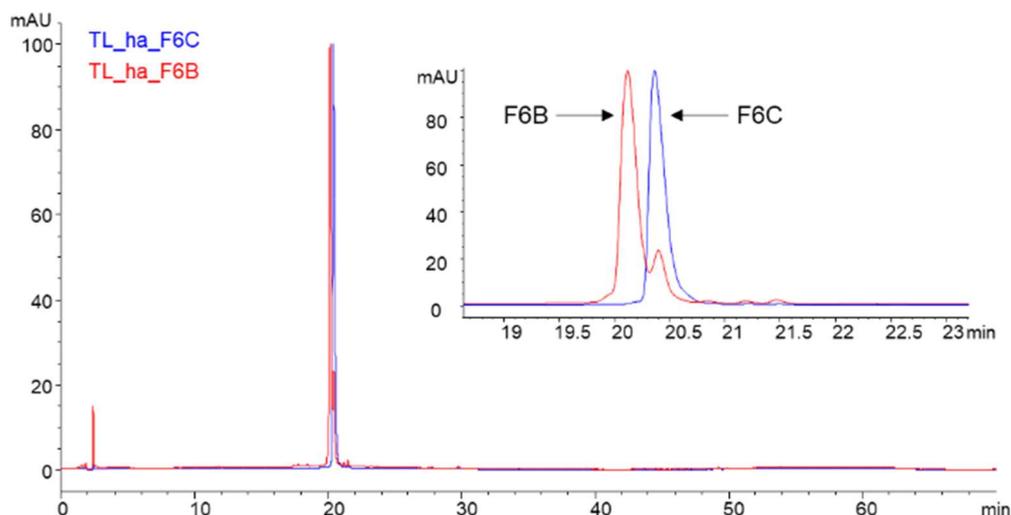


Figure 93 : Chromatogrammes HPLC-DAD à 280 nm des sous-fractions TL\_ha\_F6B et TL\_ha\_F6C

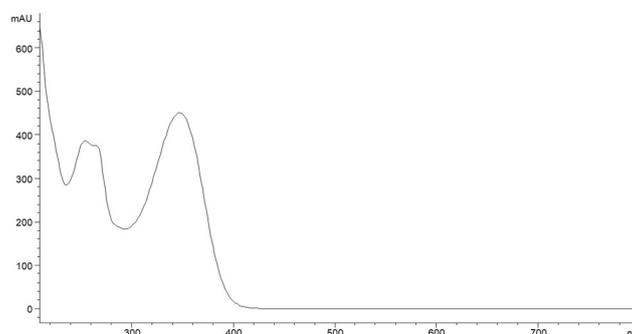
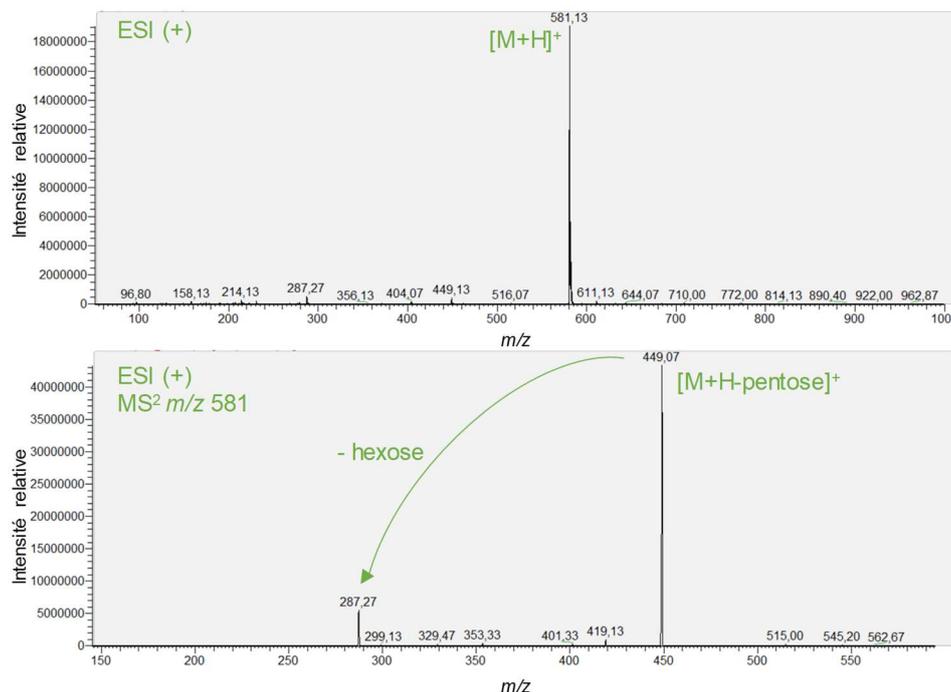


Figure 94 : Spectre UV du composé F6C (similaire à celui de F6B)

Grâce aux analyses de ces deux sous-fractions par HPLC-ESI-MS et MS/MS, des informations sur la structure de ces composés ont pu être obtenues. Les composés F6B et F6C sont des isomères puisqu'ils présentent le même spectre de masse : ils sont caractérisés par la présence d'un ion pseudo-moléculaire de  $m/z$  581  $[M+H]^+$ . Ce dernier donne lieu, par fragmentation, à deux ions de  $m/z$  449 et 287, correspondant respectivement à la perte d'un groupement pentose et d'un groupement hexose, tous deux greffés sur un aglycone de masse molaire égale à 286 g/mol (Figure 95).

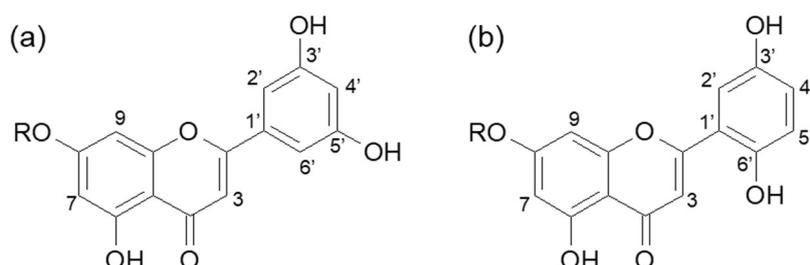
Par comparaison de ces données avec celles obtenues lors de l'étude de déréplication, ce mélange d'isomères F6B et F6C pourrait correspondre au composé **F6\_MS4** ( $C_{26}H_{28}O_{15}$ ) pour lequel 2 structures avaient été proposées préférentiellement : le kaempférol 7-arabinofuranoside-3-glucoside et la lutéoline 3'-xyloside-7-glucoside (Figure 228). D'après le

spectre UV représenté sur la Figure 94, l'hypothèse de la lutéoline 3'-xyloside-7-glucoside est la plus probable.



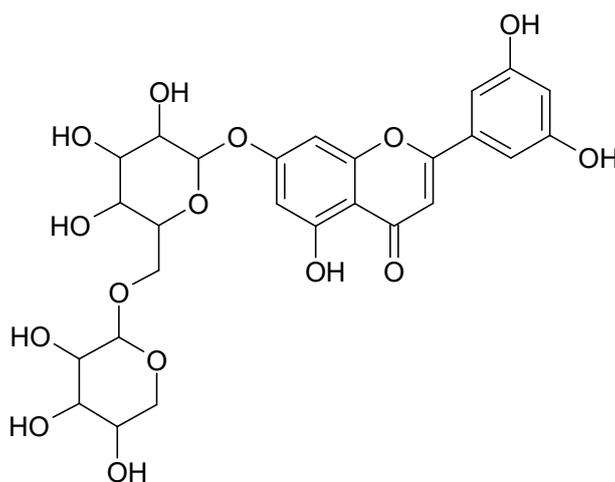
**Figure 95** : Spectres HPLC-POS-ESI-MS et MS/MS de l'ion de  $m/z$  581 correspondant au composé F6C (comparables à ceux du composé F6B)

Ces deux sous-fractions ont été analysées par RMN. Les données spectrales obtenues pour la sous-fraction TL\_ha\_F6C présentant une meilleure résolution, elles ont été étudiées en priorité (Tableau 41, Figure 98). La comparaison des données ainsi obtenues avec celles de la lutéoline disponibles dans la littérature, a permis de réfuter l'hypothèse émise lors de l'étude dérégulative. En revanche, de nombreuses similarités ont été observées entre les composés F6C et F6G, notamment en ce qui concerne les déplacements chimiques des carbones C3, C7 et C9 de l'aglycone (et de leurs protons associés). Ainsi, le motif structural de l'aglycone du composé F6C est proche de celui du composé F6G, avec comme principale différence le positionnement des deux groupements hydroxyles présents sur le cycle aromatique. Des deux positions envisagées (Figure 96), la proposition (a) semble la plus probable en raison de la multiplicité des signaux des protons H-2', H-4' et H-6', et des corrélations observées par les analyses de RMN 2D COSY. Cependant, ces données expérimentales et le peu d'informations disponibles dans la littérature, ne sont pas suffisants pour identifier de manière définitive ce composé.



**Figure 96** : Hypothèses de structure pour l'aglycone du composé F6C (R = substituants)

Les déplacements chimiques des groupements glycosylés de cette molécule sont également comparables à ceux de la molécule F6G ; les déplacements chimiques des carbones 1'', 6'', 1''' et 5''' et de leurs protons sont les plus discriminants (Figure 98, Tableau 41). Les composés F6C et F6G étant tous les deux caractérisés par la présence de deux groupements glycosylés (l'un de type pentose et l'autre de type glucose), la structure représentée sur la Figure 97 a été proposée comme correspondant au composé F6C. Selon les règles de nomenclature, il pourrait s'agir de la 5,2',4'-trihydroxyflavone-7-O-β-D-xylosyl-(1'''→6'')-β-D-glucopyranoside. Ce composé, non décrit dans la littérature, correspond au composé 3 mis en évidence dans l'extrait brut. Des analyses de RMN <sup>13</sup>C et 2D sont nécessaires afin de confirmer cette structure.



**Figure 97** : Structure proposée pour le composé F6C

**Tableau 41** : Données de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) du composé F6C obtenues par analyses de la sous-fraction TL\_ha\_F6C dans le DMSO-d<sub>6</sub> à 298 K

Atome	δ <sub>H</sub>	δ <sub>C</sub>
2	-	n.d.
3	6,71 ; s ; 1H	103,3
4	-	n.d.
5	-	n.d.
6	-	n.d.
7	6,47 ; s ; 1H	99,8
8	-	n.d.
9	6,77 ; s ; 1H	95,1
10	-	n.d.
1'	-	n.d.
2'	7,40 ou 7,43 ; s ; 1H	119,5 ou 119,8
3'	-	n.d.
4'	6,87 ; m ; 1H	116,4
5'	-	n.d.
6'	7,40 ou 7,43 ; s ; 1H	119,5 ou 119,8
1''	5,05 ; d (6,7) ; 1H	100,4
6'' a	3,63 ; m ; 1H	68,8
6'' b	3,95 ; m ; 1H	
1'''	4,16 ; d (7,6) ; 1H	104,64
5''' a	3,01 ; m ; 1H	66,3
5''' b	3,70 ; m ; 1H	

δ en ppm, s : singulet, d : doublet, m : multiplet, J en Hz, n.d. : non déterminé, δ<sub>C</sub> déterminés à partir des données de RMN 2D HSQC

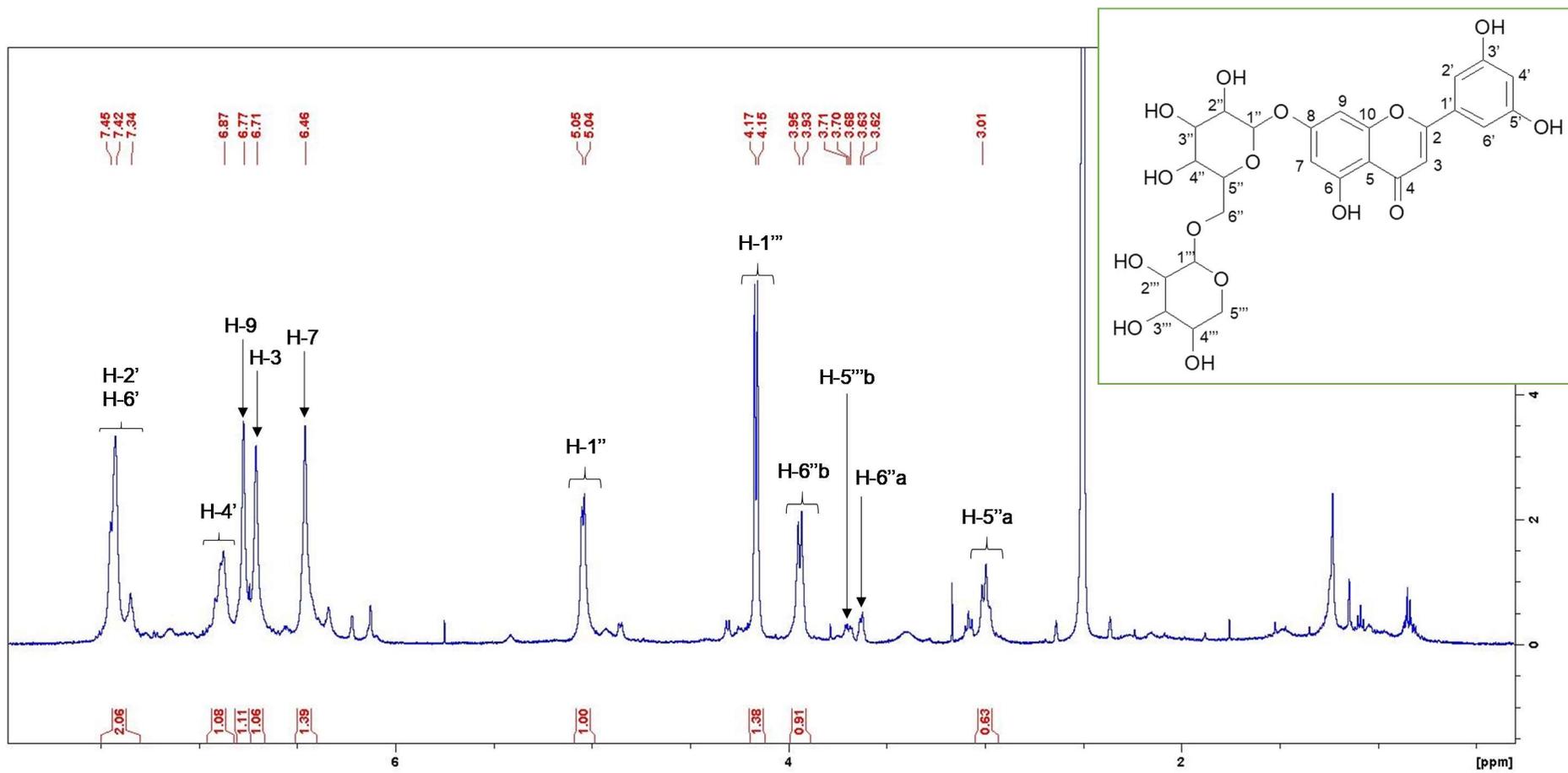


Figure 98 : Spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé F6C ( $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$  ; 500 MHz ; avec pré-saturation du signal de l'eau)

Les données de RMN de la sous-fraction TL\_ha\_F6B sont en cours d'étude afin d'identifier le composé F6B. Les premières données mettent en évidence des signaux comparables de l'aglycone F6B avec celui du composé F6C (Tableau 42). Les données de RMN obtenues pour ce composé ne sont pas suffisantes pour en déterminer la configuration. Un isolement en quantité plus importante est nécessaire afin de compléter cette caractérisation.

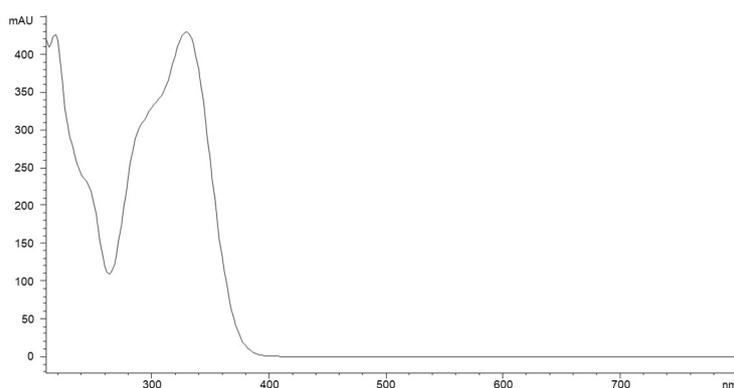
**Tableau 42** : Données de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé F6B obtenues par analyses de la sous-fraction TL\_ha\_F6B dans le DMSO- $d_6$  à 298 K

Atome	F6B		F6C	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
2	-	n.d.	-	n.d.
3	6,68 ; s ; 1H	105,9	6,71	103,3
4	-	n.d.	-	n.d.
5	-	n.d.	-	n.d.
6	-	n.d.	-	n.d.
7	6,43 ; s ; 1H	99,3	6,47	99,8
8	-	n.d.	-	n.d.
9	6,76 ; s ; 1H	94,5	6,77	95,1
10	-	n.d.	-	n.d.
1'	-	n.d.	-	n.d.
2'	7,41 ou 7,42 ; s ; 1H	118,6 ou 112,7	7,40 ou 7,43	119,5 ou 119,8
3'	-	n.d.	-	n.d.
4'	6,83 ; m ; 1H	114,7	6,87	116,4
5'	-	n.d.	-	n.d.
6'	7,41 ou 7,42 ; s ; 1H	118,6 ou 112,7	7,40 ou 7,43	119,5 ou 119,8

$\delta$  en ppm, s : singulet, m : multiplet, J en Hz, n.d. : non déterminé,  $\delta_{\text{C}}$  déterminés à partir des données de RMN 2D HSQC

### Caractérisation de la sous-fraction TL\_ha\_F6E

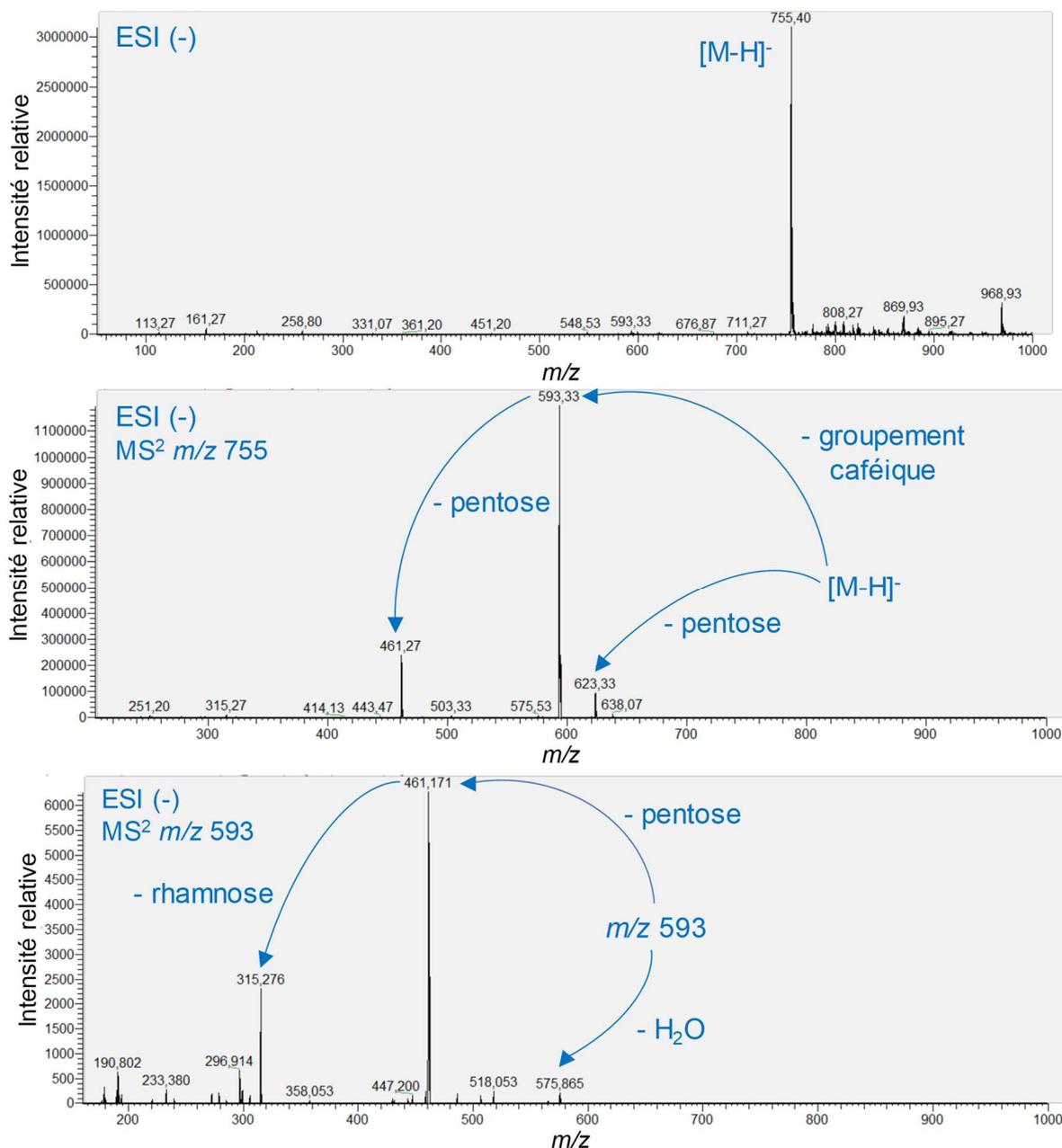
La sous-fraction TL\_ha\_F6E est composée majoritairement du composé F6E, dont le spectre UV correspond à un flavonol. Le composé F6F est également présent en quantité très faible dans cette fraction ; il présente le même spectre UV (Figure 99).



**Figure 99** : Spectre UV du composé F6E

Les analyses par HPLC-ESI-MS indiquent que les composés F6E et F6F présentent le même spectre de masse, ce sont donc des isomères. Ils sont caractérisés par un ion pseudo-moléculaire de  $m/z$  755  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (Figure 100). La fragmentation de cet ion est caractérisée par la présence d'ions de  $m/z$  593, 461 et 315 pouvant correspondre à la perte respective d'un

groupement caféique, d'un groupement pentose et d'un groupement rhamnose, tous greffés sur un aglycone de masse moléculaire 316 g/mol. Grâce aux données de HRMS obtenues pour la fraction TL\_ha\_F6, la formule brute  $C_{34}H_{44}O_{19}$  a été proposée pour ce composé, caractérisé par l'ion pseudo-moléculaire de  $m/z$  755,2328  $[M-H]^-$  et son fragment de  $m/z$  593,1564  $[M-H-\text{groupement caféique}]^-$ .



**Figure 100** : Spectres HPLC-NEG-ESI-MS et MS/MS de l'ion de  $m/z$  755 correspondant au composé F6E et spectre MS/MS de l'ion fragment de  $m/z$  593

Cette sous-fraction a été analysée par RMN dans les mêmes conditions que les sous-fractions précédentes. Les données spectrales obtenues pour le composé sont présentées dans le Tableau 43 et sur la Figure 102.

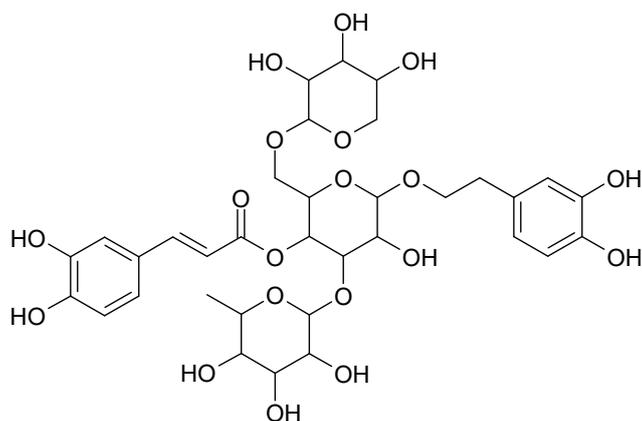
**Tableau 43** : Données de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) du composé F6E obtenues par analyses de la sous-fraction TL\_ha\_F6E dans le DMSO-d<sub>6</sub> à 298 K

Atome	$\delta_H$	$\delta_C$
1	-	n.d.
2	6,63 ; d (2,0) ; 1H	115,6
3	-	n.d.
4	-	n.d.
5	6,60 ; d (7,9) ; 1H	115,6
6	6,48 ; dd (8,0 ; 1,9) ; 1H	118,6
$\alpha_1$	3,58 ; m ; 1H	70,8
$\alpha_2$	3,88 ; m ; 1H	
$\beta$	2,68 ; m ; 2H	36,1
1'	4,36 ; d (7,8) ; 1H	102,4
2'	3,21 ; m ; 1H	74,3
3'	3,66 ; t (9,2) ; 1H	80,2
4'	4,71 ; t (9,7) ; 1H	68,6
5'	3,46 ; m ; 1H	73,6
6'	n.d.	n.d.
1''	-	n.d.
2''	7,02 ; d (1,8) ; 1H	115,4
3''	-	n.d.
4''	-	n.d.
5''	6,75 ; d (8,4) ; 1H	115,8
6''	6,98 ; dd (8,7 ; 1,3) ; 1H	121,1
$\alpha'$	6,20 ; d (16,4) ; 1H	112,2
$\beta'$	7,46 ; d (16,4) ; 1H	146,3
1'''	5,25 ; d (1,4) ; 1H	98,1
2'''	3,77 ; m ; 1H	80,4
3'''	n.d.	n.d.
4'''	n.d.	n.d.
5'''	3,35 ; m ; 1H	71,4
6'''	0,95 ; d (6,2) ; 3H	18,6
1''''	4,22 ; d (6,8) ; 1H	106,1
2''''	3,36 ; m ; 1H	71,2
3''''	n.d.	n.d.
4''''	n.d.	n.d.
5'''' a	3,37 ; m ; 1H	63,2
5'''' b	3,64 ; m ; 1H	

$\delta$  en ppm, s : singulet, d : doublet, t : triplet, m : multiplet, J en Hz, n.d. : non déterminé,  $\delta_C$  déterminés à partir des données de RMN 2D HSQC et HMBC

Afin d'identifier ce composé, ses données de RMN ont été comparées avec celles disponibles dans la littérature pour les composés présentant la structure déterminée lors des analyses par LC-MS : plusieurs isomères se différenciant soit par la position des groupements glycosylés, soit par la configuration du groupement de type pentose pouvaient correspondre. Le composé F6E a finalement été identifié comme correspondant à l'angoroside A (Figure 101) [265] car celui-ci présente des déplacements chimiques comparables à ceux du composé F6E, bien que les données fournies aient été obtenues dans un autre solvant (méthanol-d<sub>4</sub>). Une tendance générale est observée : les signaux des carbones du composé F6E sont moins déblindés que ceux de l'angoroside A. Ces différences peuvent s'expliquer par la différence de solvants utilisés ou par les incertitudes dues aux attributions des spectres de RMN 2D (COSY, HSQC et HMBC).

L'angoroside A n'a pas été décrit dans le genre *Teucrium*. Il a fait l'objet de différentes études concernant ses activités anti-inflammatoires : il présente un pouvoir d'inhibition notable des lipopolysaccharides, ainsi qu'une action significative sur la libération du thromboxane B2 [266]. Sa cytotoxicité a également été évaluée, et serait plus significative que celle des angorosides B et C, en raison de sa structure [266]. Il correspond au composé 5 mis en évidence dans l'extrait brut.



**Figure 101** : Structure de l'angoroside A

Un isolement en quantité plus importante est nécessaire afin de réaliser des analyses de RMN  $^{13}\text{C}$ , et ainsi compléter la caractérisation de ce composé. Les activités biologiques de ce composé pourront également être évaluées afin de déterminer sa contribution aux activités présentées par l'extrait brut.

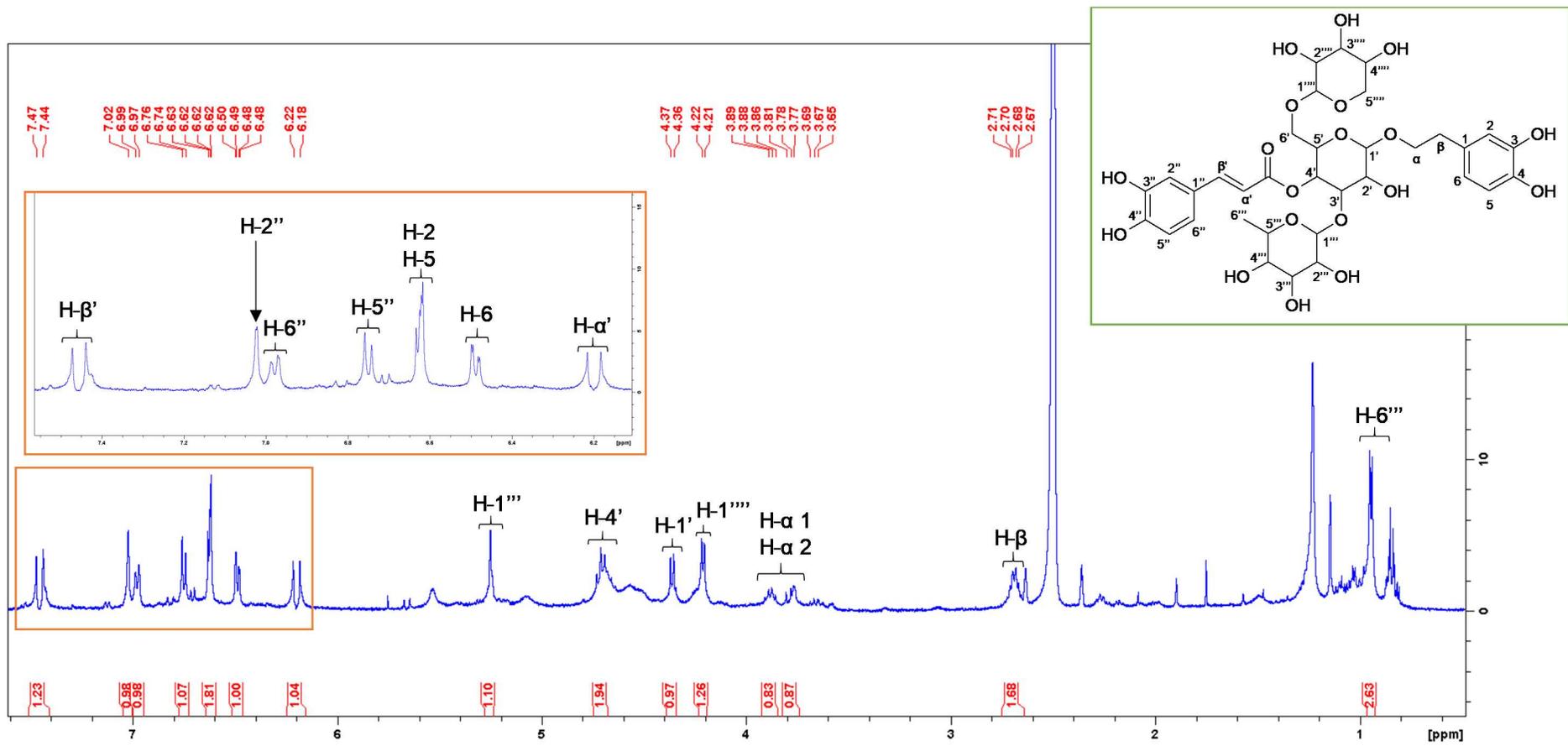


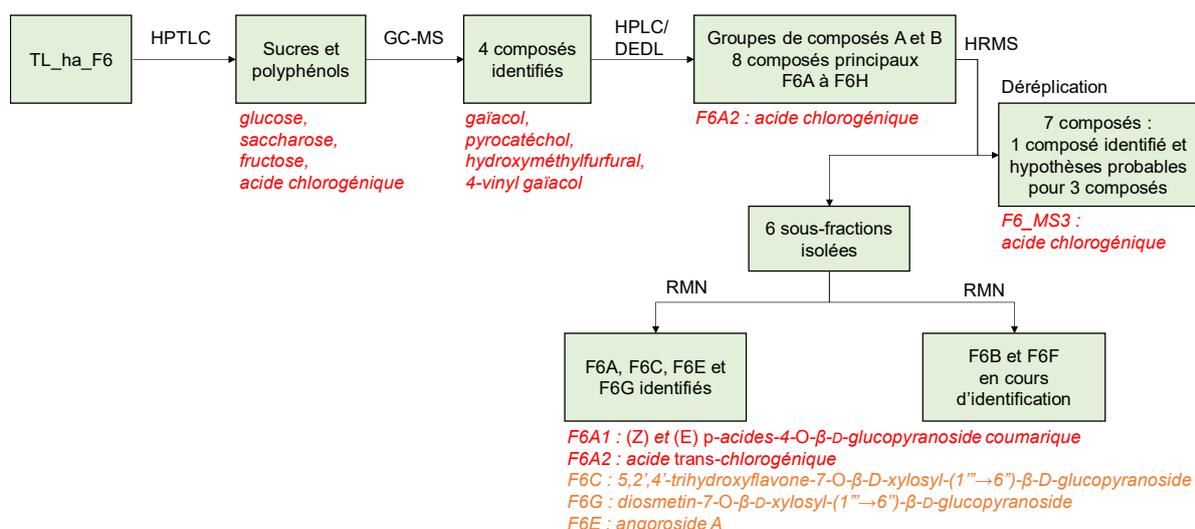
Figure 102 : Spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé F6E ( $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$  ; 500 MHz ; avec pré-saturation du signal de l'eau)

L'isolement des composés majoritaires de la fraction TL\_ha\_F6 a permis de déterminer la configuration *trans* de l'acide chlorogénique. Deux autres composés majoritaires ont également été caractérisés dans cette sous-fraction : les 2 isomères (*Z*) et (*E*) du *p*-acide-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside coumarique, non décrits jusqu'à présent dans le genre *Teucrium* et dont les activités biologiques ont été très peu étudiées. Le composé F6G a été identifié comme correspondant à la diosmetin-7-*O*- $\beta$ -D-xylosyl-(1"<sup>'''</sup>→6"<sup>'''</sup>)- $\beta$ -D-glucopyranoside, le composé F6C comme correspondant à la 5,2',4'-trihydroxyflavone-7-*O*- $\beta$ -D-xylosyl-(1"<sup>'''</sup>→6"<sup>'''</sup>)- $\beta$ -D-glucopyranoside, et le composé F6E comme correspondant à l'angoroside A. Des analyses supplémentaires sont nécessaires afin de compléter leurs caractérisations, et évaluer leurs activités biologiques. Ces trois composés correspondent à 3 composés principaux mis en évidence dans l'extrait brut (composés 7, 5 et 3, respectivement).

Le composé F6B, correspondant au composé 2 de l'extrait brut, est en cours de caractérisation. Le composé F6F est un isomère du composé F6E ; il correspond au composé 6 de l'extrait TL\_ha. Un isolement en quantité plus importante est nécessaire afin de les identifier.

**La fraction TL\_ha\_F6 présente de nombreuses similarités avec l'extrait brut TL\_ha : elle est caractérisée par la présence des deux groupes de composés A et B (Figure 103). Huit composés principaux ont été mis en évidence, parmi lesquels 6 correspondent aux composés principaux de l'extrait brut. L'isolement de ces composés a permis d'en identifier 4 par caractérisation structurale : F6A, F6C, F6G et F6E, qui correspondent respectivement aux composés 1, 3, 5 et 7 de l'extrait brut. Quatre composés volatils ont également été identifiés, parmi lesquels 3 avaient préalablement été identifiés dans l'extrait brut.**

**L'étude de déréplication ne s'est pas révélée efficace : elle a seulement permis d'identifier l'acide chlorogénique (F6A2) dans cette fraction. Les hypothèses de structure proposées pour les autres composés isolés ont été réfutées.**



**Figure 103 :** Informations obtenues suite à la caractérisation phytochimique de la fraction TL\_ha\_F6 (rouge : composé identifié, orange : identification à compléter avec des analyses de RMN complémentaires)

Afin de compléter cette étude de caractérisation de l'extrait brut de germandrée, les 4 autres fractions obtenues lors du fractionnement de l'extrait brut TL\_ha sur colonne ouverte, bien que moins intéressantes du point de vue de leurs activités biologiques, ont également été analysées par HPTLC, GC-MS, GC/FID et HPLC-DAD/DEDL. Une analyse par RMN a également été réalisée pour la fraction TL\_ha\_F1. Ces fractions n'ont pas été étudiées par dérégulation.

#### 3.2.2.4.4. Etude de la fraction TL\_ha\_F1

La fraction TL\_ha\_F1 a été obtenue avec un rendement très faible (< 1 %) à l'aide d'un mélange cyclohexane/éther diéthylique ; elle ne présente pas d'activité biologique.

La révélation avec le *p*-anisaldéhyde, suite à l'analyse de cette fraction par HPTLC, a permis de mettre en évidence la présence majoritaire d'un composé peu polaire, appartenant à la famille des triterpènes.

Les révélations successives au réactif de Neu et au PEG, ont permis de mettre en évidence la présence d'un composé de type acide phénolique et/ou coumarine, sous forme d'une bande de coloration bleue de faible intensité.

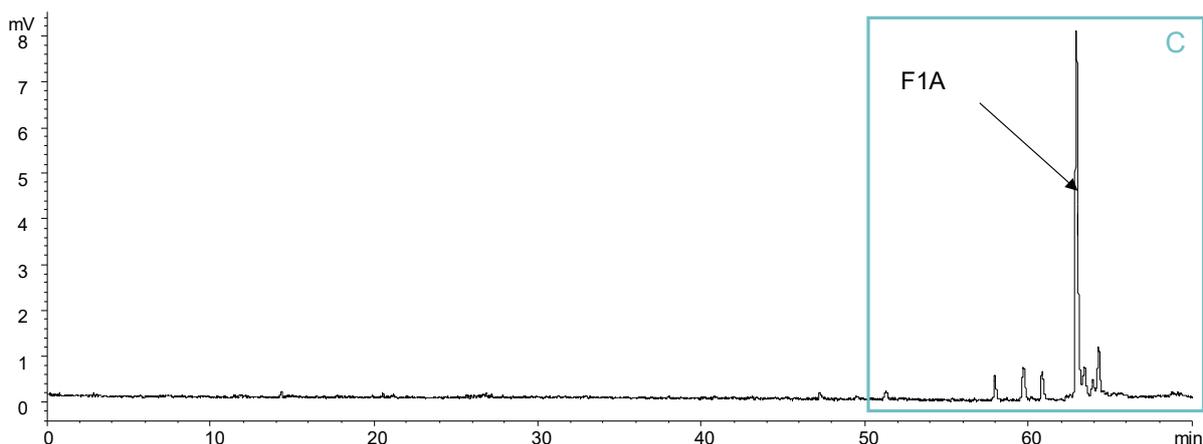
L'étude des composés volatils et semi-volatils de cette fraction par GC-MS a permis l'identification de 4 composés (Tableau 44) : le 9-oxonanoate d'éthyle, le 4,8,12,16-tétraméthylheptadécane-4-olide, l'octadécène et le palmitate de méthyle. Ces deux derniers ont déjà été décrits dans le genre *Teucrium* [212, 267]. Le palmitate de méthyle a par ailleurs déjà été identifié dans la fraction TL\_ha\_F3. Bien que présentant des activités intéressantes, le palmitate de méthyle et l'octadécène doivent être présents en quantités trop faibles dans cette fraction pour que celle-ci présente ces activités.

**Tableau 44** : Composés identifiés par GC-MS dans la fraction TL\_ha\_F1

Composés identifiés	RI calculé <sup>(1)</sup> / RI littérature	Références	Activités biologiques <sup>(3)</sup>
9-oxonanoate d'éthyle	1495/1502	Non décrit dans le genre <i>Teucrium</i>	Non évaluées
Octadécène	1790/1794 <sup>(2)</sup>	Décrit dans l'huile essentielle des parties aériennes de <i>T. flavum</i> subsp. <i>Flavum</i> [267]	Anti-élastase (65,29 ± 0,01 %)
Palmitate de méthyle	1923/1919 <sup>(2)</sup>	Décrit dans les huiles essentielles de <i>T. hyrcanicum</i> [212]	Anti-inflammatoire (30,73 ± 0,01 %)
4,8,12,16-tétraméthylhepta-décane-4-olide	2345/2364	Non décrit dans le genre <i>Teucrium</i>	Non évaluées

<sup>(1)</sup> RI = indice de rétention déterminé sur colonne HP-1 à l'aide d'une série d'alcane (C8-C24) et comparé aux RI disponibles dans la littérature – <sup>(2)</sup> Identification validée par comparaison de RI avec le RI d'un standard analysé dans les mêmes conditions – <sup>(3)</sup> évaluées selon les tests in vitro

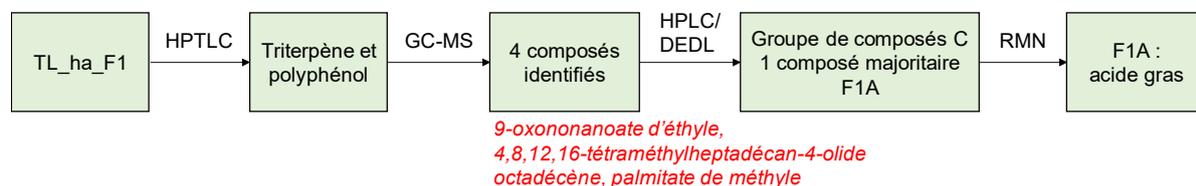
Le profil phytochimique de cette fraction obtenu par HPLC/DEDL est caractérisé par la présence des composés lipophiles du groupe C et notamment du composé majoritaire F1A (Figure 104). Par co-injection des standards analytiques de palmitate de méthyle et d'octadécène par HPLC, aucun de ces composés lipophiles ne correspond à ces standards ; il semble que ces composés soient présents en quantité trop faible pour être observée.



**Figure 104 :** Chromatogramme HPLC/DEDL de la fraction TL\_ha\_F1

D'après le spectre RMN  $^1\text{H}$  de la fraction TL\_ha\_F1, le composé majoritaire F1A serait un acide gras. Une étape de méthylation avant analyse par GC-MS pourrait être réalisée afin d'identifier ce composé. Cependant, la faible quantité de matière disponible pour cette fraction n'a pas permis de la réaliser pour le moment.

La fraction TL\_ha\_F1 est caractérisée par la présence de composés lipophiles du groupe C, parmi lesquels le composé majoritaire F1A correspond à un acide gras. Quatre composés volatils ont été identifiés par GC-MS, parmi lesquels se trouve le palmitate de méthyle, identifié précédemment dans la fraction TL\_ha\_F3 (Figure 105).



**Figure 105 :** Informations obtenues suite à la caractérisation phytochimique de la fraction TL\_ha\_F1 (rouge : composé identifié)

### 3.2.2.4.5. Etude de la fraction TL\_ha\_F2

La fraction TL\_ha\_F2 a également été obtenue avec un faible rendement (0,9 %) par élution à l'éther diéthylique. Elle présente des activités comparables à celles de la fraction TL\_ha\_F3, à savoir des activités anti-élastase et anti-inflammatoires fortes, non observées pour l'extrait brut (Figure 106).

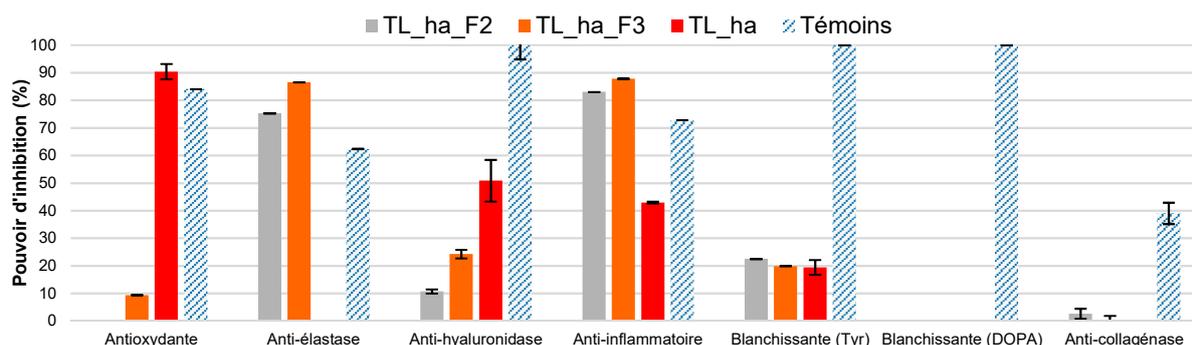


Figure 106 : Activités biologiques de la fraction TL\_ha\_F2

Cette fraction semble composée majoritairement de composés peu polaires révélés après analyse par HPTLC par le *p*-anisaldéhyde. Les acides bétulinique et oléanolique ont notamment été mis en évidence. Des dérivés de chlorophylle semblent également présents dans cette fraction. Les révélations au réactif de Neu et au PEG indiquent la présence de quelques polyphénols ; la coloration bleue des bandes semble indiquer la présence d'acides phénoliques et/ou de coumarines.

Les analyses par GC-MS de cette fraction ont permis l'identification de 6 composés volatils (Tableau 45). Comme pour la fraction TL\_ha\_F3, l'acide palmitique et le palmitate de méthyle ont été identifiés, et les concentrations ont été déterminées : elles sont respectivement de 2,9 % et 0,2 % dans cette fraction, contre 0,6 % et 9,4 % dans TL\_ha\_F3. L'acide laurique présent à 0,1 % a également été identifié ; ce composé a déjà été décrit dans une espèce de *Teucrium* [214]. Les 3 autres composés identifiés, à savoir le nonanal, l'acide myristique et le (*E*)-2-decenal, ont également été décrits dans le genre *Teucrium* ; leurs teneurs ont été estimées à moins de 0,1 % dans cette fraction [213, 214, 268].

Tableau 45 : Composés identifiés par GC-MS dans la fraction TL\_ha\_F2

Composés identifiés	RI calculé <sup>(1)</sup> / RI littérature	Teneur estimée <sup>(3)</sup>	Références	Activités biologiques <sup>(4)</sup>
Nonanal	1101/1102 <sup>(2)</sup>	0,05 %	Décrit parmi les composés volatils de <i>T. chamaedrys</i> [213]	Anti-élastase (52,08 ± 0,02 %)
( <i>E</i> )-2-décenal	1252/1255 <sup>(2)</sup>	0,06 %	Décrit dans les huiles essentielles de <i>T. flavum</i> subsp. <i>glaucum</i> et <i>T. flavum</i> subsp. <i>flavum</i> [268]	Anti-inflammatoire (100,00 ± 0,10 %)
Acide laurique	1571/1567 <sup>(2)</sup>	0,10 %	Décrit dans les huiles essentielles de différentes variétés de <i>T. orientale</i> [214]	Aucune
Acide myristique	1767/1770 <sup>(2)</sup>	0,04 %	Décrit dans les huiles essentielles de différentes variétés de <i>T. orientale</i> [214]	Aucune
Palmitate de méthyle	1923/1919 <sup>(2)</sup>	0,20 %	Décrit dans les huiles essentielles de <i>T. hyrcanicum</i> [212]	Anti-inflammatoire (30,73 ± 0,01 %)
Acide palmitique	1978/1970 <sup>(2)</sup>	2,90 %	Décrit parmi les composés volatils de <i>T. chamaedrys</i> [213], dans les huiles essentielles de différentes variétés de <i>T. orientale</i> [214]	Anti-hyaluronidase (52,00 ± 12,00 %)

<sup>(1)</sup> RI = indice de rétention déterminé sur colonne HP-1 à l'aide d'une série d'alcane (C8-C24) et comparé aux RI disponibles dans la littérature – <sup>(2)</sup> Identification validée par comparaison de RI avec le RI d'un standard analysé dans les mêmes conditions – <sup>(3)</sup> Teneur calculée par étalonnage externe à l'aide d'une gamme étalon d'acide palmitique – <sup>(4)</sup> évaluées selon les tests in vitro

Le profil HPLC/DEDL de cette fraction présente de nombreuses similarités avec celui de la fraction TL\_ha\_F3 (Figure 107). Par comparaison des temps de rétention, 6 des 8 composés principaux mis en évidence dans la fraction TL\_ha\_F3 sont observés, et notamment l'acide bétulinique (F3F), l'acide oléanolique (F3G), ainsi que l'acide palmitique (F3H). Les composés F3B et/ou F3C, difficilement distinguables l'un de l'autre en raison de leurs temps de rétention très proches, ainsi que les composés F3D et F3E, non identifiés dans la fraction TL\_ha\_F3 en raison de leur dégradation au cours du temps, sont également mis en évidence dans cette fraction. Enfin, deux composés plus lipophiles, F2A et F2B, ont également été mis en évidence dans cette fraction.

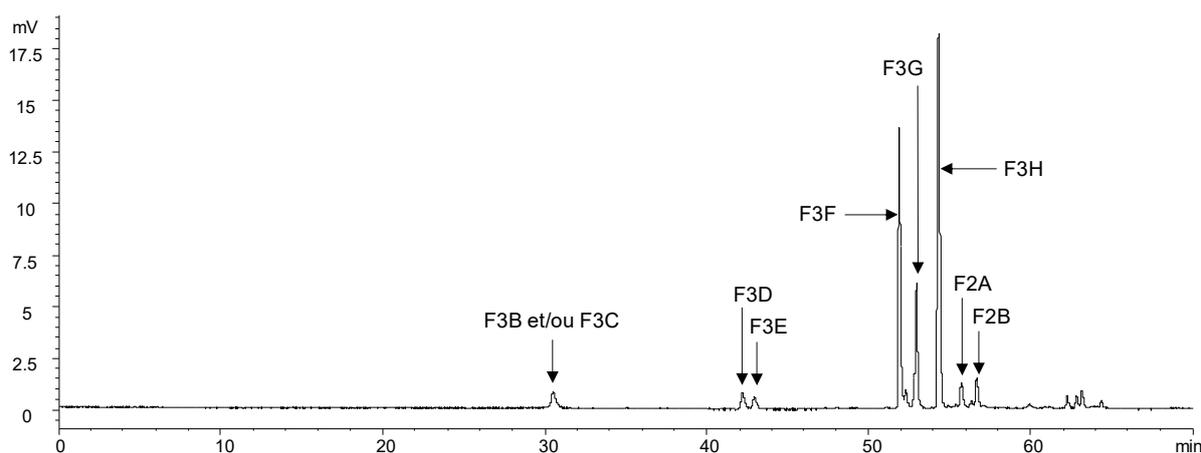
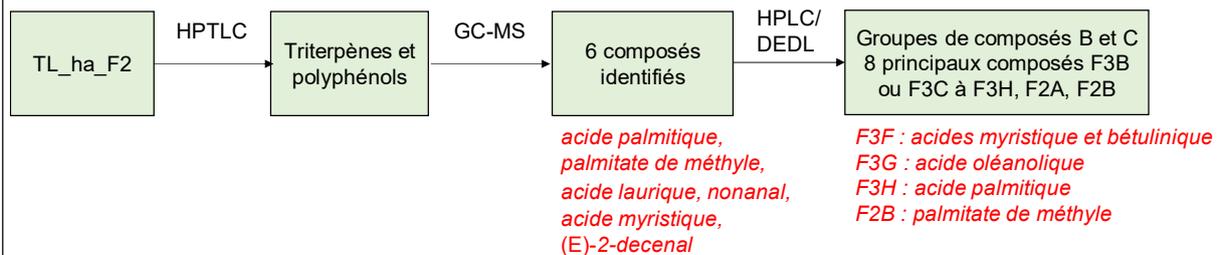


Figure 107 : Chromatogramme HPLC/DEDL de la fraction TL\_ha\_F2

Par co-injection de standards par HPLC-DAD/DEDL, le composé **F2B** a été identifié comme étant le **palmitate de méthyle** et le composé **F3F** comme correspondant à l'**acide myristique**. Or, lors des études précédentes, le composé F3F a été identifié comme correspondant à l'acide bétulinique. Ces composés ont probablement co-élué dans ces conditions d'analyse. En effet, la teneur en acide myristique étant évaluée à 0,04 % dans la fraction TL\_ha\_F2 par GC/FID, sa présence seule ne pourrait pas expliquer la forte intensité du composé F3F sur le profil HPLC/DEDL, en comparaison de l'acide palmitique par exemple qui est présent à 2,9 % (F3H). La teneur en acide bétulinique n'a pu être déterminée en raison de la co-élution avec l'acide myristique ; en revanche, la teneur en acide oléanolique a été estimée par dosage externe à 3,6 % dans cette fraction. Ces différents composés contribuent aux activités anti-élastase et anti-inflammatoires de cette fraction, comme cela avait déjà été mentionné lors de l'étude de la fraction TL\_ha\_F3.

Avant d'isoler les composés majoritaires de la fraction TL\_ha\_F3 et notamment de caractériser les composés F3B, F3D et F3E, il aurait été judicieux de rassembler d'emblée les deux fractions TL\_ha\_F2 et TL\_ha\_F3. Ceci aurait permis d'avoir des quantités plus importantes des principaux composés à isoler et éventuellement de faciliter leur caractérisation.

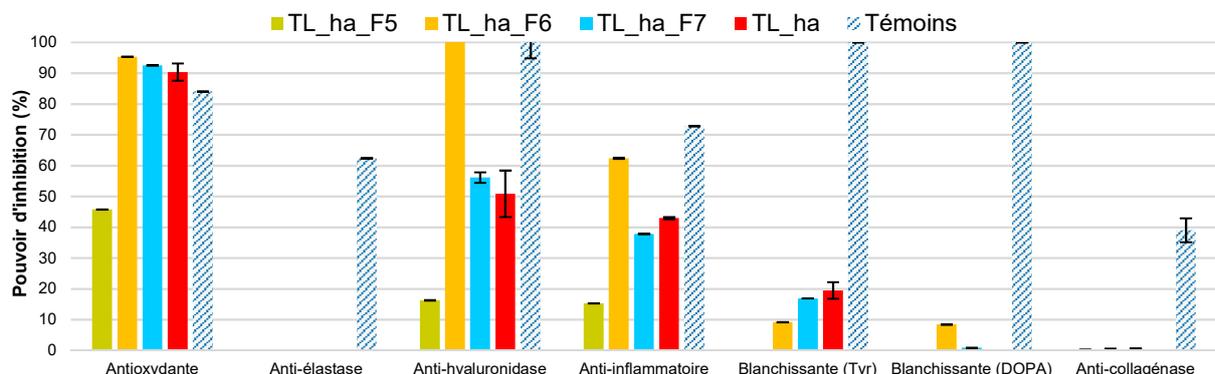
La fraction TL\_ha\_F2 présente une composition proche de celle de la fraction TL\_ha\_F3, ce qui explique leurs activités anti-inflammatoires et anti-élastase comparables. Parmi les 8 composés mis en évidence dans la fraction TL\_ha\_F3, 6 composés sont retrouvés dans la fraction TL\_ha\_F2, et deux autres composés plus lipophiles, F2A et F2B sont également présents (Figure 108). Les acides bétulinique (F3F), oléanolique (F3G) et palmitique (F3H) ont notamment été caractérisés dans cette fraction, et les analyses par GC-MS ont permis d'identifier le palmitate de méthyle (F2B) et l'acide myristique (F3F).



**Figure 108** : Informations obtenues suite à la caractérisation phytochimique de la fraction TL\_ha\_F2 (rouge : composé identifié)

### 3.2.2.4.6. Etude des fractions TL\_ha\_F5 et TL\_ha\_F7

Les fractions TL\_ha\_F5 et TL\_ha\_F7, obtenues respectivement à l'aide des mélanges de solvants éther diéthylique/méthanol (20/80 v/v) et eau/méthanol (50/50 v/v), présentent des rendements intéressants (> 32 % pour TL\_ha\_F5 et 12 % pour TL\_ha\_F7). La fraction TL\_ha\_F5 ne présente qu'une activité antioxydante modérée, alors que la fraction TL\_ha\_F7 présente une activité antioxydante forte, ainsi que des activités anti-hyaluronidase et anti-inflammatoires intéressantes (Figure 109). Les activités de la fraction TL\_ha\_F7 sont comparables à celles de l'extrait brut, ainsi qu'à celles de la fraction TL\_ha\_F6 (exception faite de l'activité anti-hyaluronidase).

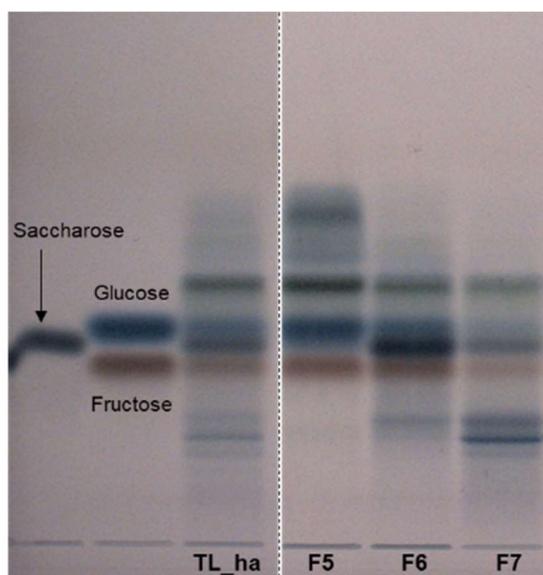


**Figure 109** : Activités biologiques des fractions TL\_ha\_F5 et TL\_ha\_F7

L'étude par HPTLC de ces fractions, réalisée dans les mêmes conditions que pour les fractions précédentes, a permis d'identifier certaines familles de composés. Elle a également permis de mettre en évidence les similarités de ces fractions avec la fraction TL\_ha\_F6 et l'extrait brut

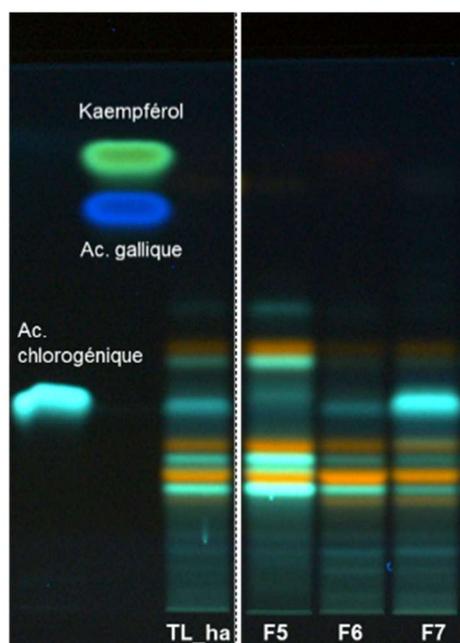
TL\_ha. La fraction TL\_ha\_F6 ayant été caractérisée de manière approfondie précédemment (isolement et caractérisation de 4 composés principaux), les compositions des fractions TL\_ha\_F5 et TL\_ha\_F7 ont été étudiées directement par comparaison avec les informations obtenues lors cette caractérisation.

La révélation avec la DAPA a principalement mis en évidence la présence de glucose et de fructose, ainsi que de saccharose en plus faible quantité (bande peu intense) dans la fraction TL\_ha\_F5 (Figure 110). La fraction TL\_ha\_F7 est, quant à elle, composée de ces trois sucres en plus faibles quantités. Ces observations sont confirmées par la révélation avec l'orcinol et par analyse des fractions par HPLC/DEDL sur colonne NH<sub>2</sub> (paragraphe 5.2.1.1, chapitre 5). Quelques acides aminés semblent également présents dans ces fractions (révélation à la ninhydrine).



**Figure 110** : Etude des glucides des fractions TL\_ha\_F5 et TL\_ha\_F7 par HPTLC (révélation à la lumière blanche après dérivatisation avec la DAPA)

Leurs compositions en polyphénols, mises en évidence par le réactif de Neu et le PEG, sont également comparables à celles de la fraction TL\_ha\_F6 (Figure 111). La fraction TL\_ha\_F5 semble en revanche plus riche puisque les bandes caractéristiques présentent des intensités plus fortes. La fraction TL\_ha\_F7 présente elle, la particularité d'être plus riche en acide chlorogénique.



**Figure 111** : Etude des polyphénols et flavonoïdes des fractions TL\_ha\_F5 et TL\_ha\_F7 par HPTLC (révélation à 366 nm après dérivations avec le réactif de Neu et le PEG 400)

Les analyses par GC-MS de la fraction TL\_ha\_F5 ont mis en évidence 9 composés volatils et semi-volatils, parmi lesquels 4 ont déjà été identifiés dans l'extrait brut ou dans les fractions étudiées précédemment (Tableau 46). Parmi les 5 autres composés identifiés, l'alcool benzylique et l'acide stéarique ont déjà été décrits dans le genre *Teucrium* [269, 270], contrairement au néophytadiène, au linoléate d'éthyle et au linoléate de méthyle qui sont identifiés pour la première fois.

**Tableau 46** : Composés identifiés par GC-MS dans la fraction TL\_ha\_F5

Composés identifiés	RI calculé <sup>(1)</sup> / RI littérature	Références	Activités biologiques <sup>(4)</sup>
Alcool benzylique	1040/1033	Décrit dans les huiles essentielles des parties aériennes de <i>T. polium</i> et <i>T. montanum</i> [269]	Non évaluées
Gaïacol	1089/1089 <sup>(2)</sup>	Non décrit dans le genre <i>Teucrium</i>	Antioxydante (75,48 ± 0,01 %)
Hydroxy-méthylfurfural	1225/1208 <sup>(3)</sup>	Non décrit dans le genre <i>Teucrium</i>	Aucune
Néophytadiène	1846/1829 <sup>(3)</sup>	Non décrit dans le genre <i>Teucrium</i>	Non évaluées
Palmitate de méthyle	1921/1919 <sup>(2)</sup>	Décrit dans l'huile essentielle de <i>T. hyrcanicum</i> [212]	Anti-inflammatoire (30,73 ± 0,01 %)
Acide palmitique	1969/1970 <sup>(2)</sup>	Composé volatil de <i>T. chamaedrys</i> [213], décrit dans les huiles essentielles de différentes variétés de <i>T. orientale</i> [214]	Anti-hyaluronidase (52,00 ± 12,00 %)
Linoléate de méthyle	2089/2069 <sup>(3)</sup>	Non décrit dans le genre <i>Teucrium</i>	Non évaluées
Linoléate d'éthyle	2147/2139 <sup>(3)</sup>	Non décrit dans le genre <i>Teucrium</i>	Non évaluées
Acide stéarique	2168/2152 <sup>(3)</sup>	Décrit dans les parties aériennes de <i>T. labiosum</i> [270]	Anti-élastase (73,45 ± 0,01 %)

<sup>(1)</sup> RI = indice de rétention déterminé sur colonne HP-1 à l'aide d'une série d'alcane (C8-C24) et comparé aux RI disponibles dans la littérature – <sup>(2)</sup> Identification validée par comparaison de RI avec le RI d'un standard analysé dans les mêmes conditions – <sup>(3)</sup> Tentative d'identification – <sup>(4)</sup> évaluées selon les tests in vitro

Les analyses par GC-MS de la fraction TL\_ha\_F7 ont permis d'identifier 4 composés, à savoir le gaïacol, le pyrocatechol, l'hydroquinone et le 4-vinyl gaïacol (Tableau 47), qui ont tous déjà été identifiés dans l'extrait brut.

**Tableau 47** : Composés identifiés par GC-MS dans la fraction TL\_ha\_F7

Composés identifiés	RI calculé <sup>(1)</sup> / RI littérature	Teneur estimée <sup>(3)</sup>	Références	Activités biologiques <sup>(4)</sup>
Gaïacol	1086/1089 <sup>(2)</sup>	0,07 %	Non décrit dans le genre <i>Teucrium</i>	Antioxydante (75,48 ± 0,01 %)
Pyrocatechol	1198/1197 <sup>(2)</sup>	0,07 %	Non décrit dans le genre <i>Teucrium</i>	Aucune
Hydroquinone	1221/1241	0,05 %	Non décrite dans le genre <i>Teucrium</i>	Non évaluées
4-vinyl gaïacol	1301/1315	0,02 %	Décrit dans l'huile essentielle de <i>T. flavum</i> spp. <i>flavum</i> [208]	Anti-inflammatoire (58,58 ± 0,01 %)

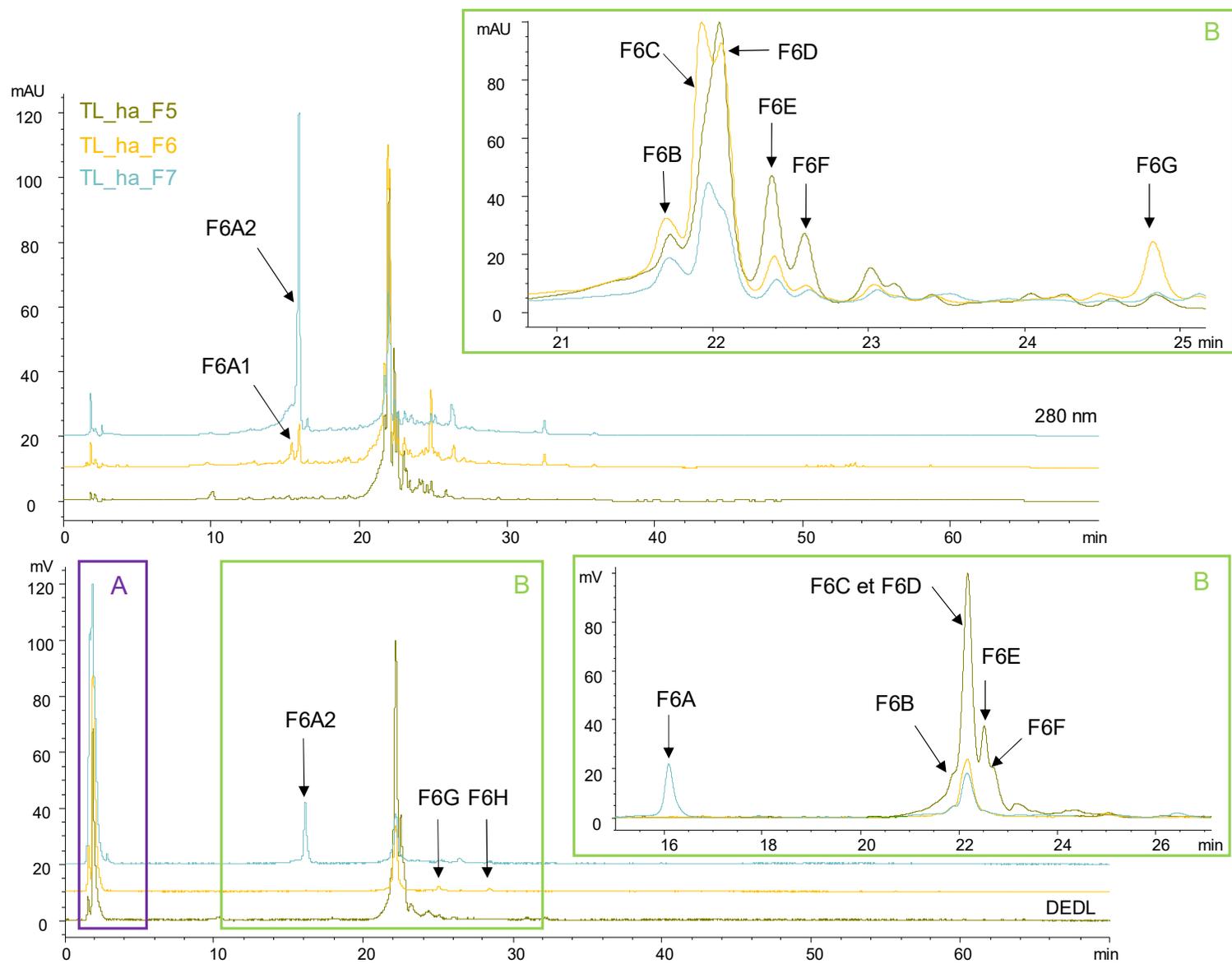
<sup>(1)</sup> RI = indice de rétention déterminé sur colonne HP-1 à l'aide d'une série d'alcane (C8-C24) et comparé aux RI disponibles dans la littérature – <sup>(2)</sup> Identification validée par comparaison de RI avec le RI d'un standard analysé dans les mêmes conditions – <sup>(3)</sup> Tentative d'identification – <sup>(4)</sup> Teneur calculée par étalonnage externe à l'aide d'une gamme étalon de gaïacol – <sup>(4)</sup> évaluées selon les tests in vitro

Les analyses par HPLC-DAD/DEDL confirment les similitudes de composition entre ces fractions et la fraction TL\_ha\_F6. Elles sont caractérisées par la présence des deux groupes de molécules A et B (Figure 112), parmi lesquels les composés F6A à F6F, et l'acide chlorogénique (F6A2) mis en évidence dans la fraction TL\_ha\_F6 sont retrouvés. La co-injection de standards analytiques par HPLC-DAD/DEDL des composés identifiés par GC-MS n'a pas permis d'identifier les composés encore inconnus.

D'après les conclusions de cette étude, les composés du groupe B mis en évidence sont responsables des activités biologiques de ces fractions. Les disparités en termes de pouvoir d'inhibition observées entre ces 2 fractions sont très probablement dues aux teneurs différentes en composés d'intérêt. Afin de comprendre davantage ces disparités, les groupes de composés A et B de ces deux fractions ont été séparés par SPE selon le protocole mis en place pour une telle séparation dans l'extrait brut TL\_ha (paragraphe 3.2.2.4.1) : 3 sous-fractions ont été obtenues pour chaque fraction (Tableau 48).

**Tableau 48** : Masses et rendements des sous-fractions obtenues par SPE

Résultats	Sous-fraction	Masse	Rendement	Sous-fraction	Masse	Rendement
Fraction	TL_ha_F5	73 mg	/	TL_ha_F7	71 mg	/
Charge de l'échantillon	TL_ha_F5_SPE1	15 mg	21 %	TL_ha_F7_SPE1	32 mg	45 %
MeOH/H <sub>2</sub> O (50/50 v/v)	TL_ha_F5_SPE2	45 mg	62 %	TL_ha_F7_SPE2	29 mg	41 %
MeOH	TL_ha_F5_SPE3	13 mg	18 %	TL_ha_F7_SPE3	16 mg	23 %

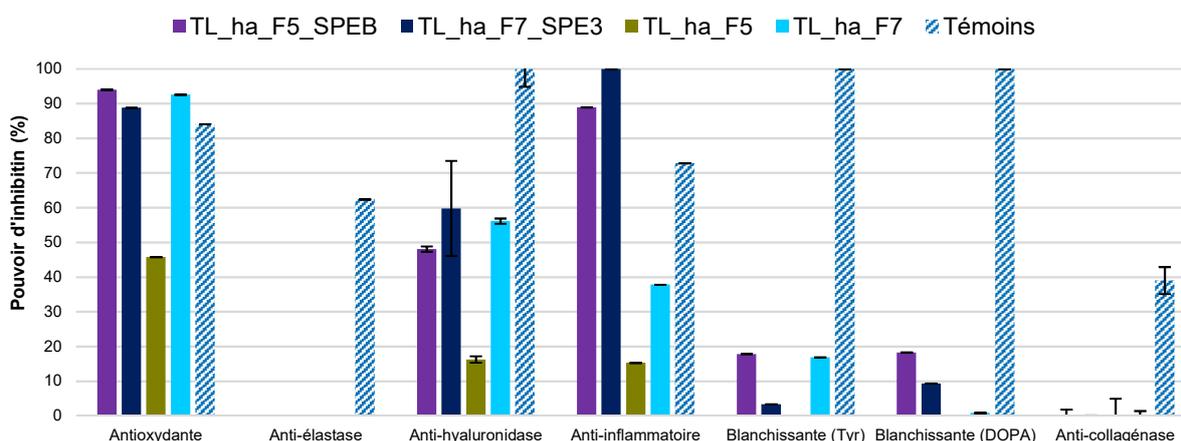


**Figure 112 :** Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 280 nm des fractions TL\_ha\_F5, TL\_ha\_F6 et TL\_ha\_F7

Pour la fraction TL\_ha\_F5, les composés du groupe A ont été isolés dans la sous-fraction TL\_ha\_F5\_SPE1 et ceux du groupe B dans les deux autres sous-fractions TL\_ha\_F5\_SPE2 et TL\_ha\_F5\_SPE3. Ces deux dernières ont été rassemblées et la sous-fraction résultante, nommée TL\_ha\_F5\_SPEB, représente 80 % de la masse de la fraction initiale TL\_ha\_F5, ce qui signifie que les composés du groupe B sont majoritaires dans cette fraction.

Cette séparation a été moins résolutive pour la fraction TL\_ha\_F7 puisque la sous-fraction TL\_ha\_F7\_SPE2 contient un mélange des groupes de composés A et B. Une partie des composés du groupe A a tout de même été isolée dans la sous-fraction TL\_ha\_F7\_SPE1 et une partie de ceux du groupe B dans la sous-fraction TL\_ha\_F7\_SPE3.

Les activités biologiques des sous-fractions TL\_ha\_F5\_SPEB et TL\_ha\_F7\_SPE3 contenant uniquement des composés du groupe B ont été évaluées, puisqu'il a été démontré précédemment que les composés du groupe A n'étaient responsables d'aucune activité (Figure 113). Ces deux sous-fractions présentent des activités similaires. L'enrichissement de la sous-fraction TL\_ha\_F5\_SPEB en composés d'intérêt induit des activités antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-hyaluronidase très intéressantes. La fraction TL\_ha\_F7\_SPE3 présente également une meilleure activité anti-inflammatoire. Ainsi, lorsque les composés du groupe B sont majoritaires dans les fractions, ces dernières présentent des activités remarquables : les composés du groupe B constituent effectivement les composés d'intérêt de cet extrait de germandrée. Ces conclusions permettront de guider l'étude d'optimisation des paramètres d'extraction afin d'extraire majoritairement ces composés d'intérêt lors du développement d'ingrédients actifs : plus la concentration des composés du groupe B est importante dans la fraction, c'est-à-dire moins il y a de composés du groupe A présents, meilleures sont les activités.

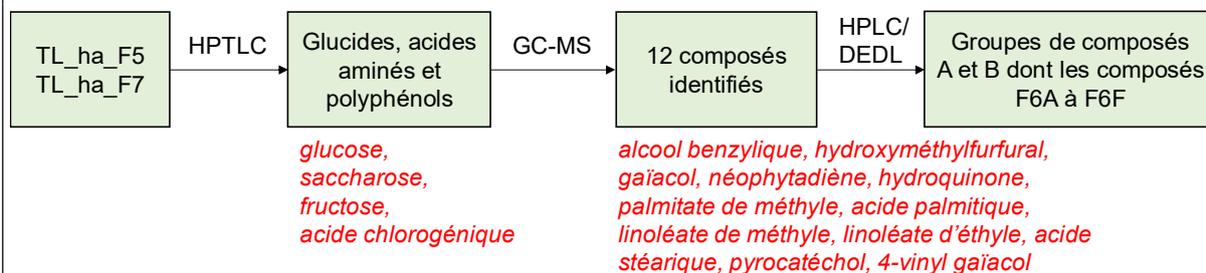


**Figure 113** : Activités biologiques des sous-fractions obtenues par SPE à partir des fractions TL\_ha\_F5 et TL\_ha\_F7

Finalement, il aurait été intéressant de rassembler les fractions TL\_ha\_F5 et TL\_ha\_F7 avec la fraction TL\_ha\_F6 afin d'isoler les principaux composés présents et compléter l'étude de caractérisation de la fraction TL\_ha\_F6. En effet, comme ces fractions ont des compositions similaires qui diffèrent par les teneurs en actifs, leur mélange aurait permis d'enrichir la fraction résultante en composés, notamment en composés F6A à F6H.

Les fractions TL\_ha\_F5 et TL\_ha\_F7, obtenues avec des rendements intéressants, présentent de compositions similaires à celle de la fraction TL\_ha\_F6 mais leurs activités biologiques diffèrent (Figure 114). Elles sont caractérisées par la présence des groupes de composés A et B, et notamment des composés F6A à F6F. Les composés du groupe A sont principalement les 3 sucres identifiés dans l'extrait brut (glucose, saccharose et fructose). Les analyses par GC-MS ont également permis d'identifier 9 composés dans la fraction TL\_ha\_F5 et 4 composés dans la fraction TL\_ha\_F7.

Les séparations réalisées par SPE ont permis de confirmer que les composés du groupe B sont responsables des activités biologiques observées : plus ces composés sont majoritaires, plus les activités sont intéressantes, ce qui explique les disparités observées en termes d'activités de ces fractions.



**Figure 114** : Informations obtenues suite à la caractérisation phytochimique des fractions TL\_ha\_F5 et TL\_ha\_F7 (rouge : composé identifié)

## Conclusion

Il s'agissait ici de caractériser d'un point de vue phytochimique un extrait de *Teucrium lucidum* L., et de développer un ingrédient cosmétique à partir d'un extrait des parties aériennes de cette plante particulièrement intéressante pour son caractère endémique et son aspect innovant.

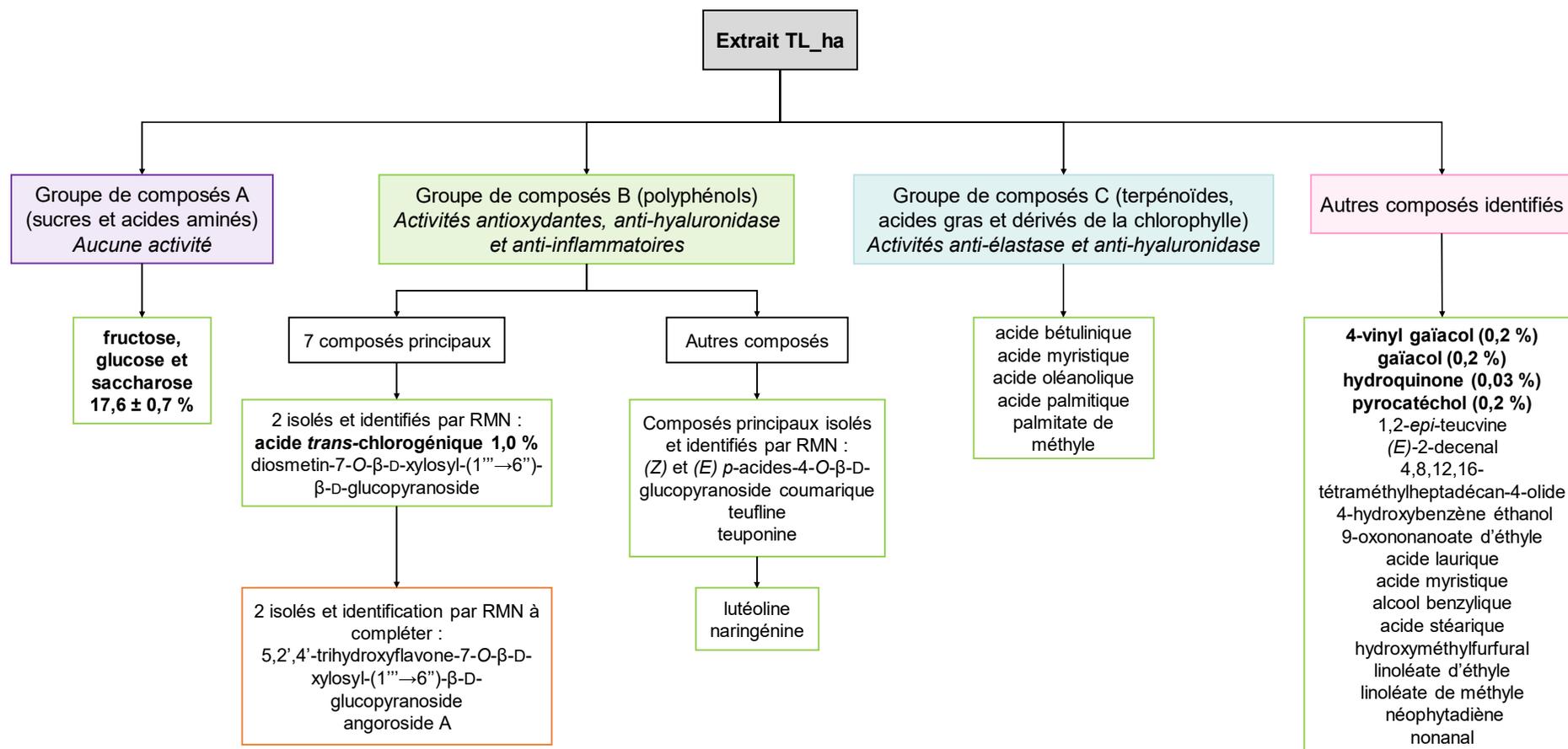
L'extrait brut obtenu par macération hydroalcoolique présente des activités antioxydantes, anti-hyaluronidase et anti-inflammatoires intéressantes ; ces activités en font un candidat de choix pour le développement d'un actif favorisant le mécanisme de réparation cutanée. Cet extrait est caractérisé par la présence majoritaire de deux groupes de composés A (sucres et acides aminés) et B (polyphénols) (Figure 115). Les composés du groupe B ont été identifiés comme étant les composés d'intérêt, puisqu'ils contribuent aux activités de cet extrait. Le fractionnement de l'extrait TL\_ha a également permis de mettre en évidence un groupe de composés C, plus lipophiles (triterpénoïdes, acides gras et dérivés de la chlorophylle), qui seraient quant à eux responsables des activités anti-élastase et anti-inflammatoires de cet extrait.

Parmi le groupe de composés B d'intérêt de l'extrait TL\_ha, 7 composés principaux ont été mis en évidence. L'étude phytochimique de l'extrait a permis d'identifier 4 de ces composés par isolement et caractérisation structurale. Ils correspondent à l'acide *trans*-chlorogénique, à la diosmetin-7-O- $\beta$ -D-xylosyl-(1'' $\rightarrow$ 6'')- $\beta$ -D-glucopyranoside, à la 5,2',4'-trihydroxyflavone-7-O- $\beta$ -D-xylosyl-(1'' $\rightarrow$ 6'')- $\beta$ -D-glucopyranoside et à l'angoroside A. Ces trois derniers composés n'ont pas été décrits dans le genre *Teucrium*, et leur caractérisation est à compléter par des analyses de RMN supplémentaires.

Quatre autres composés ont été isolés à partir des fractions d'intérêt et identifiés par RMN : la teuponine et la teufline, des *néo*-clérodanes caractéristiques du genre *Teucrium* ainsi que les isomères (*Z*) et (*E*) du *p*-acide-4-O- $\beta$ -D-glucopyranoside coumarique, non décrit dans le genre *Teucrium*.

D'autres composés ont également été identifiés lors de cette étude de caractérisation : la lutéoline et la naringénine parmi les composés du groupe B, ainsi que l'acide bétulinique, l'acide oléanolique, l'acide palmitique, le palmitate de méthyle et l'acide myristique, parmi les composés du groupe C. Pour finir, 18 autres composés ont été identifiés par GC-MS lors de cette étude.

D'autres composés sont en cours d'identification ou restent à caractériser. Pour cela, un isolement de chacun de ces composés est nécessaire en raison de la complexité de cet extrait et du peu d'informations présentes dans la littérature pour cette espèce.

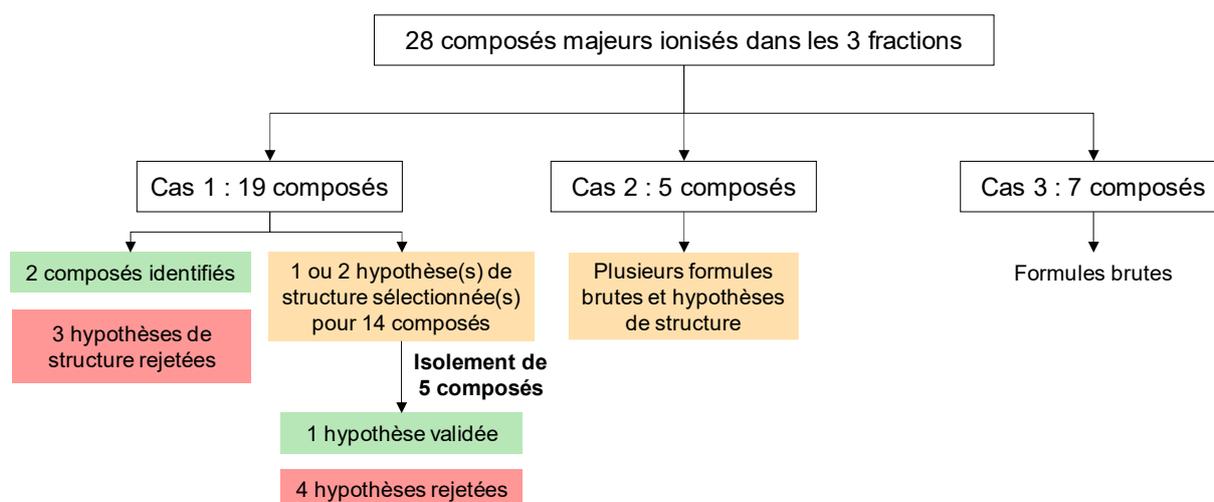


**Figure 115 :** Schéma récapitulatif de l'étude de caractérisation de l'extrait hydroalcoolique de germandrée lisse TL\_ha (encadré vert : composé identifié, encadré orange : caractérisation à compléter)

La stratégie de déréplication utilisée lors de cette étude ne s'est pas révélée concluante (Figure 116). Parmi les 28 composés majeurs ionisés dans les 3 fractions étudiées, seulement 3 composés ont été identifiés : 2 hypothèses de structure ont été confirmées par co-injection des standards analytiques correspondants, et une a été confirmée par isolement et caractérisation par RMN.

Les hypothèses de structure proposées pour 2 composés ont été réfutées par co-injection de standards analytiques correspondants par HPLC, et les hypothèses proposées pour 4 autres composés ont été réfutées après isolement et caractérisation par RMN desdits composés.

Ainsi, grâce à cette étude, il est possible de conclure que l'isolement, suivi de la caractérisation par RMN et MS est la technique d'identification la plus fiable pour ce type d'étude.



**Figure 116 :** Bilan de l'étude de déréplication réalisée sur les 3 fractions d'intérêt

La saisonnalité et la localisation pouvant induire des différences de composition des parties aériennes de germandrée, et donc des variations en termes d'activités biologiques des extraits, il sera nécessaire pour confirmer ces résultats, de réaliser des extraits à partir de germandrée récoltée en 2019.

Cette étude a conduit à un dépôt de brevet :

Plainfossé H. *et al.*, Extrait de parties aériennes de germandrée lisse, composition comprenant ledit extrait pour la réparation cutanée, Juin 2018.

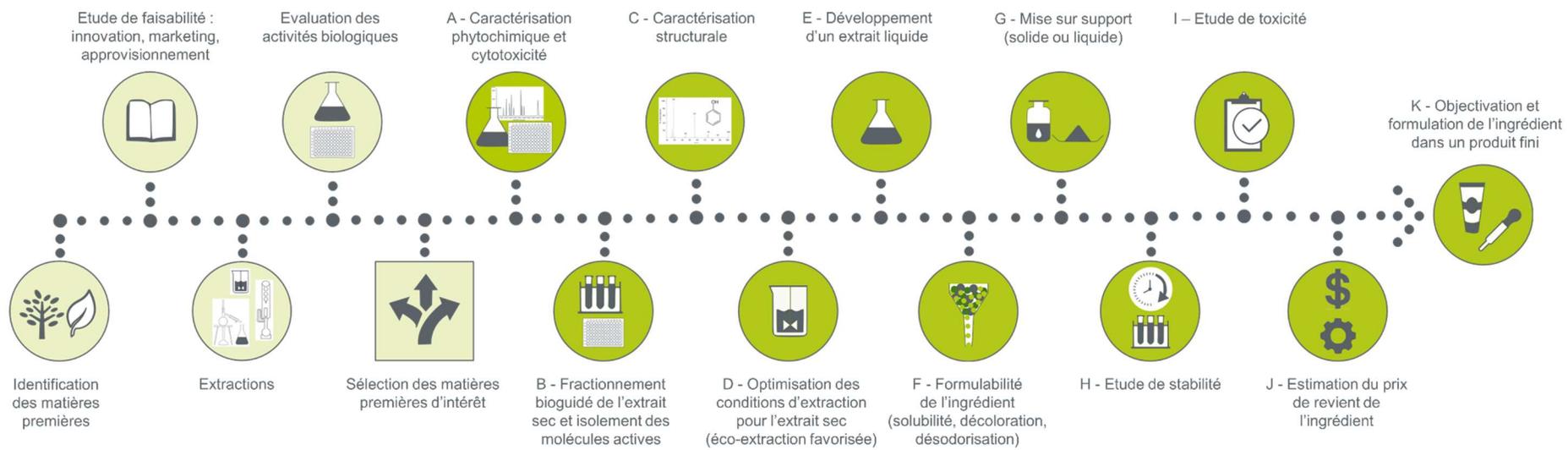


---

## Chapitre 4

Méthodologie de développement d'un  
ingrédient cosmétique à partir de matière  
première naturelle

---



**Figure 117 :** Méthodologie de développement d'un ingrédient mise en place lors de cette étude

De nombreuses étapes de développement sont nécessaires afin d'obtenir un ingrédient cosmétique naturel et innovant, à l'efficacité démontrée. Ce chapitre présente la méthodologie de développement d'un tel ingrédient, mise en place dans le cadre de ce projet. Elle sera adoptée par la suite pour le développement d'autres ingrédients cosmétiques naturels.

Cette méthodologie se divise en différentes étapes reposant sur des techniques couramment utilisées dans l'étude des substances naturelles. Les premières étapes de ce développement, correspondant à la sélection des matières premières d'intérêt, sont identiques à celles présentées dans le chapitre 2. Ce chapitre porte donc sur les étapes ultérieures d'un tel procédé (en vert foncé, Figure 117).

Le principe et les enjeux de chacune de ces étapes sont présentés en détails au travers de l'étude de deux matières premières : le chêne pubescent et le prunier de Brignoles, deux co-produits de l'agriculture sélectionnés lors du criblage présenté dans le chapitre 2 selon les critères définis dans cette étude.

Comme explicité dans le chapitre 2, ces travaux ont porté sur le développement des deux types d'extraits couramment utilisés en cosmétique : un extrait sec, obtenu à partir de solvants organiques et/ou aqueux, et un extrait liquide obtenu par macération de la matière végétale dans un solvant qui ne sera pas éliminé et qui se doit d'être compatible avec une intégration directe dans des formulations cosmétiques. Bien que les procédés d'obtention de ces deux types d'extraits soient similaires, certains ajustements sont tout de même nécessaires pour mener à deux produits finaux très différents. Dans ce chapitre, la stratégie de développement d'un ingrédient solide obtenu à partir d'un extrait sec sera présentée dans un premier temps, puis dans un second temps, les particularités du développement d'un ingrédient liquide seront explicitées. Pour finir, une présentation des étapes de formulabilité de l'ingrédient et de celles nécessaires à sa commercialisation sera réalisée.

## 4.1. Méthodologie de développement

### 4.1.1. Description des principales étapes du développement

#### 4.1.1.1. **Caractérisation phytochimique de l'extrait sec et étude des activités biologiques**

Après avoir sélectionné la matière première d'intérêt, notamment pour ses activités biologiques, il est nécessaire d'identifier les molécules/familles de molécules responsables de ces activités. L'analyse des substances limitées ou interdites de par leur toxicité dans le domaine des cosmétiques est également nécessaire à cette étape afin de développer un ingrédient respectant la réglementation en vigueur dans ce domaine. La caractérisation phytochimique de l'extrait, et l'étude de ses activités biologiques sont réalisées à l'aide de 3 étapes principales (étapes A, B et C, Figure 117).

La première étape (étape A) consiste à étudier la composition phytochimique de l'extrait brut par différentes techniques analytiques telles que l'HPTLC, la GC-MS, l'HPLC-DAD/DEDL et l'HPLC-MS. Cette première caractérisation permet d'identifier les grandes familles de métabolites secondaires présents dans l'extrait et de mettre en évidence les éventuelles substances limitées ou réglementées afin de s'assurer de la non toxicité de l'extrait et poursuivre son développement. Lorsque la matière première est très innovante, c'est-à-dire lorsque peu d'informations sont disponibles dans la littérature sur son éventuelle toxicité, il est nécessaire d'évaluer la cytotoxicité de l'extrait brut. Cette évaluation est réalisée *in vitro*, et permet de s'assurer de l'innocuité d'un tel extrait avant de poursuivre le développement d'un ingrédient à partir de cet extrait.

La composition des extraits naturels étant relativement complexe, des étapes de fractionnement et/ou d'isolement sont nécessaires afin de faciliter sa caractérisation (étape B). Le fractionnement sur colonne ouverte de silice est la technique la plus couramment utilisée pour ce type de séparation. D'autres méthodes peuvent également être utilisées telles que l'extraction liquide-liquide, la SPE, la CPC ou encore l'HPLC semi-préparative (chapitre 1, paragraphe 1.3.2.4.5). Les différentes fractions obtenues sont à leur tour analysées à l'aide de techniques analytiques et leurs activités biologiques sont évaluées. Cette étude qualifiée de « fractionnement bioguidé » permet d'identifier les fractions d'intérêt dont l'étude sera poursuivie et qui sont sélectionnées selon leur rendement, leurs activités biologiques ou encore leur composition phytochimique. L'étude des fractions obtenues avec un faible rendement mais dont les activités biologiques sont très intéressantes et/ou dont la composition phytochimique est particulière (un ou deux composés majoritaires par exemple), peut également être approfondie. A cette étape, en fonction des données analytiques obtenues et de celles disponibles dans la littérature, certains composés peuvent être identifiés, mais d'autres étapes de séparation et/ou d'isolement (HPLC semi-préparative) peuvent s'avérer nécessaires pour compléter cette caractérisation.

Une caractérisation structurale des molécules isolées est réalisée à l'aide de techniques telles que la HRMS et la RMN (étape C). Les activités biologiques de ces molécules sont également évaluées à l'aide des tests *in vitro* afin d'identifier les composés responsables des activités de l'extrait brut.

#### **4.1.1.2. Optimisation des conditions d'extraction**

##### **4.1.1.2.1. Influence des paramètres d'extraction**

L'identification des actifs permet de sélectionner la méthode d'éco-extraction la plus adaptée, afin d'obtenir un extrait enrichi en composés d'intérêts, et ainsi de développer un ingrédient aux activités objectivées (étape D, Figure 117). Une étape d'optimisation des conditions d'extraction est ensuite nécessaire ; de nombreux paramètres tels que la nature du solvant, la température ou encore la durée d'extraction peuvent être ajustés afin d'améliorer l'extraction de ces métabolites d'intérêt. L'extraction peut également être activée par ultra-sons ou par micro-ondes afin de favoriser l'extraction des composés d'intérêt.

Lors de cette étude, la macération a été sélectionnée comme technique d'extraction car elle est facilement transposable à l'échelle industrielle. L'influence du solvant d'extraction, notamment le ratio eau/éthanol, sur les rendements d'extraction et sur les activités des extraits a tout d'abord été évaluée. Une fois le solvant d'extraction optimal identifié, les effets de la température et de la durée de l'extraction ont été évalués, tout comme l'influence des ultra-sons sur l'activation de l'extraction des composés d'intérêt.

#### 4.1.1.2.2. Développement d'un extrait liquide

L'utilisation de solvants compatibles avec les formulations cosmétiques s'avère très intéressante pour le développement d'extraits sous forme liquide. Par macération directe de la matière végétale dans ce type de solvant, suivie d'une filtration des résidus végétaux, il est possible d'obtenir un extrait aux activités intéressantes, comme cela a été présenté lors du criblage des extraits liquides dans le chapitre 2. Du fait de la facilité de mise en œuvre des tels procédés d'extraction et d'évaluation des activités des extraits obtenus, une étape de développement de ce type d'extrait a été ajoutée à la méthodologie présentée précédemment (étape E, Figure 117).

Les glycols, les polyols, l'eau ou encore des huiles végétales sont des solvants utilisés dans les formulations cosmétiques. Le propylène glycol est le solvant sélectionné lors de cette étude car il est couramment employé dans les formulations cosmétiques pour ses propriétés humectantes (prévenant la déshydratation). Composé de deux groupements hydroxyles polarisés lui conférant des propriétés de solvant polaire, et de trois atomes de carbone lui conférant des propriétés plus hydrophobes que l'eau, le propylène glycol extrait efficacement de nombreux types de composés, tels que les polyphénols et les flavonoïdes, largement reconnus pour leurs activités biologiques intéressantes [87, 110, 150, 186].

La caractérisation phytochimique de ce type d'extrait nécessite une étape de pré-traitement de l'échantillon. En effet, le propylène glycol, non volatil, de par sa présence majoritaire masque le signal des métabolites présents lors des analyses par HPLC, et empêche ainsi leur caractérisation. Une étape de concentration de l'échantillon par SPE est donc ajoutée avant l'analyse de l'échantillon. La caractérisation phytochimique de ce type d'extrait est facilitée grâce aux informations obtenues lors de l'étude de caractérisation de l'extrait sec (fractionnement bioguidé, isolement et caractérisation des composés, etc.). Le propylène glycol n'étant pas volatil, le rendement d'extraction ne peut être calculé de manière conventionnelle. Des rendements spécifiques sont alors calculés pour ce type d'extrait, selon l'équation (1) :

$$(1) \text{ Rendement spécifique} = \frac{\text{Masse d'extrait}}{\text{Masse de solvant initiale}} \times 100$$

Une fois les actifs identifiés, une étude d'optimisation des conditions d'extraction est réalisée afin d'extraire au maximum ces composés d'intérêt. L'influence de différents paramètres d'extraction tels que la température, la durée d'extraction ou encore le rapport matière première/solvant, tout comme l'effet de l'activation de l'extraction par les ultra-sons sont étudiés.

D'autres solvants compatibles avec les formulations cosmétiques, de par leurs propriétés physico-chimiques diverses, peuvent extraire sélectivement certains composés, offrant ainsi aux extraits des activités variées. Lors de cette étude, trois solvants de natures différentes, couramment employés en cosmétique pour leurs nombreuses propriétés intéressantes, ont été utilisés [271] :

- la glycérine, encore appelée glycérol ( $\text{HOH}_2\text{C}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$ ), est utilisée comme agent hydratant grâce à son pouvoir hygroscopique. Elle favorise la stabilisation des émulsions eau/huile et permet d'adoucir et de protéger la peau [271] ;
- le miglyol<sup>®</sup> 812, composé d'un mélange d'acides gras (INCI : Caprylic/Capric Triglyceride), présente des actions adoucissantes. Il participe à la restauration de la peau et empêche les pertes d'eau. Il sert principalement d'agent dispersant dans les formules cosmétiques en raison de sa facilité d'étalement ;
- l'huile de tournesol (INCI : Helianthus Annuus (Sunflower) Seed Oil) présente une texture grasse intéressante pour son incorporation en cosmétique. Elle favorise l'hydratation, l'adoucissement et la protection de la peau.

Des alternatives biosourcées de ces solvants peuvent également être testées afin de développer des ingrédients plus « verts », répondant davantage à la demande de naturalité des formulateurs.

#### **4.1.1.3. Etude de formulabilité**

Selon la matière première, le solvant d'extraction et/ou les conditions d'extraction utilisées, des molécules colorées et/ou odorantes peuvent être extraites au même titre que les molécules d'intérêt lors de l'étape d'extraction. Cette coloration de l'extrait peut induire lors de l'étape de formulation, une coloration plus ou moins intense du produit cosmétique fini qui sera fonction notamment du pourcentage d'ingrédient coloré formulé. Une telle coloration peut s'avérer contraignante pour les formulateurs, et *in fine* les consommateurs qui de manière générale préfèrent une cosmétique blanche [57, 272]. Des odeurs trop marquées et/ou désagréables peuvent de la même manière engendrer des problèmes au moment de la formulation. Les formulateurs peuvent également être confrontés à des problèmes de solubilité ou encore de stabilité lors de l'intégration de ces extraits naturels dans la formule. Une étude de formulabilité des extraits est alors nécessaire afin de proposer un extrait formulable, répondant aux attentes du formulateur (étape F, Figure 117).

##### **4.1.1.3.1. Décoloration de l'extrait**

Afin de proposer un extrait répondant aux contraintes associées à une cosmétique blanche, une étape de décoloration est nécessaire ; elle peut être réalisée par distillation moléculaire ou par adsorption des molécules sur un matériau solide. Dans le cadre de cette étude, l'adsorption des composés sur charbon actif a été sélectionnée comme technique de décoloration pour sa facilité de mise en œuvre. Cet absorbant naturel est le matériau le plus utilisé en raison de sa forte capacité d'adsorption liée à son importante surface spécifique et son faible coût [273, 274]. D'autres matériaux tels que l'argile activée peuvent également être

utilisés [275]. En revanche, la non spécificité de ces matériaux peut constituer un désavantage puisqu'il entraîne généralement des pertes d'activités biologiques par adsorption des composés d'intérêt. L'optimisation des paramètres de décoloration est donc nécessaire afin de préserver au maximum ces activités, tout en obtenant un extrait dont la coloration est acceptable lors de son intégration dans les formules cosmétiques. Différents paramètres tels que le choix de l'adsorbant, la quantité d'adsorbant ajoutée, le temps de contact extrait/adsorbant, ou encore la température à laquelle est réalisée cette décoloration sont à ajuster [273].

Afin d'évaluer l'efficacité de la décoloration, la Commission Internationale de l'Eclairage a défini un système spatial de coordonnées à 3 dimensions CIE 1976 L\*a\*b\* (Figure 118), où L\* représente la clarté de l'échantillon, a\* sa composante selon les couleurs vert-rouge et b\* la composante selon les couleurs jaune-bleue. La mesure de ces coordonnées par spectrométrie permet de calculer la distance Euclidienne  $\Delta E^*_{ab}$  définie selon l'équation (2) [276]. Elle correspond à la différence de couleur entre un extrait de référence (extrait brut) et un extrait décoloré.

$$(2) \quad \Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

Lorsque  $\Delta E^*_{ab}$  est inférieure à 1, la différence de couleur est à peine perceptible par l'œil humain ; lorsqu'elle est comprise entre 1 et 2,5, la différence de couleur devient notable [277].

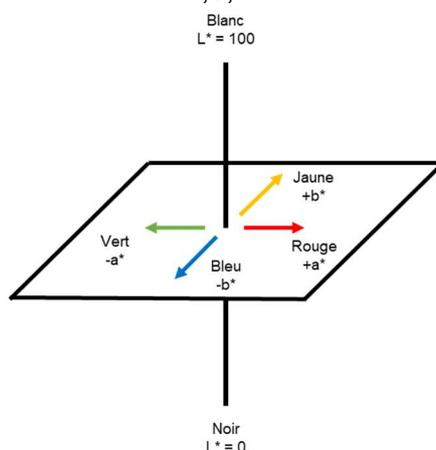


Figure 118 : Espace colorimétrique CIE L\*a\*b\*

#### 4.1.1.4. Mise sur support solide

Si les extraits liquides sont directement incorporables à une formule cosmétique, la forme pâteuse de l'extrait sec le rend difficilement formulable (difficultés de prélèvement, de solubilité, etc.) [96]. Afin de faciliter son incorporation, une étape de mise sur support solide ou liquide est nécessaire, selon le type de produit fini souhaité (étape G, Figure 117).

La mise sur support liquide consiste à diluer cet extrait sec dans un solvant compatible avec un usage cosmétique, tel que le propylène glycol, la glycérine, l'eau ou différentes huiles végétales, puis de filtrer le mélange afin d'enlever la partie insoluble, avant formulation.

La mise sur support solide consiste à solubiliser l'extrait sec dans un solvant/mélange de solvants présentant une certaine volatilité, dans lequel on ajoute un support solide tel que la maltodextrine. L'extrait sous forme solide est ensuite obtenu par évaporation du solvant ou par atomisation (chapitre 1, paragraphe 1.3.2.4.3). Le procédé d'atomisation sélectionné dans le cadre de cette étude, présente l'avantage de produire une poudre homogène [118]. Différents paramètres sont à ajuster lors de cette étape afin d'obtenir un rendement d'atomisation satisfaisant et une poudre de qualité (aspect et pourcentage d'humidité). La mise sur support de l'extrait s'accompagne généralement d'une diminution, voire d'une perte de ses activités biologiques, puisqu'il est dilué sur le matériau support. L'évaluation des activités biologiques de ces ingrédients est alors nécessaire afin de s'assurer d'obtenir le bon compromis, à savoir une mise sur support satisfaisante, sans toutefois perdre l'efficacité de l'ingrédient développé.

#### **4.1.1.5. Etude de stabilité**

Une fois l'ingrédient développé selon le cahier des charges souhaité, il est nécessaire d'étudier sa stabilité au cours du temps (étape H, Figure 117). Selon le règlement cosmétique 1223/2009, l'étude de la stabilité d'un produit cosmétique est assurée par son fabricant [4]. Des recommandations générales sont disponibles pour le suivi de stabilité mais elles n'abordent pas les spécificités de chaque produit. Lors de cette étude, un protocole a été mis en place afin de suivre la stabilité d'un ingrédient en fonction des critères considérés comme les plus pertinents pour ce type de produits. Pour cela, une évaluation des critères organoleptiques tels que l'odeur, la couleur et l'apparence de l'ingrédient est réalisée. La mesure du pH et la composition phytochimique de l'ingrédient, tout comme l'évaluation de ses activités biologiques permettent de contrôler sa stabilité chimique au cours du temps.

Afin d'étudier l'influence des conditions de stockage et de définir éventuellement des recommandations particulières pour le formulateur, cette étude de stabilité est réalisée selon 3 conditions de stockage : conservation à 4 °C, à température ambiante et à 40 °C. L'étude à 40 °C sert également de test de vieillissement « accéléré » afin de prédire une éventuelle dégradation au cours du temps.

Pour les ingrédients sous forme liquide, les contraintes liées à l'utilisation de solvants non volatils s'imposent à nouveau lors de cette étape. L'ingrédient est alors concentré par SPE avant d'être analysé par HPLC afin de suivre l'évolution de sa composition phytochimique au cours du temps.

Ces études de stabilité sont réalisées sur des extraits produits à l'échelle pilote (extraction réalisée sur 2 kg de matière végétale), qui sont ainsi plus proches des ingrédients commercialisés après transposition des paramètres à l'échelle industrielle.

#### **4.1.1.6. Etude de toxicité**

A l'issue du processus de développement d'un actif, arrive l'étape consistant à s'assurer de son innocuité en vue de sa commercialisation. L'évaluation de la sécurité est conduite par un expert toxicologue. Aucune exigence spécifique quant aux données minimales nécessaires pour garantir l'innocuité des ingrédients commercialisés n'est mentionnée dans une quelconque réglementation, mais la sécurité des consommateurs relève de la responsabilité

pleine et entière de la personne ou de l'entité en charge de la mise sur le marché. Il est généralement recommandé de procéder à *minima* aux tests d'irritation cutanée et oculaire, de sensibilisation cutanée, de toxicité à doses répétées et de phototoxicité. Les ingrédients développés lors de cette étude présentant des activités anti-âge, ils seront donc intégrés dans des formulations cosmétiques appliquées directement sur la peau, et pouvant être en contact avec les yeux. Trois tests ont été sélectionnés afin d'évaluer *in vitro* la cytotoxicité, le potentiel d'irritation cutanée et le potentiel d'irritation oculaire de ces ingrédients par un laboratoire externe (étape I, Figure 117).

La cytotoxicité de l'ingrédient est évaluée à l'aide du test *in vitro* 3T3 NRU sur des lignées de fibroblastes murins, selon les lignes directrices de l'OCDE n° 129 [278]. Elle permet de déterminer la toxicité orale aiguë par calcul de la concentration inhibitrice médiane  $CI_{50}$ , correspondant à la concentration nécessaire pour induire 50 % de mortalité cellulaire. Cette concentration permet alors d'estimer la dose létale médiane  $DL_{50}$ , indicateur quantitatif de la toxicité d'une substance. Selon le système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH), une substance est classée *sans catégorie* concernant sa toxicité par voie orale lorsque sa  $DL_{50}$  est supérieure à 2000 mg/kg [279].

Le potentiel d'irritation cutanée est déterminé sur un modèle d'épiderme humain reconstruit *in vitro*, selon les lignes directrices de l'OCDE n° 439 [280]. La viabilité tissulaire est calculée à l'aide du test MTT (méthode rapide de numération des cellules vivantes). Selon le SGH, l'ingrédient est classé *sans catégorie* si la viabilité tissulaire est supérieure à 50 % et *irritant de catégorie 1 ou 2* si elle est inférieure à 50 % [279]. Le potentiel d'irritation oculaire est quant à lui déterminé sur un modèle d'épithélium cornéen humain, selon les lignes directrices de l'OCDE n° 492 [281]. La viabilité tissulaire est également déterminée à l'aide du test MTT : lorsqu'elle est supérieure à 60 %, l'ingrédient sous forme liquide est classé *sans catégorie* selon la classification du SGH (50 % pour les ingrédients sous forme solide) [279] ; dans le cas où la viabilité est inférieure à ces pourcentages respectifs aucune prédiction n'est possible. Comme pour l'étude de stabilité, ces tests sont effectués sur les extraits réalisés à l'échelle pilote.

#### 4.1.1.7. Estimation du prix de revient de l'ingrédient

Lorsque toutes les étapes du développement de l'ingrédient ont été optimisées, il est nécessaire d'évaluer le prix de revient de l'ingrédient à travers son coût de production (étape J, Figure 117). Il peut sembler tardif de faire intervenir ce calcul en fin de développement mais les étapes de formulabilité et de mise sur support peuvent fortement impacter le coût de production. Ce dernier est évalué en tenant compte du prix de la matière première, du procédé d'extraction, du rendement d'extraction, ainsi que des étapes de formulabilité et de mise sur support. Il est ensuite ré-évalué en fonction des activités biologiques de l'ingrédient et du pourcentage d'incorporation de l'ingrédient dans la formule finale préconisé pour le formulateur.

#### 4.1.1.8. Objectivation et formulation de l'ingrédient dans un produit cosmétique fini

Une fois l'ingrédient défini comme stable et non toxique, les Laboratoires JYTA intègrent cet ingrédient dans différents produits cosmétiques finis. Différents essais de formulation sont réalisés afin de déterminer les formulations les plus adaptées à chaque ingrédient, ainsi que la gamme de pourcentages d'incorporation de l'ingrédient dans la formule finale préconisée. Des tests *in vivo* peuvent alors être réalisés afin d'attester de l'efficacité de ces ingrédients dans un produit cosmétique fini.

De nombreuses étapes sont nécessaires afin de développer un ingrédient cosmétique naturel à l'efficacité démontrée. Cette méthodologie de développement a été mise en place et optimisée lors de cette étude, à travers les exemples de deux matières premières : les parties aériennes de chêne pubescent et les feuilles de prunier. Dans un premier temps, ces différentes étapes ont été mises au point en utilisant le chêne comme matière première (choix des techniques, conditions opératoires, etc.). Ensuite, afin de valider les protocoles, le prunier a été utilisé comme matière première. Cette étude comparative a permis d'identifier les principales étapes à ajuster lors de l'utilisation de nouvelles matières premières, ainsi que les étapes limitantes d'un tel développement.

## 4.2. Développement d'ingrédients à partir des parties aériennes de *Quercus pubescens* Willd.

### 4.2.1. Choix de la matière première

*Quercus pubescens* Willd., appartenant à la famille des Fagacées, est connu sous les noms communs de chêne pubescent et chêne blanc de Provence [190]. Il est dénommé « pubescent » en raison de la présence de poils sur ses feuilles et ses jeunes rameaux, qui sont caractéristiques de son adaptation à la sécheresse (Figure 119) [282]. Pouvant atteindre jusqu'à 25 m de haut, cet arbre à feuilles caduques se retrouve particulièrement dans les régions au climat subméditerranéen sur les sols plutôt acides, calcaires et bien drainés [190, 283]. Il est majoritairement rencontré sur des collines entre 200 et 800 m d'altitude, mais on peut le retrouver jusqu'à 1300 m [283]. Très résistant aux conditions climatiques extrêmes (sécheresse ou gel), il est connu pour sa longévité, puisqu'il peut atteindre facilement 500 ans. L'exploitation de cette espèce de chêne et à plus forte raison, d'un co-produit de cette espèce, n'est pas préoccupante pour la survie de l'espèce qui, comme la germandrée ne fait l'objet que d'une « préoccupation mineure » dans la liste rouge mondiale des espèces menacées, c'est-à-dire que suffisamment de données ont pu être collectées pour étudier le statut du chêne, et qu'il n'en résulte aucune inquiétude quant à sa survie [197].

Il est caractérisé de « truffier » car il présente la particularité de pouvoir être mycorhizé et ainsi de favoriser le développement de truffes (*Tuber spp.*) à la base de son tronc dans certaines conditions pédoclimatiques particulières [284].



**Figure 119** : Parties aériennes du chêne pubescent (récoltées dans le Parc Valrose, Nice, 06)

De nombreux ingrédients cosmétiques obtenus à partir des écorces ou des fruits de différentes espèces de chêne existent sur le marché des cosmétiques, mais à priori, aucun ingrédient n'a été développé à partir des parties aériennes de ces espèces [285]. L'objectif de cette étude étant d'exploiter la biodiversité de manière durable et raisonnée, l'étude des parties aériennes (petits rameaux et feuilles) a été privilégiée. La taille de ces parties aériennes ne met pas la survie de l'arbre en péril, comme cela pourrait être le cas avec l'exploitation de l'écorce (en effet, si trop d'écorce est prélevée à la fois, l'arbre ne peut produire suffisamment de cellules pour cicatriser, entraînant ainsi sa mort) [286].

Outre le fait de préserver l'espèce, l'exploitation de cette partie de l'arbre permet la valorisation d'un co-produit de la trufficulture régionale : en effet, les branches des chênes truffiers sont taillées afin de permettre une production efficace de truffes de bonne qualité, générant ainsi des déchets dont la gestion incombe aux producteurs [284]. La valorisation de ces déchets, de par leur utilisation comme matière première pour le développement d'un ingrédient cosmétique, permettrait de diminuer les coûts inhérents à leur destruction, et fournirait de surcroît une source de revenu supplémentaire aux producteurs *via* le rachat de cette matière première. La pérennité d'une filière d'approvisionnement pour un éventuel développement industriel est assurée du fait de l'existence de la filière trufficole bien implantée dans les Alpes-Maritimes (notamment dans le pays de Grasse, Vence, etc.).

L'étude des parties aériennes du chêne pubescent, co-produit de la trufficulture, présente un intérêt particulier dans le cadre de cette étude qui tend à valoriser la biodiversité méditerranéenne de manière raisonnée. Le chêne pubescent qui s'est distingué lors du criblage initial, a ainsi été sélectionné pour mettre en place la méthodologie de développement d'un ingrédient naturel. Outre les activités biologiques intéressantes que présente l'extrait de chêne, cette matière première s'est également avérée intéressante d'un point de vue marketing *via* les notions de longévité et de noblesse que véhiculent dans l'esprit commun des espèces telles que le chêne et la truffe.

## 4.2.2. Caractérisation phytochimique de l'extrait de chêne

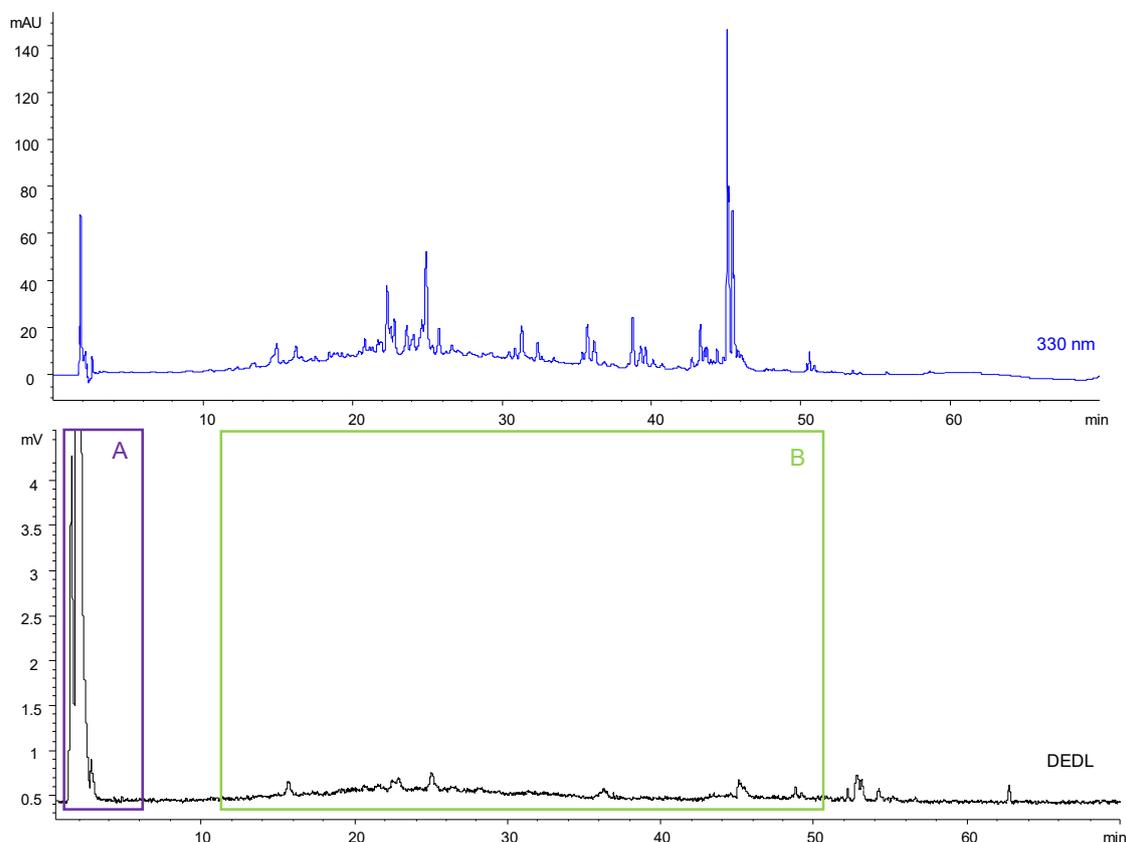
### 4.2.2.1. Profil phytochimique et activités biologiques

L'intérêt que présente l'extrait hydroalcoolique QP1\_ha obtenu à partir des parties aériennes du chêne pubescent collectées à Vinon-sur-Verdon (83) en décembre 2016, a été mis en évidence lors du criblage des matières premières présenté dans le chapitre 2. Cet extrait a été obtenu par macération de la matière végétale préalablement séchée et broyée dans un solvant hydroalcoolique selon les conditions présentées dans le Tableau 49. Après filtration et évaporation du solvant, l'extrait a été obtenu avec un rendement de 5,4 %. Cette extraction, réalisée une seule fois, est une première phase de prospection : elle permet d'obtenir l'extrait en quantité suffisante pour réaliser l'étude de caractérisation, mais le rendement d'extraction est à confirmer par des extractions supplémentaires.

**Tableau 49** : Conditions expérimentales et rendement obtenu pour l'extrait QP1\_ha

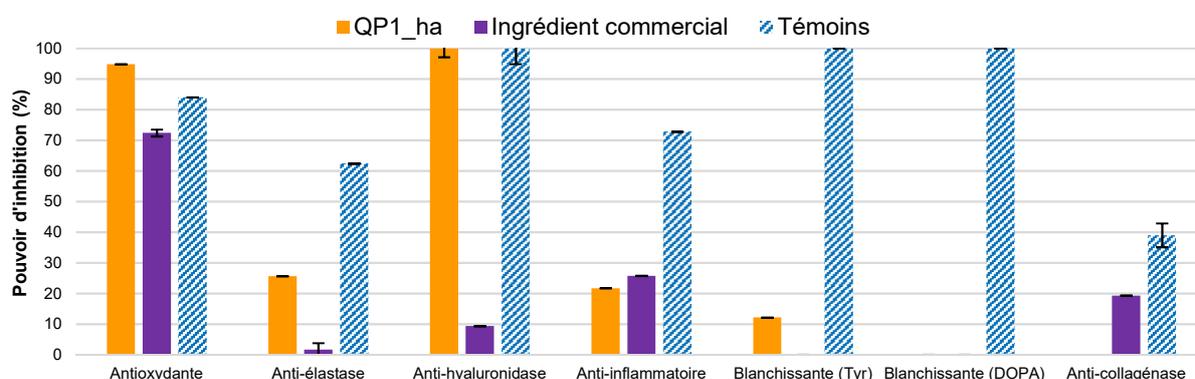
Solvant	Durée	Température	Ratio	Rendement
H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50 m/m)	2 h	Ambiante	1/8	5,4 %

D'après son profil phytochimique, cet extrait est composé de deux groupes de composés (Figure 120) : le groupe de composés polaires A, majoritaire, comprenant des composés de types glucides, acides aminés, etc., et le groupe de composés B correspondant aux polyphénols.



**Figure 120** : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 330 nm de l'extrait QP1\_ha

Le criblage présenté dans le chapitre 2 avait permis de mettre en évidence les activités antioxydantes et anti-hyaluronidase très intéressantes de cet extrait (Figure 121), et qui s'avèrent être meilleures que celles d'un ingrédient cosmétique disponible sur le marché et composé d'un extrait de duramen\* de *Q. robur*, qui présente principalement une activité anti-hyaluronidase.



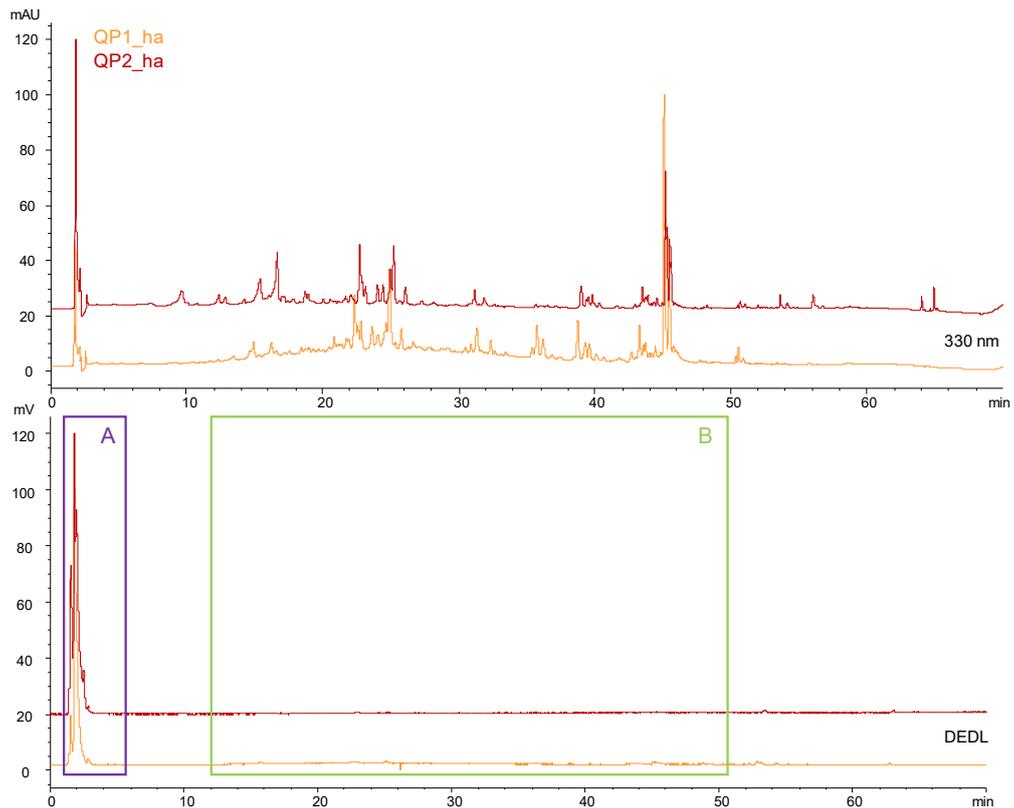
**Figure 121** : Activités biologiques de l'extrait QP1\_ha et d'un ingrédient commercial (*Q. robur*)

Pour la poursuite de cette étude, l'extrait QP1\_ha a été comparé à un extrait développé dans les mêmes conditions à partir de parties aériennes de chêne pubescent récoltées dans le Parc Valrose, Nice (06), afin d'évaluer les éventuelles variabilités dues à la provenance géographique de la matière première (Tableau 50). Réalisé en triplicat, cet extrait QP2\_ha a été obtenu avec un rendement de  $13,6 \pm 0,7$  %. Ce rendement est presque 3 fois supérieur à celui obtenu pour l'extrait QP1\_ha. Les conditions d'extraction étant similaires, la différence de localisation et/ou de l'année de récolte pourraient expliquer en partie ces disparités puisque la composition en métabolites secondaires dans une espèce végétale dépend de différents facteurs environnementaux tels que la lumière, la pédologie\*, la température, etc. [287].

**Tableau 50** : Provenance de la matière première et rendements obtenus pour les extraits de chêne

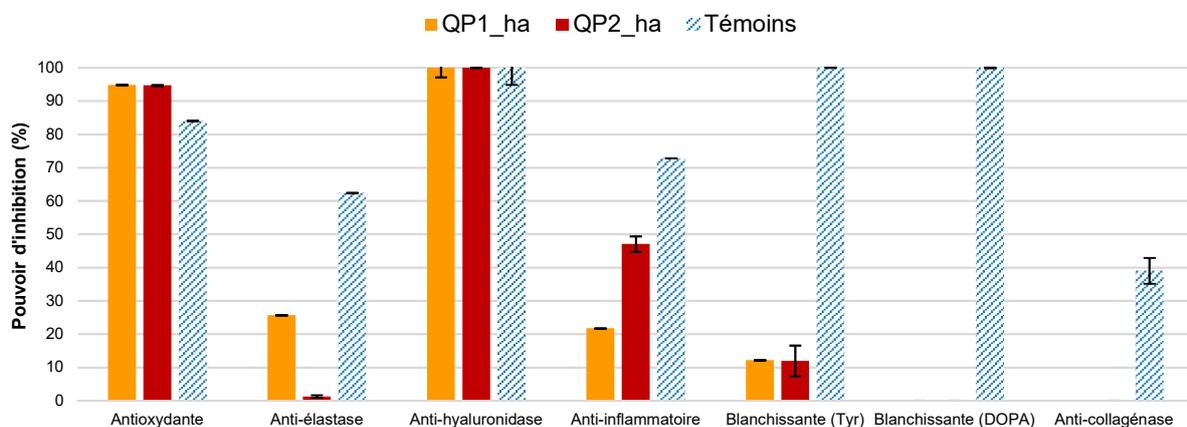
Extrait	Date de récolte	Localisation	Rendement
QP1_ha	Décembre 2016	Vinon-sur-Verdon (83)	5,4 %
QP2_ha	Juin & Décembre 2017	Parc Valrose, Nice (06)	$13,6 \pm 0,7$ %

Afin d'expliquer ces différences, les profils phytochimiques de ces extraits obtenus par HPLC-DAD/DEDL ont été comparés (Figure 122). Ils présentent des compositions semblables, caractérisées par la présence des deux groupes de composés A et B. Les composés du groupe A doivent être présents en quantité plus importante dans la matière première provenant du Parc de Valrose, Nice : un taux d'extraction plus important de ces composés majoritaires pourrait expliquer les différences de rendement observées.



**Figure 122 :** Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 330 nm des extraits QP1\_ha et QP2\_ha

L'extrait QP2\_ha présente par ailleurs des activités antioxydantes et anti-hyaluronidase similaires à celles de l'extrait QP1\_ha, mais présente un pouvoir anti-inflammatoire plus important (Figure 123). L'activité anti-élastase de l'extrait QP2\_ha est nulle, contrairement à celle de l'extrait QP1\_ha, bien que cette dernière soit relativement faible. La localisation géographique ne semble pas affecter les activités biologiques des extraits des parties aériennes de chêne truffier ; elle semblerait principalement impacter le rendement d'extraction. Ces observations liées à la variabilité de la matière première en fonction de la localisation et de la période de récolte sont à confirmer avec une étude plus approfondie (différents extraits réalisés à partir de plusieurs lots de matières premières récoltées dans différents lieux et à différentes saisons).



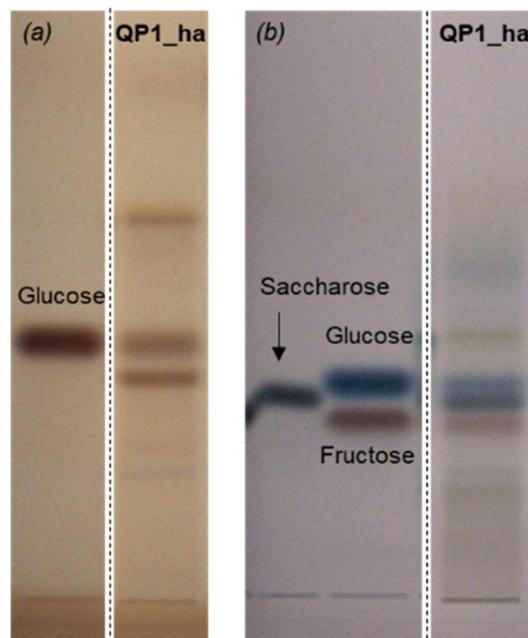
**Figure 123 :** Activités biologiques des extraits QP1\_ha et QP\_2\_ha

Les extraits hydroalcooliques des parties aériennes de chêne pubescent sont caractérisés par la présence majoritaire d'un groupe de composés polaires A (sucres, acides aminés, etc.) et d'un groupe de molécules B correspondant principalement à des polyphénols. Ils présentent essentiellement des activités antioxydantes et anti-hyaluronidase très intéressantes.

#### 4.2.2.2. Caractérisation de l'extrait QP1\_ha

Afin de caractériser les familles de composés mises en évidence dans l'extrait hydroalcoolique de chêne, l'extrait QP1\_ha a été analysé par HPTLC à l'aide des différents révélateurs et conditions expérimentales utilisées dans le chapitre 3 (paragraphe 3.2.2.3.1).

Une première séquence de dérivation post-chromatographique a été réalisée afin de caractériser les composés polaires du groupe A. D'après la révélation à la ninhydrine, l'extrait QP1\_ha ne semble pas contenir d'acides aminés. La dérivation avec de l'orcinol souligne la présence de plusieurs glucides dont 3 majoritaires (plaque (a), Figure 124). Le glucose est identifié parmi ces 3 composés, par comparaison des rapports frontaux avec la molécule pure analysée dans les mêmes conditions. Une dérivation avec la DAPA a alors permis d'identifier les 2 autres sucres majoritaires, qui correspondent respectivement au saccharose et au fructose (plaque (b), Figure 124). Cette dérivation permet également de mettre en évidence la présence d'autres glucides de natures variées, caractérisés par des bandes de colorations différentes.



**Figure 124** : Etude des glucides de l'extrait QP1\_ha par HPTLC (révélation à la lumière blanche après dérivation avec l'orcinol - plaque (a), et avec la DAPA – plaque (b))

Grâce à un dosage par HPTLC, les teneurs de ces 3 sucres principaux dans l'extrait QP1\_ha ont été évaluées (Tableau 51). Ils sont présents à des teneurs comparables de l'ordre de 34  $\text{mg}_{\text{composé}} / \text{g}_{\text{extrait}}$  ; ils représentent au total  $10,5 \pm 0,6$  % de l'extrait brut. La présence de ces trois

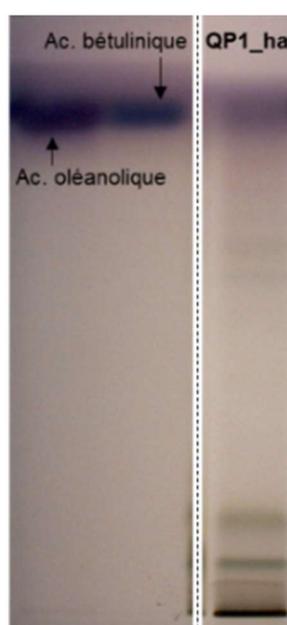
sucres est confirmée par analyse par HPLC/DEDL de l'extrait brut sur une colonne NH<sub>2</sub> qui permet une meilleure rétention des composés très polaires (chapitre 5, paragraphe 5.2.1.1).

**Tableau 51** : Teneurs des sucres identifiés dans l'extrait QP1\_ha par dosage par HPTLC

Composé	Fructose	Glucose	Saccharose
Teneur (mg <sub>composé</sub> / g <sub>extrait</sub> )	35 ± 3	33 ± 1	36 ± 2

Dans un second temps, différentes révélations ont été réalisées afin de caractériser les composés du groupe B présents dans cet extrait. Une première révélation avec le réactif de Neu, suivie d'une seconde au PEG, ont mis en évidence la présence de flavonoïdes, notamment des acides phénoliques et/ou des coumarines. Les faibles intensités des bandes observées sur les plaques confirment la faible concentration de ce groupe de composés, comme cela avait été noté lors de l'analyse par HPLC/DEDL de cet extrait.

La révélation avec l'anisaldéhyde a permis la mise en évidence de quelques composés peu polaires de type terpénoïdes (Figure 125). Le fait qu'ils soient présents en faibles quantités, explique que leur présence n'avait pas été mise en évidence lors de l'analyse par HPLC.



**Figure 125** : Etude des composés peu polaires de l'extrait QP1\_ha par HPTLC (révélation à la lumière blanche après dérivatisation avec l'anisaldéhyde)

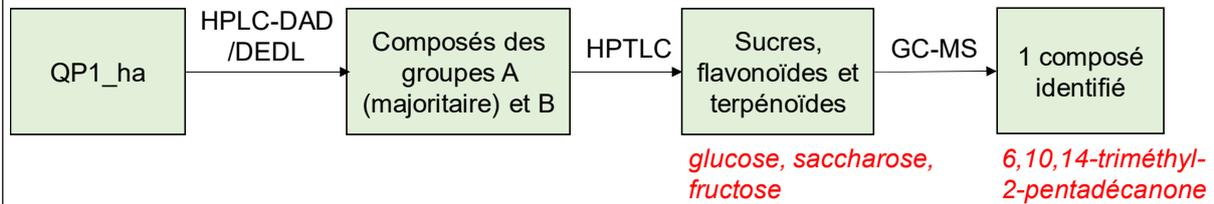
L'analyse des composés volatils par GC-MS a permis d'identifier un seul composé, la 6,10,14-triméthyl-2-pentadécane (Tableau 52), déjà décrite dans le genre *Quercus*, notamment dans les huiles essentielles de feuilles de *Q. robur* [288].

**Tableau 52** : Composé identifié par GC-MS dans l'extrait QP1\_ha

Extrait	Composé	RI calculé <sup>(1)</sup> / RI littérature	Références
QP1_ha	6,10,14-triméthyl-2-pentadécane	1827/1830	Décrite dans l'huile essentielle de feuilles de <i>Q. robur</i> [288]

<sup>(1)</sup> RI = indice de rétention déterminé sur colonne HP-1 à l'aide d'une série d'alcane (C8-C24) et comparé aux RI disponibles dans la littérature

L'étude de cet extrait par HPTLC a permis de caractériser un certain nombre de composés du groupe A : il s'agit principalement de sucres dont les 3 majoritaires ont été identifiés (glucose, saccharose et fructose) (Figure 126). Les composés du groupe B sont principalement des flavonoïdes. La présence de composés lipophiles (terpénoïdes) a également été mise en évidence dans cet extrait. Seul un composé a été identifié par GC-MS.



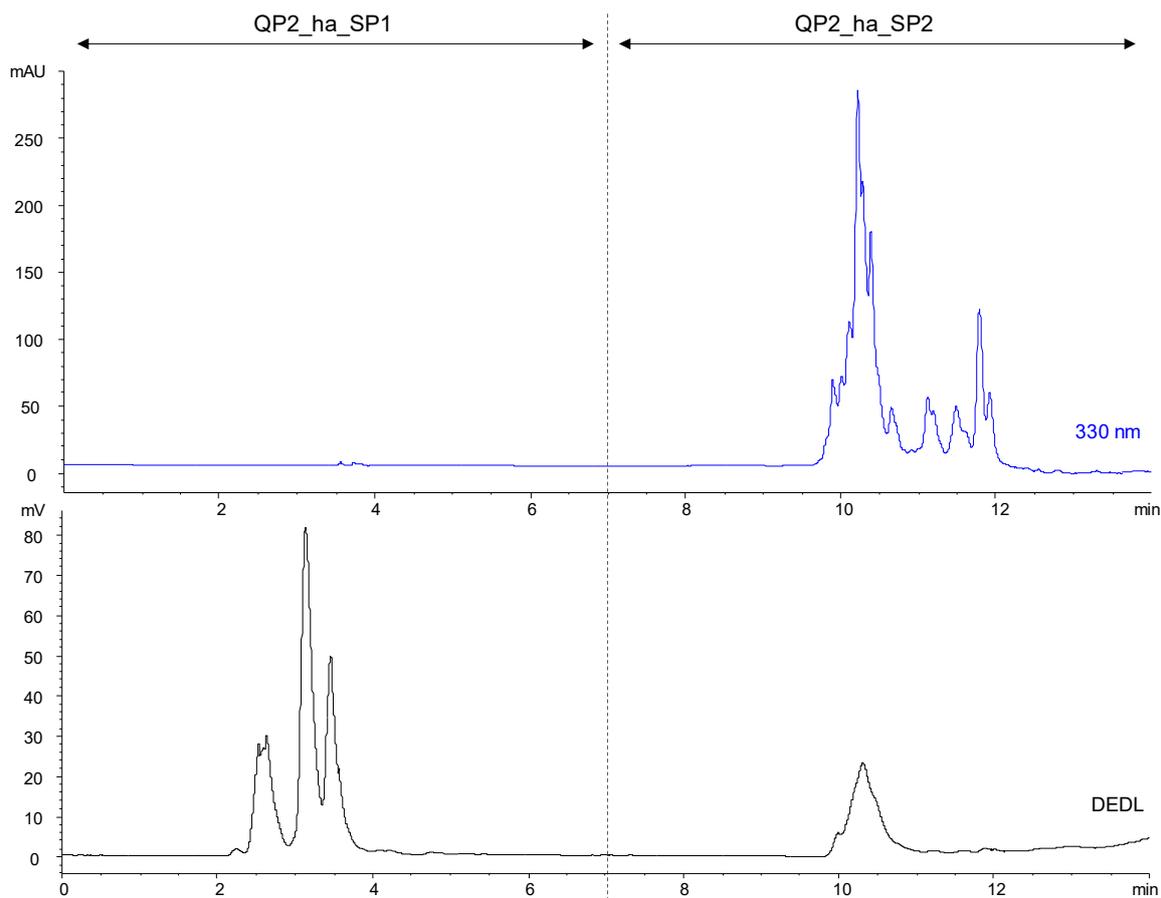
**Figure 126 :** Informations obtenues suite à la caractérisation phytochimique de l'extrait QP1\_ha (rouge : composé identifié)

#### 4.2.2.3. Isolement des groupes de composés A et B

Afin d'identifier quel(s) groupe(s) de composés est/sont responsable(s) des activités biologiques de cet extrait de chêne, une séparation des composés du groupe A, de ceux du groupe B, à partir de l'extrait QP2\_ha a été entreprise. D'après l'étude comparative des techniques de séparation présentée dans le chapitre 3 (paragraphe 3.2.2.4), la SPE aurait été la méthode de choix pour une telle séparation. Cependant, cette méthode n'étant pas optimisée au moment de cette étude, l'HPLC semi-préparative a été sélectionnée comme technique de séparation.

A partir du profil HPLC de l'extrait QP2\_ha (Figure 122), les conditions de séparation des deux groupes de composés A et B ont été optimisées (Figure 127). Deux fractions QP2\_ha\_SP1 et QP2\_ha\_SP2 ont été collectées par HPLC semi-préparative à partir de cet extrait.

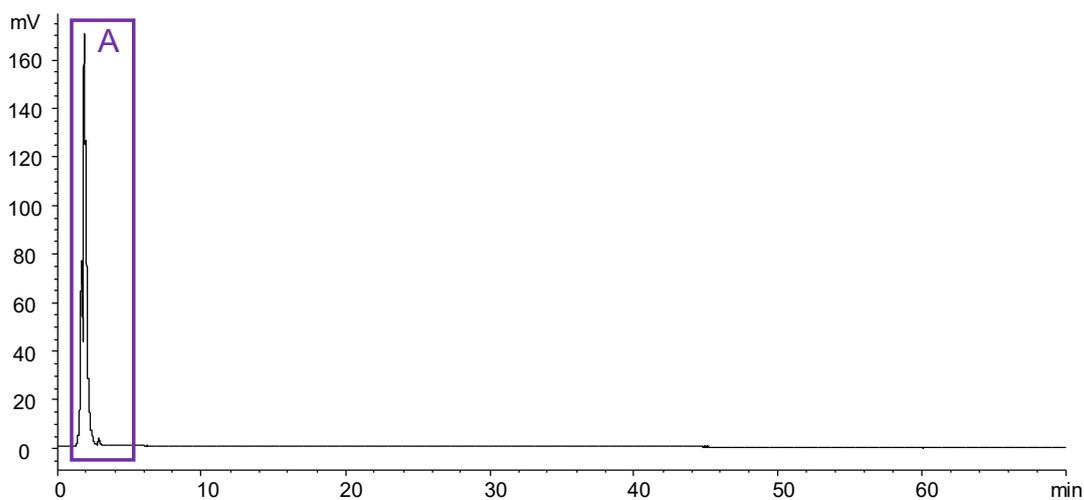
La fraction QP2\_ha\_SP1, composée uniquement du groupe de composés A (Figure 128) est obtenue avec un rendement de 60 % (Tableau 53). La fraction QP2\_ha\_SP2, obtenue avec un rendement de 36 %, est constituée des deux groupes de composés A et B (Figure 129). Au total, cette séparation a été obtenue avec un rendement de 96 %. L'hypothèse de composés retenus dans la colonne semi-préparative lors des nombreuses injections ayant été écartée par injection de méthanol pur, les pertes de matières observées peuvent s'expliquer par les incertitudes de pesée liées aux faibles quantités de matière obtenues. Selon les conditions de séparation utilisées pour la séparation des deux groupes de composés (Figure 127), la fraction QP2\_ha\_SP2 ne devrait pas contenir de composés du groupe A. Retrouvé dans le volume mort, ce groupe de composés devrait être recueilli uniquement dans la fraction QP2\_ha\_SP1. L'hypothèse concernant la dégradation des composés de type dérivés glycosylés, déjà émise lors de l'étude de l'extrait de germandrée, pourrait également expliquer ces observations.



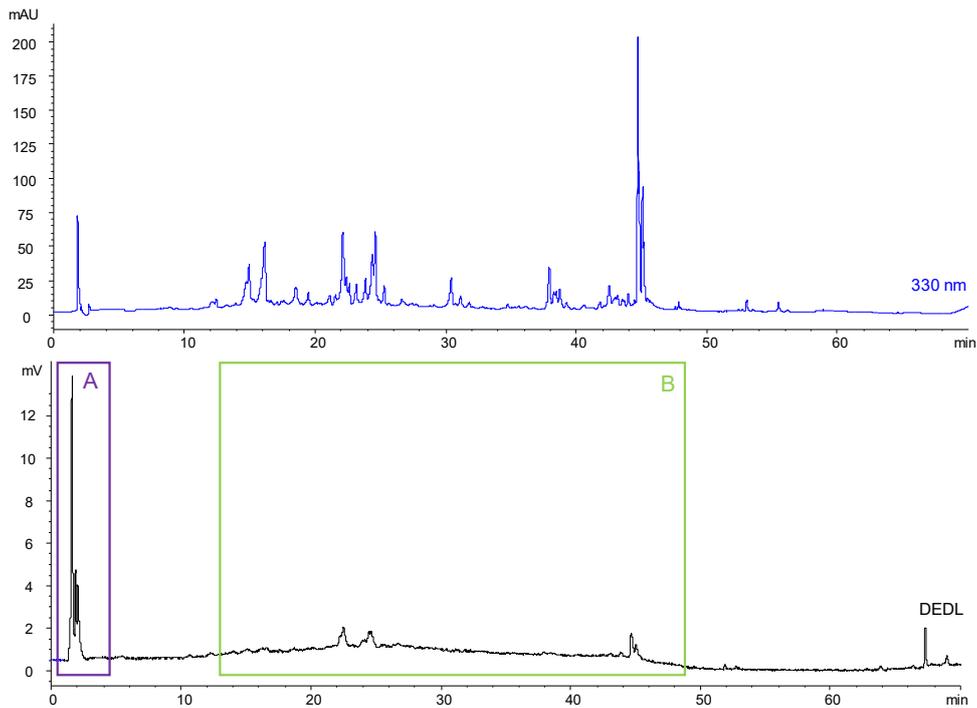
**Figure 127** : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 330 nm obtenus sur colonne semi-préparative C18 Luna® pour séparer les groupes de composés A et B de l'extrait QP2\_ha (gradient B, paragraphe 5.2.1.3)

**Tableau 53**: Conditions opératoires et rendements obtenus pour la séparation des groupes de composés A et B de l'extrait QP2\_ha par HPLC semi-préparative

Masse QP2_ha	Volume de solvant	Masses obtenues		Rendement
		QP2_ha SP1	QP2_ha SP2	
100 mg	1120 mL	60 mg	36 mg	60 %
				36 %

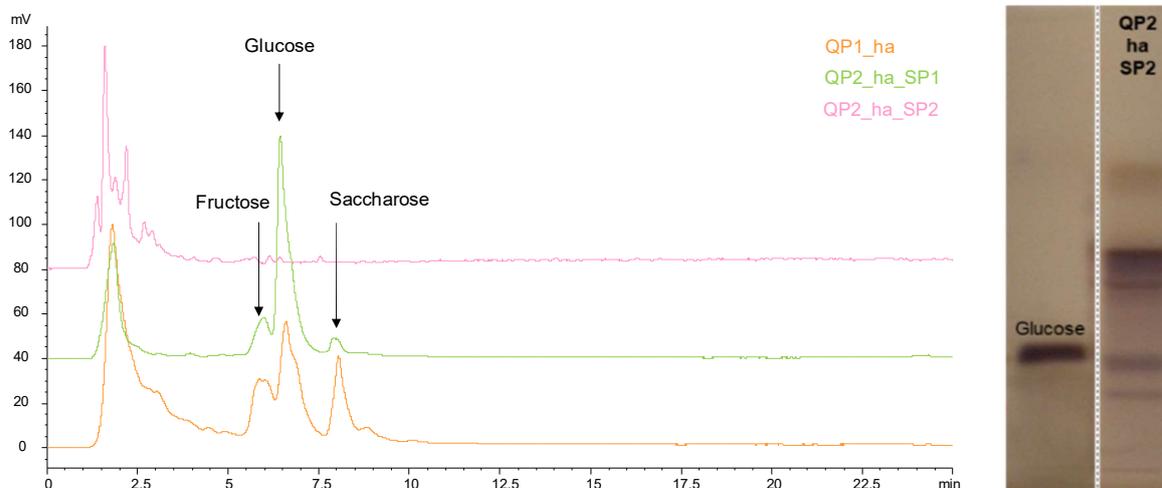


**Figure 128** : Chromatogramme HPLC/DEDL de la fraction QP2\_ha\_SP1



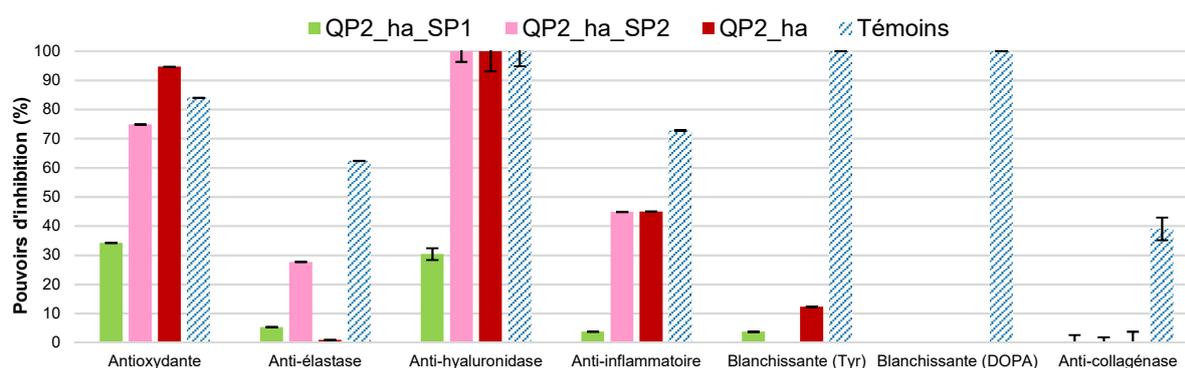
**Figure 129** : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 330 nm de la fraction QP2\_ha\_SP2

Afin de caractériser les composés du groupe A et de tenter de comprendre leur présence simultanée dans ces deux fractions obtenues par HPLC semi-préparative, ces fractions ont été analysées par HPLC/DEDL sur colonne NH<sub>2</sub> (Figure 130). La fraction QP2\_ha\_SP1 présente une composition comparable à celle de l'extrait brut, caractérisée par la présence des trois sucres identifiés précédemment (le fructose, le glucose et le saccharose). En revanche, la fraction QP2\_ha\_SP2 est caractérisée par la présence de composés moins polaires (temps d'éluion compris entre 1 et 3 minutes). Cette différence de composition est confirmée par analyse par HPTLC de cette fraction (Figure 130). Ces observations vont dans le sens de l'hypothèse formulée sur l'éventuelle dégradation de composés glycosylés, qui reste toutefois à confirmer par des études complémentaires.



**Figure 130** : Chromatogrammes HPLC/DEDL de l'extrait brut et des fractions QP2\_ha\_SP1 et QP2\_ha\_SP2 sur colonne NH<sub>2</sub> Luna® et étude des glucides de l'extrait QP2\_ha\_SP2 par HPTLC (révélation à la lumière blanche après dérivatisation avec l'orcinol)

Les activités biologiques de ces deux fractions ont été évaluées à l'aide des tests *in vitro* (Figure 131). La fraction QP2\_ha\_SP1 présente de faibles activités antioxydantes et anti-hyaluronidase : les composés du groupe A qui la constituent, ne seraient donc pas responsables des activités de l'extrait brut. La fraction QP2\_ha\_SP2, composée d'un mélange des deux groupes de composés, présente quant à elle, des activités anti-hyaluronidase et anti-inflammatoires similaires à celles de l'extrait brut, et une activité antioxydante légèrement plus faible. Elle présente par ailleurs une activité anti-élastase relativement faible, mais supérieure à celle de l'extrait brut. Les composés du groupe B seraient donc principalement responsables des activités de l'extrait brut, puisque la fraction QP2\_ha\_SP2, enrichie en ces composés, présente des activités au moins similaires à celles de l'extrait brut.



**Figure 131 :** Activités biologiques des fractions QP2\_ha\_SP1 et QP2\_ha\_SP2

La séparation des groupes de composés A et B présents dans l'extrait hydroalcoolique de chêne par HPLC semi-préparative a permis d'isoler une partie des composés du groupe A. L'analyse des fractions obtenues permet d'émettre l'hypothèse que les composés du groupe B sont principalement responsables des activités de l'extrait brut.

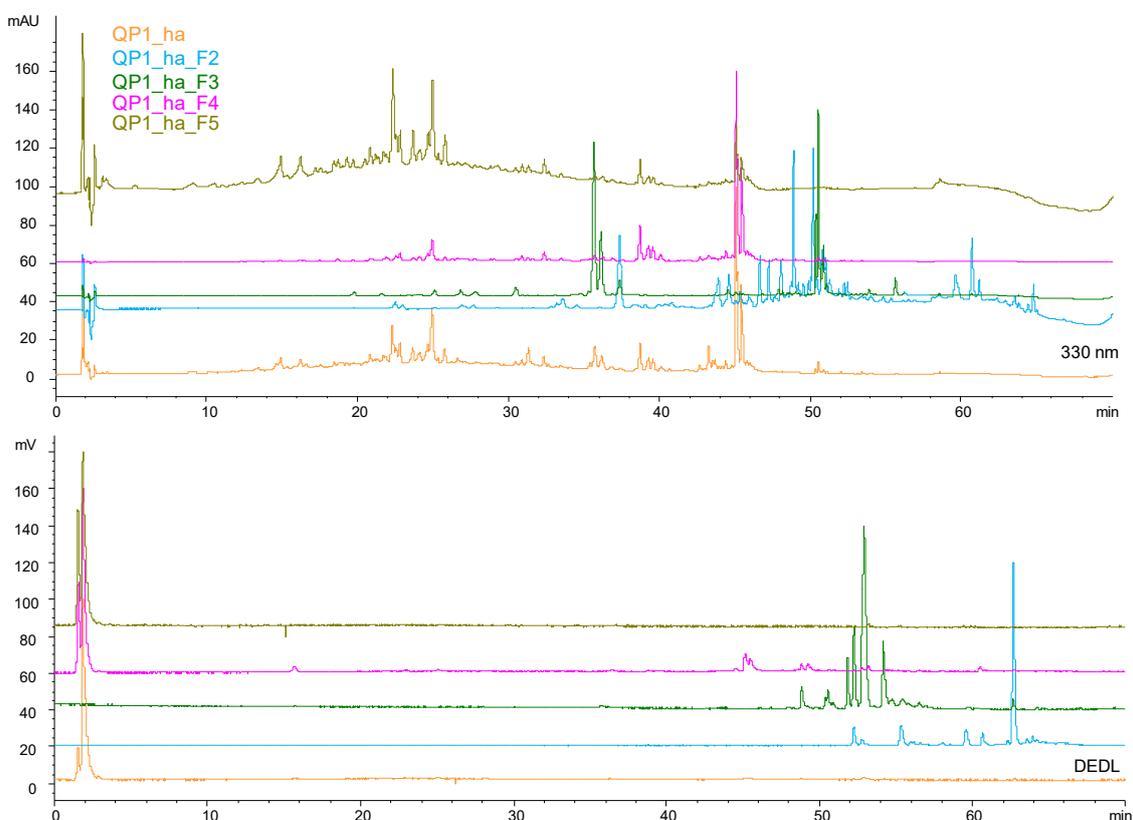
#### 4.2.2.4. Fractionnement bioguidé de l'extrait QP1\_ha

Afin de poursuivre la caractérisation de l'extrait de chêne et d'identifier les composés du groupe B, un fractionnement bioguidé a été réalisé à partir de l'extrait QP1\_ha. Ce fractionnement a été réalisé sur colonne ouverte de silice en phase normale après dépôt solide de l'extrait. Cinq solvants/mélanges de solvants de polarité croissante ont été utilisés pour ce fractionnement, et ont permis d'obtenir des fractions avec des rendements très variés (Tableau 54).

**Tableau 54 :** Conditions expérimentales et rendements du fractionnement de QP1\_ha

Fraction	Solvant	Masse	Rendement
Extrait brut	/	3550 mg	/
QP1_ha_F1	Cyclohexane	< 1 mg	< 0,1 %
QP1_ha_F2	Cyclohexane/éther diéthylique (50/50 v/v)	34 mg	1,0 %
QP1_ha_F3	Éther diéthylique	150 mg	4,2 %
QP1_ha_F4	MeOH	304 mg	28,5 %
QP1_ha_F5	MeOH/H <sub>2</sub> O (50/50 v/v)	2300 mg	66,0 %

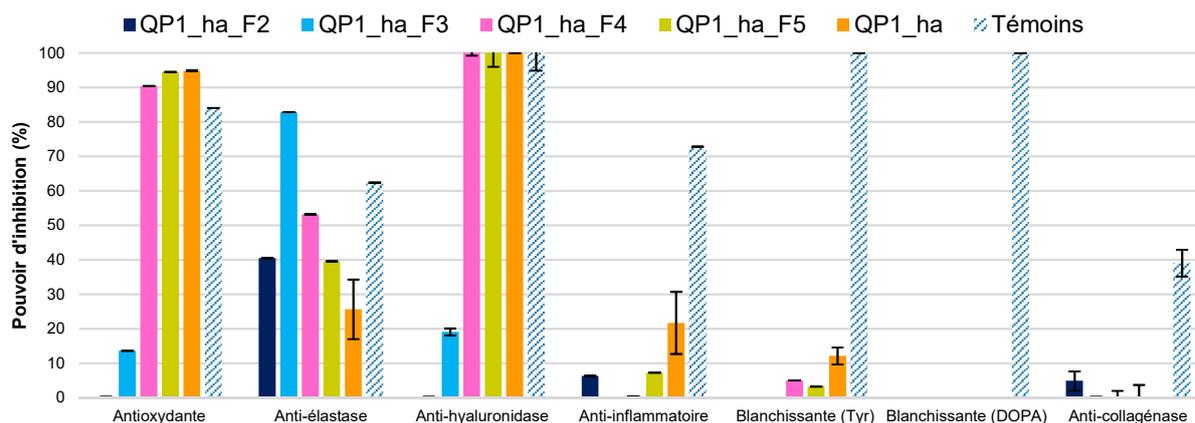
Les compositions phytochimiques des fractions obtenues étant différentes (Figure 132), elles présentent par conséquent des activités biologiques variées (Figure 133). L'analyse de la fraction QP1\_ha\_F1, obtenue avec un très faible rendement (< 0,1 %), n'a pas été poursuivie.



**Figure 132** : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 330 nm des fractions obtenues par fractionnement sur colonne ouverte de silice de l'extrait QP1\_ha

Deux groupes de fractions se distinguent selon leurs activités. Les fractions QP1\_ha\_F2 et QP1\_ha\_F3 se distinguent par leurs activités anti-élastase, supérieures à celles de l'extrait brut. Les fractions QP1\_ha\_F4 et QP1\_ha\_F5 se démarquent par un pouvoir antioxydant et un potentiel d'inhibition de la hyaluronidase similaires à ceux de l'extrait brut, ainsi que des activités anti-élastase supérieures à celles de ce dernier.

Afin d'expliquer ces activités et d'identifier les actifs, les fractions ont été analysées par différentes techniques de caractérisation (HPTLC, GC-MS, HPLC-DAD/DEDL et HPLC-MS). Leurs compositions ont été comparées selon les similitudes mises en évidence précédemment, à savoir les fractions QP1\_ha\_F2 et QP1\_ha\_F3 d'une part, et les fractions QP1\_ha\_F4 et QP1\_ha\_F5 d'autre part.

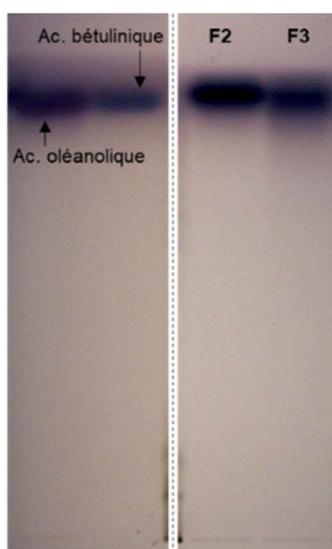


**Figure 133** : Activités biologiques des fractions obtenues par fractionnement de l'extrait QP1\_ha

#### 4.2.2.4.1. Caractérisation phytochimique des fractions QP1\_ha\_F2 et QP1\_ha\_F3

Ces deux fractions, caractérisées par des activités anti-élastase intéressantes, ont été obtenues avec des rendements inférieurs à 5,0 %. Leur analyse par HPTLC dans les mêmes conditions que l'extrait brut a permis d'identifier certains composés.

L'anisaldéhyde a révélé la présence de composés peu polaires, présents en faible concentration dans l'extrait brut. Ces fractions sont caractérisées par la présence d'une bande intense, correspondant à l'acide bétulinique et/ou l'acide oléanolique. L'utilisation d'une phase mobile plus adaptée permettrait d'améliorer la séparation de ces deux triterpénoïdes présentant des temps de rétention trop proches dans ces conditions d'étude pour les distinguer.



**Figure 134** : Etude des composés peu polaires des fractions QP1\_ha\_F2 et QP1\_ha\_F3 par HPTLC (révélation à la lumière blanche après dérivation avec l'anisaldéhyde)

La révélation à l'aide du réactif de Neu suivie d'une dérivation au PEG, a permis de mettre en évidence la faible teneur en flavonoïdes peu polaires de ces fractions. Ces derniers présentent

un rapport frontal important, ce qui traduit leur forte affinité avec la phase mobile relativement apolaire (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 90/20/1,5 v/v/v).

Des analyses par GC-MS de ces deux fractions ont été menées afin de compléter cette caractérisation phytochimique. Quatre composés déjà décrits dans le genre *Quercus* ont été caractérisés dans la fraction QP1\_ha\_F2 (Tableau 55), parmi lesquels, la 6,10,14-triméthyl-2-pentadécane, préalablement identifiée dans l'extrait brut QP1\_ha.

**Tableau 55** : Composés identifiés par GC-MS de la fraction QP1\_ha\_F2

Composé	RI calculé <sup>(1)</sup> / RI littérature	Références	Activités biologiques <sup>(2)</sup>
6,10,14-triméthyl-2-pentadécane	1829/1830	Décrite dans l'huile essentielle de feuilles de <i>Q. robur</i> [288]	Non évaluées
Palmitate d'éthyle	1975/1978	Décrit dans un extrait de copeaux de bois de <i>Q. petraea</i> [289]	Anti-inflammatoire (30,73 ± 0,01 %)
Linoléate d'éthyle	2138/2139	Décrit dans un extrait de copeaux de bois de <i>Q. petraea</i> et <i>Q. alba</i> [289]	Non évaluées
Oléate d'éthyle	2151/2150	Décrit dans un extrait de copeaux de bois de <i>Q. petraea</i> et <i>Q. alba</i> [289]	Non évaluées

<sup>(1)</sup> RI = indice de rétention déterminé sur colonne HP-1 à l'aide d'une série d'alcane (C8-C24) et comparé aux RI disponibles dans la littérature – <sup>(2)</sup> évaluées selon les tests in vitro

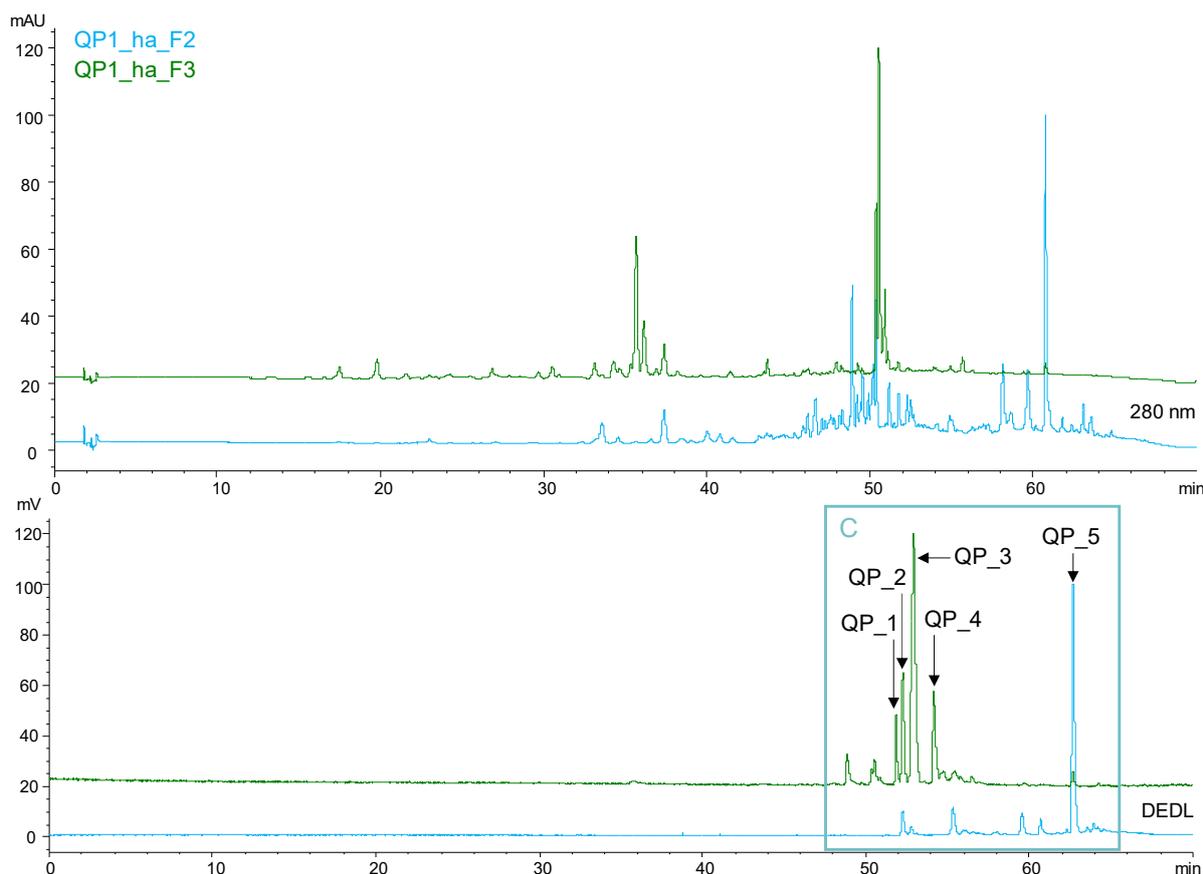
Sept composés ont été identifiés par GC-MS dans la fraction QP1\_ha\_F3, parmi lesquels 6 ont déjà été décrits dans des huiles essentielles ou extraits du genre *Quercus* (Tableau 56).

**Tableau 56** : Composés identifiés par GC-MS de la fraction QP1\_ha\_F3

Composé	RI calculé <sup>(1)</sup> / RI littérature	Références	Activités biologiques <sup>(2)</sup>
Nonanal	1081/1082	Décrit dans les extraits de bois de <i>Q. pyrenaica</i> et <i>Q. petraea</i> [290], ainsi que dans les huiles essentielles de feuilles de <i>Q. agrifolia</i> et <i>Q. robur</i> [288, 291]	Anti-élastase (52,08 ± 0,02 %)
Dihydroactinidiolide	1481/1475	Décrit dans l'huile essentielle de feuilles de <i>Q. dentata</i> [292]	Non évaluées
Acide laurique	1543/1547	Décrit dans les extraits de bois de <i>Q. robur</i> et <i>Q. petraea</i> [293]	Anti-hyaluronidase (69 ± 8 %)
Acide myristique	1743/1750	Décrit dans les extraits de bois de <i>Q. robur</i> and <i>Q. petraea</i> [293], tout comme dans l'huile essentielle de feuilles de <i>Q. robur</i> [288]	Aucune
Palmitate de méthyle	1903/1909	Non décrit dans le genre <i>Quercus</i>	Anti-inflammatoire (30,73 ± 0,01 %)
Acide palmitique	1945/1940	Décrit dans les extraits de bois de <i>Q. robur</i> , <i>Q. petraea</i> and <i>Q. alba</i> [293, 294] et dans l'huile essentielle de feuilles de <i>Q. robur</i> [288]	Anti-hyaluronidase (52,00 ± 12,00 %)
Acide linoléique	2105/2109	Décrit dans les extraits de bois de <i>Q. robur</i> , <i>Q. petraea</i> et <i>Q. alba</i> [293, 294]	Anti-inflammatoire (58,42 ± 0,01 %) et anti-hyaluronidase (99,00 ± 11,00 %)

RI = indice de rétention déterminé sur colonne HP-1 à l'aide d'une série d'alcane (C8-C24) et comparé aux RI disponibles dans la littérature – <sup>(2)</sup> évaluées selon les tests in vitro

La présence de composés peu polaires dans ces fractions est confirmée lors des analyses par HPLC : elles sont caractérisées par la présence d'un groupe de composés lipophiles, appelé groupe C (Figure 135). La présence de ce groupe de composés n'avait pas été mise en évidence dans l'extrait brut en raison de leur faible teneur puisque ces fractions sont obtenues avec un faible rendement. D'après leurs spectres UV, ils correspondraient à des terpénoïdes et des acides gras. Ce groupe de composés est responsable des activités anti-élastase de ces fractions (Figure 135). Cinq composés principaux ont été mis en évidence parmi ces composés du groupe C, numérotés QP\_1 à QP\_5.



**Figure 135** : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 280 nm des fractions QP1\_ha\_F2 et QP1\_ha\_F3

Les co-injections des standards analytiques correspondant aux composés mis en évidence lors des analyses par HPTLC et par GC-MS ont permis de confirmer l'identification de 4 de ces composés. Le composé **QP\_2** correspond à l'**acide bétulinique**, un triterpène qui n'a jamais été décrit dans l'espèce *Q. pubescens* dans la littérature. Cependant, on le retrouve dans de nombreuses espèces du genre *Quercus*, notamment dans un extrait d'écorces de *Q. incana* [295]. Ses activités ont été testées (standard disponible au laboratoire) : il présente de fortes activités anti-élastase ( $77,14 \pm 0,01$  %), anti-hyaluronidase ( $51,00 \pm 3,00$  %) et anti-collagénase ( $47,00 \pm 1,00$  %). Si les activités anti-élastase [220] et anti-collagénase [221] de ce composé ont déjà été décrites dans la littérature, son activité anti-hyaluronidase n'avait jamais été mise en évidence auparavant. La teneur en acide bétulinique dans ces fractions a été estimée par étalonnage externe à 1,9 % dans la fraction QP2\_ha\_F2 et à 1,5 % dans la fraction QP2\_ha\_F3.

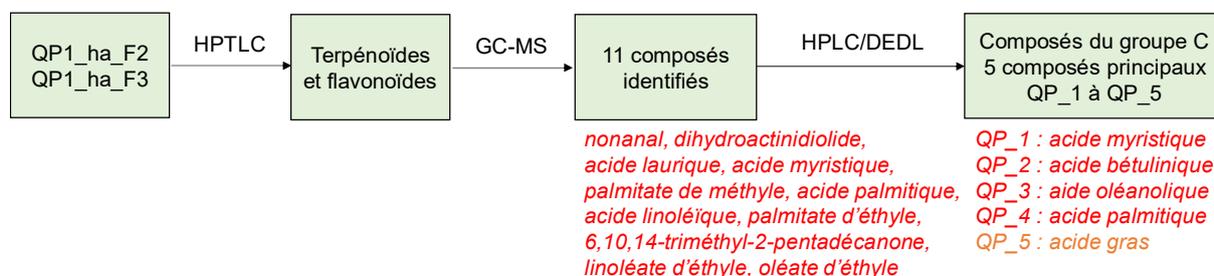
Le composé **QP\_3** correspond quant à lui à l'**acide oléanolique**, dont la présence a déjà été décrite dans un extrait de *Q. semicarpifolia* [296]. Ses activités ont également été évaluées : il présente des activités anti-inflammatoires ( $53,93 \pm 0,01$  %) et anti-élastase ( $49,09 \pm 0,02$  %), déjà décrites dans la littérature [218, 219]. Sa teneur a été estimée par étalonnage externe à 0,02 % dans la fraction QP1\_ha\_F2 et à 1,7 % dans la fraction QP1\_ha\_F3.

Le composé **QP\_1** est identifié comme étant l'**acide myristique**. Dans le chapitre 3, La co-élution de ce composé avec l'acide bétulinique a été mise en évidence dans la fraction TL\_ha\_F2. Les variabilités de séparation observées lors des analyses par HPLC, les temps de rétention très proches de ces deux composés, ainsi que leurs teneurs (influençant la largeur des pics) peuvent expliquer ces différences de séparation observées lors de ces deux études. Le composé **QP\_4** a été identifié comme correspondant à l'**acide palmitique** ; sa teneur a été estimée par étalonnage externe à 4,2 % dans la fraction QP1\_ha\_F3. Il contribuerait aux activités anti-hyaluronidase.

Le nonanal, l'acide laurique et le palmitate de méthyle, identifiés par GC-MS, correspondent eux, aux composés éluant entre 50 et 52 minutes (Figure 135). Cependant, en tenant compte de leurs faibles concentrations, il est difficile de les identifier de manière certaine par HPLC/DEDL.

Afin d'identifier le composé QP\_5, majoritaire dans la fraction QP1\_ha\_F2, les standards analytiques de palmitate d'éthyle, de linoléate d'éthyle et d'oléate d'éthyle qui avaient été identifiés dans cette fraction par GC-MS ont été co-injectés : aucun ne correspond à QP\_5. D'après son spectre UV, ce composé correspondrait à un acide gras ; il doit être isolé afin de le caractériser.

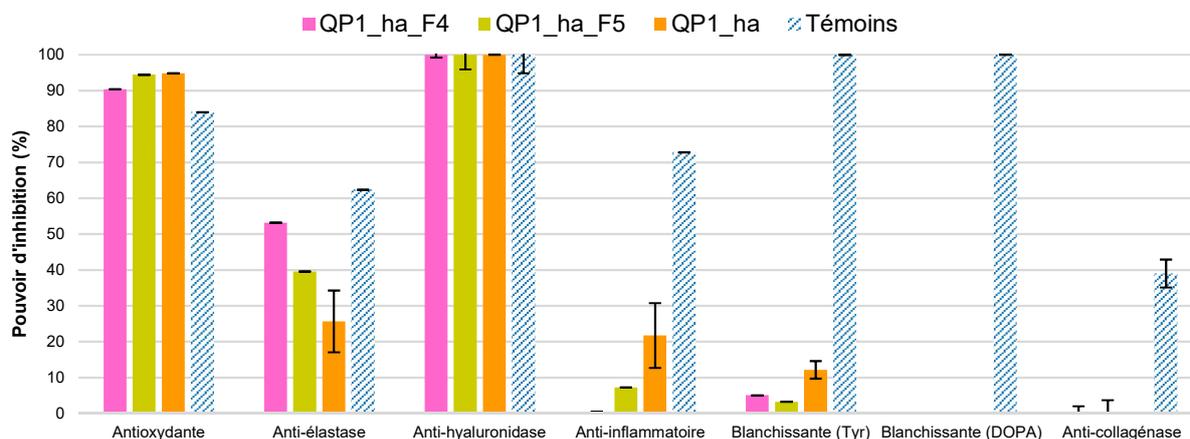
Les fractions QP1\_ha\_F2 et QP1\_ha\_F3 obtenues avec un faible rendement, sont composées principalement de molécules lipophiles du groupe C, correspondant à des terpénoïdes et des acides gras (Figure 136). Ils ont été identifiés comme responsables des activités anti-élastase de ces fractions. Cinq composés principaux ont été mis en évidence, parmi lesquels 4 ont été identifiés : l'acide myristique (QP\_1), l'acide bétulinique (QP\_2), l'acide oléanolique (QP\_3) et l'acide palmitique (QP\_4). Le composé QP\_5 reste à identifier pour compléter cette étude. Les analyses par GC-MS ont permis l'identification de 4 composés dans la fraction QP1\_ha\_F2, dont l'un avait déjà été identifié dans l'extrait brut, et de 7 composés dans la fraction QP1\_ha\_F3.



**Figure 136** : Informations obtenues suite à la caractérisation phytochimique des fractions QP1\_ha\_F2 et QP1\_ha\_F3 (rouge : composé identifié, orange : composé à identifier)

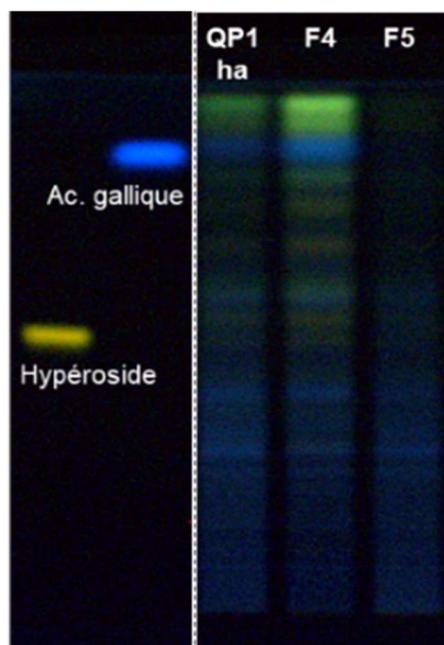
#### 4.2.2.4.2. Caractérisation phytochimique des fractions QP1\_ha\_F4 et QP1\_ha\_F5

Les fractions QP1\_ha\_F4 et QP1\_ha\_F5 sont obtenues avec des rendements très intéressants. Elles présentent des activités antioxydantes et anti-hyaluronidase fortes, comparables à celles de l'extrait brut ainsi que des activités anti-élastase (Figure 137).



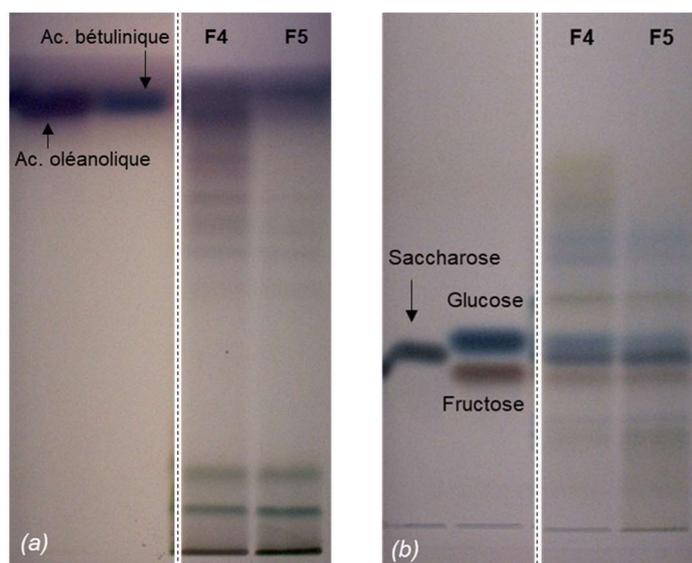
**Figure 137** : Activités biologiques des fractions QP1\_ha\_F4 et QP1\_ha\_F5

Les analyses par HPTLC de ces deux fractions ont montré certaines similarités phytochimiques avec l'extrait brut. Les révélations avec le réactif de Neu et le PEG 400 ont permis de mettre en évidence la présence en faible concentration de flavonoïdes de natures variées dans la fraction QP1\_ha\_F4 (Figure 138). L'intensité des bandes correspondantes montre toutefois que cette fraction a été enrichie en ces composés par rapport à l'extrait brut. La fraction QP1\_ha\_F5 semble également composée de polyphénols en très faible quantité.



**Figure 138** : Etude des polyphénols et flavonoïdes des fractions QP1\_ha\_F4 et QP1\_ha\_F5 (révélation à 366 nm après dérivations avec le réactif de Neu et le PEG)

La dérivation avec l'anisaldéhyde a révélé la présence de composés peu polaires dans ces fractions (Figure 139). Elles sont également composées des sucres mis en évidence dans l'extrait brut, et notamment les 3 principaux identifiés : le fructose, le glucose et le saccharose (Figure 139).



**Figure 139** : Etude des composés peu polaires (a) et des glucides (b) des fractions QP1\_ha\_F4 et QP1\_ha\_F5 (révélation à la lumière blanche après dérivation avec l'anisaldéhyde (a) et avec la DAPA (b))

Peu de composés volatils ont été identifiés par GC-MS dans ces fractions (Tableau 57). La 6,10,14-triméthyl-2-pentadécane, précédemment identifiée dans l'extrait brut a été identifiée dans la fraction QP1\_ha\_F4. Le 2,3-dihydrobenzofurane, non décrite jusqu'à présent dans le genre *Quercus*, a également été identifié dans cette fraction. Le furfural, déjà décrit dans les bois de *Q. suber* [297], ainsi que l'alcool correspondant, l'alcool furfurylique, ont quant à eux été identifiés dans la fraction QP1\_ha\_F5.

**Tableau 57** : Composés identifiés par GC-MS dans les fractions QP1\_ha\_F4 et QP1\_ha\_F5

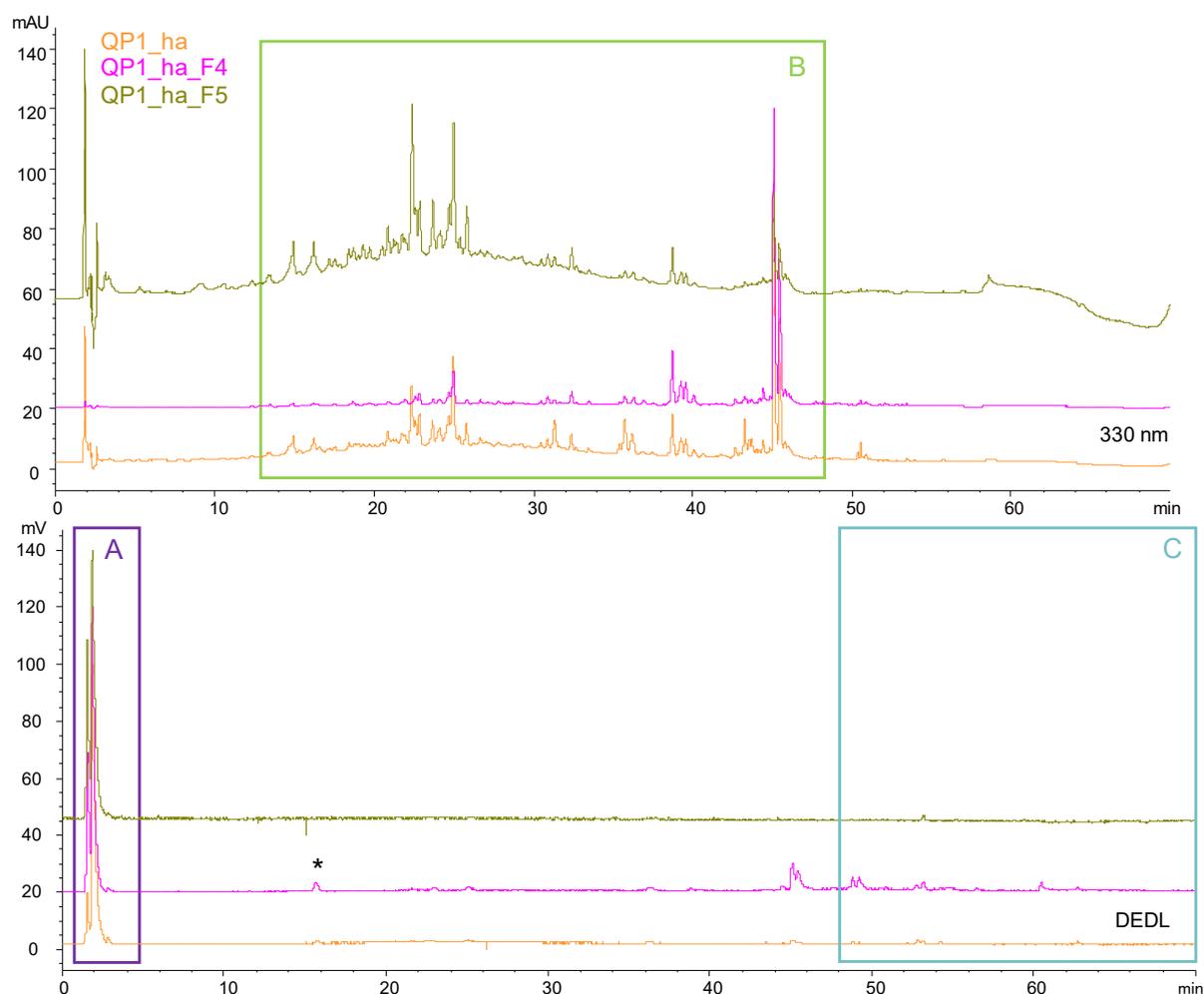
Composé	RI calculé <sup>(1)</sup> / RI littérature	Références	Activités biologiques <sup>(2)</sup>
<b>Fraction QP1_ha_F4</b>			
2,3-dihydrobenzofurane	1197/1188	Non décrit dans le genre <i>Quercus</i>	Aucune
6,10,14-triméthyl-2-pentadécane	1827/1830	Décrite dans l'huile essentielle de feuilles de <i>Q. robur</i> [288]	Aucune
<b>Fraction QP1_ha_F5</b>			
Furfural	805/805	Décrit dans les bois de <i>Q. suber</i> [297]	Activité anti-inflammatoire (52,59 ± 0,05 %)
Alcool furfurylique	838/835	Non décrit dans le genre <i>Quercus</i>	Aucune

<sup>(1)</sup> RI = indice de rétention déterminé sur colonne HP-1 à l'aide d'une série d'alcane (C8-C24) et comparé aux RI disponibles dans la littérature – <sup>(2)</sup> évaluées selon les tests in vitro

Comme cela avait déjà été mis en évidence lors des analyses par HPTLC, les profils phytochimiques de ces fractions sont comparables à celui de l'extrait brut (Figure 140). Elles sont caractérisées par la présence majoritaire de composés du groupe A, ainsi que par la

présence moindre des composés du groupe B. Quelques composés peu polaires du groupe C semblent également présents, notamment dans la fraction QP1\_ha\_F4.

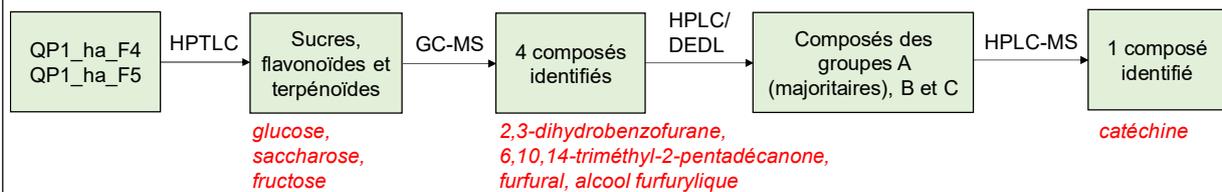
Suite aux conclusions énoncées lors de l'étude des groupes de composés A et B, les activités antioxydantes et anti-hyaluronidase de ces fractions sont liées à la présence des composés du groupe B. Les activités anti-élastase sont quant à elles, dues à la présence des composés du groupe C, d'après l'étude des fractions QP1\_ha\_F2 et QP1\_ha\_F3.



**Figure 140** : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 330 nm des fractions QP1\_ha\_F4 et QP1\_ha\_F5

L'analyse par LC-MS de ces fractions a permis d'identifier la catéchine dans la fraction QP1\_ha\_F4, une identification confirmée par co-injection du standard analytique par HPLC, (marqué par un astérisque sur la Figure 140). Ce flavanol a déjà été décrit dans le genre *Quercus*, notamment dans une décoction d'écorces de *Q. robur* [298]. Les activités biologiques du standard analytique ont été évaluées : la catéchine présente de fortes activités antioxydantes ( $95,09 \pm 0,01$  %) et anti-inflammatoires ( $87,89 \pm 0,01$  %), toutes deux déjà décrites dans la littérature [299, 300].

Les fractions QP1\_ha\_F4 et QP1\_ha\_F5 présentent des profils comparables à celui de l'extrait brut, caractérisés par la présence majoritaire des molécules du groupe A, et notamment des sucres déjà identifiés dans l'extrait brut (Figure 141). Ces fractions contiennent également des composés du groupe B de types flavonoïdes qui contribuent aux activités antioxydantes et anti-hyaluronidase. La catéchine a d'ailleurs été identifiée dans la fraction QP1\_ha\_F4. Des composés peu polaires du groupe C ont également été mis en évidence dans ces fractions ; ils ont été identifiés comme responsables des activités anti-élastase de ces fractions. Les analyses par GC-MS ont, quant à elles, permis la caractérisation de quelques composés volatils.

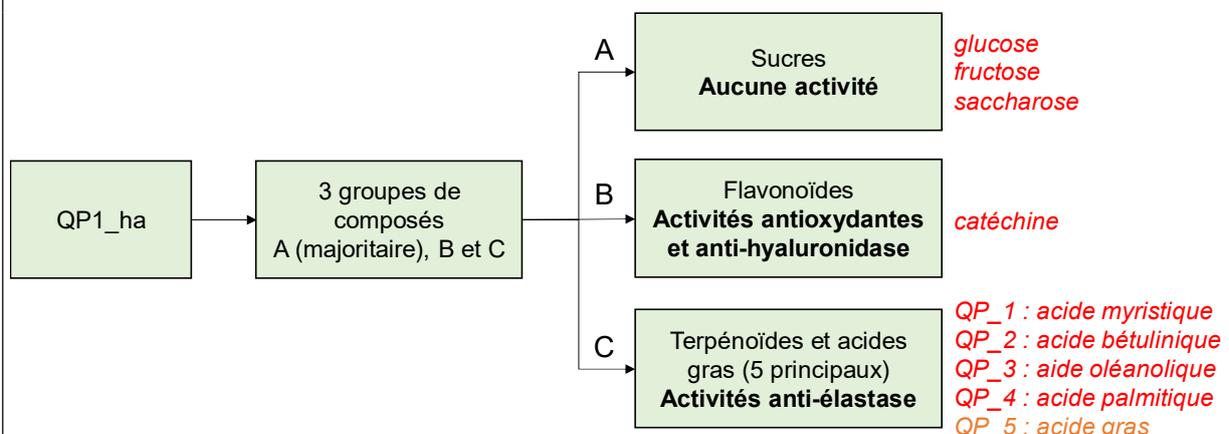


**Figure 141 :** Informations obtenues suite à la caractérisation phytochimique des fractions QP1\_ha\_F4 et QP1\_ha\_F5 (rouge : composé identifié)

L'extrait hydroalcoolique de chêne pubescent est composé majoritairement de composés polaires du groupe A, ainsi que de composés des groupes B et C (Figure 142). Il présente des activités antioxydantes et anti-hyaluronidase très intéressantes, ainsi qu'une activité anti-élastase plus modérée.

Le groupe de molécules A, composé principalement de sucres (fructose, glucose, saccharose), n'est pas responsable des activités de cet extrait. En revanche, les composés du groupe B (flavonoïdes) contribuent aux activités antioxydantes et anti-hyaluronidase. Les composés du groupe C (terpénoïdes et acides gras) sont quant à eux, responsables des activités anti-élastase.

Parmi les 5 composés principaux du groupe C, 4 ont été identifiés comme étant les acides oléanolique, bétulinique, palmitique et myristique. Le dernier composé doit être isolé afin d'être caractérisé par RMN.



**Figure 142 :** Informations obtenues suite à la caractérisation phytochimique des fractions (rouge : composé identifié, orange : composé à identifier)

#### 4.2.2.5. Optimisation des conditions d'extraction

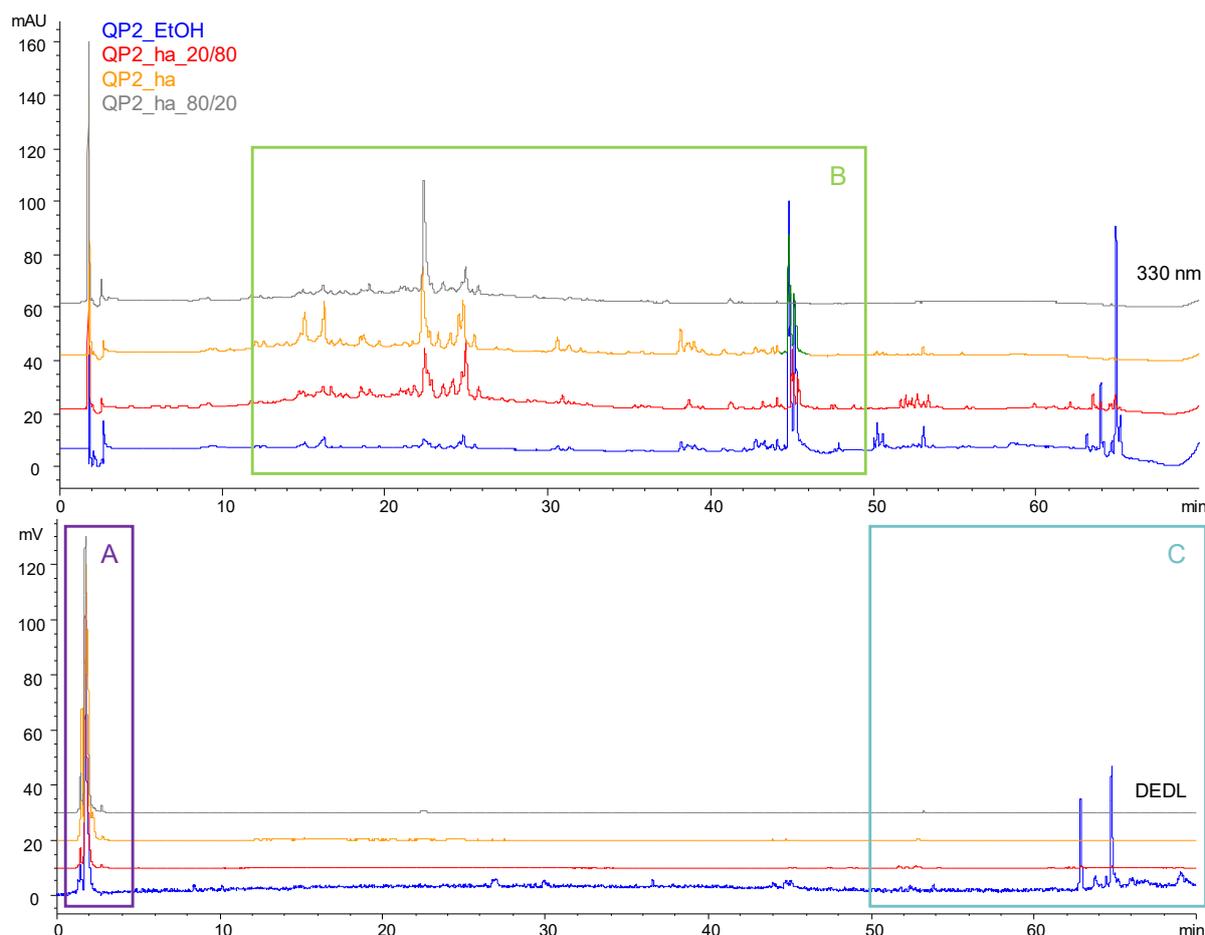
La caractérisation de l'extrait hydroalcoolique de chêne truffier a permis de relier les activités de cet extrait à la présence des composés du groupe B, principalement dans les fractions polaires, ainsi que des composés du groupe C, retrouvés principalement dans les fractions plus apolaires. Afin d'extraire majoritairement ces deux groupes de composés d'intérêt et de limiter l'extraction des composés du groupe A, l'influence du solvant d'extraction a été étudiée en faisant varier le ratio eau/éthanol. Les extractions ont été réalisées en triplicat par macération des parties aériennes de chêne pubescent (collectées dans le Parc Valrose, Nice en 2017) dans le solvant sélectionné, à température ambiante pendant 2 h. Les rendements d'extraction sont fonction du solvant utilisé et sont donc très différents les uns des autres (Tableau 58) : le meilleur rendement a été obtenu pour l'extrait QP2\_ha obtenu avec un mélange H<sub>2</sub>O/EtOH (50/50 m/m).

**Tableau 58** : Conditions expérimentales et rendements obtenus pour les extraits hydroalcooliques de parties aériennes de chêne pubescent

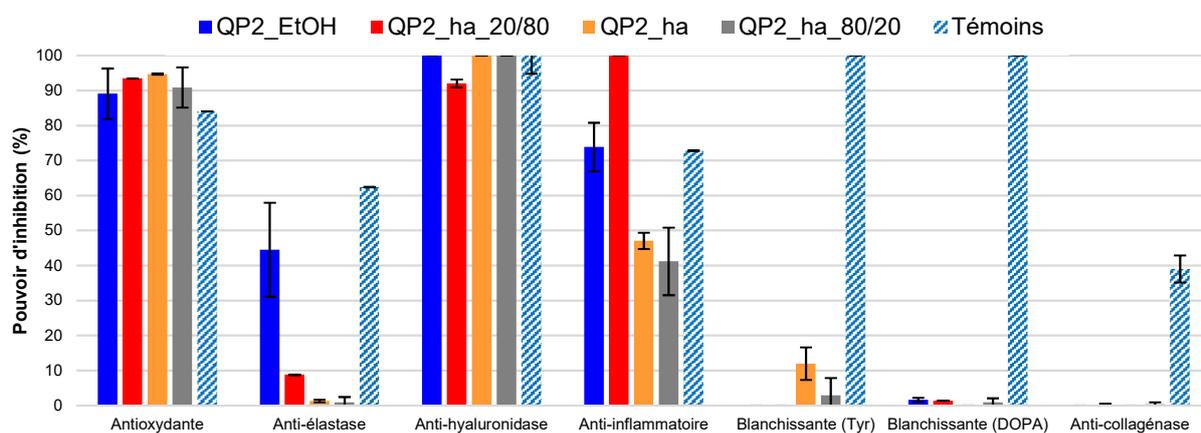
Extrait	QP2_EtOH	QP2_ha_20/80	QP2_ha	QP2_ha_80/20
Solvant	EtOH	H <sub>2</sub> O/EtOH (20/80 m/m)	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50 m/m)	H <sub>2</sub> O/EtOH (80/20 m/m)
Rendement	3,0 ± 1,0 %	8,0 ± 1,0 %	13,6 ± 0,7 %	7,0 ± 1,0 %

Quel que soit le solvant d'extraction utilisé, les profils phytochimiques des différents extraits sont caractérisés par la présence majoritaire du groupe de composés A (Figure 143). Ces composés présentent de meilleures affinités avec le mélange hydroalcoolique 50/50, ce qui explique le meilleur rendement obtenu. Ces différents extraits sont également composés du groupe de molécules B, identifiés comme composés d'intérêt. Enfin, quelques composés peu polaires du groupe C ont été mis en évidence dans l'extrait QP2\_EtOH ; leur extraction est facilitée par la polarité de l'éthanol plus faible.

Ces différents extraits présentent des activités antioxydantes et anti-hyaluronidase comparables (Figure 144). En revanche, l'extrait QP2\_EtOH est le seul extrait à présenter une activité anti-élastase, liée à la présence des composés du groupe C. Ces extraits et tout particulièrement les extraits obtenus avec les solvants moins polaires (extrait QP2\_ha\_20/80), présentent des activités anti-inflammatoires intéressantes. Les composés du groupe B, identifiés comme responsables de cette activité, doivent être présents en quantité plus importante dans ces extraits. Ainsi, les solvants les plus polaires extraient davantage de composés du groupe A, ce qui explique les meilleurs rendements d'extraction, ainsi que les activités moindres de ces extraits, puisque les composés d'intérêt, c'est-à-dire les composés actifs, y sont en quelque sorte dilués par la présence de ces composés du groupe A.



**Figure 143 :** Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 330 nm des extraits hydroalcooliques de parties aériennes de chêne pubescent



**Figure 144 :** Activités biologiques des différents extraits hydroalcooliques de parties aériennes de chêne pubescent

La nature du solvant d'extraction, notamment sa polarité, a donc un impact important sur le rendement et les activités des extraits : l'extrait éthanolique se démarque par ses activités très intéressantes, mais il est obtenu avec un rendement plus faible et l'extrait QP2\_ha, obtenu par un mélange H<sub>2</sub>O/EtOH 50/50 présente le meilleur rendement mais des activités plus modérées. Ce solvant d'extraction a toutefois été sélectionné pour la suite du procédé de

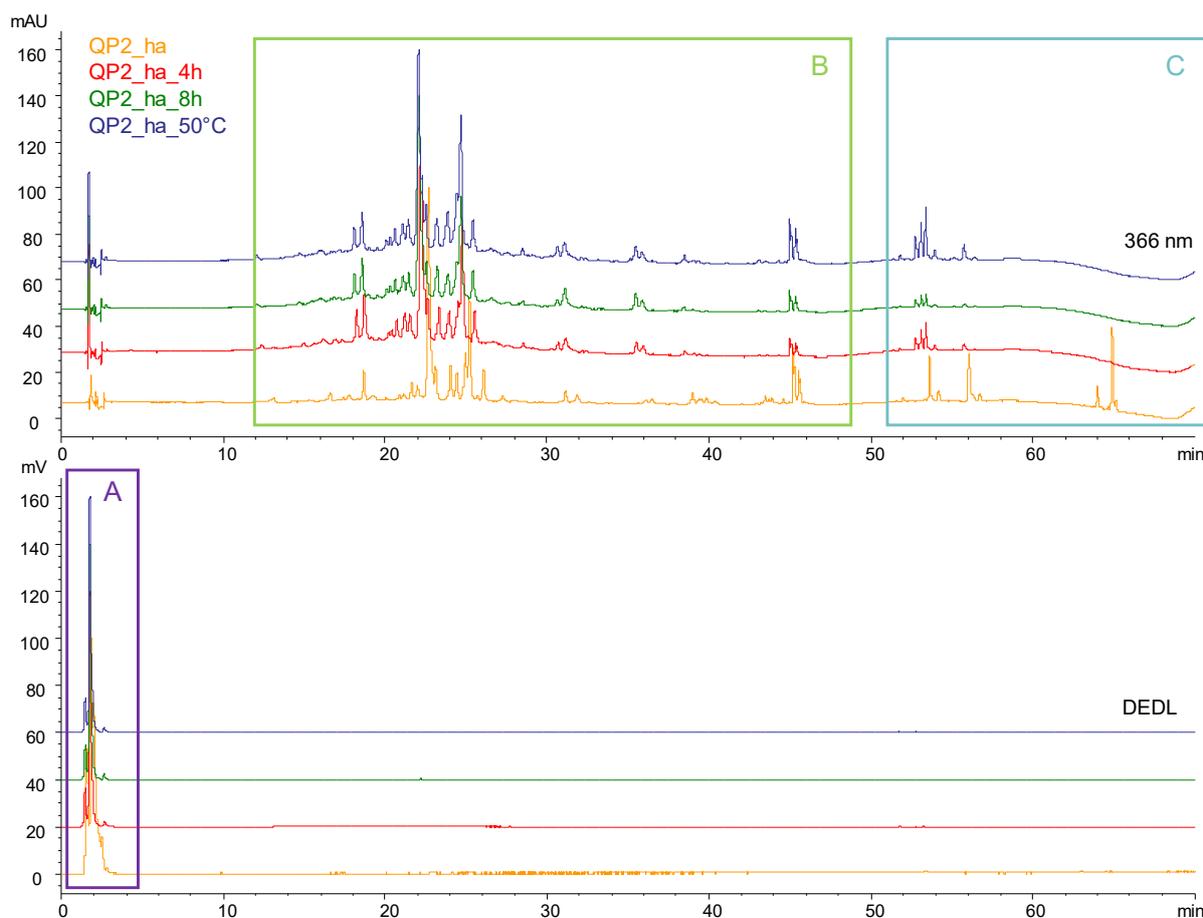
développement de l'ingrédient puisqu'il permet d'obtenir un extrait présentant le meilleur compromis entre des activités intéressantes et un bon rendement.

Une fois ce ratio de solvants fixé, l'influence de la durée de macération (4 h et 8 h) et de la température à laquelle est réalisée la macération (température ambiante et 50 °C), sur l'extraction des composés d'intérêt, a été étudiée. Toutes ces extractions ont été réalisées en triplicat. Les extraits correspondants ont été obtenus avec des rendements compris entre 9 et 11 %, inférieurs à celui de l'extrait QP2\_ha (Tableau 59).

**Tableau 59** : Conditions expérimentales et rendements obtenus pour les extraits hydroalcooliques de parties aériennes de chêne pubescent

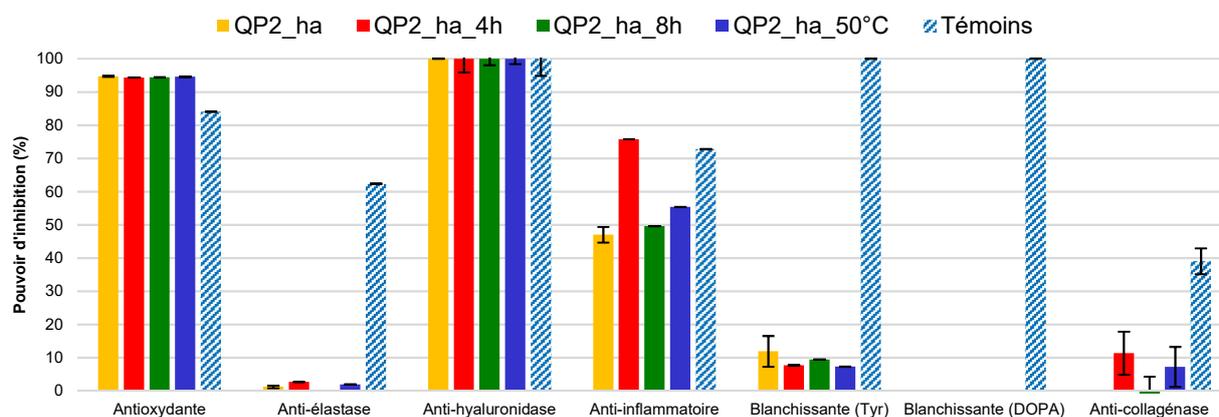
Extrait	QP2_ha	QP2_ha_4h	QP2_ha_8h	QP2_ha_50°C
Température d'extraction	TA	TA	TA	50 °C
Temps d'extraction	2 h	4 h	8 h	2 h
Rendement	13,6 ± 0,7 %	10,0 ± 1,0 %	9,0 ± 1,0 %	11,0 ± 0,9 %

Les profils HPLC de ces différents extraits sont caractérisés par la présence majoritaire des composés du groupe A (Figure 145). Les composés des groupes B sont également présents dans ces extraits.



**Figure 145** : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 366 nm des extraits hydroalcooliques de parties aériennes de chêne pubescent

Les activités présentées par ces extraits sont comparables à celles de l'extrait QP2\_ha, s'expliquant par leurs compositions phytochimiques proches (Figure 146). L'extrait QP2\_ha ayant été obtenu avec le meilleur rendement, dans des conditions de moindres impacts économique et environnemental puisque l'extraction est réalisée à température ambiante en 2 h seulement, ces conditions d'extraction (mélange H<sub>2</sub>O/EtOH 50/50, température ambiante, 2 h) sont donc sélectionnées pour la suite du développement de l'ingrédient.

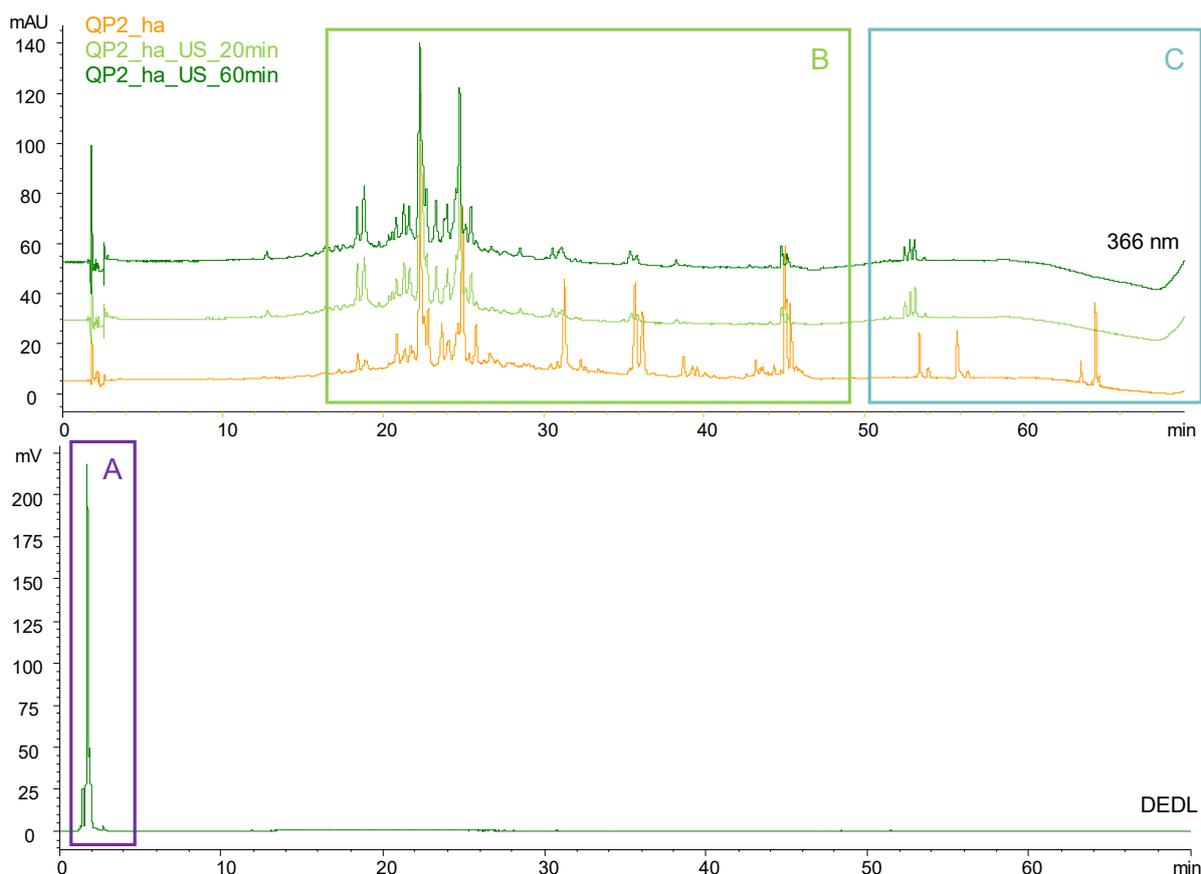


**Figure 146 :** Activités biologiques des extraits obtenus lors de l'optimisation des conditions d'extraction

Des techniques d'éco-extraction, telles que l'extraction activée par les ultra-sons ou par les micro-ondes, peuvent également améliorer l'efficacité de l'extraction (paragraphe 1.3.2.4.1, chapitre 1). Elles favorisent la rupture des parois cellulaires en déstabilisant le mélange, et permettent d'accélérer la cinétique de la réaction en augmentant la diffusion des substances dissoutes de l'intérieur de la cellule végétale vers le milieu d'extraction [52, 88, 116, 117]. Les ultra-sons présentent également l'avantage d'extraire des composés thermolabiles, puisqu'aucun chauffage n'est appliqué.

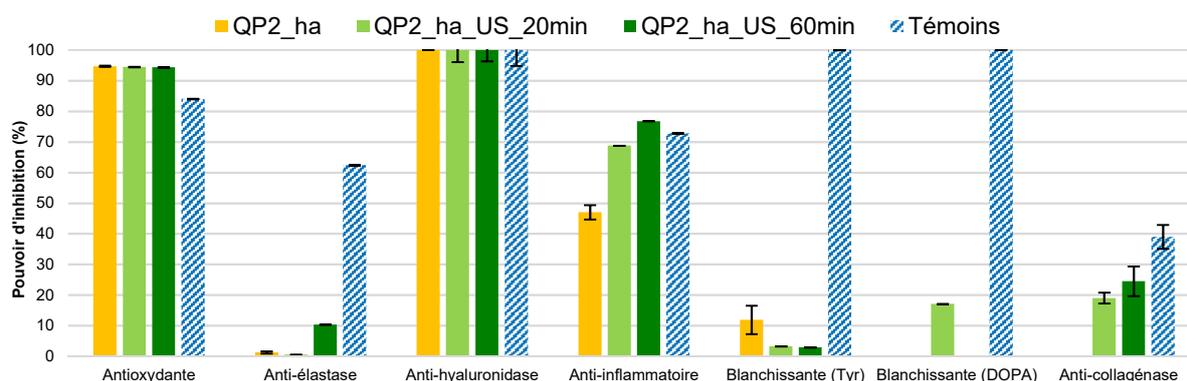
Afin d'évaluer l'intérêt de telles techniques sur l'extraction des parties aériennes de chêne pubescent, deux essais d'extraction assistée par ultra-sons ont été réalisés en faisant varier la durée d'extraction : 20 min et 60 min. Ces deux durées ont été choisies afin d'évaluer de manière significative l'influence du temps d'extraction avec ce type d'équipement. La fréquence des ultra-sons, fixée par l'appareil utilisé, était de 25 kHz [301]. L'activation de l'extraction par les ultra-sons a été réalisée à travers un bain d'eau dont la température est contrôlée par un système de refroidissement et maintenue fixe par le double manteau de l'extracteur. Les extractions ont été réalisées en triplicat dans le solvant hydroalcoolique 50/50 sans agitation. En raison des faibles quantités de matière végétale disponibles au moment de l'étude, ces essais ont été réalisés à partir de 3 g de plante.

Les premiers résultats obtenus par cette technique d'éco-extraction sont encourageants : les profils phytochimiques de ces deux extraits sont comparables à celui de l'extrait QP2\_ha (Figure 147). Ils sont caractérisés par la présence majoritaire de composés du groupe A, et de composés phénoliques du groupe B. Les profils HPLC/DEDL de ces extraits étant similaires, celui de l'extrait QP2\_ha\_US\_60min a uniquement été représenté.



**Figure 147** : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 366 nm des extraits de parties aériennes de chêne pubescent obtenus par extraction assistée par ultra-sons

Les extraits obtenus par extraction pendant 20 min et 60 min présentent des activités antioxydantes et anti-hyaluronidase similaires à celles de l'extrait obtenu par macération pendant 2 h (Figure 148). Leurs activités anti-inflammatoires sont mêmes supérieures à celles de ce dernier.



**Figure 148** : Activités biologiques des extraits obtenus par extraction assistée par ultra-sons

Ainsi, ces premiers essais d'extraction assistée par ultra-sons sont prometteurs. Des études complémentaires en faisant varier un certain nombre de paramètres (agitation, température du double manteau de l'extracteur, quantité plus importante de matière végétale, etc.) sont nécessaires afin de confirmer ces résultats et de conclure de manière significative sur l'intérêt

des ultra-sons sur l'extraction des composés présents dans les parties aériennes du chêne pubescent.

De nombreuses conditions d'extraction (nature du solvant, durée de l'extraction, température à laquelle est réalisée cette extraction, activation du procédé par les ultra-sons) ont été testées afin d'optimiser l'extraction des parties aériennes de chêne truffier. Ni l'augmentation de la durée, ni celle de la température d'extraction, ne favorisent l'extraction de davantage de composés d'intérêt. Des études complémentaires sont nécessaires afin de conclure sur l'influence des ultra-sons sur cette extraction.

Le meilleur compromis entre rendement d'extraction satisfaisant et activités biologiques intéressantes a été obtenu dans le cas de l'extrait QP2\_ha produit par macération conventionnelle de 2 h réalisée à température ambiante dans un mélange hydroalcoolique 50/50. Cet extrait a donc été sélectionné pour poursuivre le développement d'un ingrédient actif favorisant la réparation cutanée.

#### 4.2.2.6. Développement d'un extrait liquide

##### 4.2.2.6.1. Extraction au propylène glycol

Comme mentionné précédemment, il est possible pour extraire des matières végétales, d'utiliser des solvants directement compatibles avec une incorporation de l'extrait dans les formulations cosmétiques. Ces solvants (comme par exemple le propylène glycol, la glycérine ou encore l'éthylène glycol), de par leurs propriétés physico-chimiques différentes de celles de solvants conventionnels, peuvent favoriser l'extraction de composés d'intérêt, et ainsi permettre d'obtenir des extraits sous forme liquide aux propriétés intéressantes.

L'extrait QP\_PG a été obtenu par macération des parties aériennes du chêne truffier dans du propylène glycol (Tableau 60). Les conditions d'extraction utilisées sont celles définies lors du chapitre 2 pour le criblage : le ratio massique matière végétale/solvant 1/10 permet d'assurer l'immersion complète du matériel végétal et une durée d'extraction de 7 h est sélectionnée étant donnée la viscosité importante du propylène glycol, diminuant la vitesse de diffusion des métabolites en solution. L'extraction a été réalisée en triplicat.

**Tableau 60** : Conditions expérimentales utilisées pour obtenir l'extrait QP\_PG

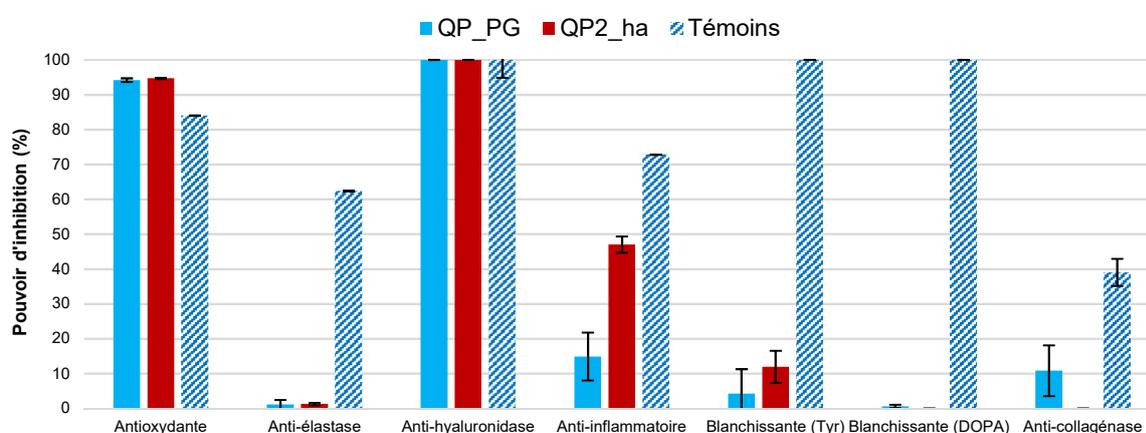
Date de récolte	Localisation	Solvant	Durée	Ratio plante/solvant	Température
Juin 2017	Parc Valrose, Nice	Propylène glycol	7 h	1/10 m/m	TA

Un rendement spécifique (défini paragraphe 4.1.1.2.2, équation 1) de  $80 \pm 4$  % est obtenu pour cet extrait : ceci est dû à la quantité importante de propylène glycol absorbée sur la matière végétale en raison de sa viscosité. Une étape de pressage de la matière végétale serait nécessaire afin d'obtenir un rendement plus représentatif de la réalité à l'échelle

laboratoire. Ce rendement spécifique ne sera pas mentionné systématiquement, à moins d'une particularité notable.

Par ailleurs, comme cela a déjà été évoqué, la concentration en métabolites dans ce type d'extrait ne peut être déterminée en raison de la non volatilité du solvant. Les activités biologiques de ces extraits ont donc été évaluées directement, sans dilution préalable de l'extrait : elles sont comparées aux activités des extraits secs dont la concentration est ajustée à 10 mg/mL. Les activités du propylène glycol seul ont été testées afin de s'assurer de la neutralité du solvant.

L'extrait QP\_PG présente des activités antioxydantes et anti-hyaluronidase comparables à celles de l'extrait hydroalcoolique QP2\_ha (Figure 149). En revanche, son activité anti-inflammatoire est plus faible.

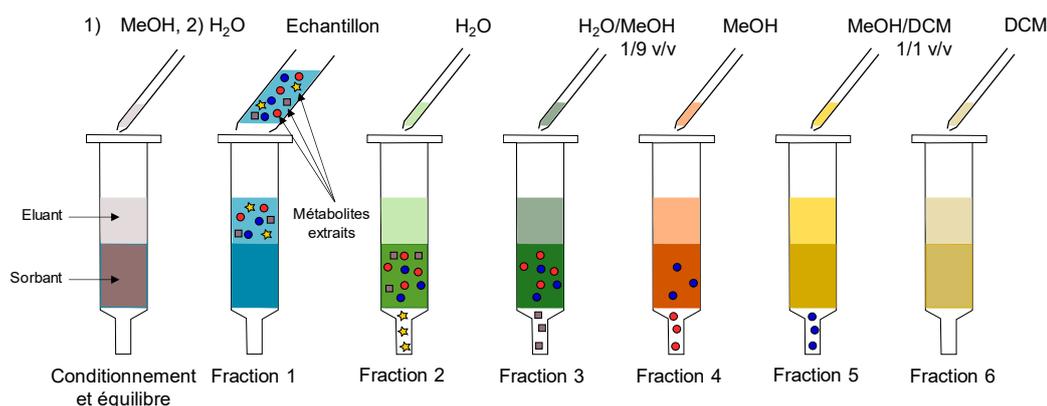


**Figure 149 :** Activités biologiques de l'extrait liquide QP\_PG

En raison de la non volatilité du propylène glycol, une étape de concentration de l'extrait est nécessaire avant d'analyser sa composition phytochimique. L'extraction sur phase solide (SPE), une technique particulièrement utilisée pour concentrer les échantillons riches en polyphénols et éliminer les matrices supports, a été sélectionnée pour cette étape [142, 144]. L'objectif principal de cette étape est d'extraire les métabolites présents dans l'extrait QP\_PG, et d'éliminer le propylène glycol, qui masque le signal des composés d'intérêt lors des analyses par HPLC, puisqu'il est majoritaire dans cet extrait. La nature de la phase stationnaire, ainsi que le solvant d'élution, la quantité d'extrait à concentrer, etc. sont autant de paramètres à optimiser afin de permettre une rétention optimale des composés de l'extrait.

Du fait du manque d'informations sur la composition de l'extrait QP\_PG, intrinsèque à sa nature (extrait dans du propylène glycol), la nature de la phase stationnaire a été sélectionnée en extrapolant à partir des données phytochimiques obtenues pour l'extrait hydroalcoolique QP2\_ha, tout en gardant à l'esprit que ces deux extraits n'étaient pas directement comparables. Compte tenu de la composition de l'extrait QP2\_ha (principalement des composés polaires du groupe A et des composés phénoliques du groupe B) et de la polarité du propylène glycol, des cartouches composées de phases stationnaires inverses de deux natures différentes ont été choisies : d'une part de la silice C18 et d'autre part de la silice

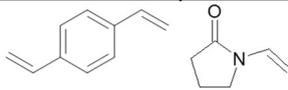
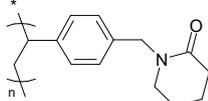
greffée avec des groupements polymériques [144]. Un total de 9 phases stationnaires se différenciant par la nature du sorbant, sa masse, sa capacité de charge, la taille des particules ou encore la taille des pores ont été testées pour concentrer l'extrait QP\_PG (paragraphe 5.3.3.2, chapitre 5). Un protocole en 7 étapes a été mis en place pour cette étude (Figure 150). L'extrait a préalablement été dilué dans de l'eau selon un ratio volumique extrait/eau 1/3 afin de diminuer sa viscosité. Des solvants/mélanges de solvants de polarités différentes ont ensuite été utilisés pour élué les différents métabolites présents dans l'extrait et retenus sur la phase stationnaire.



**Figure 150** : Protocole de concentration de l'extrait par SPE

La somme des masses obtenues pour les fractions 2 à 6 a permis de calculer un « rendement en métabolites présents, hormis les composés très polaires » appelé ici « rendement partiel » : il permet d'évaluer la capacité de rétention des différentes phases stationnaires en composés d'intérêt, et sert ainsi de critère de sélection afin de déterminer les paramètres optimaux permettant la concentration des composés. La fraction 1, correspondant à la charge de l'échantillon, est composée principalement de propylène glycol et de composés très polaires non retenus : elle n'est pas prise en compte dans le calcul de ce rendement partiel. Hormis la fraction 1, chaque fraction a été analysée par HPLC. Deux cartouches composées d'une phase stationnaire polymérique se démarquent parmi les 9 testées, en raison des rendements obtenus et des profils chromatographiques des fractions ainsi collectées (Tableau 61). Les composés phénoliques sont élués dans les fractions 2 à 5 ; la fraction 6 ne contient, quant à elle, aucun composé. Ces 2 phases stationnaires, reconnues pour leur capacité de charge importante (10 à 15 % selon la masse du sorbant) et leur caractère universel quant à leur sélectivité ont alors été sélectionnées pour la poursuite de l'étude.

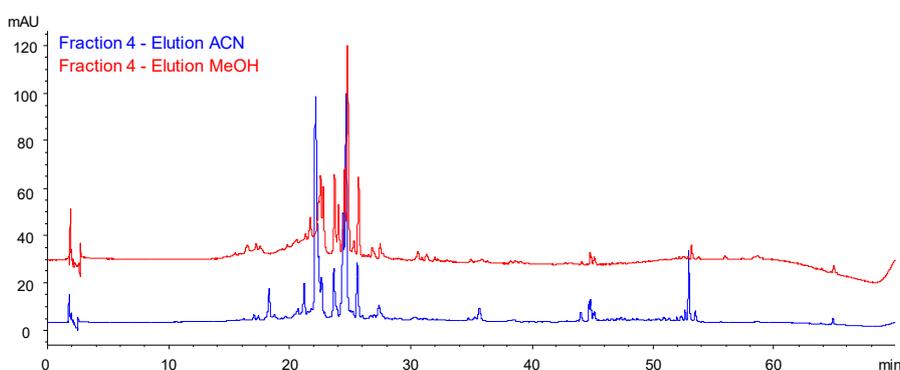
**Tableau 61** : Phases stationnaires sélectionnées pour la concentration de l'extrait QP\_PG

Cartouche	Phase stationnaire	Sélectivité
HLB 6 cc OASIS (Waters)		Universelle (composés acides, basiques et neutres)
Strata-X (Phenomenex)		Universelle (composés neutres et aromatiques, acides et basiques)

Les étapes de conditionnement et d'équilibrage sont principalement réalisées pour mouiller la phase stationnaire, et influent ainsi sur la rétention des composés d'intérêt. Le méthanol, par son caractère polaire, est le solvant principalement utilisé pour cette étape, mais d'autres solvants tels que l'acétonitrile peuvent être employés. Afin d'évaluer l'influence de ce solvant, des essais ont été réalisés en remplaçant le méthanol par l'acétonitrile selon le protocole décrit sur la Figure 150. Après avoir chargé l'extrait QP\_PG dilué dans l'eau (ratio volumique 1/3), la fraction 1 consiste en l'élimination du propylène glycol et les fractions suivantes consistent à éluer les composés retenus sur la phase stationnaire. Les fractions 2 à 5 ainsi obtenues ont été analysées par HPLC et leur rendement partiel a été calculé (Tableau 62). Le rendement partiel obtenu après conditionnement de la colonne avec du méthanol est près de 4 fois supérieur à celui obtenu après conditionnement de la colonne avec de l'acétonitrile : il est possible de conclure que le méthanol favorise la rétention des composés sur la colonne. La triple liaison de l'acétonitrile pourrait déstabiliser les liaisons  $\pi$ - $\pi$  des composés phénoliques et ainsi empêcher leur fixation sur la phase stationnaire lors de la charge de l'échantillon. En revanche, la composition des fractions 4 (correspondant à l'élution des composés) obtenues selon les deux modes de conditionnement sont comparables (Figure 151). Le méthanol a donc été choisi pour la suite de cette étude.

**Tableau 62** : Conditions expérimentales et rendements obtenus lors de l'étude de l'influence du solvant de conditionnement et d'élution

Caractéristiques de la phase stationnaire Strata-XL		Echantillon	Solvant	Rendement partiel
Masse de sorbant	500 mg		2,5 mL extrait QP_PG + 7,5 mL eau	MeOH
Taille des particules	100 $\mu$ m	ACN		1,4 mg/mL <sub>extrait</sub>



**Figure 151** : Chromatogrammes HPLC-DAD à 366 nm des fractions 4 obtenues par SPE par élution avec l'ACN (bleu) et le MeOH (rouge)

Afin d'évaluer la répétabilité de ce protocole, différents essais ont été réalisés en faisant varier le diamètre des particules des sorbants des deux phases stationnaires sélectionnées. Les cartouches disponibles au laboratoire présentant des phases stationnaires de capacités différentes (masse de sorbant), la quantité d'échantillon chargée a été adaptée afin de se placer dans les mêmes conditions (Tableau 63).

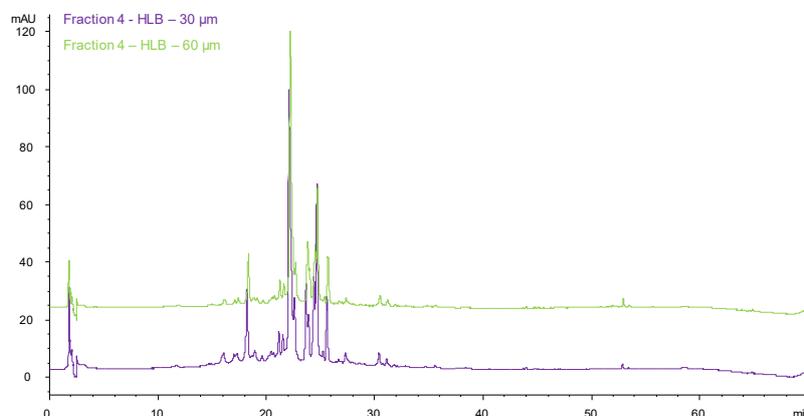
La cartouche HLB composée d'une phase stationnaire de particules de 60  $\mu$ m permet de récupérer environ deux fois plus de composés que celle composée de particules de 30  $\mu$ m. Des résultats similaires ont été obtenus avec les cartouches Strata-X contenant des phases stationnaires de particules de 33  $\mu$ m et de 100  $\mu$ m. Quel que soit le diamètre des particules,

les profils HPLC des fractions 4 correspondant à l'élution des composés par le méthanol pour les cartouches HLB sont comparables (Figure 152) ; des observations similaires ont pu être réalisées pour les cartouches Strata-X.

Cette étude permet donc de confirmer la répétabilité de ce protocole, et les cartouches composées de phases stationnaires de particules de plus grand diamètre ont donc été sélectionnées pour la suite.

**Tableau 63** : Conditions expérimentales et rendements obtenus lors de l'étude de répétabilité de ce protocole, en faisant varier la taille des particules

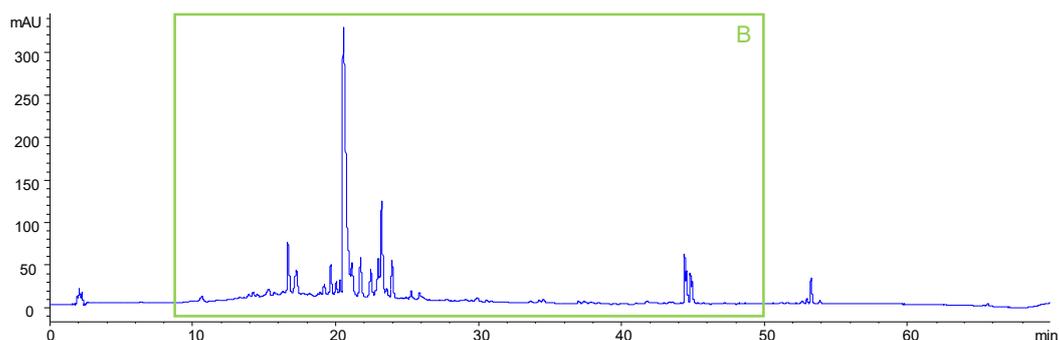
Cartouche	Masse de sorbant	Taille des particules	Volume d'extrait chargé	Rendement partiel
HLB 6 cc	200 mg	30 µm	1 mL	2,6 mg/mL <sub>extrait</sub>
HLB 6 cc	500 mg	60 µm	2,5 mL	4,4 mg/mL <sub>extrait</sub>
Strata-X	2 g	33 µm	8,75 mL	2,0 mg/mL <sub>extrait</sub>
Strata-XL	500 mg	100 µm	2,5 mL	5,4 mg/mL <sub>extrait</sub>



**Figure 152** : Chromatogrammes HPLC-DAD à 366 nm des fractions 4 obtenues par SPE sur cartouches HLB dont la taille des particules de la phase stationnaire est respectivement de 30 µm (violet) et de 60 µm (vert)

Une fois la phase stationnaire sélectionnée, il est nécessaire de déterminer le volume de fin de fixation de cette dernière, et d'identifier les solvants d'élution appropriés permettant d'éluer les composés retenus. Cette étude est à ajuster pour chaque matière première puisque la composition des extraits diffère. Pour l'extrait QP\_PG, le seuil de saturation est atteint lorsque le volume d'échantillon chargé est supérieur à 15 mL (dilué avec un ratio volumique 1/3 dans l'eau). Les passages successifs de 15 mL de méthanol et de 5 mL d'un mélange MeOH/DCM (50/50 v/v) permettent d'éluer tous les composés retenus sur la phase stationnaire.

Grâce à cette phase de concentration, le profil phytochimique de l'extrait QP\_PG a pu être obtenu (Figure 153). Cet extrait est composé du groupe de composés B mis en évidence dans l'extrait QP2\_ha, ce qui explique les activités biologiques comparables de ces deux extraits (Figure 149). Par comparaison des chromatogrammes HPLC-DAD, il s'avère que les composés du groupe B extraits par le propylène glycol sont identiques à ceux retrouvés dans l'extrait QP2\_ha. Cet extrait renferme également le groupe de molécules A, cependant la teneur en composés de ce groupe n'est pas représentative de la réalité ici puisque la majeure partie de ces composés a été éluée avec le propylène glycol lors de la charge de l'échantillon sur la phase stationnaire.



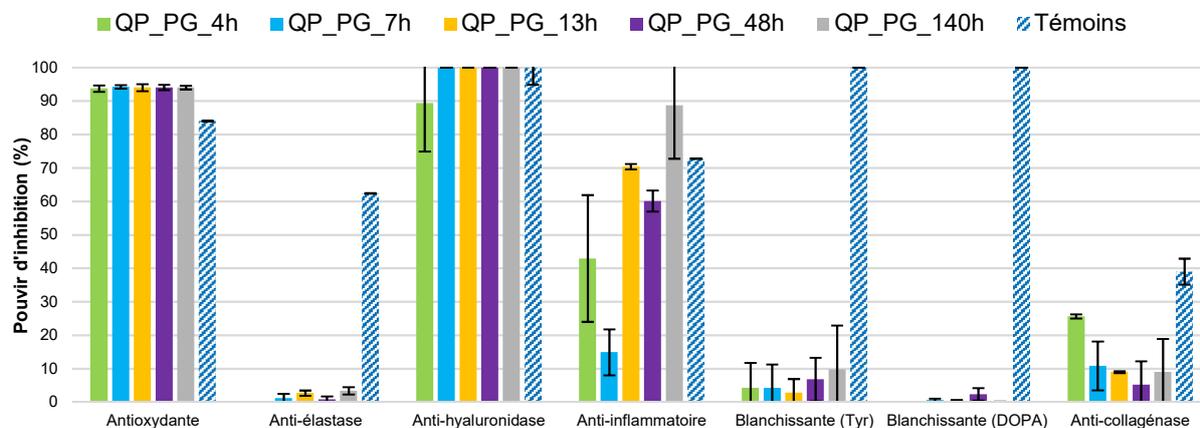
**Figure 153 :** Chromatogramme HPLC-DAD à 366 nm de l'extrait QP\_PG

L'extrait QP\_PG est caractérisé par la présence des deux groupes de composés A et B déjà mis en évidence dans l'extrait hydroalcoolique. La présence des composés du groupe B, dont le profil est comparable à celui de l'extrait hydroalcoolique, explique les activités de cet extrait. Le propylène glycol est donc un solvant d'extraction permettant d'obtenir des extraits liquides aux propriétés intéressantes.

#### 4.2.2.6.2. Optimisation des conditions d'extraction

Comme dans le cas de l'extrait hydroalcoolique, une étude d'optimisation des conditions d'extraction a été réalisée afin de maximiser l'extraction des composés d'intérêt par le propylène glycol. Pour cela, l'influence de trois paramètres a été étudiée : la température de macération, la durée d'extraction et le ratio massique matière première/solvant. Tous les essais ont été réalisés en triplicat.

Dans un premier temps, l'influence de la durée d'extraction a été évaluée. Pour cela, des macérations de 4 h, 7 h, 13 h, 48 h et 140 h de parties aériennes de chêne ont été réalisées. La durée d'extraction a peu d'influence sur les activités antioxydantes et anti-hyaluronidase de l'extrait (Figure 154). En revanche, les activités anti-inflammatoires sont meilleures lorsque la durée de macération augmente. L'étude des profils HPLC, obtenus après concentration des extraits par SPE, ne met en évidence aucune différence significative.



**Figure 154 :** Influence du temps d'extraction sur les activités biologiques des extraits QP\_PG

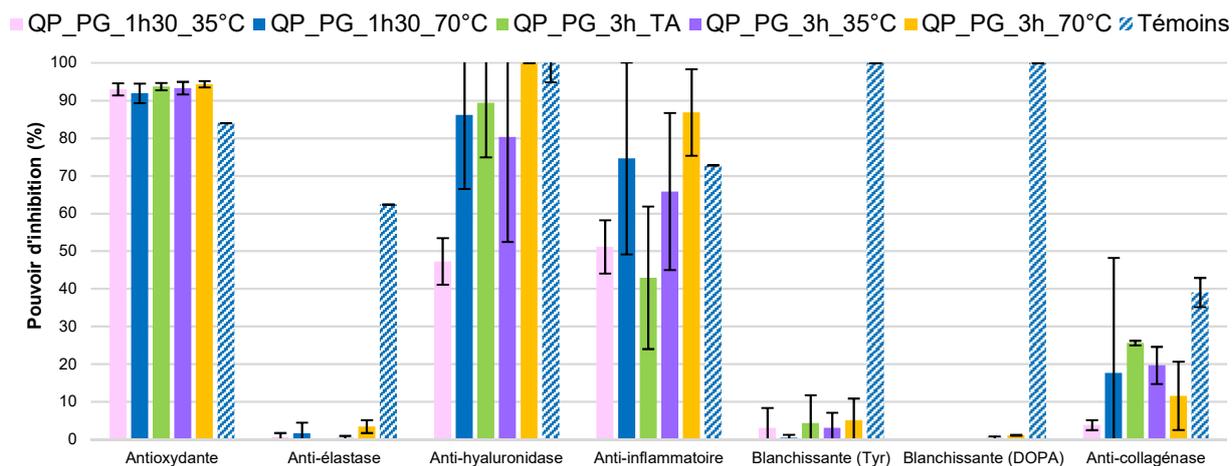
Deux hypothèses peuvent expliquer la faible influence de la durée d'extraction sur les activités antioxydantes et anti-hyaluronidase :

- soit les composés responsables de ces activités sont tous extraits après 4 h d'extraction,
- soit la concentration de solutés extraits dans le solvant est à l'équilibre avec la concentration de solutés restants dans la matrice végétale. Un tel équilibre est établi par la seconde loi de Fick concernant la diffusion, qui prédit un équilibre de concentration au bout d'un certain temps, et qui explique qu'on ait atteint le maximum d'extraction des solutés dans ces conditions [302]. Dans ce cas, l'augmentation de la durée d'extraction ne permet pas d'augmenter le taux d'extraction des composés d'intérêt.

En ce qui concerne les différences d'activités anti-inflammatoires mises en évidence, une explication possible serait que les composés responsables de cette activité sont plus difficiles à extraire que les composés du groupe A, et ainsi que l'augmentation de la durée d'extraction permettrait d'en extraire davantage. Une autre explication possible serait la dégradation de certains des composés extraits sous l'influence de facteurs environnementaux tels que la lumière ou l'oxygène [302]. Les composés de dégradation ainsi générés, selon leur nature, pourraient être responsables de ces activités.

Pour la suite de cette étude, des temps de macération compris entre 4 h et 7 h ont été sélectionnés afin d'obtenir des extraits aux activités intéressantes, tout en employant un procédé dont les impacts économique et environnemental sont les plus faibles.

L'influence de la température de macération (35 °C et 70 °C) a ensuite été étudiée. L'application d'un chauffage lors de l'extraction favorise la rupture des parois cellulaires, et la libération des composés retenus à température ambiante. Le chauffage peut influencer sur leur vitesse de diffusion dans le milieu, et permet d'augmenter le rendement d'extraction [302]. En revanche, un chauffage excessif peut provoquer la dégradation de certains composés thermolabiles, et ainsi induire des pertes d'activités. Il a donc été choisi de réduire les temps d'extraction à 1 h 30 et 3 h pour ces deux températures, afin d'éviter de telles dégradations. Quelles que soient les conditions d'extraction, les activités antioxydantes ne sont pas impactées par le chauffage (Figure 155). En revanche, le chauffage semble favoriser l'extraction des composés responsables des activités anti-inflammatoires (Figure 155 : QP\_PG\_TA (vert), QP\_PG\_35°C (violet), QP\_PG\_70°C (jaune)). Les profils phytochimiques de ces extraits obtenus par HPLC-DAD/DEDL après SPE étant comparables, il a été suggéré que l'application d'un chauffage permettrait de favoriser l'extraction des composés responsables des activités anti-inflammatoires, qui sont, comme cela a été observé précédemment, plus difficiles à extraire. La dégradation de certains composés sous l'effet de la chaleur, en composés actifs pourrait également expliquer ces différences.



**Figure 155 :** Influence de la température d'extraction sur les activités biologiques des extraits QP\_PG

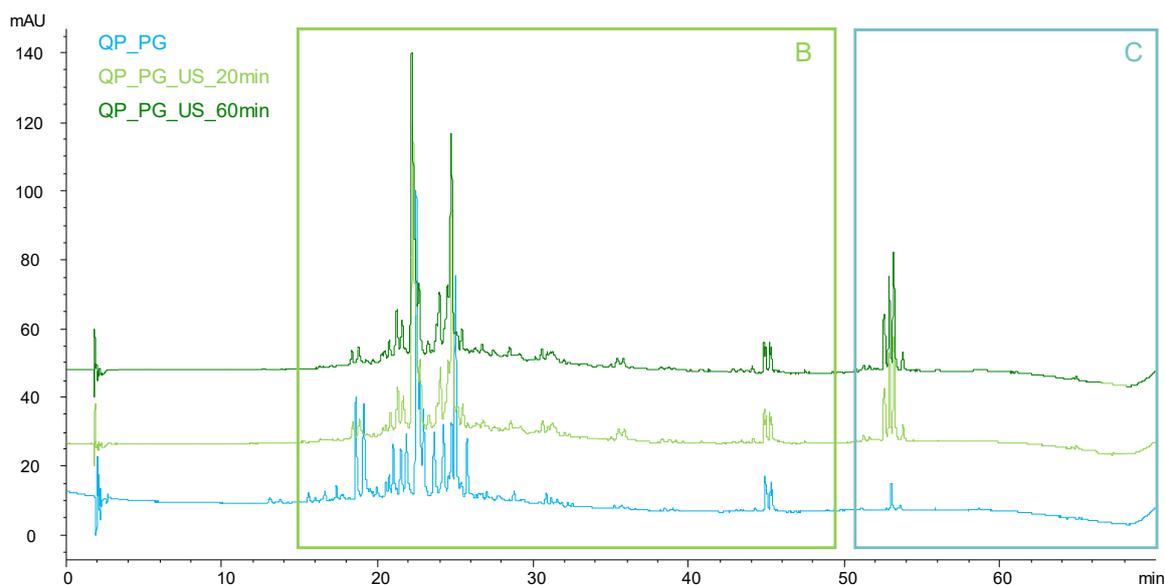
Ainsi, bien que cette étude ait permis d'établir que l'application d'un chauffage lors de la macération favorise l'extraction des composés responsables des activités anti-inflammatoires, cette augmentation des activités ne contrebalance pas l'impact économique et environnemental de ce chauffage sur le procédé d'extraction. Il a donc été choisi de poursuivre cette étude en réalisant les extractions à température ambiante.

Pour finir, l'influence du ratio massique matière végétale/solvant utilisé a été étudiée. Il est crucial de définir la quantité de solvant adéquate, afin de s'assurer que le solvant ne soit pas saturé en composés d'intérêt, alors qu'il en resterait encore dans la matière végétale. L'extraction réalisée selon un ratio massique matière végétale/solvant de 1/20 induit des pertes d'activités par rapport à l'extraction réalisée selon un ratio 1/10. Une forte diminution des activités anti-hyaluronidase (de 90 % à 18 %) est observée, ainsi que des pertes respectives d'activités antioxydantes et anti-inflammatoires de 25 % et de 15 %. Ces pertes d'activités s'expliquent par une dilution des composés d'intérêt dans le propylène glycol.

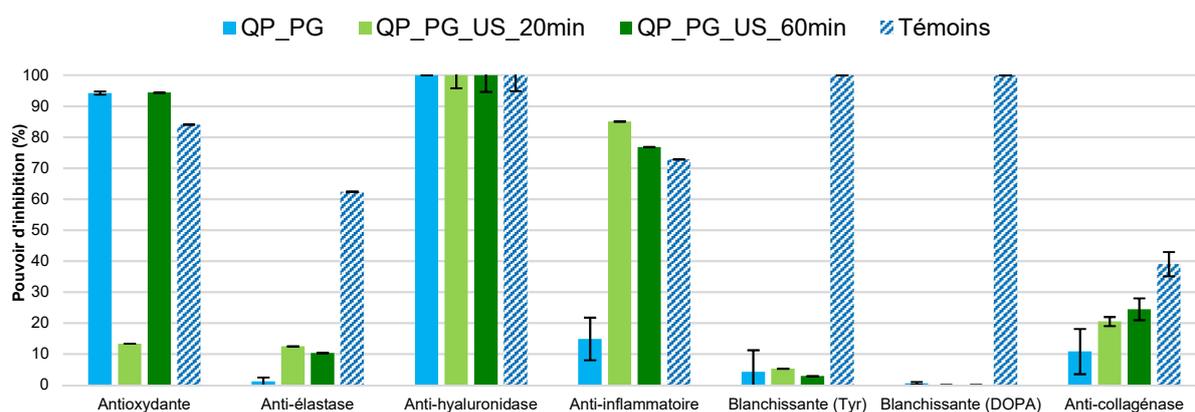
Comme précédemment, l'effet d'une activation de l'extraction par ultra-sons a également été évalué. Pour cela, des extractions activées par ultra-sons (fréquence de 25 kHz) de 20 min et 60 min dans les conditions déterminées précédemment (ratio massique matière végétale/solvant 1/10, TA) ont été réalisées en triplicat.

Les profils phytochimiques des extraits ainsi obtenus après concentration par SPE sont comparables à celui de l'extrait QP\_PG : ils sont caractérisés par la présence du groupe de composés B (Figure 156).

Les ultra-sons accélèrent la diffusion des composés d'intérêt dans le propylène glycol puisque l'extrait obtenu après activation durant 60 min aux ultra-sons présente des activités biologiques comparables à celles de l'extrait QP\_PG obtenu par macération pendant 7 h (Figure 157). En revanche, une durée d'extraction activée par ultra-sons pendant 20 minutes n'est pas suffisante pour extraire davantage de composés du groupe B, identifiés comme responsables des activités antioxydantes de cet extrait.



**Figure 156** : Chromatogrammes HPLC-DAD à 366 nm des extraits liquide de parties aériennes de chêne obtenus par extraction activée par ultra-sons



**Figure 157** : Activités biologiques des extraits liquide obtenus par activation de l'extraction aux ultra-sons

Cette étude d'optimisation a permis de définir les paramètres optimaux pour l'extrait de parties aériennes de chêne au propylène glycol : la macération est réalisée à température ambiante durant 7 h avec un ratio massique matière végétale/solvant de 1/10.

L'extraction activée par les ultra-sons est intéressante pour réduire le temps d'extraction et obtenir un extrait présentant des activités comparables lorsque le temps d'extraction est suffisant.

#### 4.2.2.6.3. Extraction avec d'autres solvants

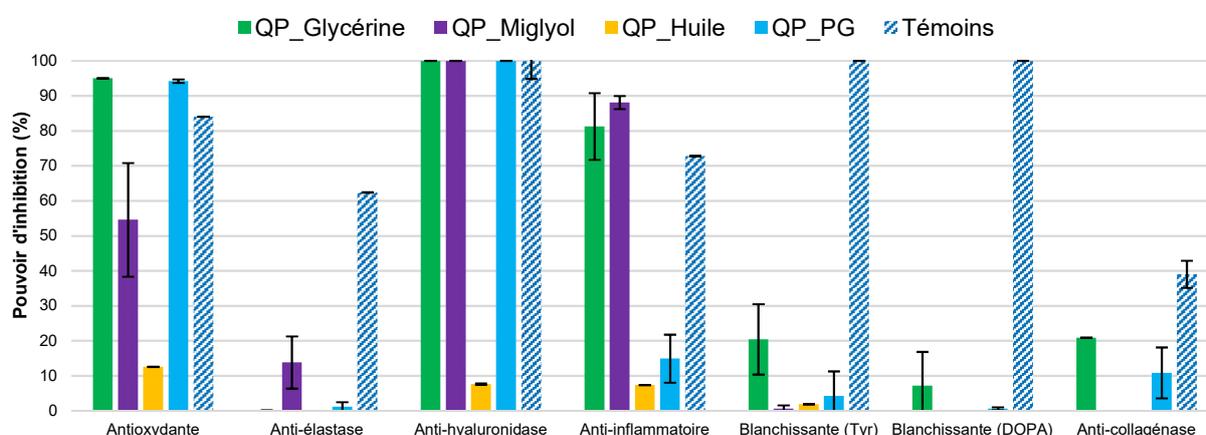
Comme explicité dans le paragraphe 4.1.1.2.2, d'autres solvants tels que la glycérine, le miglyol® 812 et l'huile de tournesol sont également couramment utilisés dans les formulations cosmétiques. Des extractions ont été réalisées en duplicat avec ces 3 solvants selon les paramètres d'extraction définis précédemment (Tableau 60).

Les extraits au miglyol et à l'huile de tournesol ont été obtenus avec des rendements comparables à celui de l'extrait QP\_PG ( $80 \pm 4 \%$ ). En revanche, le rendement d'extraction avec la glycérine est plus faible en raison de sa viscosité très importante ( $1490 \text{ mPa}\cdot\text{s}$  vs  $56 \text{ mPa}\cdot\text{s}$  pour le propylène glycol). Les activités biologiques de ces extraits ont alors été évaluées (Figure 158), tout comme celles des solvants seuls. Il s'avère que le miglyol présente des activités anti-hyaluronidase ( $100,00 \pm 3,00 \%$ ), antioxydantes ( $53,77 \pm 0,04 \%$ ) et anti-inflammatoires ( $43,56 \pm 0,01 \%$ ).

L'extrait QP\_Glycérine présente des activités antioxydantes et anti-hyaluronidase comparables à celles de l'extrait QP\_PG, ainsi qu'une meilleure activité anti-inflammatoire (Figure 158). Les profils phytochimiques de ces deux extraits étant comparables, une explication possible serait que la glycérine, plus hydrophile que le propylène glycol (présence supplémentaire d'un groupement hydroxyle), permettrait une meilleure extraction des composés contribuant aux activités anti-inflammatoires. Ce solvant aurait pu être sélectionné pour la suite du développement de l'ingrédient, cependant, pour des raisons de formulabilité, le propylène glycol a été sélectionné pour un premier développement. Les extraits au propylène glycol peuvent être formulés dans des phases aqueuses, contrairement aux extraits glycérisés qui sont solubles dans les phases grasses. Il est toutefois envisagé de poursuivre le développement de cet extrait glycérisé ultérieurement.

L'extrait QP\_Miglyol présente lui aussi des activités intéressantes, et notamment des activités anti-hyaluronidase et anti-inflammatoires comparables à celles de l'extrait glycérisé. En revanche, ses activités antioxydantes sont faibles. L'étude du profil phytochimique de l'extrait QP\_Miglyol et du miglyol seul par HPLC-DAD/DEDL met en évidence peu de différences. Le miglyol ne permettrait pas d'extraire les composés d'intérêt présents dans les parties aériennes de chêne : ainsi, les activités biologiques de l'extrait QP\_Miglyol sont probablement dues à la seule présence du solvant.

L'extrait QP\_Huile ne présente aucune activité intéressante. Très apolaire, ce solvant ne permet pas d'extraire les composés d'intérêt présents dans les parties aériennes du chêne pubescent.



**Figure 158 :** Activités biologiques d'extraits liquides obtenus par extraction des parties aériennes du chêne pubescent à la glycérine, au miglyol et à l'huile de tournesol

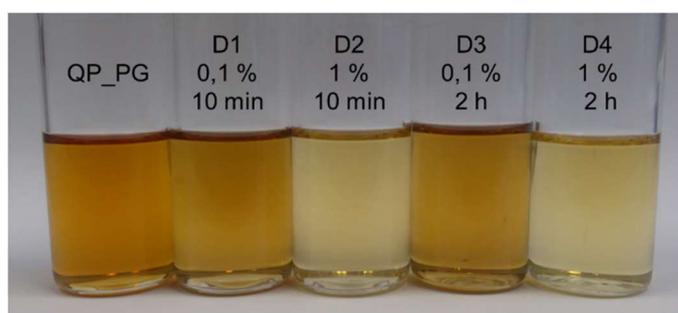
Il est donc possible de remplacer le propylène glycol par d'autres solvants compatibles en formulation cosmétique. Les rendements d'extraction et les activités biologiques des extraits correspondants sont fonctions de la nature de ces solvants. De telles substitutions permettent d'obtenir des extraits aux propriétés diverses, à partir d'une même matière première. Dans le cas des parties aériennes du chêne, la glycérine s'avère être un solvant intéressant puisque l'extrait obtenu présente des activités biologiques plus intéressantes que l'extrait au propylène glycol.

#### 4.2.2.7. Etude de formulabilité : décoloration de l'ingrédient liquide

L'extrait QP\_PG présente une couleur brun-orangé qui, selon la quantité intégrée, peut induire une coloration plus ou moins prononcée de la formulation cosmétique. Afin de répondre aux demandes des formulateurs, qui favorisent bien souvent une cosmétique blanche, des essais de décoloration de l'extrait par adsorption sur charbon actif (CA) ont été réalisés. L'influence de deux paramètres a été évaluée : le temps de contact de l'extrait et du charbon actif, et le ratio massique charbon actif/extrait (Tableau 64). L'efficacité de la décoloration a ensuite été appréciée selon 2 critères : les activités biologiques de l'extrait décoloré (en comparaison de l'extrait non décoloré) et la distance euclidienne  $\Delta E^*_{ab}$  calculée à partir de la mesure des coordonnées CIE  $L^*a^*b^*$  par spectrométrie. Cette distance euclidienne  $\Delta E^*_{ab}$  correspond à la différence de couleur entre l'extrait de référence QP\_PG et les extraits décolorés. Les rendements de décoloration sont proches de 85 % pour ces différentes études.

**Tableau 64** : Conditions de décoloration testées et distances euclidiennes des extraits décolorés par rapport à l'extrait QP\_PG

Paramètres	QP_PG_D1	QP_PG_D2	QP_PG_D3	QP_PG_D4
Temps de contact	10 min	10 min	2 h	2 h
Teneur en CA	0,1 %	1,0 %	0,1 %	1,0 %
$\Delta E^*_{ab}$	18,5 ± 0,4	41,0 ± 1,0	20,0 ± 1,0	41,0 ± 0,3



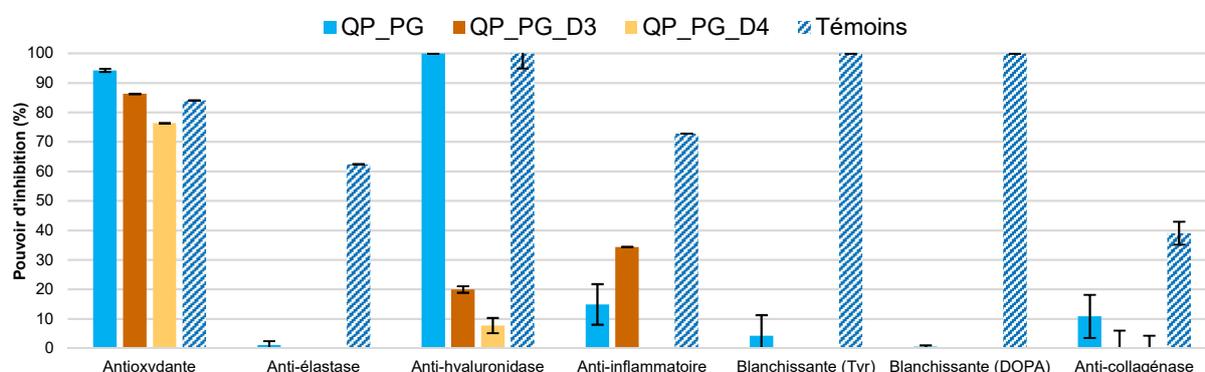
**Figure 159** : Extrait QP\_PG non décoloré, et extraits décolorés QP\_PG\_D1 à QP\_PG\_D4 (gauche à droite)

Le temps de contact semble n'avoir que peu d'influence sur la décoloration de ce genre d'extraits : en effet, les extraits QP\_PG\_D1 et QP\_PG\_D3, obtenus par décoloration avec 0,1 % de charbon actif pendant respectivement 10 mn et 2 h, présentent une décoloration équivalente à l'œil nu, ce qui est confirmé par les distances euclidiennes  $\Delta E^*_{ab}$  calculées (Tableau 64, Figure 159). Des observations similaires sont réalisées en ce qui concerne les

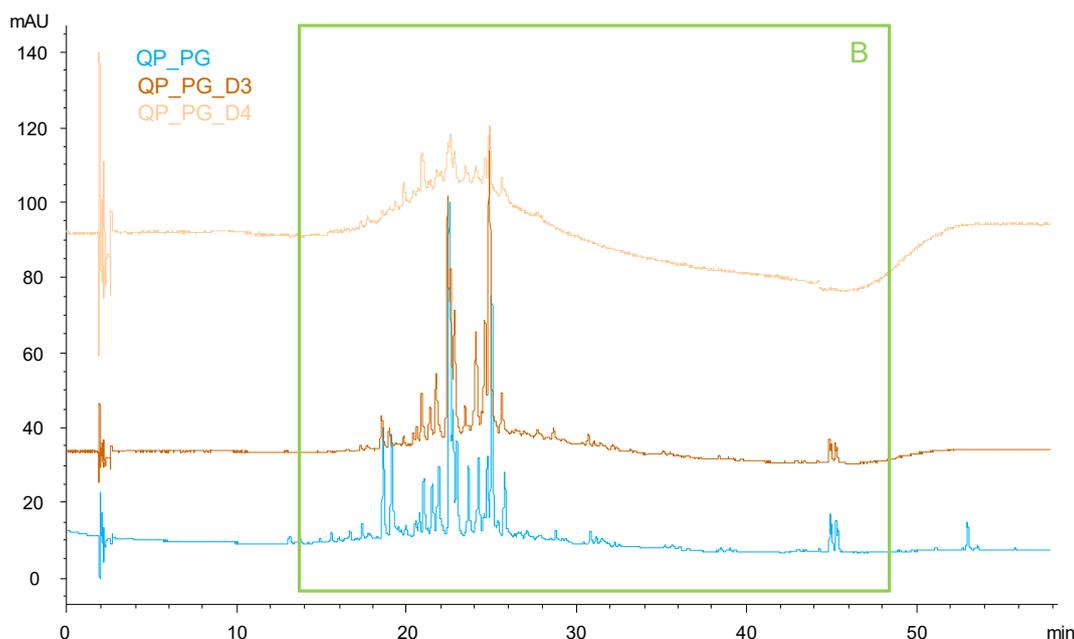
extraits décolorés avec 1 % de CA (QP\_PG\_D2 et QP\_PG\_D4), pour lesquels les distances euclidiennes sont égales à 41.

En revanche, le pourcentage de charbon actif utilisé lors de la décoloration a une forte influence sur la décoloration puisque les distances euclidiennes des extraits décolorés avec 1 % de charbon actif ont plus que doublé par rapport à celles des extraits décolorés avec 0,1 % ( $\Delta E^*_{ab}$  égale à 18 vs 41).

Quel que soit le pourcentage de charbon actif utilisé, les extraits décolorés présentent des activités antioxydantes comparables à celles de l'extrait QP\_PG (Figure 160). En revanche, une perte totale des activités anti-hyaluronidase est observée. Ces pertes d'activités sont principalement dues à l'adsorption des composés d'intérêt du groupe B par le charbon actif, comme cela peut être observé sur les profils chromatographiques (Figure 161).



**Figure 160** : Activités biologiques des extraits QP\_PG non décoloré (bleu), décolorés avec 0,1 % et 1 % de charbon actif pendant 2 h (QP\_PG\_D3 et QP\_PG\_D4)



**Figure 161** : Chromatogrammes HPLC-DAD à 366 nm de l'extrait QP\_PG non décoloré (bleu) et des extraits décolorés avec 0,1 % et 1 % de charbon actif pendant 2 h (QP\_PG\_D3 et QP\_PG\_D4)

Le charbon actif adsorbe donc non seulement les colorants, mais aussi les composés d'intérêt de manière non spécifique (principalement ceux responsables des activités anti-hyaluronidase).

Des études de décoloration supplémentaires seront nécessaires pour affiner les paramètres permettant une décoloration efficace de cet extrait de chêne, sans perte majeure des activités anti-hyaluronidase. Cependant, au vu de ces premiers résultats, le caractère non spécifique du charbon actif risque de rester problématique dans tous les cas pour ce qui est de l'adsorption des composés d'intérêt.

Afin d'évaluer la nécessité d'une telle décoloration, l'impact de la coloration de l'ingrédient sur la couleur d'un produit fini a été évaluée. Pour cela, l'extrait non décoloré QP\_PG et l'extrait décoloré QP\_PG\_D4 ont tous deux été formulés à 3 % dans une émulsion huile/eau, un pourcentage d'utilisation relativement important pour ce type d'ingrédient (Figure 162). Bien que la faible coloration induite par l'extrait non décoloré soit considérée comme acceptable par les Laboratoires JYTA pour son intégration dans leurs gammes cosmétiques, elle peut représenter un frein pour d'autres façonniers et sociétés cosmétiques. D'autres techniques de décoloration telles que la distillation moléculaire pourraient alors être testées afin de déterminer si elles permettent des décolorations efficaces, sans toutefois trop affecter les activités biologiques des extraits naturels [303].



**Figure 162 :** Extraits non décoloré (gauche) et décoloré (droite) formulés à 3 % dans une émulsion huile/eau

Lorsque le temps de contact est suffisant, la décoloration par adsorption sur charbon actif est efficace. Cependant, elle s'accompagne de pertes conséquentes d'activités biologiques par adsorption non spécifique des composés d'intérêt par le charbon actif.

#### **4.2.2.8. Mise sur support de l'extrait sec par atomisation**

L'extrait hydroalcoolique de chêne se présente sous forme d'une pâte visqueuse qui doit être mise sur support afin de faciliter son intégration dans les formules cosmétiques. L'atomisation est le procédé sélectionné pour cette étude en raison de ses nombreux avantages présentés dans le chapitre 1 (paragraphe 1.3.2.4.3.). Avec l'équipement à disposition au laboratoire, il est possible d'ajouter jusqu'à 20 % de solvant organique à l'eau, principal solvant utilisé pour réaliser l'atomisation. Afin de faciliter la solubilisation de l'extrait de chêne dans le mélange de solvants H<sub>2</sub>O/EtOH 80/20 (v/v), une étape nécessaire pour réaliser l'atomisation, l'extrait hydroalcoolique 80/20 de chêne a été sélectionné préférentiellement pour cette étude.

Une fois les paramètres d'atomisation optimisés sur cet extrait, ils seront transposés à l'extrait hydroalcoolique 50/50, qui avait été sélectionné pour le développement de l'ingrédient à l'échelle industrielle. La maltodextrine a été choisie comme support d'atomisation en raison de sa grande solubilité dans l'eau [119].

Un extrait de chêne QP2\_A a été obtenu par macération de matière végétale dans un mélange hydroalcoolique 80/20 avec un rendement de  $6 \pm 1$  %. Le mélange à atomiser a été réalisé à partir de 20 g d'extrait sec, dans les conditions présentées dans le Tableau 65, qui ont été déterminées à partir de données expérimentales disponibles auprès du constructeur de l'atomiseur utilisé [304]. Cette quantité d'extrait sec est, selon le constructeur, nécessaire afin d'obtenir un rendement d'atomisation représentatif à l'échelle laboratoire.

**Tableau 65** : Conditions expérimentales de la solution à atomiser

Support	Ratio support/extrait	Solvant	Concentration en solide
Maltodextrine	2/1 m/m	H <sub>2</sub> O/EtOH (80/20 v/v)	0,15 g/mL

Dans un premier temps, l'influence de la température de l'air à l'entrée du système sur la qualité d'atomisation (rendement et pourcentage d'humidité de la poudre) a été évaluée en réalisant des essais à 160 °C, 180 °C et 200 °C (Tableau 66).

**Tableau 66** : Paramètres d'atomisation utilisés pour l'extrait de chêne

Paramètres	Valeurs
Température d'entrée	160 °C, 180 °C, 200 °C
Vitesse d'alimentation	20 %
Gaz de pulvérisation	Azote
Débit du gaz de pulvérisation	473 L/h
Aspiration du liquide à atomiser	100 %

Quelle que soit la température de l'air à l'entrée du système, les rendements d'atomisation obtenus sont supérieurs ou égaux à 70 %, valeur définie comme intéressante à cette échelle en raison de la taille de la chambre de pulvérisation (Tableau 67). L'apparence des trois poudres obtenues est satisfaisante pour une intégration dans des formulations cosmétiques, et leurs taux d'humidité, estimés à moins de 3 %, sont également convenables. Le meilleur rendement étant obtenu pour une température d'entrée de 160 °C, cette dernière a été sélectionnée pour la suite de l'étude.

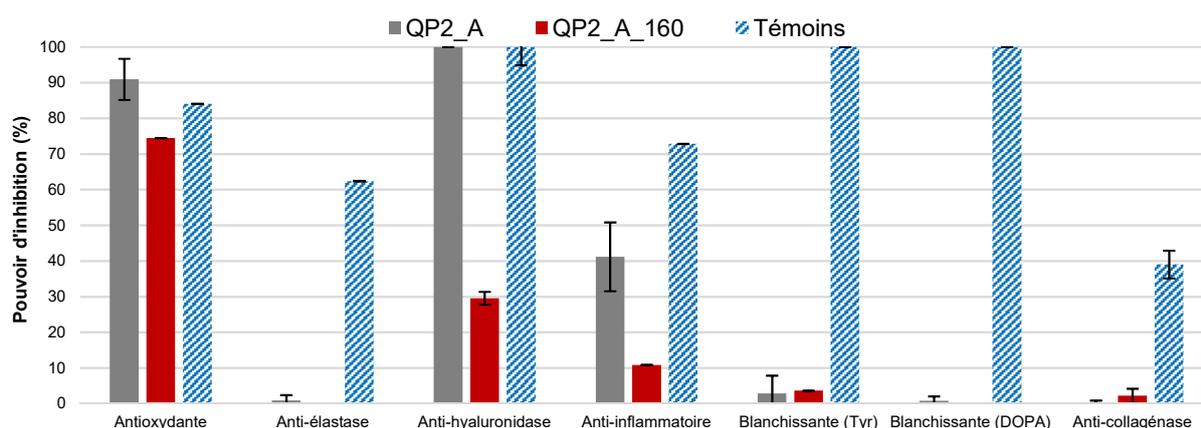
**Tableau 67** : Conditions d'atomisation et rendements obtenus pour les extraits atomisés

Extrait	Température d'entrée	Rendement
QP2_A_160	160 °C	79 %
QP2_A_180	180 °C	75 %
QP2_A_200	200 °C	69 %

L'influence de la concentration totale en solide de la solution à atomiser sur le rendement d'atomisation a également été évaluée. Pour cela, un nouvel essai d'atomisation a été réalisé en augmentant cette concentration de 0,15 g/mL à 0,20 g/mL, tout en conservant le ratio

maltodextrine/extrait 2/1. En fixant la température de l'air à l'entrée du système à 160 °C, aucune poudre n'a été obtenue, puisque la solution nébulisée s'est retrouvée collée à la surface du cylindre de nébulisation et a brûlé. Il a donc été considéré qu'une concentration en solide de 0,15 g/mL était adaptée à l'atomisation efficace de l'extrait de chêne.

En revanche, cette mise sur support engendre des pertes d'activités biologiques de l'extrait QP2\_A\_160, principalement d'activités anti-inflammatoires et anti-hyaluronidase (Figure 163). Les activités antioxydantes sont quant à elles conservées. Ces pertes d'activités sont dues à la « dilution » de l'extrait par la maltodextrine.



**Figure 163** : Activités biologiques de l'extrait QP2\_A\_160 déposé sur maltodextrine

Des études supplémentaires seront nécessaires afin d'affiner les paramètres d'atomisation, notamment afin de déterminer le ratio massique extrait/maltodextrine idéal permettant de limiter les pertes d'activités tout en obtenant une poudre de qualité et un rendement satisfaisant.

Cette première étude d'atomisation de l'extrait QP2\_A a permis de sélectionner les conditions d'atomisation adaptées pour obtenir une poudre avec un rendement d'atomisation et un taux d'humidité satisfaisants. Cependant, cette mise sur support s'accompagne de pertes d'activités par « dilution » des composés d'intérêt sur la maltodextrine.

#### 4.2.2.9. Etude de stabilité de l'ingrédient liquide

Lorsque toutes les étapes d'optimisation des conditions d'extraction, ainsi que de formulabilité de l'extrait sont réalisées, il est nécessaire d'étudier la stabilité de l'ingrédient au cours du temps. Cette étude a été effectuée à partir d'un ingrédient réalisé à l'échelle pilote, afin d'être le plus proche possible de l'ingrédient qui sera obtenu à l'échelle industrielle. L'extrait liquide a donc été sélectionné pour cette étude, pour des raisons de facilité de transposition du procédé d'extraction à l'échelle pilote. En effet, l'obtention de l'extrait sec nécessitant des étapes de concentration et de mise sur support supplémentaires par rapport à l'extrait liquide, son étude de stabilité sera conduite de la même manière ultérieurement.

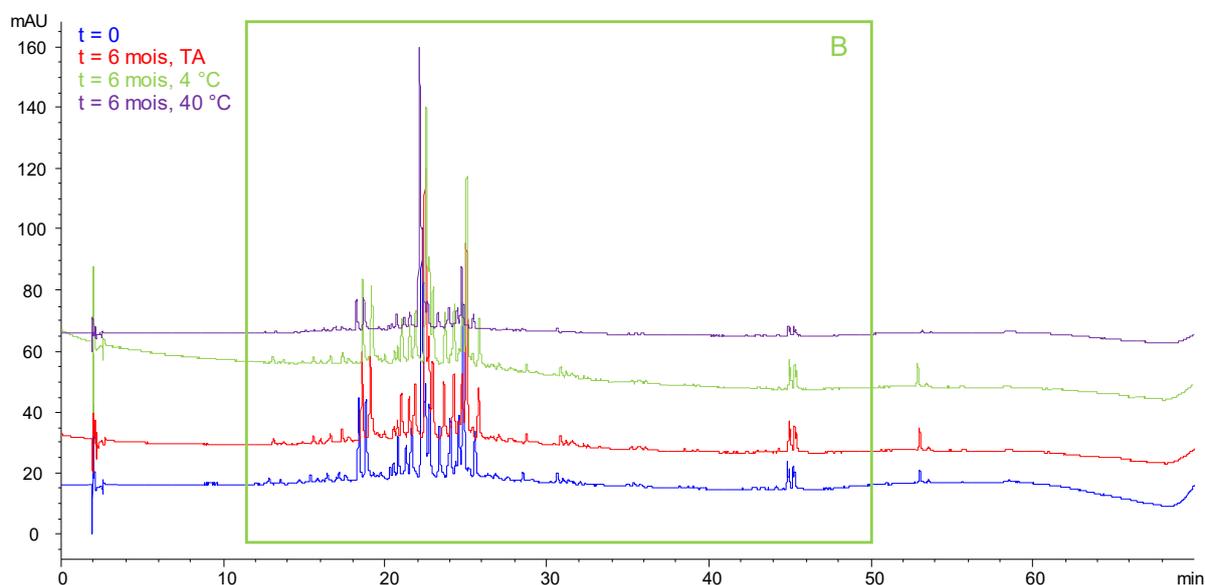
Un extrait QP\_Pilote a été réalisé à l'échelle pilote selon les conditions d'extraction déterminées lors de l'étude d'optimisation (Tableau 68). Une étape de pressage mécanique a été ajoutée à ce procédé afin de récupérer une partie du propylène glycol retenu par la matière végétale et ainsi augmenter le rendement spécifique d'extraction. Le profil phytochimique et les activités de cet extrait sont comparables à ceux de l'extrait QP\_PG, ce qui traduit de la réussite de la transposition d'échelle.

**Tableau 68** : Conditions expérimentales et rendement obtenu pour l'extrait pilote de chêne

Provenance	Masse matière végétale	Conditions expérimentales	Rendement
Valrose, 2018	1,243 kg	7 h, TA, agitation mécanique à 1500 rpm	93 %

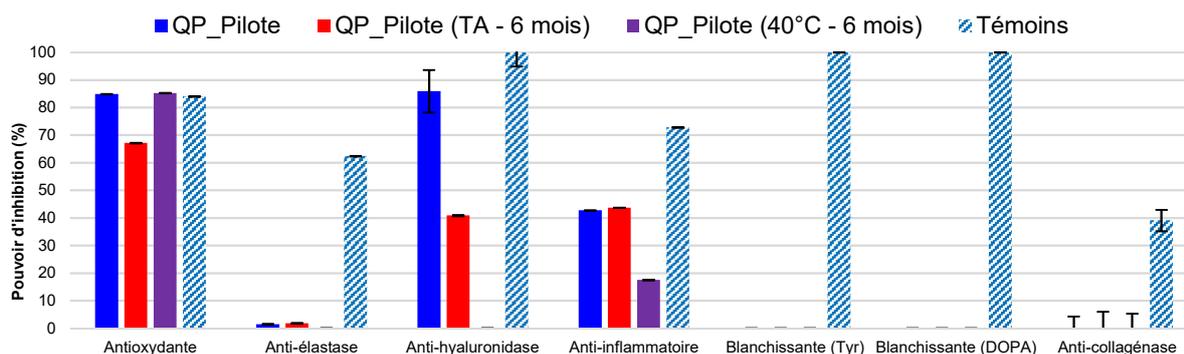
Un échantillon de cet extrait est alors conservé selon les 3 conditions de température (4°C, température ambiante et 40 °C) déterminées pour le suivi de stabilité au cours du temps. Aucun changement de couleur, d'odeur, ou d'aspect des extraits n'est mis en évidence au cours du temps, et ce, quelle que soit la température de stockage. Les mesures de pH sont également stables au cours du temps.

Les profils chromatographiques, obtenus après concentration de l'échantillon par SPE selon les conditions déterminées précédemment, permettent de suivre la stabilité chimique des extraits. Quelle que soit la température de stockage, les extraits de chêne présentent la même composition phytochimique que l'extrait pilote (Figure 164).



**Figure 164** : Chromatogrammes HPLC-DAD à 366 nm de l'extrait pilote de chêne à t = 0 (bleu) et après 6 mois de mise en stabilité selon différentes conditions de température (TA - rouge, 4 °C - vert, 40 °C - violet)

Quelle que soit la température de stockage, des pertes d'activités anti-hyaluronidase sont observées pour ces deux extraits, particulièrement pour l'extrait conservé à 40 °C (Figure 165). Les activités anti-inflammatoires de l'extrait conservé à 40 °C sont également impactées. En revanche, les activités antioxydantes de ces deux extraits sont conservées après 6 mois de mise en stabilité. Des précautions particulières de conservation telles que la conservation de l'extrait dans un emballage opaque et à température modérée seront nécessaires afin d'éviter la dégradation des composés sensibles, responsables des activités anti-inflammatoires et anti-hyaluronidase.



**Figure 165 :** Activités biologiques de l'extrait pilote de chêne au moment de sa production, et après 6 mois de mise en stabilité, conservé à TA et 40 °C

#### 4.2.2.10. Etude de toxicité de l'ingrédient liquide

La cytotoxicité, le potentiel d'irritation cutanée et le potentiel d'irritation oculaire de l'extrait ont été évalués ; les résultats de ces tests sont encourageants pour la commercialisation de cet ingrédient (Tableau 69). En effet, les potentiels irritants cutané et oculaire présentent des valeurs conformes à la réglementation. De la même manière, l'échantillon induit une réduction relative de la viabilité des cellules seulement lorsque celles-ci sont exposées à des doses extrêmement importantes ( $DL_{50} > 5000$  mg/kg) ; le test *in vitro* 3T3 NRU permet donc de conclure quant à l'absence de cytotoxicité de l'échantillon.

**Tableau 69 :** Résultats des tests de toxicité de l'ingrédient QP\_Pilote

Test de toxicité	Résultats	Règlementation
Cytotoxicité <i>in vitro</i> 3T3 NRU	$Cl_{50} = 35,52$ mg/mL $DL_{50} = 5209$ mg/kg	$DL_{50} > 2000$ mg/kg
Potentiel irritant cutané <i>in vitro</i>	Viabilité tissulaire $> 50$ %	Viabilité tissulaire $> 50$ %
Potentiel irritant oculaire <i>in vitro</i>	Viabilité tissulaire $> 60$ %	Viabilité tissulaire $> 60$ %

Les études de stabilité de l'ingrédient QP\_Pilote sont encourageantes, bien que des précautions particulières de conservation soient nécessaires afin d'éviter la dégradation de certains composés d'intérêt. L'ingrédient ne présente par ailleurs pas de toxicité.

Ces résultats confirment l'intérêt de développer un tel ingrédient cosmétique à partir d'un extrait de parties aériennes de chêne. Le calcul du coût de production et les étapes d'objectivation de cet ingrédient seront à réaliser par la suite afin de finaliser le développement de cet ingrédient en vue de sa commercialisation prochaine.

**Cette étude a permis de mettre en place toutes les étapes nécessaires au développement d'ingrédients cosmétiques à partir de matières premières naturelles. L'exemple du chêne a permis d'illustrer l'importance de chacune des étapes menant *in fine* à des ingrédients aux activités démontrées.**

**L'étude de formulabilité de l'extrait hydroalcoolique de parties aériennes de chêne est à compléter par une étude de décoloration, et il est par ailleurs nécessaire de transposer les conditions d'atomisation à l'extrait hydroalcoolique 50/50. Il sera alors primordial de transposer l'ensemble du processus à l'échelle pilote. Une étude de stabilité de l'ingrédient sur support solide est également à prévoir.**

**L'ingrédient liquide obtenu par extraction des parties aériennes de chêne au propylène glycol est en cours de transposition à l'échelle industrielle en vue d'une commercialisation fin 2019. Une étude plus poussée de décoloration pourrait être menée afin d'obtenir un ingrédient décoloré et toujours actif.**

**Le développement d'autres ingrédients obtenus par extraction des parties aériennes de chêne à l'aide de glycérine ou d'alternatives biosourcées est également envisagé pour la suite.**

Cette étude a conduit à la publication de deux articles :

H. Plainfossé *et al.*, Development of a natural anti-age ingredient based on *Quercus pubescens* Willd. leaves extract - A case study, *Cosmetics*, 5(1), **2018**.

H. Plainfossé *et al.*, Eco-conception of an anti-age ingredient based on *Quercus pubescens* Willd. leaves extract, *Household and Personal Care Today*, 13(4), **2018**.

### 4.3. Développement d'ingrédients à partir des feuilles de *Prunus domestica* L.

#### 4.3.1. Choix de la matière première

Le prunier domestique (*Prunus domestica* L.) est un arbre fruitier de la famille des Rosacées [190]. C'est la principale espèce de prunier cultivée en Europe et en Asie du Sud-Ouest, notamment pour ses fruits. Pouvant atteindre jusqu'à 7 mètres, il est caractérisé par de petites feuilles dentées et s'adapte à des conditions climatiques variées. Ses fleurs blanches (floraison entre mars et mai) permettent la formation de grosses drupes, c'est-à-dire des fruits charnus renfermant un noyau à une seule graine. La fructification a lieu entre juillet et septembre, et les prunes sont très appréciées fraîches ou séchées comme dessert, ou pour la préparation de tartes et d'eau de vie [305].

L'espèce *Prunus domestica* compte de nombreuses variétés. La variété Perdrigon violet, encore appelée Perdrigon bleu ou Prune de Brignoles, est une variété très ancienne, cultivée en Provence et dans les Alpes (Figure 166). Elle est caractérisée par des branches duveteuses et des fruits à la forme ovale, de calibre moyen, arrivant à maturité de mi-août à fin septembre.

Le nom de cette variété est lié à la couleur de la peau de son fruit : rouge dans un premier temps, elle devient rapidement violette. Sa chair, plutôt ferme et sucrée, est accrochée au noyau et présente une couleur jaune-verdâtre. En Provence, ces fruits sont séchés et transformés afin de donner des « pistoles » selon le procédé suivant : les prunes sont pelées (à l'aide d'un léger chauffage si besoin), séchées, dénoyautés et aplaties à la main puis elles subissent un dernier séchage avant de pouvoir être consommées [305].



**Figure 166** : Prunier de Brignoles (Source : association « La Prune de Brignoles »)

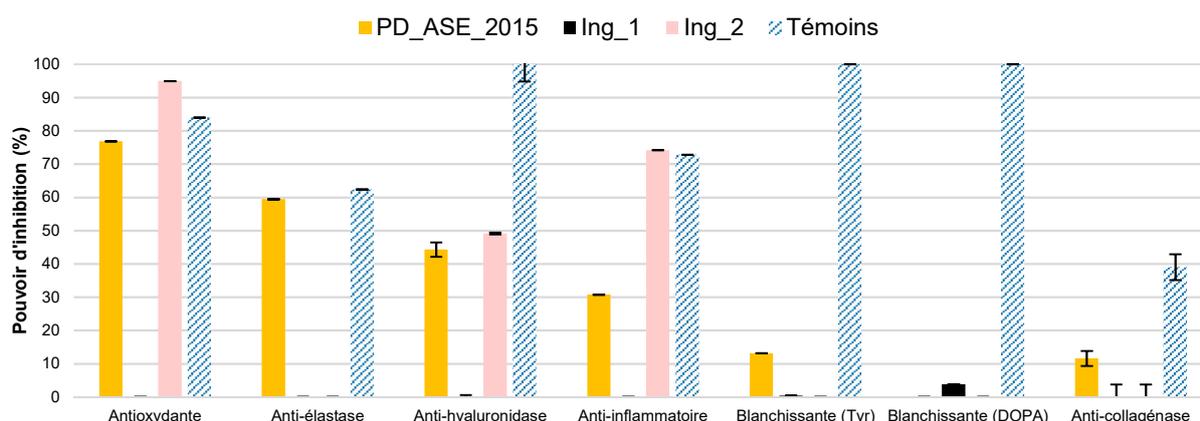
Le prunier est donc un arbre cultivé pour ses fruits et une bonne gestion des cultures est indispensable afin d'en améliorer la productivité d'une année à l'autre. Pour cela, les producteurs réalisent un élagage annuel de leurs arbres, une fois la fructification terminée. Cette taille, nécessaire pour une production efficace de prunes de bonne qualité, génère une quantité importante de déchets (branches et feuilles) dont la gestion incombe aux producteurs (ils sont généralement brûlés, ce qui génère des coûts supplémentaires). Par ailleurs, il est important de noter qu'un prunier ne produit des fruits qu'une fois à maturité ; selon les variétés, cette maturité est atteinte entre quatre à six ans après la mise en culture. Ainsi, la culture de ces arbres fruitiers ne génère aucun bénéfice durant les premières années de mise en culture, tout en ayant un coût certain lié à la main d'œuvre nécessaire à la gestion des arbres.

La valorisation des feuilles de prunier en tant que matière première pour la production d'ingrédients cosmétiques permettrait d'agir à deux niveaux sur cette production : elle permettrait de fournir une source de revenus aux producteurs en attendant la maturation des pruniers, tout en diminuant les coûts inhérents à la destruction de ces déchets. Elle participe également à la réduction de l'impact environnemental de ces cultures.

Quelques études de caractérisation de la composition phytochimique d'extraits de feuilles de *P. domestica* ont été menées précédemment [306, 307], et font notamment mention du pouvoir antioxydant d'un extrait hydroalcoolique [306] et d'autres activités biologiques laissant présupposer une potentielle valorisation de tels extraits pour le développement d'actifs cosmétiques [307]. Des brevets portant sur des formulations cosmétiques intégrant des extraits obtenus à partir de feuilles d'espèces de *Prunus* ont été identifiés [308, 309] ; cependant aucun brevet mentionnant l'exploitation dans le domaine cosmétique, de cette espèce de prunier en particulier n'a été identifié. De la même manière, des ingrédients

cosmétiques développés à partir d'extraits de fruits ou de noyaux de *P. domestica* existent sur le marché, mais aucun n'a été obtenu à partir de feuilles [285].

Lors du criblage présenté dans le chapitre 2, les activités biologiques intéressantes d'un extrait éthanolique de feuilles de prunier de Brignoles obtenu par extraction accélérée par solvant (ASE) et disponible dans l'extractothèque du groupe MVBV, ont été mises en évidence (extrait dénommé PD\_ASE\_2015, Figure 167). Cet extrait présente une forte capacité antioxydante, des potentiels d'inhibition intéressants de l'élastase et de la hyaluronidase, ainsi qu'une activité anti-inflammatoire non négligeable. Afin d'évaluer l'intérêt d'un tel extrait sur le marché cosmétique, ses activités ont été comparées avec celles de deux ingrédients disponibles sur le marché contenant des extraits de feuilles d'autres espèces de *Prunus*. Le premier ingrédient (Ing\_1) est composé d'un extrait de feuilles de pêcher (*Prunus persica*), alors que le second (Ing\_2) est constitué d'un mélange de 3 extraits : un extrait de fruits de pommier sauvage (*Pyrus malus*), un extrait de fruits de framboisier (*Rubus ideaus*) et un extrait de feuilles de pêcher (Figure 167). L'ingrédient Ing\_1, ne présente aucune activité, alors que l'ingrédient Ing\_2 présente des activités antioxydantes, anti-hyaluronidase et anti-inflammatoires. Cependant, cet ingrédient étant constitué d'un mélange de 3 extraits, il est difficile de déterminer la contribution de l'extrait de feuilles de pêcher sur ces activités.



**Figure 167** : Activités biologiques de l'extrait de feuilles de *P. domestica* et des ingrédients commerciaux Ing\_1 et Ing\_2 contenant un extrait de *P. persica*

Les activités antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-hyaluronidase de l'extrait de feuilles de prunier, en font un candidat intéressant pour le développement d'un ingrédient cosmétique et ce d'autant plus que les feuilles de cette espèce n'ont encore jamais été valorisées dans le domaine cosmétique.

La valorisation d'un co-produit de la fruiticulture locale comme matière première dont la filière d'approvisionnement est identifiée, représente également un argument majeur quant au choix de cette matière pour un développement à l'échelle industrielle.

## 4.3.2. Caractérisation phytochimique de l'extrait de prunier

### 4.3.2.1. Profil phytochimique et activités biologiques

Afin d'identifier les composés présents, un nouvel extrait de feuilles de prunier a été obtenu par macération éthanolique (PD\_EtOH). Contrairement à l'ASE, cette technique présente l'avantage d'être facilement transposable à l'échelle industrielle. L'éthanol a en revanche été conservé comme solvant d'extraction, étant données les activités biologiques intéressantes que présentait l'extrait PD\_ASE\_2015.

L'extraction a été réalisée à partir de feuilles de prunier récoltées en 2016, préalablement séchées et broyées (Tableau 70). Après filtration et évaporation, l'extrait réalisé en triplicat a été obtenu avec un rendement de  $11 \pm 1$  %. Il est plus faible que celui obtenu suite à l'extraction par ASE (18,1 %). Cette différence de rendement peut être directement liée à la technique d'extraction utilisée : l'ASE permet d'épuiser davantage la matière première, puisque 3 extractions successives sont réalisées avec du solvant « frais ». Les conditions de pression et de température (70 °C) utilisées pour l'ASE peuvent également expliquer ce meilleur rendement. Par ailleurs, de très nombreux facteurs environnementaux (lumière, pédologie, température, année et saison de récolte, etc.) influent sur la composition chimique des feuilles et peuvent impacter le rendement d'extraction [287]. D'autres paramètres tels que les conditions de récolte, de séchage, de stockage ou encore de broyage peuvent également avoir un impact sur leur composition. Lors de cette étude, il a été choisi de sécher le matériel végétal à l'air libre avant de le stocker, afin de conserver la qualité de la plante, et avoir un impact moindre sur sa composition phytochimique [310].

**Tableau 70** : Conditions expérimentales utilisées pour l'extrait PD\_EtOH

<b>Matière première</b>	<b>Solvant</b>	<b>Ratio</b>	<b>Température</b>	<b>Durée</b>	<b>Rendement</b>
Brignoles, 2016	EtOH	1/5	Ambiante	2 h	$11 \pm 1$ %

L'extrait PD\_EtOH est caractérisé par la présence des 3 principaux groupes de composés déjà mis en évidence dans les extraits de chêne pubescent : le groupe A correspondant à des sucres, acides aminés, etc. ; le groupe B regroupant les composés moyennement polaires, tels que les polyphénols, et le groupe C correspondant aux terpénoïdes et acides gras (Figure 168). Six composés principaux, numérotés PD\_1 à PD\_6, ont été mis en évidence sur le profil HPLC/DEDL de cet extrait.

Cet extrait éthanolique présente des activités antioxydantes et anti-élastase très intéressantes ainsi que des activités anti-hyaluronidase, anti-inflammatoires et blanchissante (substrat L-tyrosine) notables (Figure 169).

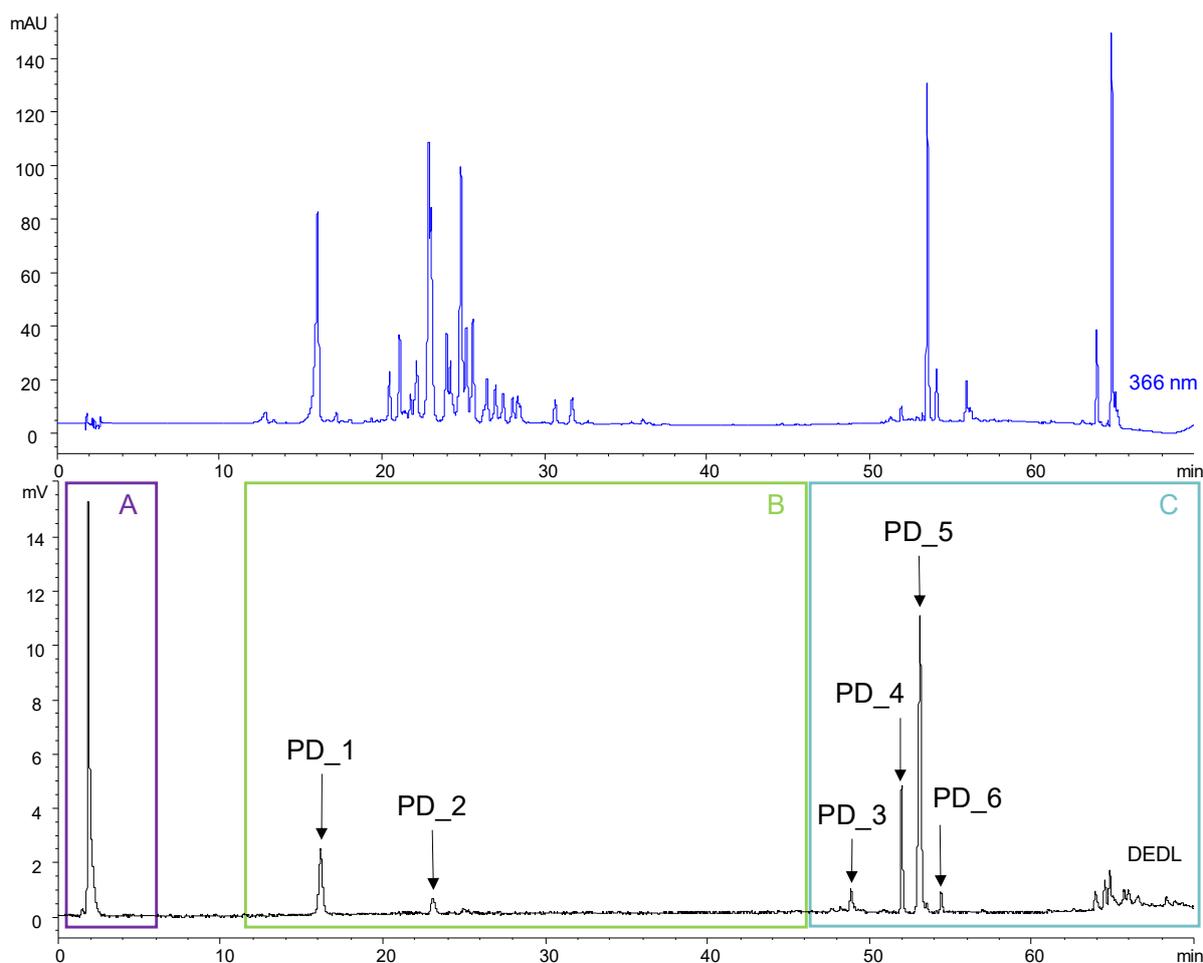


Figure 168 : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 366 nm de l'extrait PD\_EtOH

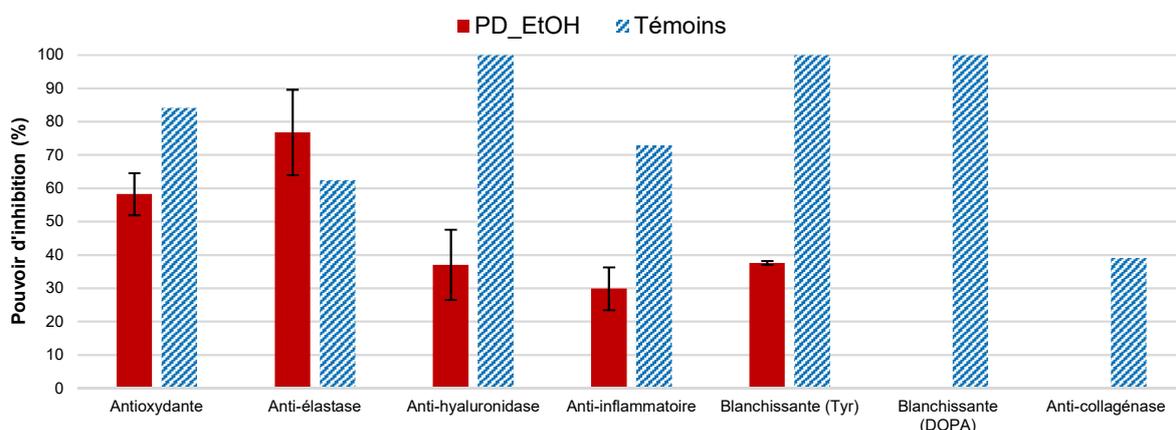
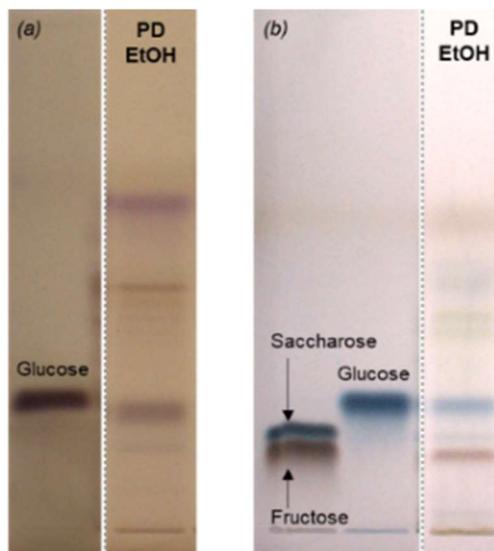


Figure 169 : Activités biologiques de l'extrait PD\_EtOH

#### 4.3.2.2. Caractérisation de l'extrait PD\_EtOH

Afin d'identifier les familles de composés présents dans cet extrait, différentes analyses par HPTLC ont été réalisées à l'aide des révélateurs déjà utilisés lors des études des extraits de germandrée et de chêne. Les dérivations avec l'orcinoïl, ainsi qu'avec la DAPA révèlent la présence de nombreux glucides, parmi lesquels le glucose, le fructose, et dans une moindre mesure le saccharose, ont été identifiés (Figure 170).



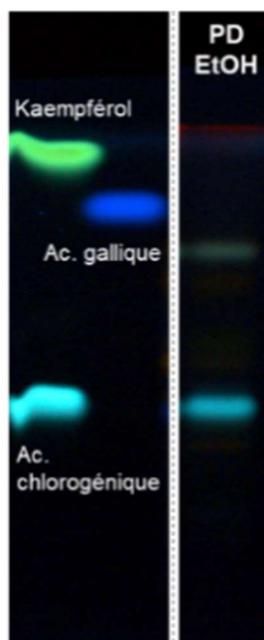
**Figure 170** : Etude des glucides de l'extrait PD\_EtOH par HPTLC (révélation à la lumière blanche après dérivatisation avec l'orcinol - plaque (a) et avec la DAPA - plaque (b))

La teneur de ces composés dans l'extrait PD\_EtOH a été estimée à l'aide d'un dosage par HPTLC (Tableau 16). Ils représentent  $4,7 \pm 0,5$  % de cet extrait, et le fructose est identifié comme le sucre majoritaire. Cette teneur en sucres relativement faible peut être expliquée par la nature du solvant d'extraction utilisé : l'éthanol, moins polaire qu'un mélange hydroalcoolique, permet d'extraire moins de composés très polaires du groupe A (sucres, etc.).

**Tableau 71** : Teneurs en sucres identifiés dans l'extrait PD\_EtOH par dosage par HPTLC

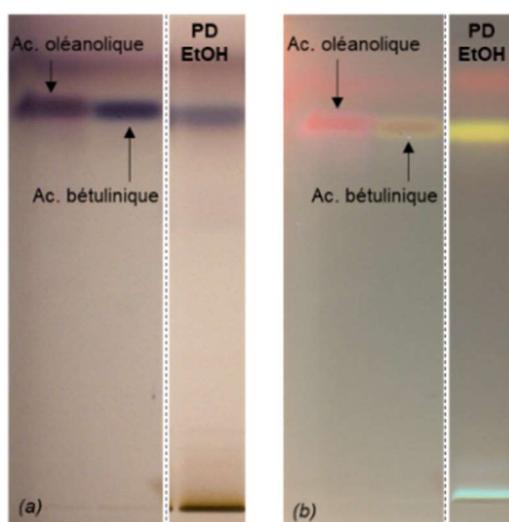
Composé	Fructose	Glucose	Saccharose
Teneur ( $\text{mg}_{\text{composé}} / \text{g}_{\text{extrait}}$ )	$28 \pm 3$	$17 \pm 1$	$2 \pm 1$

La révélation au réactif de Neu, puis au PEG a mis en évidence la présence de flavonoïdes parmi les composés du groupe B, et notamment d'**acide chlorogénique** (Figure 171). La présence de ce dernier a été confirmée par co-injection du standard analytique par HPLC ; il correspond au composé **PD\_1** mis en évidence sur le profil HPLC (Figure 168). L'acide chlorogénique, déjà décrit les feuilles de *P. domestica* [307], contribue aux activités antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-hyaluronidase de cet extrait. Sa teneur a été estimée à 3,2 % par étalonnage externe.



**Figure 171** : Etude des polyphénols et flavonoïdes de l'extrait PD\_EtOH par HPTLC (révélation à 366 nm après dérivations avec le réactif de Neu et le PEG 400)

La révélation avec l'anisaldéhyde a permis la mise en évidence de composés peu polaires correspondants à des monoterpènes et des triterpènes (Figure 172). L'acide bétulinique (révélation à 366 nm) et éventuellement l'acide oléanolique (révélation à la lumière blanche) semblent présents, mais leurs rapports frontaux étant très proches, cette analyse par HPTLC ne permet pas de les distinguer. La co-injection des standards analytiques par HPLC a permis d'identifier le composé **PD\_4** qui correspond à l'**acide bétulinique**, et le composé **PD\_5** qui correspond à l'**acide oléanolique**. Leurs teneurs respectives ont été estimées à 1,4 % et 1,5 % dans l'extrait par dosage par étalonnage. Ces composés, non décrits dans le genre *Prunus*, contribuent aux activités biologiques de l'extrait éthanolique : comme cela a été indiqué précédemment, l'acide bétulinique présente de fortes activités anti-élastase, anti-collagénase et anti-hyaluronidase, et l'acide oléanolique présente des activités anti-inflammatoires et anti-élastase.



**Figure 172** : Etude des composés peu polaires de l'extrait PD\_EtOH par HPTLC (révélation à la lumière blanche - plaque (a) et révélation à 366 nm – plaque (b) après dérivatisation avec l'anisaldéhyde)

Lors des analyses par HPTLC, la présence dans cet extrait de composés de type chlorophylle a également été mise en évidence par la présence de bandes rouges observées à 366 nm sans révélation.

Des analyses par GC-MS réalisées sur deux colonnes de natures différentes, ont permis d'identifier 8 composés dans cet extrait (Tableau 72). Le palmitate d'éthyle [311], le linoléate d'éthyle [312], l'octadécanoate d'éthyle [311] et l'eugénol [313] ont déjà été décrits dans des extraits de fruits ou de bourgeons de l'espèce *P. domestica*. L'acide palmitique [314, 315] et le 4-vinyl gaïacol [316] ont quant à eux été décrits dans d'autres espèces de *Prunus*. En revanche, le néophytadiène et le pyrocatechol identifiés dans cet extrait, n'ont jamais été mis en évidence dans le genre *Prunus*. L'évaluation des activités biologiques des standards analytiques disponibles au laboratoire ont permis d'établir que certains de ces composés, et notamment l'acide palmitique, l'eugénol et le 4-vinyl gaïacol, contribuent aux activités de cet extrait. Ces mêmes standards analytiques ont été co-injectés par HPLC : ils ne correspondent pas aux 3 composés principaux restants à identifier.

**Tableau 72** : Composés identifiés par GC-MS dans l'extrait PD\_EtOH

Composés	RI calculé <sup>(1)</sup> / RI littérature	Références	Activités biologiques <sup>(3)</sup>
Néophytadiène	1834*/1829 <sup>(2)</sup>	Non décrit dans le genre <i>Prunus</i>	Non évaluées
Acide palmitique	1938*/1943	Décrit dans un extrait de fruits séchés de <i>P. armeniaca</i> [314] et dans une huile de pépins de <i>P. mahaleb</i> [315]	Anti-hyaluronidase (52,00 ± 12,00 %)
Palmitate d'éthyle	1973*/978	Décrit dans un extrait de fruits de <i>P. domestica</i> [311]	Non évaluées
Linoléate d'éthyle	2140*/2139	Décrit dans un extrait de bourgeons de <i>P. domestica</i> [312]	Non évaluées
Octadécanoate d'éthyle	2171*/2181	Décrit dans un extrait de fruits de <i>P. domestica</i> [311]	Non évaluées
Pyrocatechol	1198**/1197	Non décrit dans le genre <i>Prunus</i>	Aucune
4-vinyl gaïacol	1300**/1311	Décrit dans un extrait de fruits séchés de <i>P. armenicus</i> [316]	Anti-inflammatoire (58,59 ± 0,01 %)
Eugénol	1348**/1348	Décrit dans un extrait de fruits séchés de <i>P. domestica</i> [313]	Anti-inflammatoire (59,72 ± 0,01 %) et antioxydante (88,35 ± 0,01 %)

<sup>(1)</sup> RI = indice de rétention déterminé sur colonne HP-1 (\*) ou DB-5 (\*\*) à l'aide d'une série d'alcane (C8-C24) et comparé aux RI disponibles dans la littérature – <sup>(2)</sup> Tentative d'identification – <sup>(3)</sup> évaluées selon les tests in vitro

Cet extrait a ensuite été analysé par HPLC-ESI-MS selon les deux modes d'ionisation, afin d'obtenir des informations sur les autres composés à identifier, et notamment les composés du groupe B. La présence de l'acide chlorogénique a été confirmée lors de ces analyses. Elles ont également permis d'émettre des hypothèses sur la nature de 3 composés du groupe B, dont le composé PD\_2.

Le premier composé est caractérisé par un ion pseudo-moléculaire de  $m/z$  595 [M1+H]<sup>+</sup>, se fragmentant en ions de  $m/z$  433 [M1+H-glucose]<sup>+</sup> et 287 [M1+H-glucose-rhamnose]<sup>+</sup>. Il pourrait

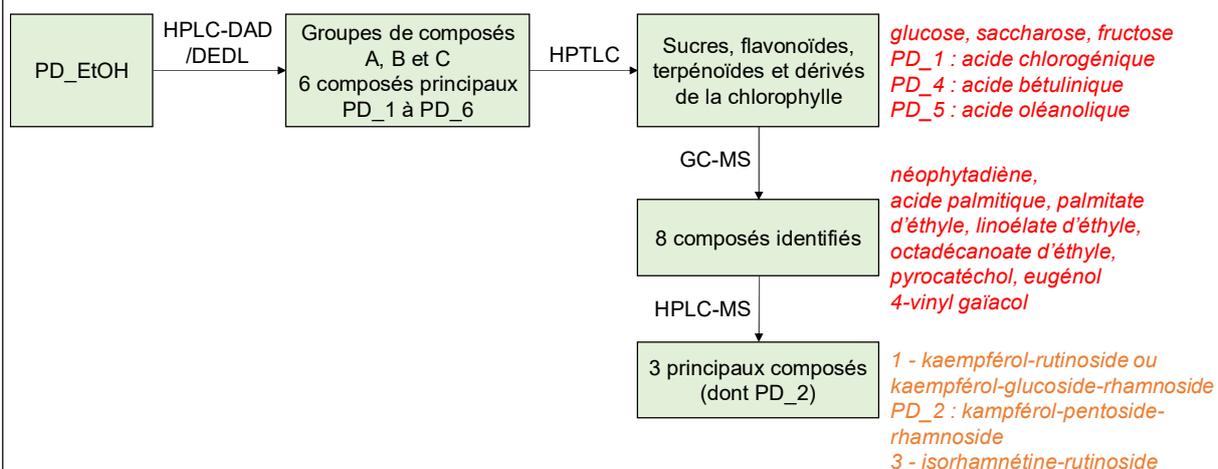
ainsi correspondre à un dérivé glycosylé contenant un groupement de type glucose et un groupement de type hexose, tous deux greffés sur un aglycone de masse 286 g/mol.

Le second composé, qui correspondrait au composé PD\_2 par comparaison des temps de rétention, est caractérisé par la présence d'un ion pseudo-moléculaire de  $m/z$  565  $[M_2+H]^+$ , se fragmentant en ions de  $m/z$  433  $[M_2+H-pentose]^+$  et 287  $[M_2+H-pentose-rhamnose]^+$ . Il serait lui aussi constitué d'un aglycone de masse égale à 286 g/mol, auquel seraient greffés un sucre de type pentose et un autre de type rhamnose.

Le troisième composé présente quant à lui, un ion pseudo-moléculaire de  $m/z$  625  $[M_3+H]^+$  donnant lieu à un ion de  $m/z$  317  $[M_3+H-rutinoside]^+$ . Il pourrait s'agir d'un dérivé glycosylé dont l'aglycone aurait une masse de 316 g/mol auquel serait greffé un groupement rutinoside. Bien que ces analyses ne soient pas suffisantes pour caractériser davantage ces composés, certaines hypothèses de structure ont été émises par comparaison avec la littérature [307]. Le composé 1 pourrait correspondre au kaempférol-rutinoside ou au kaempférol-glucoside-rhamnoside, tandis que le composé 2 pourrait correspondre au kaempférol-pentoside-rhamnoside et le composé 3 à l'isorhamnétine-rutinoside. Des analyses MS<sup>n</sup> permettraient d'obtenir davantage d'informations sur l'identification de ces composés.

L'extraction par macération éthanolique des feuilles de prunier permet d'obtenir un extrait présentant des activités antioxydantes, anti-élastase, anti-hyaluronidase, anti-inflammatoires et blanchissantes intéressantes. Il est caractérisé par la présence des 3 groupes de composés A, B et C, parmi lesquels 6 composés principaux, PD\_1 à PD\_6, se distinguent (Figure 173).

L'acide chlorogénique (PD\_1), l'acide bétulinique (PD\_4) et l'acide oléanolique (PD\_5) ont pu être identifiés parmi ces composés principaux. Les analyses par HPTLC ont également révélé la présence de nombreux sucres, notamment de fructose et de glucose, et dans une moindre mesure, de saccharose. Enfin, trois composés principaux ont été mis en évidence par HPLC-MS, dont un correspond au composé PD\_2. Huit composés volatils ont été identifiés par GC-MS dans cet extrait.



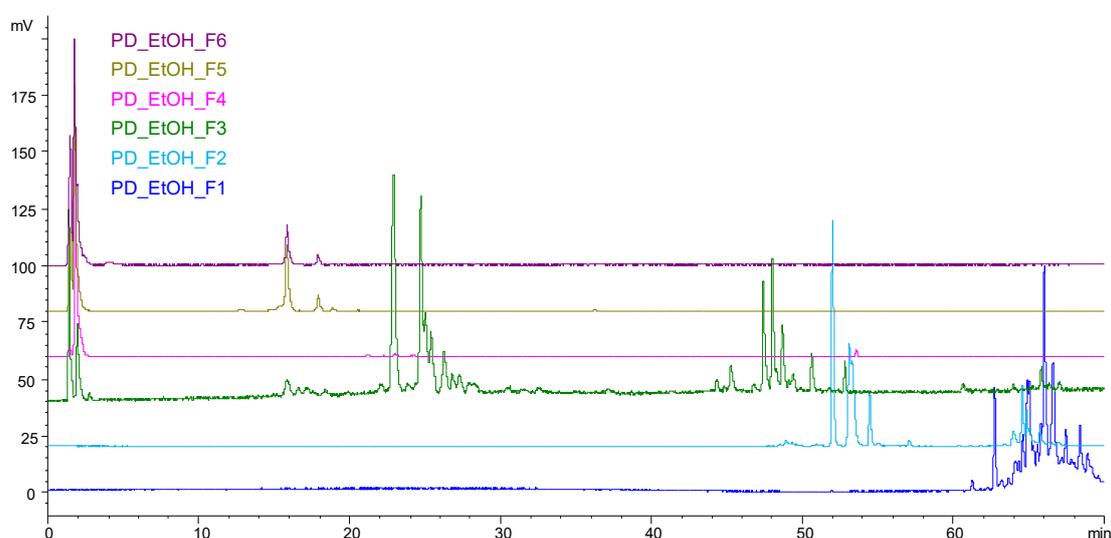
**Figure 173 :** Informations obtenues suite à la caractérisation phytochimique de l'extrait PD\_EtOH (rouge : composé identifié, orange : identification à confirmer)

### 4.3.2.3. Fractionnement bioguidé de l'extrait PD\_EtOH

Afin de compléter la caractérisation phytochimique de l'extrait de prunier, un fractionnement sur colonne de silice a été réalisé à partir de l'extrait PD\_EtOH (Tableau 73, Figure 174).

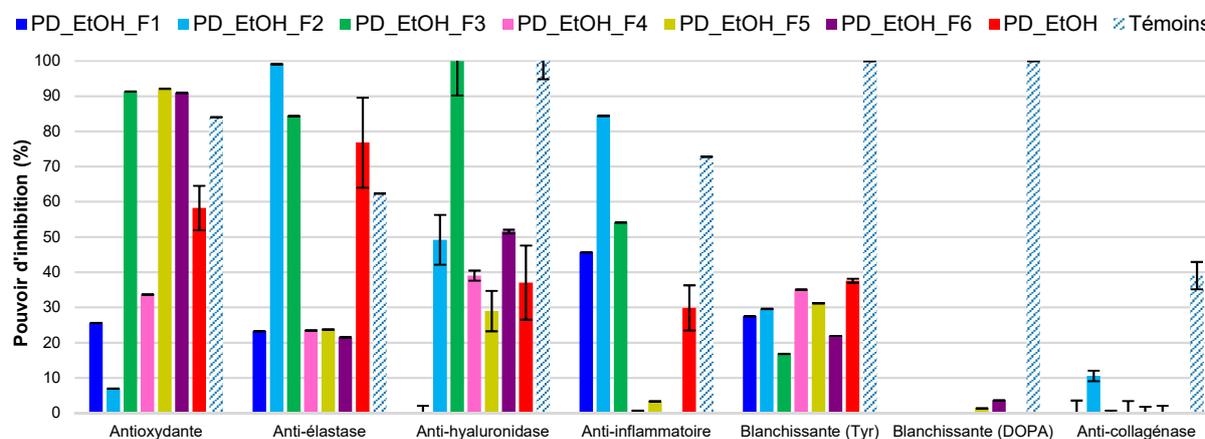
**Tableau 73** : Conditions expérimentales et rendements du fractionnement de PD\_EtOH

Extrait/Fraction	Solvant	Masse	Rendement
PD_EtOH	/	7,937 g	/
PD_EtOH_F1	Cyclohexane/éther diéthylique (50/50 v/v)	531 mg	6,7 %
PD_EtOH_F2	MeOH/éther diéthylique (20/80 v/v)	1041 mg	13,1 %
PD_EtOH_F3	MeOH/éther diéthylique (50/50 v/v)	1033 mg	13,0 %
PD_EtOH_F4	MeOH/éther diéthylique (80/20 v/v)	2549 mg	32,1 %
PD_EtOH_F5	MeOH	997 mg	12,6 %
PD_EtOH_F6	MeOH/H <sub>2</sub> O (50/50 v/v)	998 mg	12,6 %



**Figure 174** : Chromatogrammes HPLC/DEDL des fractions obtenues par fractionnement de l'extrait PD\_EtOH

Les activités biologiques de chacune des fractions ainsi obtenues ont alors été évaluées (Figure 175) ; les résultats de cette évaluation sont discutés fraction par fraction en lien avec leur phytochimie.



**Figure 175** : Activités biologiques des fractions obtenues par fractionnement de l'extrait PD\_EtOH

Afin de caractériser ces fractions et d'identifier les molécules les constituants, elles ont été analysées par différentes techniques d'analyses telles que l'HPTLC, la GC-MS, l'HPLC-DAD/DEDL et l'HPLC-MS.

#### 4.3.2.3.1. Caractérisation de la fraction PD\_EtOH\_F1

La fraction PD\_EtOH\_F1, obtenue avec un rendement de 6,7 %, présente une activité anti-inflammatoire modérée (45 %) (Figure 175). Les analyses par HPTLC, notamment la révélation avec l'anisaldéhyde, ont permis de mettre en évidence la présence de composés peu polaires correspondant à des triterpènes. Cette fraction est également caractérisée par la présence de dérivés de la chlorophylle.

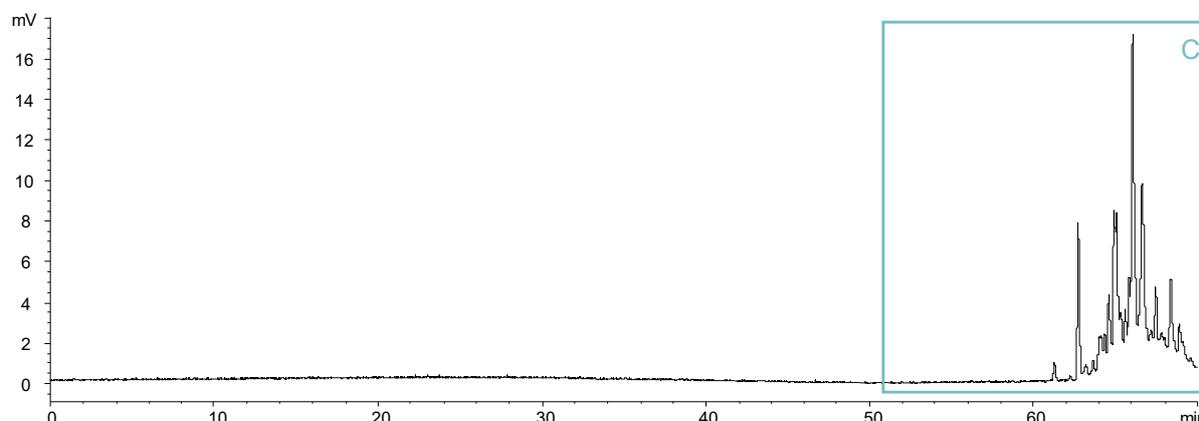
L'étude de cette fraction par GC-MS a permis d'identifier deux composés déjà décrits dans l'espèce *P. domestica* : l'eugénol [33] et la 6,10,14-triméthylpentadécane-2-one [312] (Tableau 74).

**Tableau 74** : Composés identifiés dans la fraction PD\_EtOH\_F1 par GC-MS

Composés	RI calculé <sup>(1)</sup> / RI littérature	Références	Activités biologiques <sup>(2)</sup>
Eugénol	1327/1330	Décrit dans un extrait de fruits séchés de <i>P. domestica</i> [313]	Anti-inflammatoire (59,71 ± 0,01 %) et antioxydante (88,35 ± 0,01 %)
6,10,14-triméthylpentadécane-2-one	1827/1830	Décrite dans l'huile de <i>P. domestica</i> [312]	Non évaluées

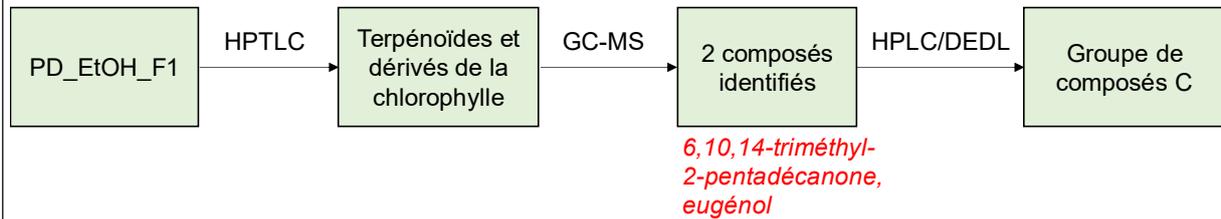
<sup>(1)</sup> RI = indice de rétention déterminé sur colonne HP-1 à l'aide d'une série d'alcane (C8-C24) et comparé aux RI disponibles dans la littérature – <sup>(2)</sup> évaluées selon les tests in vitro

D'après son profil HPLC, la fraction PD\_EtOH\_F1 est composée majoritairement des composés peu polaires du groupe C (Figure 176). Ces derniers correspondent d'après leurs spectres UV, aux triterpènes et dérivés de la chlorophylle mis en évidence par HPTLC, ainsi qu'à des acides gras. Ils sont responsables de l'activité anti-inflammatoire de cette fraction.



**Figure 176** : Chromatogramme HPLC/DEDL de la fraction PD\_EtOH\_F1

Les composés du groupe C (triterpènes, acides gras et dérivés de la chlorophylle) sont responsables de l'activité anti-inflammatoire de la fraction PD\_EtOH\_F1 (Figure 177). Deux composés ont également été identifiés par GC-MS.



**Figure 177** : Informations obtenues suite à la caractérisation phytochimique de la fraction PD\_EtOH\_F1

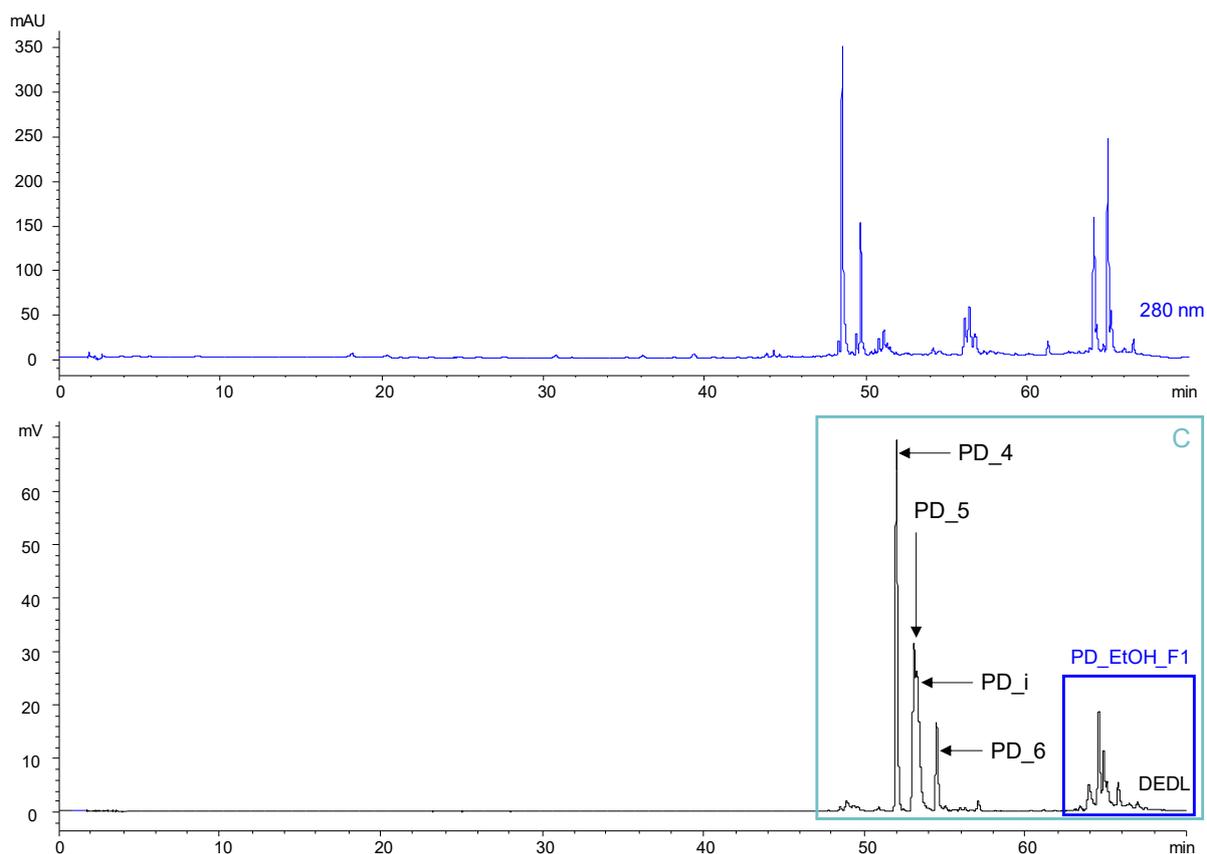
#### 4.3.2.3.2. Caractérisation de la fraction PD\_EtOH\_F2

La fraction PD\_EtOH\_F2 est obtenue avec un rendement de 13,1 %. Elle présente des activités anti-élastase et anti-hyaluronidase comparables à celles de l'extrait brut (Figure 175). Elle se démarque par une activité anti-inflammatoire plus importante que celle de l'extrait brut.

Les analyses par HPTLC révèlent la présence de composés peu polaires dans cette fraction (triterpènes et monoterpènes), notamment l'acide bétulinique et/ou l'acide oléanolique. Des composés de type chlorophylle sont également mis en évidence.

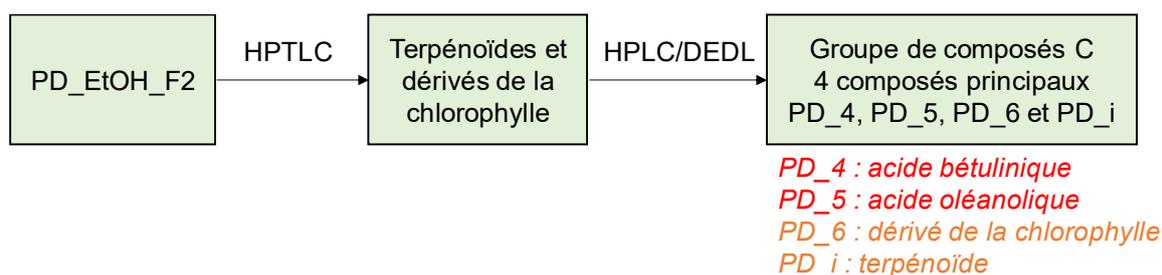
Les analyses par GC-MS de cette fraction n'ont permis d'identifier aucun composé volatil ou semi-volatil.

D'après le profil HPLC de cette fraction, elle est caractérisée par la présence de molécules peu polaires du groupe C, parmi lesquelles se trouvent les composés déjà identifiés dans la fraction PD\_EtOH\_F1 (Figure 178). Quatre composés principaux sont mis en évidence ; 3 d'entre eux correspondent aux composés principaux identifiés dans l'extrait brut (PD\_4 : acide bétulinique, PD\_5 : acide oléanolique et PD\_6). Le quatrième composé PD\_i semble co-éluer avec l'acide oléanolique. D'après son spectre UV, il appartiendrait à la famille des terpénoïdes. D'après les analyses par HPTLC, le composé PD\_6 correspondrait quant à lui, à un dérivé de la chlorophylle. La présence dans cette fraction PD\_EtOH\_F2, des composés déjà mis en évidence dans la fraction PD\_EtOH\_F1, explique une partie des activités anti-inflammatoires présentées par la fraction PD\_EtOH\_F2. Les autres composés du groupe C contribuent également à cette activité, ainsi qu'aux activités anti-élastase et anti-hyaluronidase de cette fraction.



**Figure 178** : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 280 nm de la fraction PD\_EtOH\_F2

La fraction PD\_EtOH\_F2 présente des activités anti-élastase, anti-hyaluronidase et anti-inflammatoires. Elle est caractérisée par la présence de composés peu polaires du groupe C, dont 4 sont majoritaires (Figure 179) ; les composés PD\_4 et PD\_5 ont été identifiés comme correspondants aux acides bétulinique et oléanolique. Les composés PD\_i (terpénoïde) et PD\_6 (dérivé de la chlorophylle) restent à être identifiés.

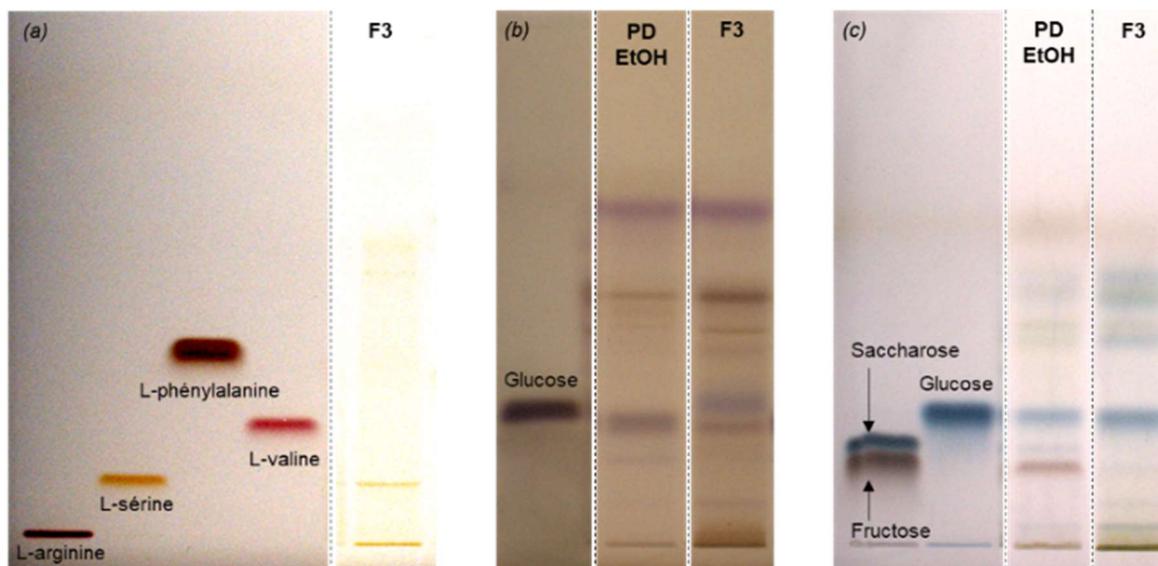


**Figure 179** : Informations obtenues suite à la caractérisation phytochimique de la fraction PD\_EtOH\_F2 (rouge : composé identifié, orange : composé à identifier)

#### 4.3.2.3.3. Caractérisation de la fraction PD\_EtOH\_F3

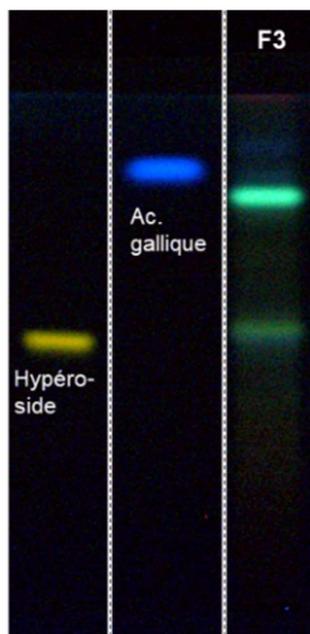
La fraction PD\_EtOH\_F3 a été obtenue avec un rendement de 13,0 %. Elle présente des activités antioxydantes, anti-élastase et anti-hyaluronidase très intéressantes, ainsi qu'une activité anti-inflammatoire notable, toutes supérieures à celles de l'extrait brut (Figure 175).

L'analyse par HPTLC et révélation à la ninhydrine a permis la mise en évidence d'acides aminés dans cette fraction. La comparaison des rapports frontaux de ces acides aminés avec ceux de standards permet notamment d'identifier la L-sérine (Figure 180). Les révélations avec l'orcinol et avec la DAPA témoignent de la diversité des glucides présents dans cette fraction. La composition en sucres de cette fraction est relativement comparable à celle de l'extrait brut ; on y note notamment la présence importante de glucose.



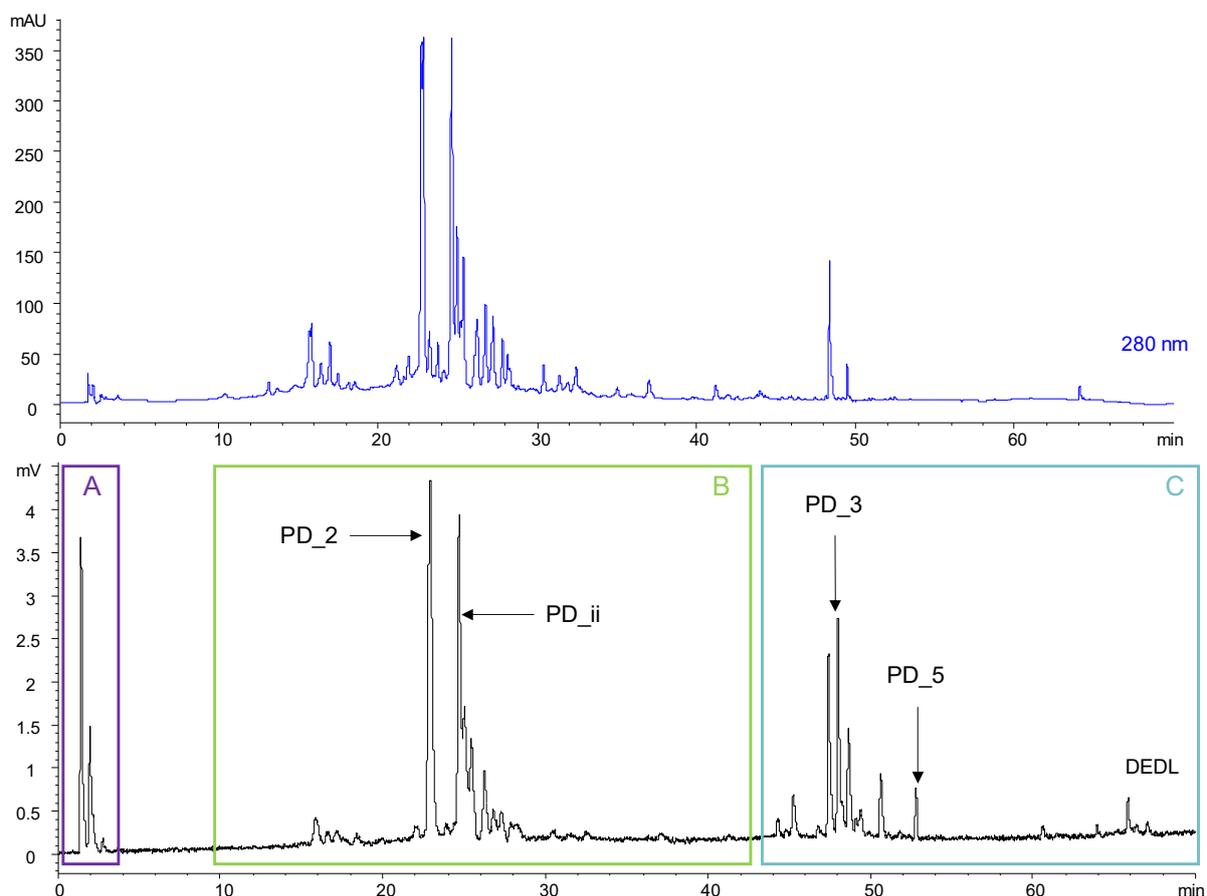
**Figure 180** : Etude des acides aminés et des glucides de la fraction PD\_EtOH\_F3 par HPTLC (révélation à la lumière blanche après dérivatisation avec la ninhydrine – plaque (a), avec l'orcinol - plaque (b), et avec la DAPA - plaque (c))

La fraction PD\_EtOH\_F3 est également caractérisée par la présence de composés peu polaires. La révélation à l'aide du réactif de Neu, suivie d'une révélation au PEG, traduit principalement la présence de deux flavonols (Figure 181).



**Figure 181** : Etude des composés phénoliques de la fraction PD\_EtOH\_F3 par HPTLC (révélation à 366 nm après dérivations avec le réactif de Neu et le PEG 400)

D'après son profil HPLC, cette fraction est composée des trois groupes de molécules A, B et C mis en évidence dans l'extrait brut (Figure 182). Parmi les composés du groupe B, deux molécules se démarquent : le composé PD\_2 (mis en évidence dans l'extrait brut) et le composé PD\_ii. D'après leur spectre UV, ils pourraient correspondre aux 2 flavonols mis en évidence par HPTLC. De nombreux composés sont également présents dans le groupe C, notamment les composés PD\_3 et PD\_5 (acide oléanolique) déjà observés dans l'extrait brut.



**Figure 182** : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 280 nm de la fraction PD\_EtOH\_F3

Les analyses par HPLC-ESI-MS de cette fraction ont permis d'émettre des hypothèses sur les structures des deux composés PD\_2 et PD\_ii. Le composé PD\_2 est caractérisé par la présence d'un ion pseudo-moléculaire de  $m/z$  565  $[M+H]^+$  et des ions de  $m/z$  433  $[M+H-pentose]^+$  et 287  $[M+H-pentose-rhamnose]^+$ , et correspond au composé 2 mis en évidence lors de l'analyse de l'extrait brut par HPLC-ESI-MS. Comme mentionné précédemment, ce dernier pourrait correspondre au kaempférol-pentoside-rhamnoside [307]. Cependant, d'autres composés tels que le kaempférol-3-O- $\beta$ -D-xylopyranoside-7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside et le kaempférol-3-O- $\alpha$ -L-arabinofuranoside-7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside, présentant la même fragmentation, pourraient également correspondre [317].

Le composé PD\_ii est caractérisé par un ion pseudo-moléculaire de  $m/z$  435  $[M+H]^+$  se fragmentant en un ion de  $m/z$  303  $[M+H-pentose]^+$ . Il correspondrait à un flavonol glycosylé tel que la quercétine-pentoside retrouvée dans de nombreuses feuilles et fleurs du genre *Prunus*

[307, 318]. Un isolement de ces composés est nécessaire afin de confirmer ces hypothèses et de déterminer leur structure par RMN.

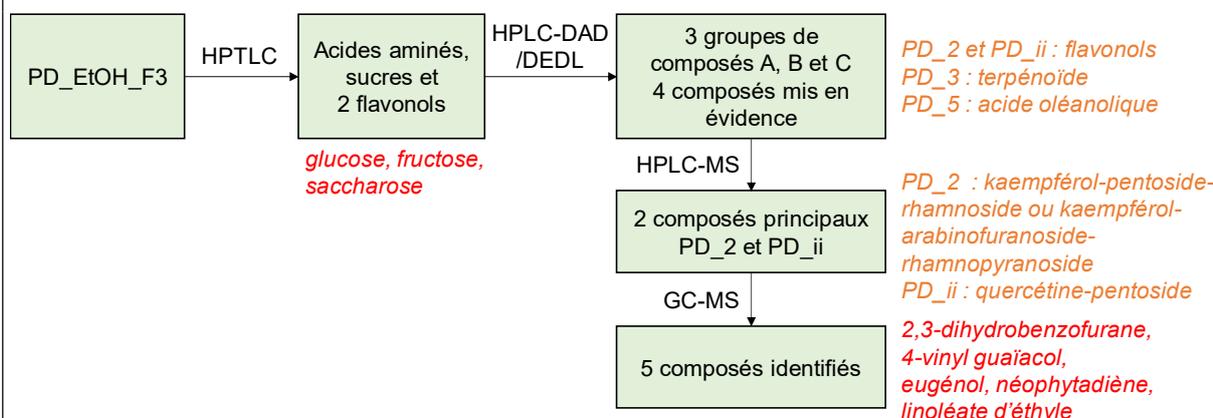
Les analyses par GC-MS ont permis d'identifier 5 composés dans cette fraction (Tableau 75), parmi lesquels 4 avaient déjà été identifiés dans l'extrait brut. Le cinquième composé, correspondant au 2,3-dihydrobenzofurane, n'a jamais été décrit dans le genre *Prunus*.

**Tableau 75** : Composés identifiés par GC-MS dans la fraction PD\_EtOH\_F3

Composés	RI calculé <sup>(1)</sup> / RI littérature	Références	Activités biologiques <sup>(3)</sup>
2,3-dihydrobenzofurane	1192/1188	Non décrit dans le genre <i>Prunus</i>	Non évaluées
4-vinyl gaiacol	1281/1280	Décrit dans un extrait de fruits séchés de <i>P. armeniaca</i> [314]	Anti-inflammatoire (58,59 ± 0,01 %)
Eugénol	1325/1330	Décrit dans un extrait de fruits séchés de <i>P. domestica</i> [313]	Anti-inflammatoire (59,72 ± 0,01 %) et antioxydante (88,35 ± 0,01 %)
Néophytadiène	1833/1829 <sup>(2)</sup>	Non décrit dans le genre <i>Prunus</i>	Non évaluées
Linoléate d'éthyle	2140/2139	Décrit dans un extrait de bourgeons de <i>P. domestica</i> [312]	Non évaluées

<sup>(1)</sup> RI = indice de rétention déterminé sur colonne HP-1 à l'aide d'une série d'alcane (C8-C24) et comparé aux RI disponibles dans la littérature – <sup>(2)</sup> Tentative d'identification – <sup>(3)</sup> évaluées selon les tests in vitro

Cette fraction, caractérisée par la présence des 3 groupes de composés A, B et C, présente des activités au moins égales à celles de l'extrait brut (Figure 183). Les composés du groupe A correspondent à de nombreux glucides, et notamment le glucose, et à quelques acides aminés. Deux composés principaux, PD\_2 et PD\_ii, ont été mis en évidence dans le groupe de composés B ; ils correspondraient à des dérivés glycosylés de flavonols. Un isolement de ces derniers est nécessaire afin de les caractériser. Les analyses par GC-MS ont permis d'identifier 5 composés dans cette fraction, parmi lesquels 4 avaient déjà été identifiés dans l'extrait brut.

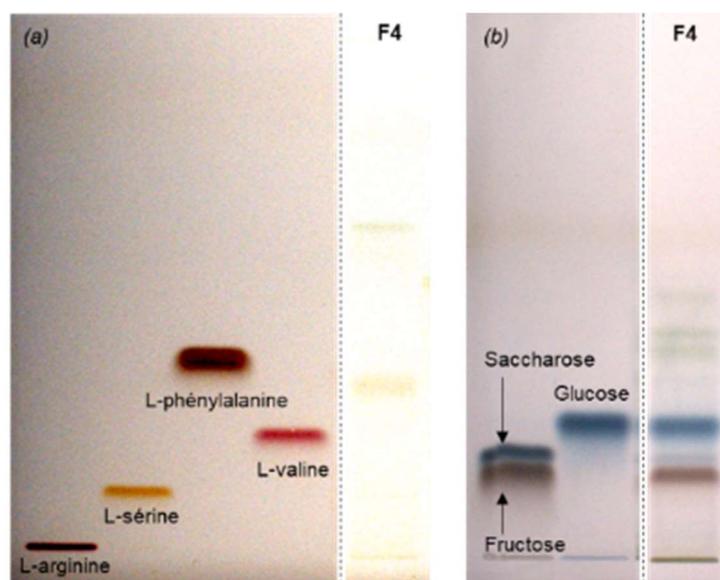


**Figure 183** : Informations obtenues suite à la caractérisation phytochimique de la fraction PD\_EtOH\_F3 (rouge : composé identifié, orange : composé à identifier)

#### 4.3.2.3.4. Caractérisation de la fraction PD\_EtOH\_F4

La fraction PD\_EtOH\_F4, obtenue avec un rendement de 32,1 %, est caractérisée par des activités anti-hyaluronidase et blanchissantes comparables à celles de l'extrait brut mais présente des activités antioxydantes et anti-élastase plus faibles (Figure 175).

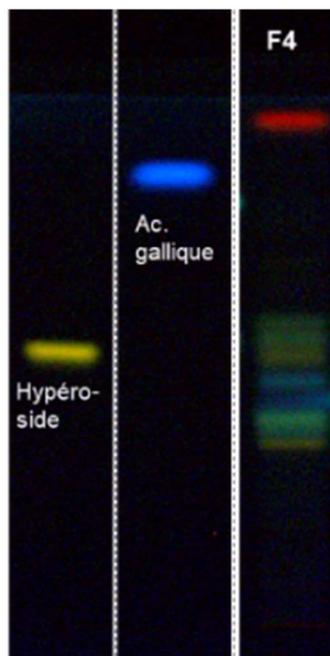
L'analyse par HPTLC de cette fraction indique la présence de quelques acides aminés suite à la révélation à la ninhydrine (Figure 184). Elle est également caractérisée par la présence de divers glucides, parmi lesquels le glucose et le fructose sont majoritaires ; le saccharose quant à lui, est présent en plus faible concentration.



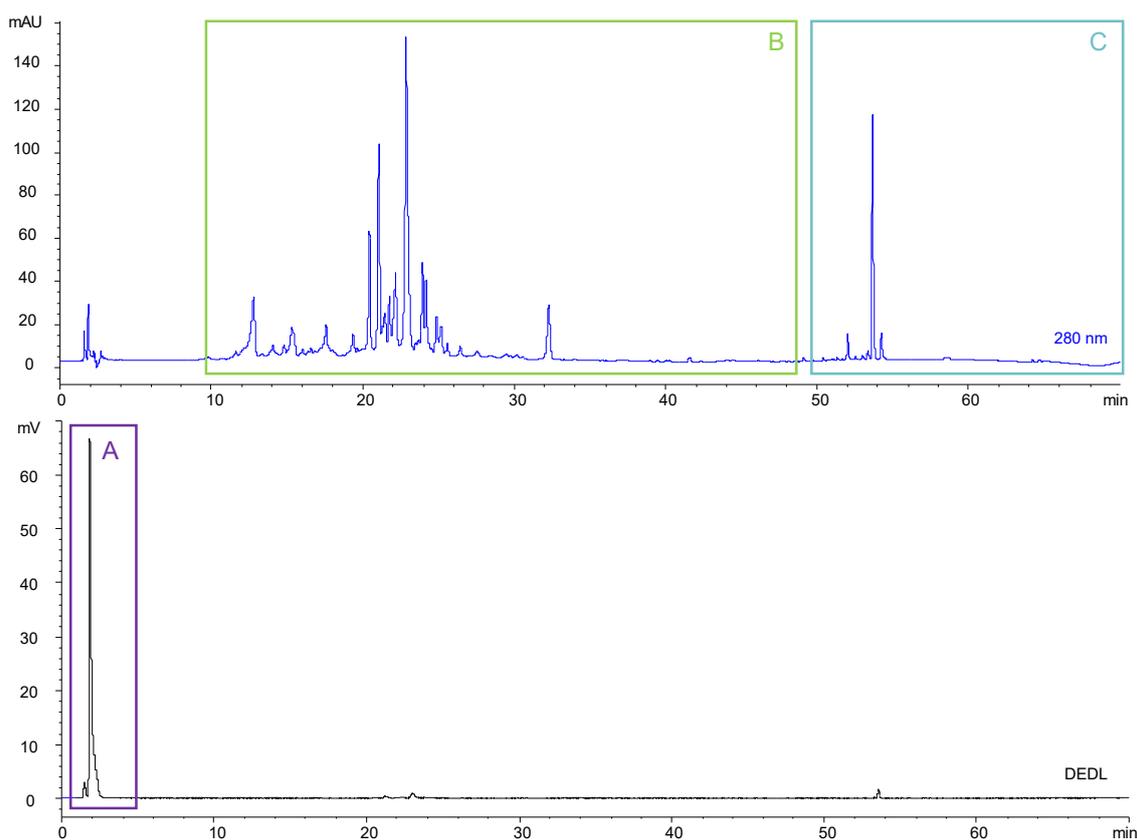
**Figure 184** : Etude des acides aminés et des glucides de la fraction PD\_EtOH\_F4 par HPTLC (révélation à la lumière blanche après dérivatation avec la ninhydrine - plaque (a) et avec la DAPA – plaque (b))

La révélation au réactif de Neu permet de mettre en évidence de nombreux flavonoïdes de différentes natures dans cette fraction (Figure 185). Un composé de type chlorophylle a également été révélé.

Cette fraction TL\_ha\_F4 est caractérisée par la présence majoritaire de composés du groupe A, et dans une moindre mesure, de composés des groupes B et C (Figure 186). La présence majoritaire des composés du groupe A constitue une explication aux faibles activités de cette fraction. Cette fraction a d'ailleurs été collectée avec un rendement important, ce qui indique que les composés du groupe A représentent une part importante de l'extrait brut.



**Figure 185** : Etude des polyphénols et flavonoïdes de la fraction PD\_EtOH\_F4 par HPTLC (révélation à 366 nm après dérivations avec le réactif de Neu et le PEG 400)



**Figure 186** : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 280 nm de la fraction PD\_EtOH\_F4

Les analyses par GC-MS ont permis d'identifier 3 composés dans cette fraction, parmi lesquels deux ont déjà été observés dans la fraction PD\_EtOH\_F3, à savoir le 2,3-dihydroxybenzofurane et le 4-vinyl gaïacol. La 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-méthyl-4H-pyran-4-one a quant à elle, déjà été caractérisée dans les fruits séchés de *P. domestica* [319].

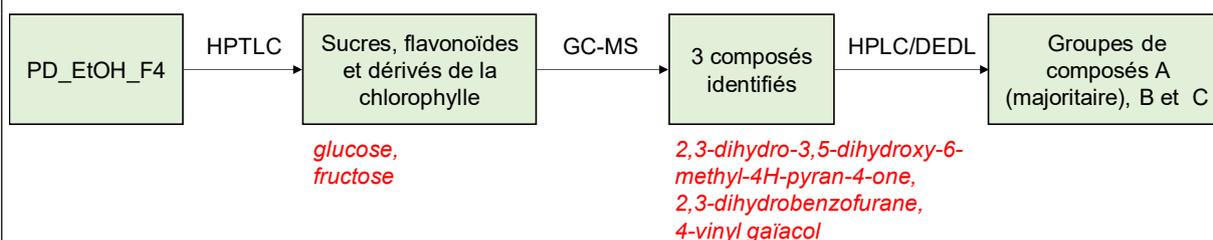
**Tableau 76** : Composés identifiés par GC-MS dans la fraction PD\_EtOH\_F4

Composés	RI calculé <sup>(1)</sup> / RI littérature	Références	Activités biologiques <sup>(2)</sup>
2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-méthyl-4H-pyran-4-one	1113/1120	Décrite dans les fruits séchés de <i>P. domestica</i> [319]	Non évaluées
2,3-dihydroxybenzofurane	1192/1188	Décrit dans du miel de <i>P. mahaleb</i> [320]	Non évaluées
4-vinyl gaïacol	1281/1280	Décrit dans un extrait de fruits séchés de <i>P. armeniaca</i> [314]	Anti-inflammatoire (58,58 ± 0,01 %)

<sup>(1)</sup> RI = indice de rétention déterminé sur colonne HP-1 à l'aide d'une série d'alcane (C8-C24) et comparé aux RI disponibles dans la littérature - <sup>(2)</sup> évaluées selon les tests in vitro

La fraction PD\_EtOH\_F4 est composée majoritairement des composés du groupe A, qui correspondent aux sucres (glucose et fructose notamment) et aux acides aminés mis en évidence dans l'extrait PD\_EtOH (Figure 187).

La présence majoritaire de composés du groupe A dans cette fraction expliquerait les faibles activités de celle-ci. Elle est également caractérisée par la présence de composés des groupes B et C. Trois composés ont été identifiés par GC-MS, parmi lesquels deux avaient déjà été mis en évidence dans la fraction PD\_EtOH\_F3.



**Figure 187** : Informations obtenues suite à la caractérisation phytochimique de la fraction PD\_EtOH\_F4 (rouge : composé identifié)

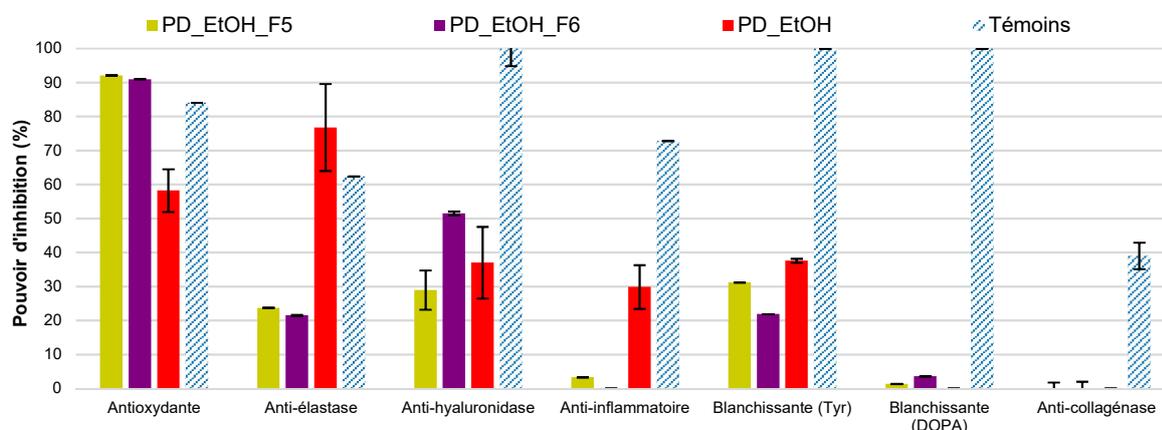
#### 4.3.2.3.5. Caractérisation des fractions PD\_EtOH\_F5 et PD\_EtOH\_F6

Les fractions PD\_EtOH\_F5 et PD\_EtOH\_F6 ont toutes les deux été obtenues avec un rendement de 12,6 %. Leurs activités sont comparables : elles présentent de fortes capacités antioxydantes, supérieures à celles de l'extrait brut, ainsi que des activités anti-hyaluronidase et blanchissantes comparables à celles de ce dernier (Figure 175). Leurs activités anti-élastase sont en revanche plus modérées que celles de l'extrait brut.

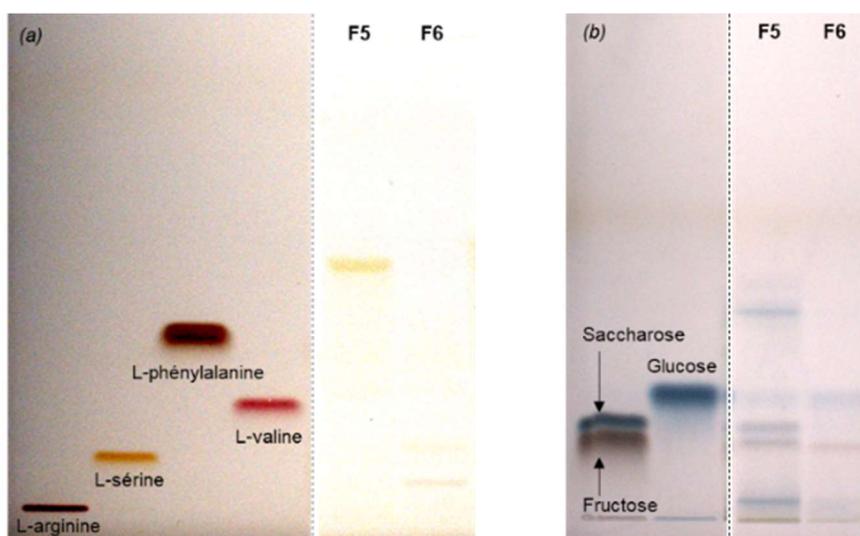
Les révélations au réactif de Neu et au PEG ont mis en évidence la présence majoritaire de l'acide chlorogénique dans ces fractions. La présence de quelques flavonoïdes en proportions plus faibles a également été révélée (faibles intensités des bandes correspondantes).

Des acides aminés ont été révélés, principalement dans la fraction PD\_EtOH\_F5 (Figure 189). Quelques glucides ont également été identifiés : le saccharose et le fructose ont été

caractérisés dans la fraction PD\_EtOH\_F5, et le glucose et le fructose dans la fraction PD\_EtOH\_F6.



**Figure 188** : Activités biologiques des fractions PD\_EtOH\_F5 et PD\_EtOH\_F6

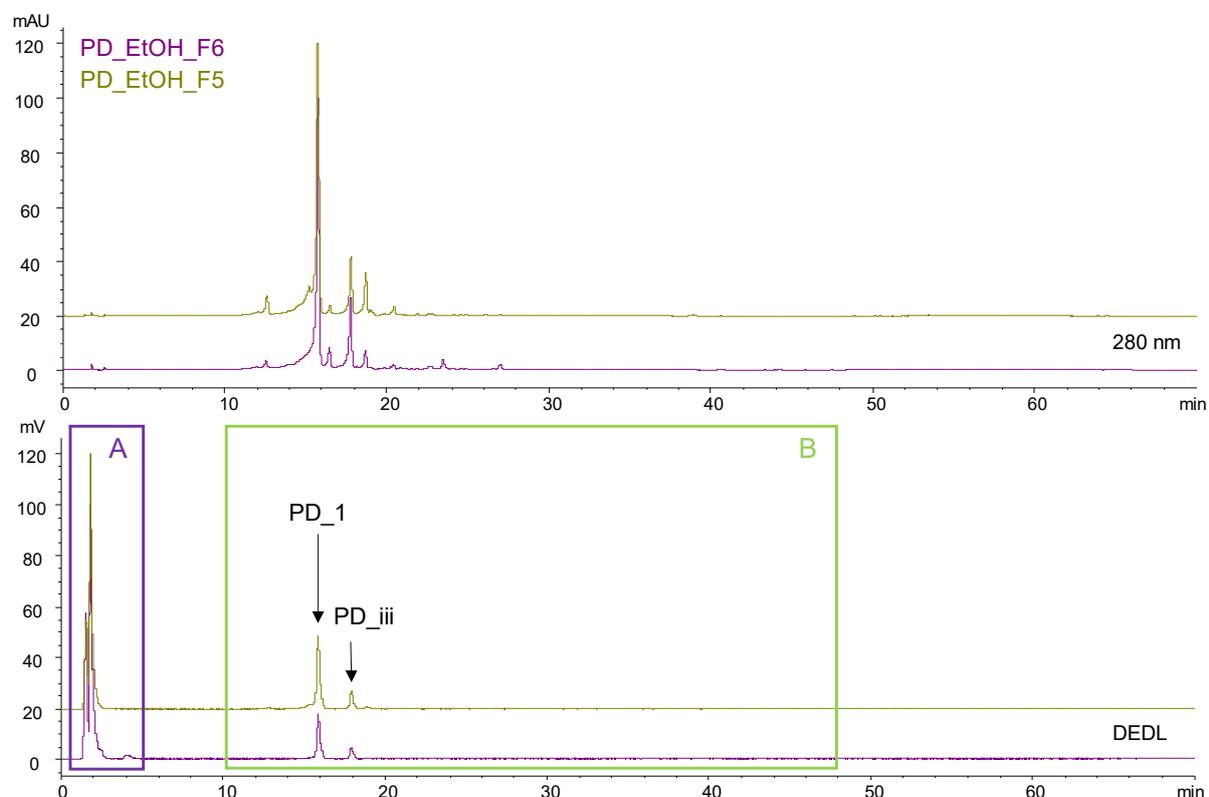


**Figure 189** : Etude des acides aminés et des glucides des fractions PD\_EtOH\_F5 et PD\_EtOH\_F6 par HPTLC (révélation à la lumière blanche après dérivatisation avec la ninhydrine – plaque (a) et avec la DAPA – plaque (b))

Ces fractions sont caractérisées par la présence des deux groupes de composés A et B, parmi lesquels 2 composés principaux se distinguent : le composé PD\_1, correspondant à l'acide chlorogénique identifié dans l'extrait brut, et le composé PD\_iii, qui d'après son spectre UV, correspondrait à un acide phénolique (Figure 190). La teneur en acide chlorogénique a été estimée par étalonnage externe à 16,6 % dans la fraction TL\_ha\_F5 et à 5,1 % dans la fraction TL\_ha\_F6 ; sa présence pourrait expliquer les fortes activités antioxydantes et anti-hyaluronidase de ces fractions.

Afin de caractériser le composé PD\_iii, des analyses par HPLC-ESI-MS de ces fractions ont été réalisées. Celui-ci serait caractérisé par l'ion pseudo-moléculaire de  $m/z$  339 et l'ion fragment de  $m/z$  147. L'ion de  $m/z$  147 [coumaroyl+H]<sup>+</sup> est caractéristique de la présence d'un groupement coumaroyl [321]. Ce composé pourrait correspondre à l'acide *p*-coumaroylquinique, déjà décrit dans de nombreuses espèces de prunier, et notamment *P*.

*domestica*. [322, 323]. Cette observation est cohérente avec le spectre UV correspondant. Un isolement de ce composé est nécessaire afin de compléter sa caractérisation. Ces analyses ont également permis de confirmer la présence d'acide chlorogénique.



**Figure 190** : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 280 nm des fractions PD\_EtOH\_F5 et PD\_EtOH\_F6

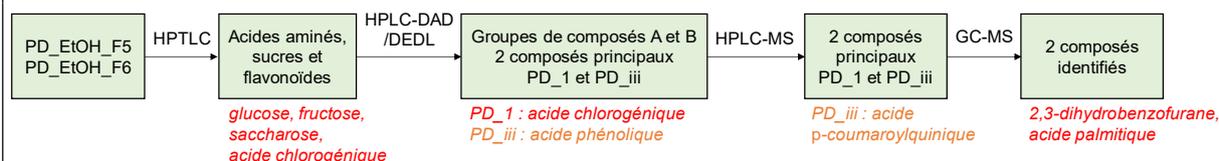
Les analyses par GC-MS de ces deux fractions ont permis d'identifier un composé commun, l'acide palmitique, déjà décrit dans un extrait de fruits séchés de *P. armeniaca* [314] (Tableau 77). Elles ont également permis d'identifier le 2,3-dihydrobenzofurane dans la fraction PD\_EtOH\_F5, un composé déjà caractérisé dans les fractions PD\_EtOH\_F3 et PD\_EtOH\_F4.

**Tableau 77** : Composés majoritaires identifiés dans les fractions PD\_EtOH\_F5 et F6 par GC-MS

Composés	RI calculé <sup>(1)</sup> / RI littérature	PD_EtOH_F5	PD_EtOH_F6	Références	Activités biologiques <sup>(2)</sup>
2,3-dihydroxy-benzofurane	1192/1188	Présent	/	Décrit dans du miel de <i>P. mahaleb</i> [320]	Non évaluées
Acide palmitique	1939/1943	Présent	Présent	Décrit dans un extrait de fruits séchés de <i>P. armeniaca</i> [314] et dans une huile de pépins de <i>P. mahaleb</i> [315]	Anti-hyaluronidase (52,00 ± 12,00 %)

<sup>(1)</sup> RI = indice de rétention déterminé sur colonne HP-1 à l'aide d'une série d'alcane (C8-C24) et comparé aux RI disponibles dans la littérature – <sup>(2)</sup> évaluées selon les tests in vitro

Les fractions PD\_EtOH\_F5 et PD\_EtOH\_F6 présentent des activités antioxydantes et anti-hyaluronidase intéressantes. Elles sont caractérisées par la présence des composés du groupe A (sucres, acides aminés) et du groupe B (flavonoïdes) (Figure 191). Deux composés majoritaires sont mis en évidence dans ce groupe de composés B : le composé PD\_1 correspondant à l'acide chlorogénique et le composé PD\_iii qui correspondrait à l'acide *p*-coumaroylquinique.

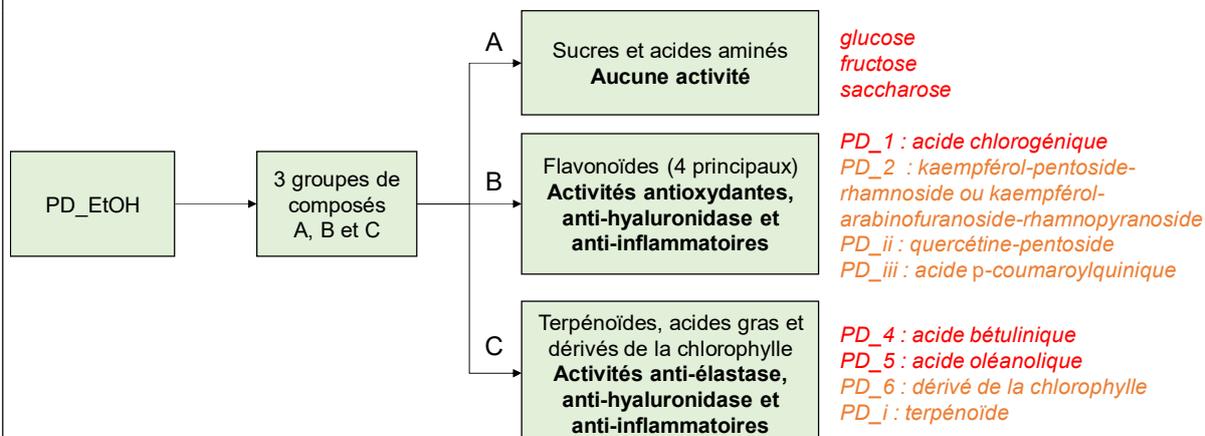


**Figure 191** : Informations obtenues suite à la caractérisation phytochimique des fraction PD\_EtOH\_F5 et PD\_EtOH\_F6 (rouge : composé identifié, orange : identification à confirmer)

L'extrait PD\_EtOH, composé de 3 groupes de composés A, B et C, présente des activités antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-hyaluronidase intéressantes, ainsi que des activités anti-élastase et blanchissantes modérées (Figure 192).

Les composés du groupe A, majoritairement des sucres (glucose, fructose et saccharose) et des acides aminés, ne sont pas responsables de ces activités. Les composés du groupe B (flavonoïdes) contribuent aux activités antioxydantes, anti-hyaluronidase et anti-inflammatoires. L'acide chlorogénique (PD\_1) a été identifié parmi les 4 principaux composés mis en évidence lors du fractionnement de cet extrait. Des hypothèses de structure ont été proposées pour les 3 autres composés ; elles sont à confirmer par isolement et caractérisation structurale.

Les composés du groupe C (terpénoïdes, acides gras et dérivés de la chlorophylle) sont responsables des activités anti-élastase, et contribuent également aux activités anti-inflammatoires et anti-hyaluronidase. Quatre composés principaux ont été mis en évidence, parmi lesquels les acides bétulinique (PD\_4) et oléanolique (PD\_5) ont été identifiés. L'isolement des deux autres composés étant nécessaire afin de les identifier.



**Figure 192** : Informations obtenues suite à la caractérisation phytochimique de l'extrait PD\_EtOH et de ses fractions (rouge : composé identifié, orange : identification à confirmer)

#### 4.3.2.4. Influence de l'année de récolte

Les facteurs climatiques peuvent influencer la composition en métabolites secondaires de nombreux végétaux [287]. Afin d'évaluer cette variabilité, l'influence de l'année de récolte sur la composition d'extraits de feuilles de prunier a été évaluée. Cette étude de variabilité due à l'année de récolte n'a pu être réalisée sur les parties aériennes du chêne par manque de matière première, puisque seuls des échantillons récoltés en 2017 et en 2018 étaient disponibles.

Pour cette étude, les extraits de prunier ont été obtenus par ASE, une technique qui permet de réaliser des extractions à partir de faibles quantités de matière de manière automatisée. Les conditions d'extraction utilisées pour cette étude sont présentées dans le Tableau 78.

**Tableau 78** : Conditions expérimentales pour l'extraction par ASE

Solvant	Nombre de cycles	Temps d'extraction	Température
EtOH	3	5 min	70 °C

L'étude de variabilité a été réalisée à partir de feuilles de prunier récoltées à Brignoles 3 années consécutives (2015, 2016 et 2017). Les extractions ont été réalisées en triplicat, sauf pour l'extrait datant de 2015 qui était celui disponible dans l'extractothèque. Les différents extraits ont été obtenus avec des rendements compris entre 15 et 19 % ; l'année de récolte ne semble donc n'avoir que peu d'influence sur le rendement d'extraction (Tableau 79).

**Tableau 79** : Rendements obtenus pour les extraits de feuilles de prunier en fonction de l'année de récolte

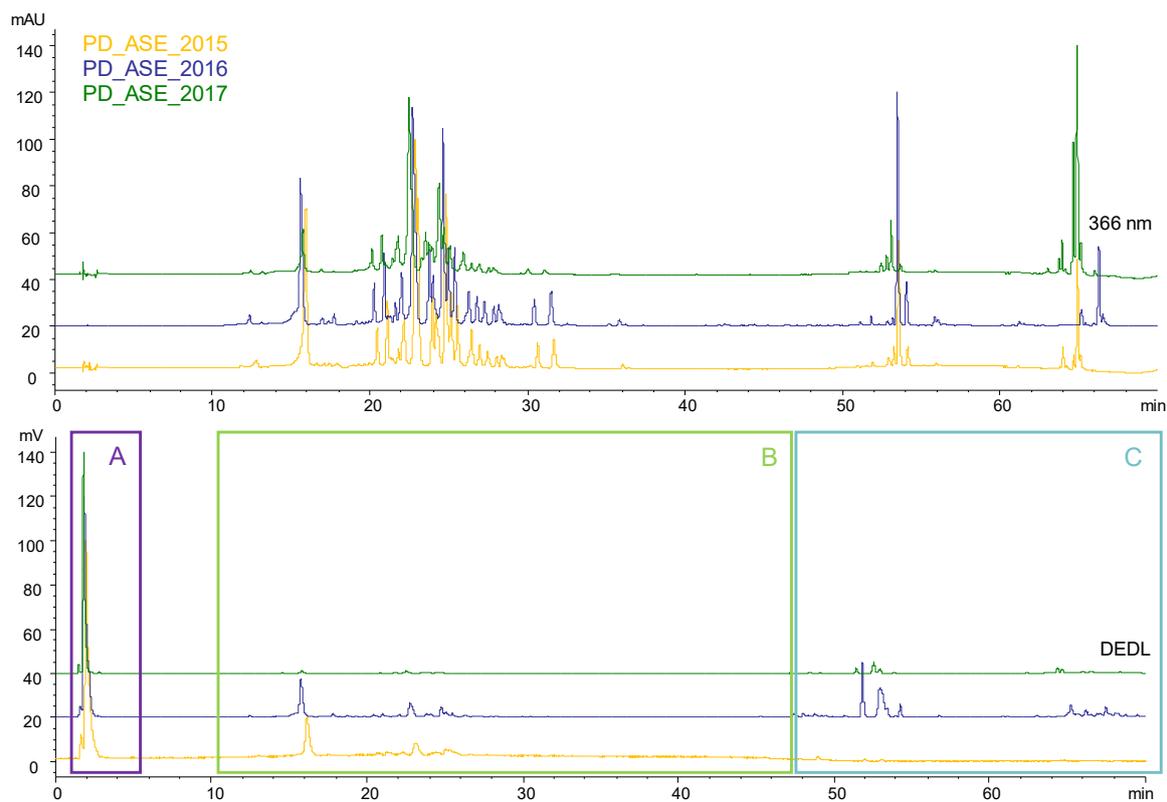
Extrait	Date de récolte	Rendement
PD ASE 2015	Automne 2015	18,1 %
PD ASE 2016	Automne 2016	15,7 ± 0,9 %
PD ASE 2017	Automne 2017	19,0 ± 1,0 %

Quelle que soit l'année de récolte, les extraits sont caractérisés par la présence des trois principaux groupes de composés A, B et C mis en évidence dans l'extrait PD\_EtOH. D'après leurs profils HPLC, les compositions de ces extraits sont comparables (Figure 193). Quelques différences peuvent toutefois être mises en évidence sur les profils HPLC/DEDL, notamment en ce qui concerne leurs teneurs en composés d'intérêt. L'extrait PD\_ASE\_2016 semblerait contenir davantage de composés du groupe C ; l'extrait PD\_EtOH\_2017 semblerait lui moins riche en composés du groupe B. Ces observations seraient à confirmer avec l'étude de plusieurs lots de feuilles récoltés la même année, afin de s'assurer de l'homogénéité de la matière végétale.

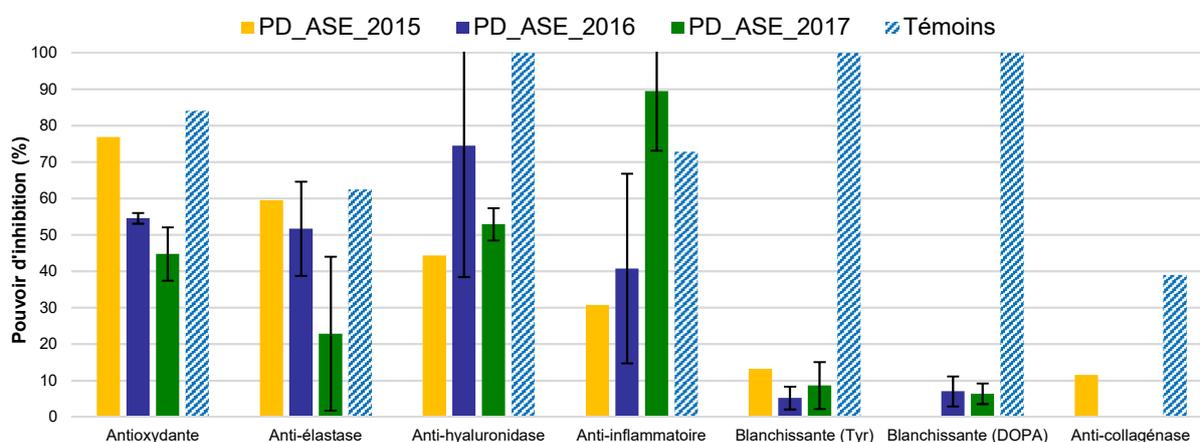
De manière générale, les différents extraits présentent les activités antioxydantes, anti-élastase, anti-hyaluronidase et anti-inflammatoires, mises en évidence pour l'extrait PD\_EtOH (Figure 194). En revanche, leurs pouvoirs d'inhibition sur l'élastase, la hyaluronidase et la lipoxigénase ainsi que leurs activités antioxydantes présentent quelques différences selon

l'année de récolte, ce qui pourrait s'expliquer par les différences de teneurs en composés d'intérêt mises en évidence sur les profils HPLC/DEDL.

Ces variabilités sont toutefois à moduler puisque les écart-types obtenus pour certains tests d'activités sont parfois importants. Ces écart-types représentent la moyenne des activités obtenues pour 3 extraits réalisés dans les mêmes conditions à partir de la même matière première. Les profils phytochimiques de ces répliques sont comparables ; seules des différences de teneurs en composés d'intérêt (PD\_1 à PD\_6) sont mises en évidence et pourraient expliquer les différences d'activités observées. Ces disparités peuvent s'expliquer par les faibles quantités de matière premières engagées pour réaliser ces répliques d'extraction et par une hétérogénéité de cette dernière en termes de concentration d'actifs.



**Figure 193** : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 366 nm des extraits de feuilles de prunier collectées 3 années consécutives



**Figure 194** : Activités biologiques des extraits de feuilles de prunier collectées 3 années consécutives

Quelle que soit l'année de récolte, les extraits présentent des profils HPLC caractérisés par la présence des trois groupes de composés identifiés lors de l'étude de caractérisation de l'extrait PD\_EtOH. Cependant, la teneur respective en composés d'intérêt (groupes de composés B et C) semble varier d'une année à l'autre, induisant certaines disparités en ce qui concerne les activités de ces extraits.

Il serait intéressant d'étudier l'influence du stade de maturité du prunier au moment de la taille, sur la composition phytochimique des feuilles de pruniers jeunes (entre 6 et 8 ans), non productifs, et productifs et âgés (plus de 10 ans). L'exploitation des pruniers jeunes et âgés permettrait de développer une voie de valorisation de cette culture d'arbres fruitiers lorsque la production n'est pas/plus assez efficace ou de bonne qualité.

#### 4.3.2.5. Optimisation des conditions d'extraction

L'optimisation des conditions d'extraction des feuilles de prunier a été réalisée en deux étapes afin d'extraire un maximum de composés d'intérêt (composés des groupes B et C). Dans un premier temps, l'optimisation a été réalisée comme pour l'extrait de chêne : le ratio éthanol/eau optimal a tout d'abord été déterminé, puis différentes températures et durées d'extraction ont été testées. L'extraction activée par les ultra-sons a également été étudiée.

Dans un second temps, une double extraction de la matière première avec deux solvants de polarités différentes a été réalisée. En effet, l'étude de caractérisation a permis de mettre en évidence les activités particulières des composés peu polaires du groupe C et des composés phénoliques du groupe B. L'extraction sélective de chacun de ces groupes de composés à partir de la même matière première a ainsi été étudiée, afin d'obtenir deux ingrédients aux propriétés différentes, sans étape de séparation/purification.

##### 4.3.2.5.1. Influence des conditions d'extraction

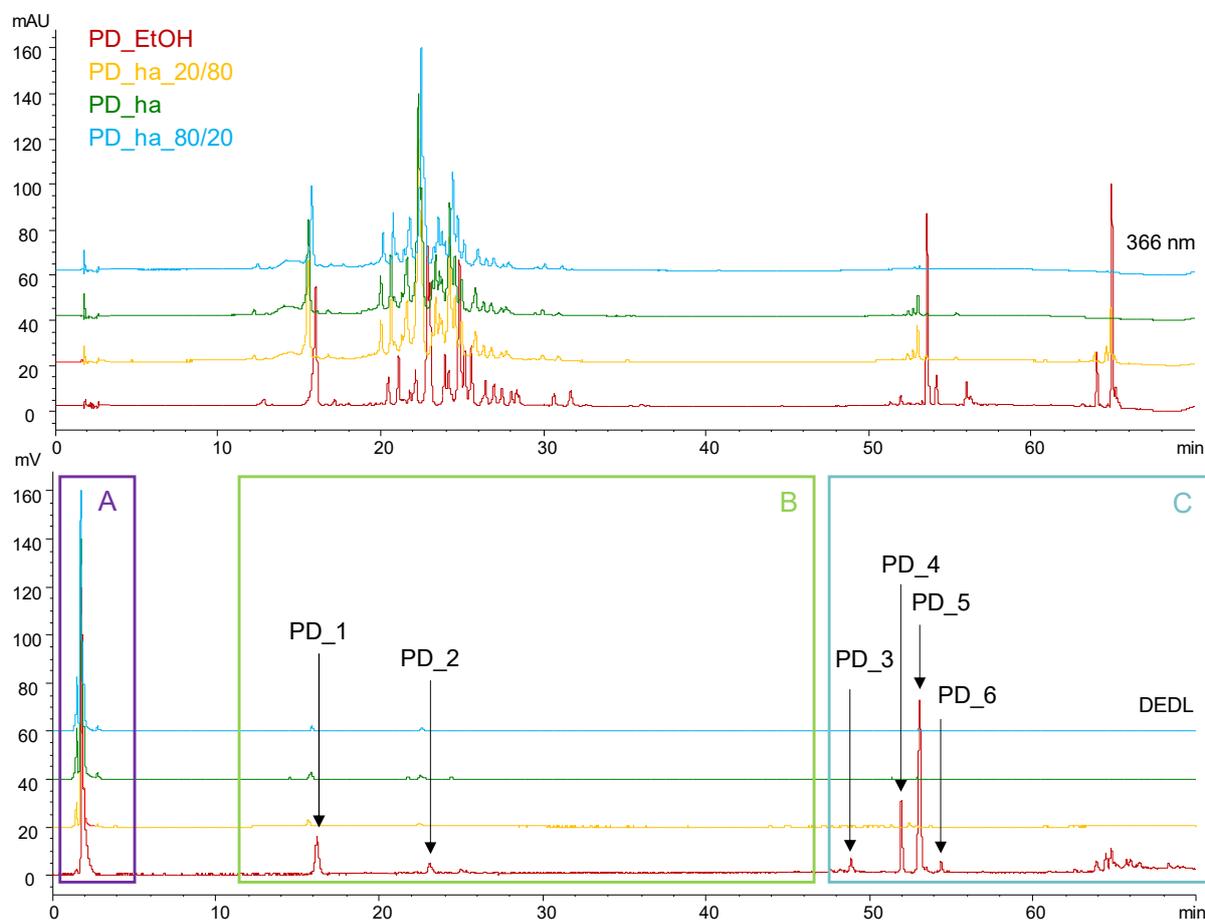
Différents extraits ont été obtenus en triplicat par macération des feuilles de prunier (Brignoles, 2017) à température ambiante pendant 2 h, en faisant varier le ratio eau/éthanol du solvant d'extraction (Tableau 80). Les différents extraits ont été obtenus avec des rendements compris entre 9 et 13 %, exception faite de l'extrait PD\_ha\_80/20 qui présente un rendement plus important.

**Tableau 80** : Conditions expérimentales et rendements obtenus pour les extraits de feuilles de prunier

Extrait	PD_EtOH	PD_ha_20/80	PD_ha	PD_ha_80/20
Solvant	EtOH	H <sub>2</sub> O/EtOH (20/80 m/m)	H <sub>2</sub> O/EtOH (50/50 m/m)	H <sub>2</sub> O/EtOH (80/20 m/m)
Rendement	11,0 ± 1,0 %	9,0 ± 1,0 %	13,3 ± 0,4 %	17,0 ± 2,0 %

Tous ces extraits sont caractérisés par la présence majoritaire des composés du groupe A (Figure 195). Les composés du groupe B sont également présents dans ces extraits : si leurs profils HPLC-DAD sont similaires, ces composés semblent présents en plus ou moins grande quantité d'un extrait à l'autre d'après les profils HPLC/DEDL. L'extrait éthanolique PD\_EtOH

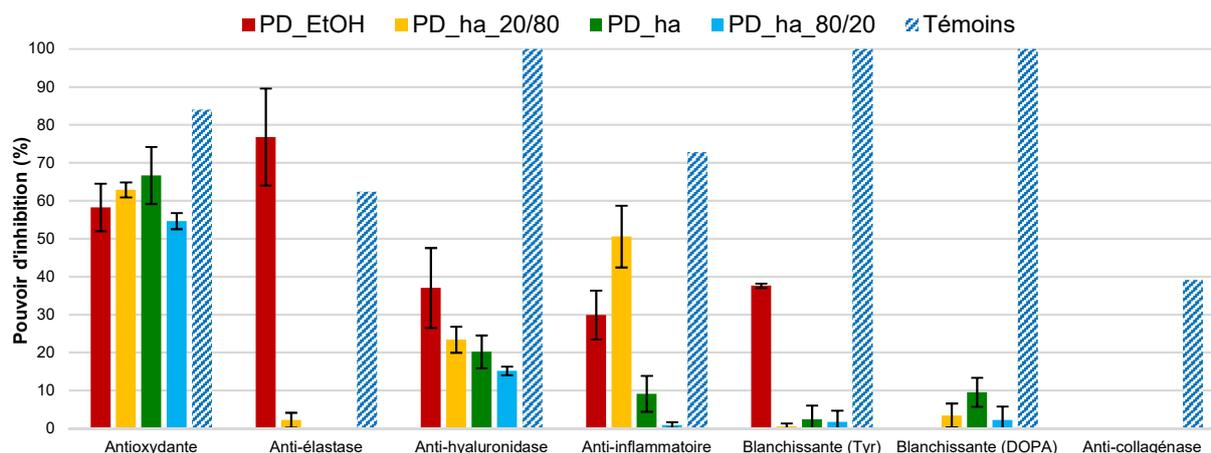
est le plus riche, notamment en ce qui concerne les composés PD\_1 (acide chlorogénique) et PD\_2. C'est également le seul à renfermer des composés du groupe C, notamment les composés PD\_3, PD\_4 (acide bétulinique), PD\_5 (acide oléanolique) et PD\_6.



**Figure 195 :** Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 366 nm des extraits hydroalcooliques de feuilles de prunier

Les activités antioxydantes de ces extraits sont comparables, et sont liées à la présence des composés du groupe B (Figure 196). En revanche, de nombreuses disparités sont observées pour les autres activités. L'extrait PD\_EtOH est le seul à présenter une activité anti-élastase, liée à la présence de composés du groupe C, ainsi qu'une activité blanchissante (substrat L-tyrosine), qui pourrait également être liée à la présence de ce groupe de composés. Les activités anti-hyaluronidase et anti-inflammatoires sont plus importantes pour les extraits obtenus avec les solvants les moins polaires. Les solvants plus polaires permettent d'extraire davantage de composés du groupe A, qui diluent en quelque sorte les composés d'intérêt des groupes B et C, ce qui pourrait expliquer les activités plus faibles mises en évidence.

L'éthanol a donc été sélectionné comme solvant le plus intéressant pour extraire sélectivement les composés d'intérêt présents dans les feuilles de prunier.



**Figure 196 :** Activités biologiques des extraits hydroalcooliques de feuilles de prunier

L'influence de la température (TA et 50 °C) et de la durée (4 h et 8 h) d'extraction a ensuite été évaluée. Les extraits, réalisés en triplicat, ont été obtenus avec des rendements compris entre 9 et 13 % (Tableau 81).

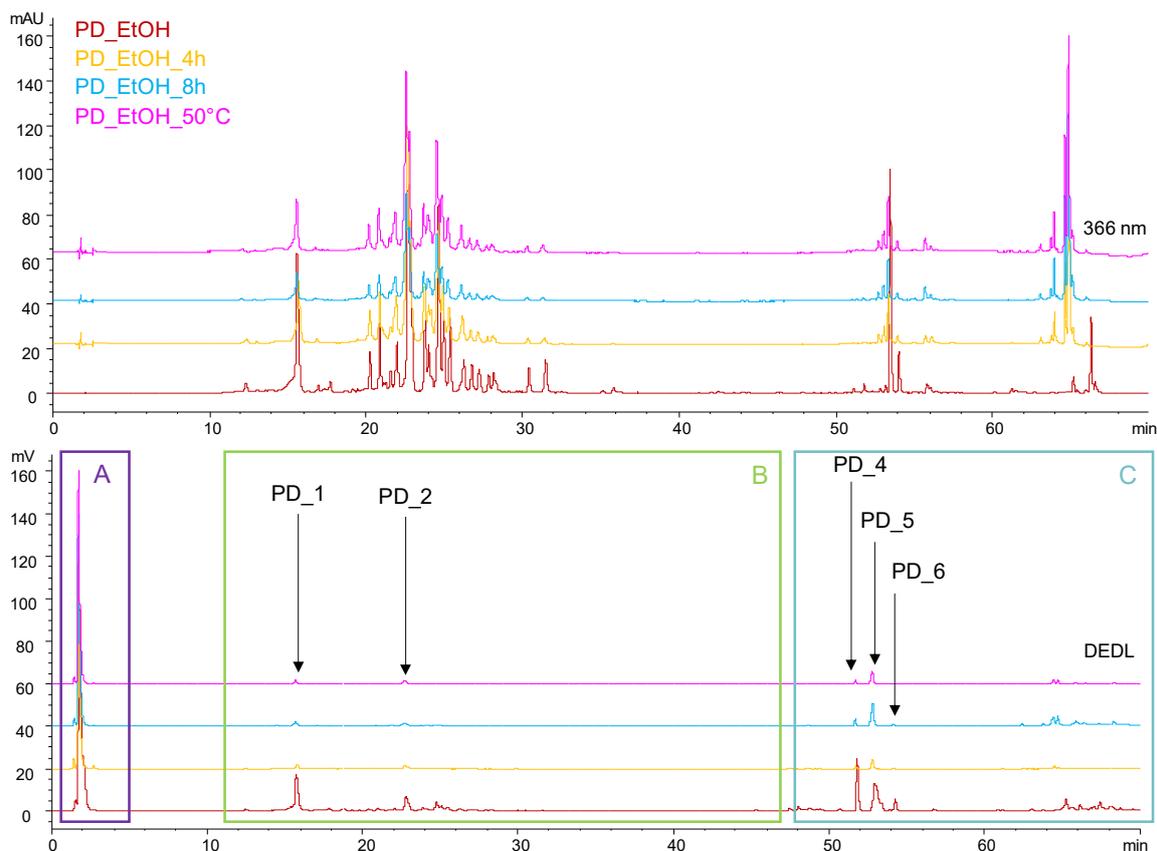
**Tableau 81 :** Conditions expérimentales et rendements obtenus pour les extraits de feuilles de prunier

Extrait	PD_EtOH	PD_EtOH_4h	PD_EtOH_8h	PD_EtOH_50°C
Température d'extraction	TA	TA	TA	50 °C
Temps d'extraction	2 h	4 h	8 h	2 h
Rendement	11,0 ± 1,0 %	9,7 ± 0,2 %	12,4 ± 0,4 %	13,0 ± 2,0 %

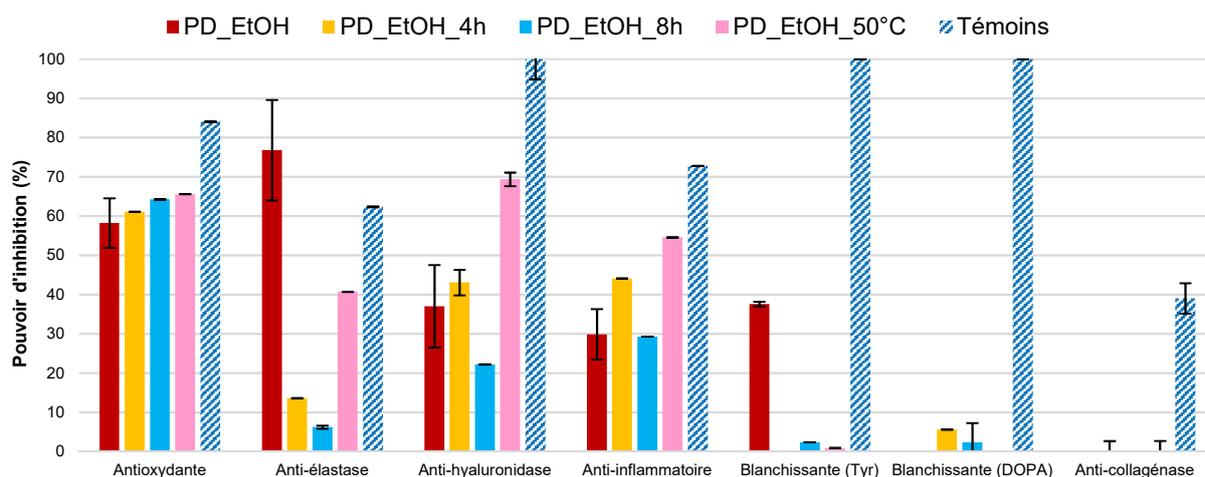
Les différents extraits sont caractérisés par la présence de composés des groupes A, B et C (Figure 197). L'extrait PD\_EtOH contient davantage de composés des groupes B et C, surtout en comparaison de l'extrait PD\_EtOH\_50°C. Une première explication à ces différences serait une extraction plus importante de composés du groupe A par chauffage ou lorsque les macérations sont plus longues, ce qui expliquerait les meilleurs rendements obtenus, mais qui induirait également une dilution des composés d'intérêt. D'autres explications telles que la dégradation de certains composés thermolabiles par chauffage ou lors d'une exposition prolongée aux facteurs environnementaux (lumière, oxygène, etc.) lorsque l'extraction est trop longue, peuvent également expliquer ces différences [302].

La durée et la température d'extraction n'influencent pas les activités antioxydantes de ces extraits (Figure 198). En revanche, des pertes d'activités anti-élastase sont observées, particulièrement lorsque la durée d'extraction augmente. Les composés du groupe C, responsables de ces activités pourraient être dégradés au cours du temps, ce qui expliquerait ces pertes d'activités. Ceci pourrait également expliquer les pertes d'activités blanchissantes. Les activités anti-inflammatoires et anti-hyaluronidase sont moins impactées par ces paramètres d'extraction, et s'avèrent même légèrement plus intéressantes, particulièrement pour l'extrait PD\_EtOH\_50°C. La dégradation des composés du groupe C pourrait produire des composés contribuant à ces activités, ce qui expliquerait les meilleures activités observées. Les composés du groupe B, qui contribuent également à ces activités, ne semblent

pas extraits en quantités plus importantes dans ces extraits et leur présence ne permet pas d'expliquer ces meilleures activités (Figure 197).



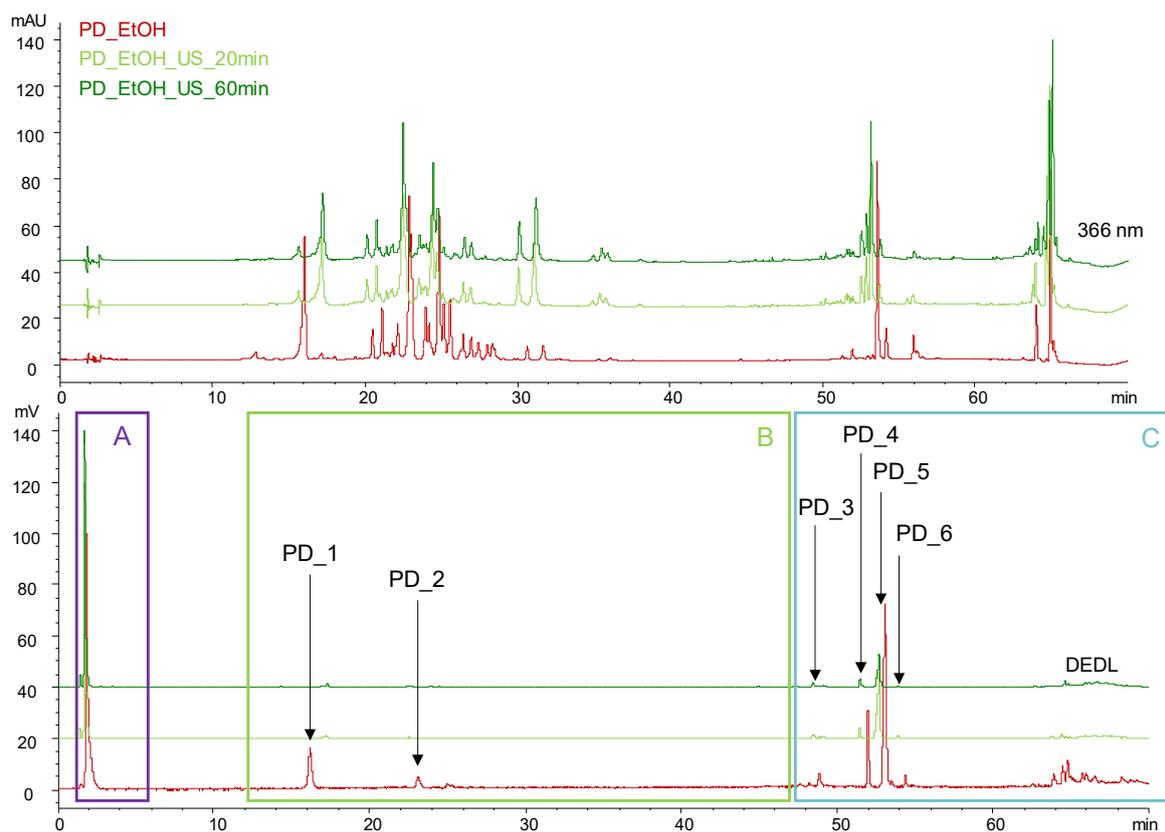
**Figure 197** : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 366 nm des extraits PD\_EtOH en faisant varier la durée et la température d'extraction



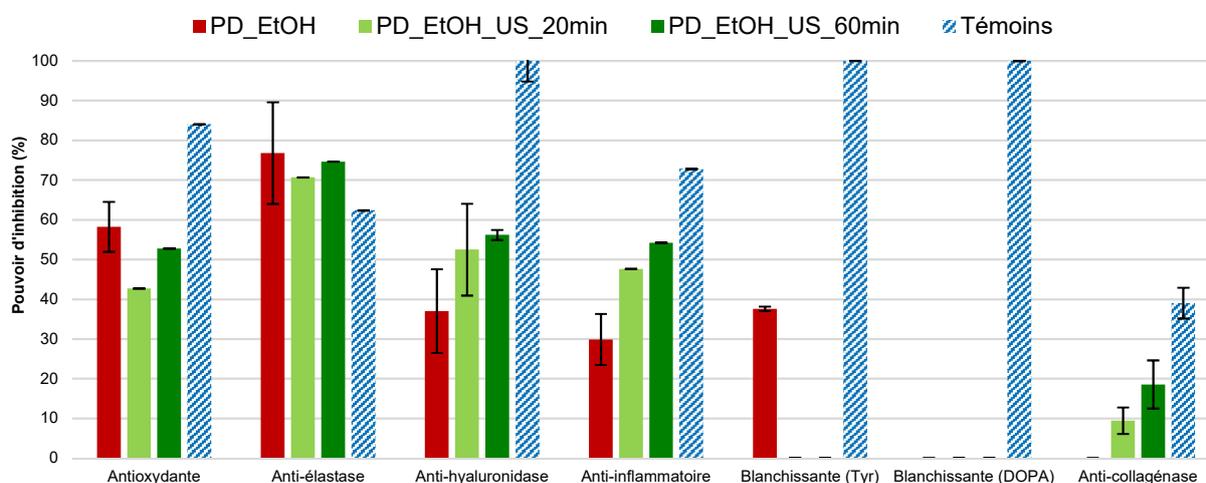
**Figure 198** : Activités biologiques des extraits PD\_EtOH obtenus lors de l'optimisation des conditions d'extraction

Ces conditions d'extraction ne favorisent pas l'extraction des composés d'intérêt. La macération à température ambiante pendant 2 h a donc été sélectionnée car ses impacts économiques et environnementaux sont les plus faibles.

L'influence des ultra-sons sur l'extraction des composés d'intérêt a ensuite été évaluée dans les mêmes conditions que celles sélectionnées dans le cas du chêne : les durées d'extraction sans agitation ont été fixées à 20 min et 60 min, et la fréquence des ultra-sons à 25 kHz. Les résultats sont encore une fois encourageants : les profils phytochimiques et les activités biologiques de ces extraits sont comparables à ceux de l'extrait PD\_EtOH obtenu par macération pendant 2 h. Ils sont caractérisés par la présence des 3 groupes de composés A, B et C, et notamment des 6 composés PD\_1 à PD\_6 contribuant aux activités de ces extraits (Figure 199, Figure 200).



**Figure 199** : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 366 nm des extraits obtenus par extraction activée par les ultra-sons



**Figure 200** : Activités biologiques des extraits obtenus par extraction activée par les ultra-sons

Ces premières observations permettent de mettre en évidence l'intérêt des ultra-sons sur l'activation de l'extraction. Cette étude est à compléter afin d'évaluer davantage l'impact de cette technique d'éco-extraction.

L'extrait PD\_EtOH obtenu par macération à l'éthanol, à température ambiante pendant 2 h est l'extrait sélectionné pour la poursuite du développement de l'ingrédient, en raison de ses meilleures activités et de son rendement satisfaisant. Ces conditions d'extraction sont également celles qui présentent l'impact économique et environnemental le plus faible. Des études complémentaires sont nécessaires afin de confirmer l'intérêt des ultra-sons sur l'extraction des composés présents dans les feuilles de prunier.

#### 4.3.2.5.2. Double extraction des feuilles de prunier

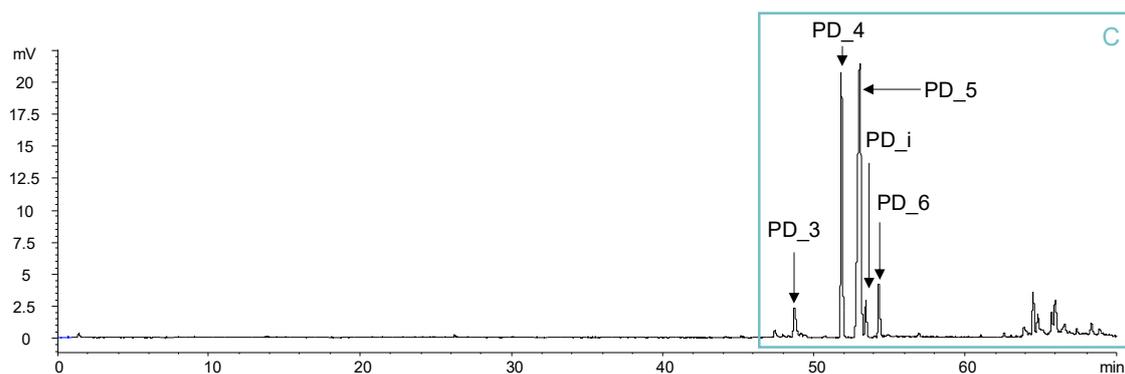
Afin d'extraire sélectivement d'une part les composés du groupe B et d'autre part, les composés du groupe C, deux extractions successives de la matière première avec deux solvants de polarité différente ont été réalisées. La première extraction a été effectuée par macération dans de l'éther diéthylique, suivie, après séchage de la matière végétale à l'air libre durant une nuit, d'une seconde extraction à l'éthanol. Chaque extraction a été opérée par macération des feuilles de prunier (Brignoles, 2017) pendant 1 h 30 à température ambiante. Cette double extraction a été réalisée en triplicat. L'extrait PD\_Ep1\_Ether est obtenu avec un rendement plus faible que l'extrait PD\_Ep1\_EtOH (Tableau 82). Leur rendement total est comparable à celui de l'extrait PD\_EtOH (11 %).

Tableau 82 : Conditions opératoires de la double extraction des feuilles de prunier

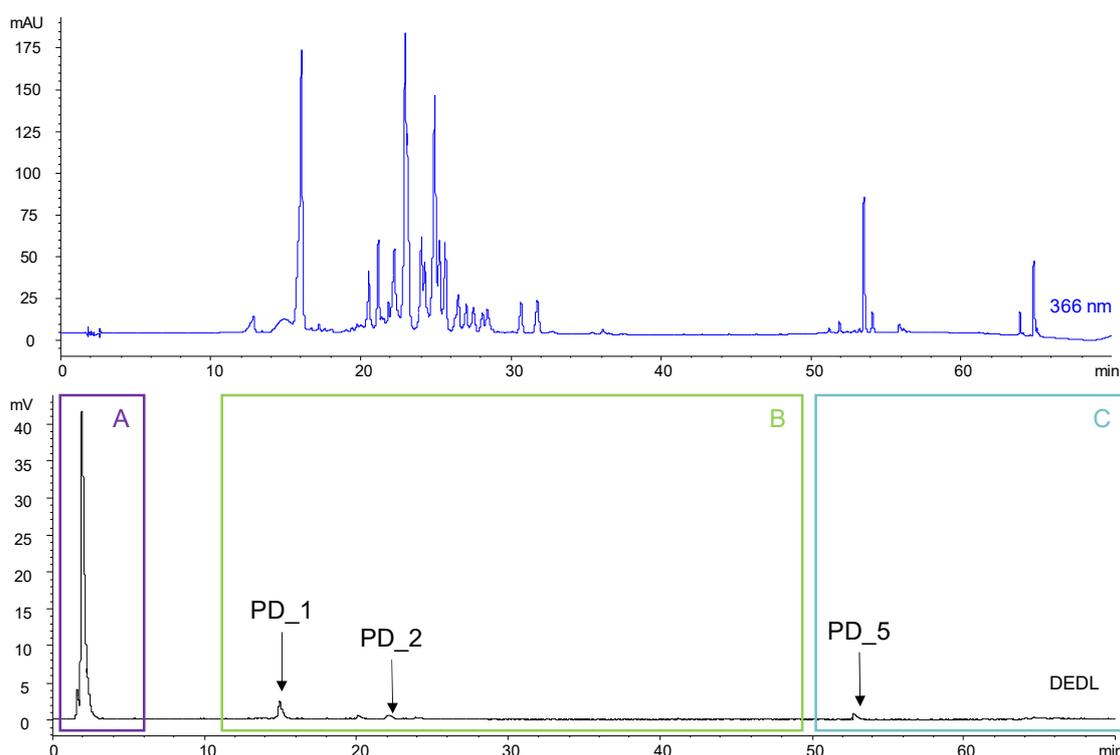
Fraction	Solvant	Rendement
PD_Ep1_Ether	Ether diéthylique	4 ± 1 %
PD_Ep1_EtOH	Ethanol	7 ± 1 %

D'après le profil phytochimique de l'extrait PD\_Ep1\_Ether, l'éther diéthylique permet d'extraire sélectivement les composés du groupe C (Figure 201). Il permet d'extraire 5 composés principaux mis en évidence lors de l'étude de caractérisation de l'extrait PD\_EtOH : les acides bétulinique et oléanolique dont les teneurs ont été estimées respectivement à 6,0 % et à 3,7 % par dosage par étalonnage externe, ainsi que les composés PD\_3 et PD\_i qui correspondent à des triterpénoïdes, et le composé PD\_6 qui correspond à un dérivé de la chlorophylle. En raison de sa faible polarité, l'éther diéthylique ne permet pas d'extraire les composés du groupe A, majoritaires dans les feuilles de prunier, ce qui en explique le faible rendement d'extraction. L'éther diéthylique permet en revanche d'extraire efficacement les composés souhaités.

L'extrait PD\_Ep1\_EtOH se compose majoritairement de molécules du groupe A (Figure 202). Les groupes de composés B et C sont également présents, mais à des concentrations moindres. La présence des deux composés phénoliques mis en évidence dans l'extrait PD\_EtOH, à savoir l'acide chlorogénique (PD\_1) et le composé PD\_2, ainsi que celle de l'acide oléanolique (PD\_5) sont à noter dans cet extrait.

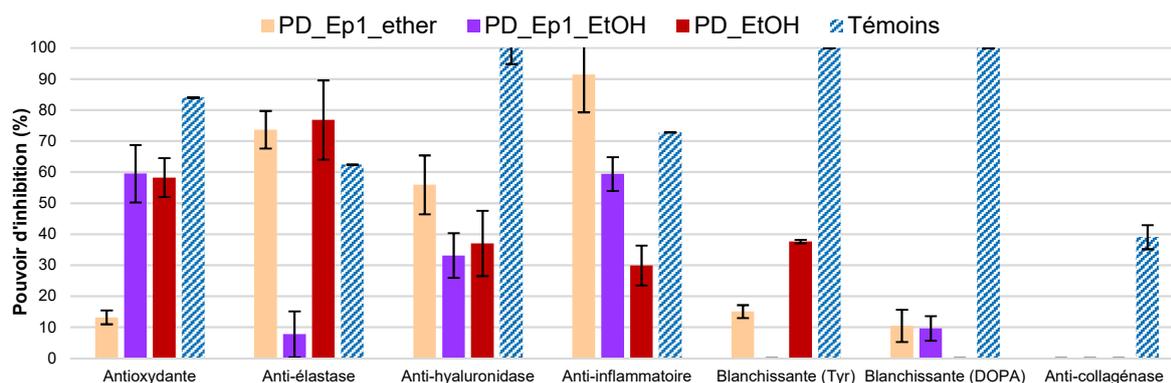


**Figure 201** : Chromatogramme HPLC/DEDL de l'extrait PD\_Ep1\_Ether



**Figure 202** : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 366 nm de l'extrait PD\_Ep1\_EtOH

La présence des composés du groupe C dans l'extrait PD\_Ep1\_Ether pourrait justifier la forte activité anti-élastase que présente ce dernier (Figure 203). Cet extrait PD\_Ep1\_Ether présente également de meilleures activités anti-hyaluronidase et anti-inflammatoires que l'extrait brut, ce qui confirme la contribution de ce groupe de composés C à ces activités. L'extrait PD\_Ep1\_EtOH présente des activités antioxydantes et anti-hyaluronidase similaires à celles de l'extrait brut, ainsi qu'une meilleure activité anti-inflammatoire. Les composés du groupe B, notamment les actifs PD\_1 et PD\_2, contribuent donc bien aux activités antioxydantes, anti-hyaluronidase et anti-inflammatoires.



**Figure 203 :** Activités biologiques des extraits obtenus par double extraction des feuilles de prunier

Cette double extraction permet ainsi le développement de deux ingrédients présentant des activités différentes à partir de la même matière première. En revanche, l'utilisation d'éther diéthylique dans le secteur cosmétique n'est pas recommandée du fait de son explosivité. Ce solvant a donc été remplacé par une alternative plus intéressante du point de vue de la sécurité, à savoir le méthoxycyclopentane (CPME) qui est considéré comme un solvant « vert », puisqu'il présente l'avantage de réduire les risques d'explosion en comparaison des éthers classiques [324]. La double extraction a été réalisée dans les conditions utilisées précédemment en remplaçant l'éther diéthylique par le CPME. L'extrait PD\_Ep2\_CPME est obtenu avec un rendement légèrement plus faible que l'extrait à l'éther (Tableau 83), alors que l'extrait éthanolique PD\_Ep2\_EtOH est obtenu avec un rendement comparable à l'extrait PD\_Ep1\_EtOH obtenu lors de la première expérimentation. Les extractions ont été réalisées en duplicat.

**Tableau 83 :** Conditions expérimentales employées pour la double extraction de feuilles de prunier avec le CPME

Fraction	Solvant	Rendement
PD_Ep2_CPME	CPME	3 ± 1 %
PD_Ep2_EtOH	Ethanol	8 ± 1 %

Le CPME permet d'extraire des composés du groupe C, et notamment les 4 composés principaux peu polaires mis en évidence dans les extraits PD\_EtOH et PD\_Ep1\_Ether (Figure 204). Les composés très peu polaires présents dans la fraction PD\_EtOH\_F1 sont également présents. Les principales différences entre les extraits PD\_Ep1\_ether et PD\_Ep2\_CPME sont les teneurs respectives en composés. L'extrait PD\_Ep2\_EtOH présente lui, un profil comparable à celui de l'extrait PD\_Ep1\_EtOH (Figure 202).

L'extrait PD\_Ep2\_CPME présente des activités anti-élastase et anti-hyaluronidase comparables à celles de l'extrait PD\_Ep1\_ether (Figure 205). En revanche, ses activités anti-inflammatoires sont nulles. Le CPME ne permettrait pas d'extraire les composés responsables de ces activités. L'extrait PD\_Ep2\_EtOH présente quant à lui, des activités comparables à celles de l'extrait PD\_Ep1\_EtOH.

Le CPME est une alternative à l'éther diéthylique pour l'extraction des composés d'intérêt, exception faite des composés responsables des activités anti-inflammatoires. Cependant, le rendement d'extraction plus faible et le coût important de ce solvant peuvent s'avérer problématiques pour un développement industriel [324].

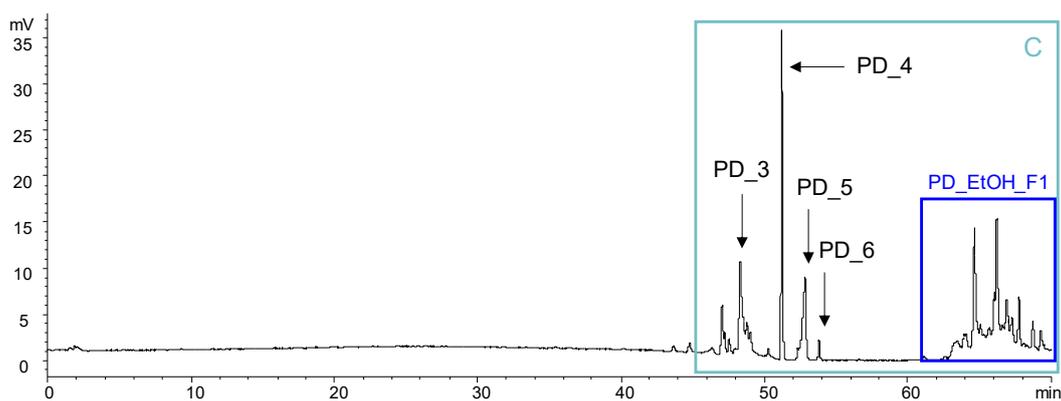


Figure 204 : Chromatogramme HPLC/DEDL de l'extrait PD\_Ep2\_CPME

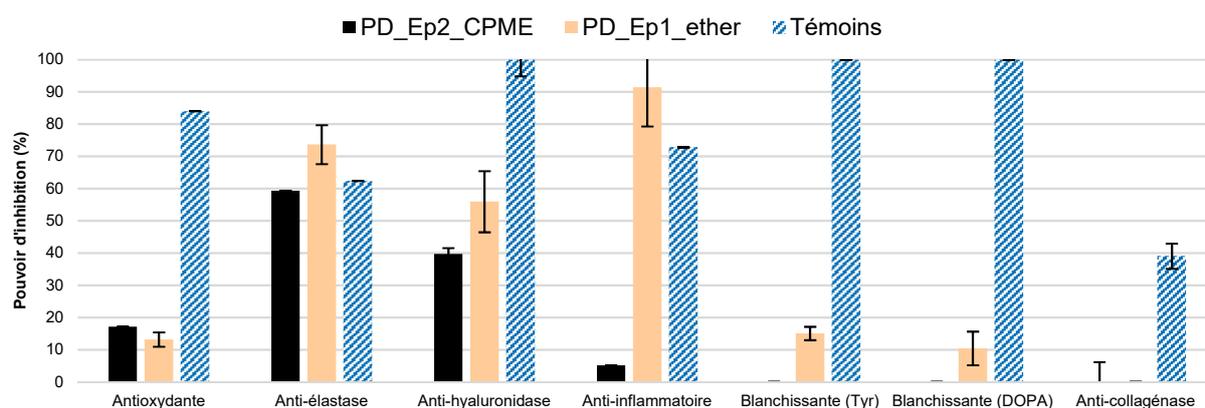


Figure 205 : Activités biologiques des extraits obtenus lors de la première extraction réalisée lors de la double extraction des feuilles de prunier

L'utilisation de deux solvants de polarités différentes permet d'extraire sélectivement les composés présents dans les feuilles de prunier. Les extraits obtenus présentent des activités spécifiques plus intéressantes que celles de l'extrait PD\_EtOH. Le CPME s'avère être une alternative à l'éther diéthylique pour une telle extraction.

Cette double extraction permet ainsi d'obtenir deux extraits à partir de la même matière première, et ainsi de développer deux ingrédients dont la commercialisation permettrait d'amortir plus rapidement les coûts inhérents à l'achat de cette matière première.

### 4.3.2.6. Développement d'un extrait liquide

#### 4.3.2.6.1. Extraction au propylène glycol

La stratégie de développement d'un ingrédient sous forme liquide mise en place pour le chêne a également été utilisée pour les feuilles de prunier. Un extrait PD\_PG a été réalisé par macération de feuilles de prunier dans le propylène glycol dans les conditions définies dans le chapitre 2 (Tableau 84). Cette extraction a été réalisée en triplicat.

Tableau 84 : Conditions expérimentales pour l'extrait PD\_PG

Date de récolte	Localisation	Solvant	Durée	Ratio	Température
Automne 2016	Brignoles (83)	Propylène glycol	7 h	1/10	TA

Cet extrait PD\_PG présente des activités antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-hyaluronidase très intéressantes, supérieures à celles de l'extrait PD\_EtOH (Figure 206). En revanche, il ne présente pas d'activité anti-élastase.

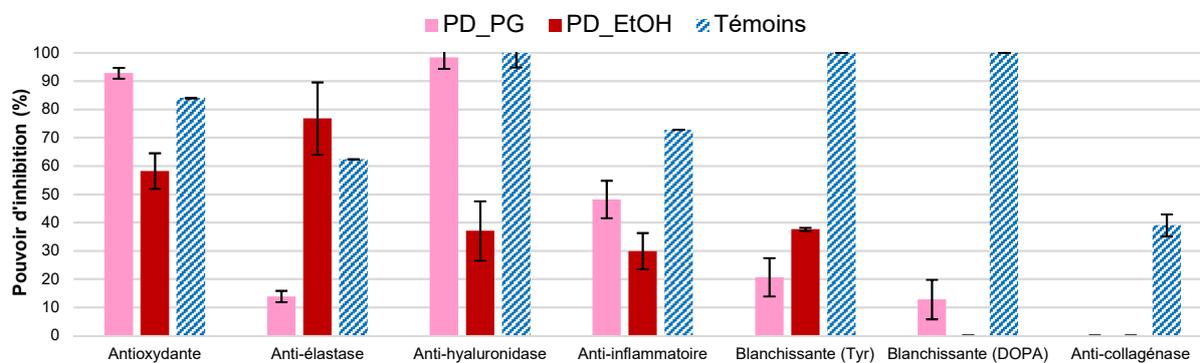


Figure 206 : Activités biologiques de l'extrait PD\_PG

Afin d'accéder à son profil phytochimique, l'extrait a été concentré par SPE selon les conditions déterminées avec les extraits de chêne. Le volume d'extrait à charger sur la phase stationnaire a été adapté, ainsi que la nature du solvant utilisé pour l'élution des composés retenus. Pour cet extrait, le volume de fin de fixation est atteint pour une charge d'échantillon (extrait dilué dans l'eau avec un ratio volumique extrait/eau 1/3) supérieure à 2,5 mL. Les composés retenus sont élués avec 4 mL d'un mélange MeOH/DCM (50/50 v/v).

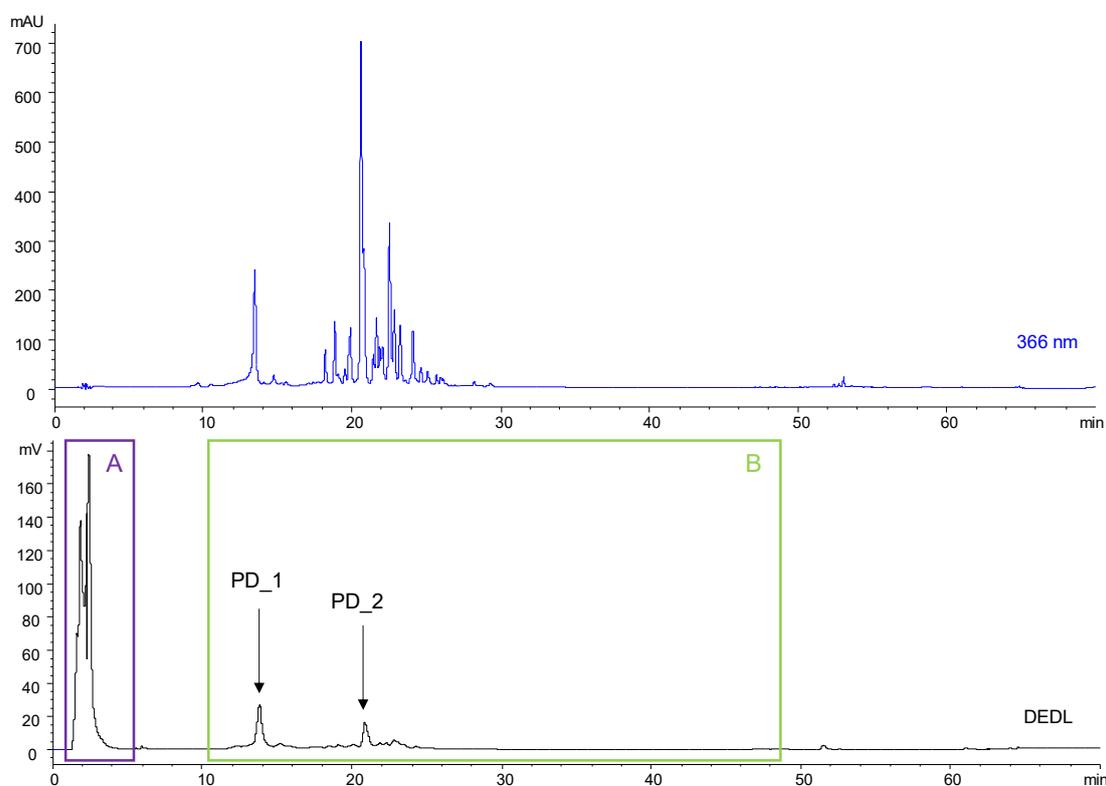


Figure 207 : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 366 nm de l'extrait PD\_PG

L'extrait PD\_PG est caractérisé par la présence de composés des groupes A et B retrouvés dans l'extrait éthanolique, notamment les polyphénols PD\_1 (acide chlorogénique) et PD\_2

(Figure 207). La présence des composés du groupe B explique les activités antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-hyaluronidase de cet extrait. Aucun composé du groupe C, c'est-à-dire aucun composé faiblement polaire n'est extrait par le propylène glycol (qui est plus polaire que l'éthanol), ce qui explique que l'activité anti-élastase de cet extrait soit nulle.

Comme dans le cas de l'extrait liquide de chêne, la SPE permet de concentrer l'échantillon en composés d'intérêt, en retirant la matrice support (propylène glycol), ainsi que les composés très polaires du groupe A. Afin d'évaluer ce facteur de concentration, une quantité connue d'acide chlorogénique (composé PD\_1 identifié dans l'extrait PD\_PG) a été ajoutée à l'échantillon avant la charge de celui-ci sur la phase stationnaire. Par comparaison de l'intensité du pic correspondant sur le profil HPLC, par rapport à celui d'un échantillon analysé sans ajout d'acide chlorogénique, le facteur de concentration par SPE a pu être estimé : il est de 6 dans ces conditions, ce qui justifie l'intérêt de cette technique pour la concentration de ce type d'extrait.

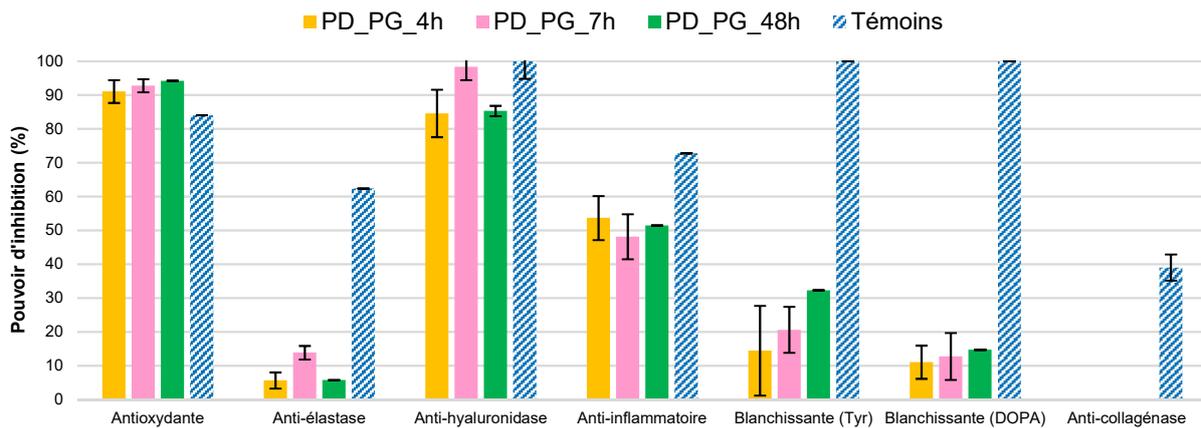
Le propylène glycol permet d'extraire une partie des composés d'intérêt mis en évidence préalablement dans l'extrait éthanolique de feuilles de prunier. L'extraction des composés du groupe B par ce solvant permet d'obtenir un extrait aux activités antioxydantes, anti-hyaluronidase et anti-inflammatoires intéressantes.

#### 4.3.2.6.2. Optimisation des conditions d'extraction

Une étude d'optimisation des conditions d'extraction similaire à celle réalisée pour l'extrait QP\_PG, a été effectuée pour l'extrait PD\_PG. L'influence du ratio massique matière végétale/solvant, de la durée et de la température d'extraction a été évaluée ; ces différentes extractions ont été réalisées en triplicat.

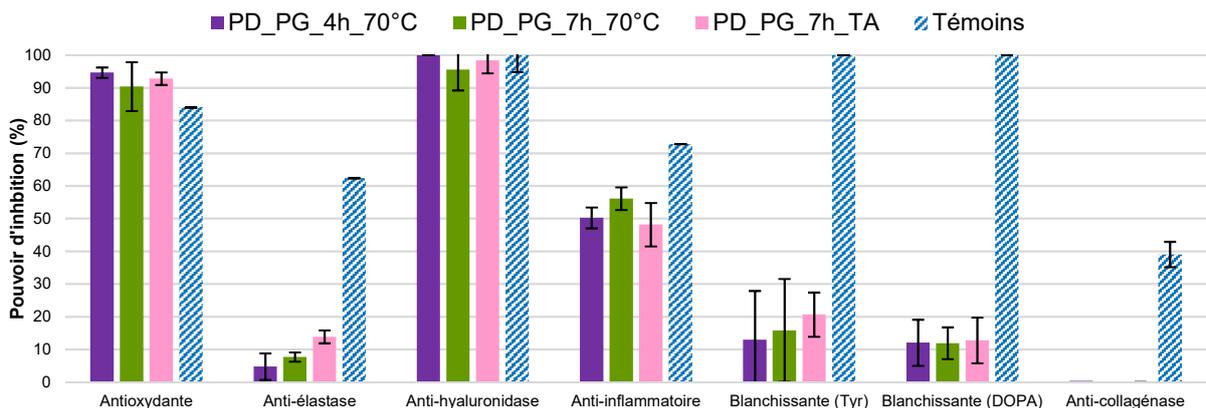
Comme pour l'extrait de chêne, l'augmentation du ratio massique matière végétale/solvant à 1/20 induit des pertes d'activités. Sauf exception (cas d'une immersion partielle de la matière végétale), cette étude a permis de sélectionner le ratio 1/10 pour toutes les extractions futures réalisées dans ces conditions puisqu'il permet l'immersion totale de la matière végétale, tout en minimisant la quantité de solvant nécessaire.

Des macérations de 4 h, 7 h et 48 h ont ensuite été réalisées. La macération de 140 h, testée dans le cas du chêne, n'ayant pas permis d'obtenir un extrait présentant de meilleures activités qu'une extraction de 48 h, et n'étant de surcroît pas viable pour une transposition industrielle, n'a pas été testée dans le cas présent. Quel que soit le temps d'extraction, les extraits PD\_PG présentent des activités relativement comparables (Figure 208). Ainsi, pour des raisons évidentes de viabilité économique, le temps de macération pour ce type d'extraction sera dorénavant compris entre 4 h et 7 h.



**Figure 208 :** Influence du temps d'extraction sur les activités biologiques de l'extrait PD\_PG

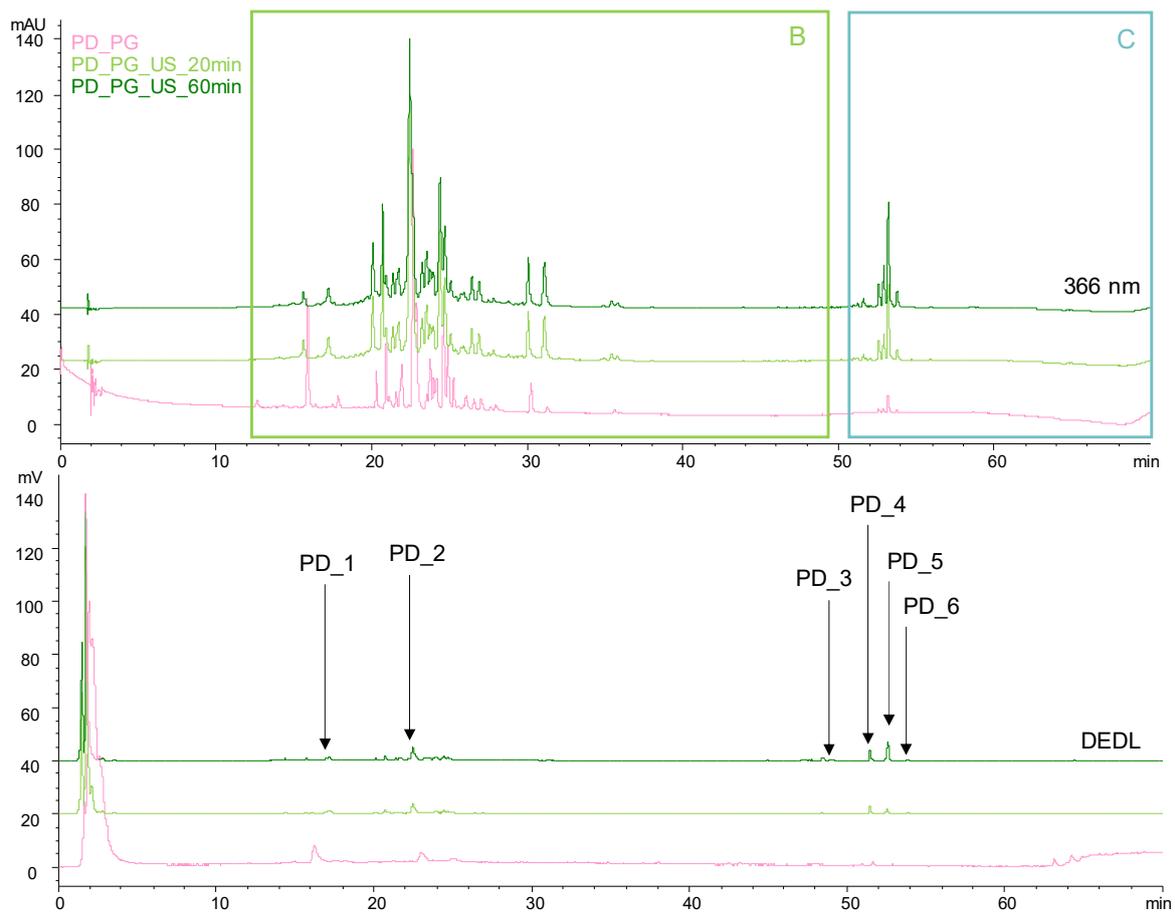
Lors de l'étude de l'extrait de chêne, il a été démontré qu'un chauffage à 35 °C ne permettait pas d'obtenir un extrait plus actif qu'un extrait obtenu à température ambiante. L'étude s'est donc seulement intéressée à l'influence d'une température d'extraction de 70 °C. Quelle que soit la durée d'extraction (4 h ou 7 h), le chauffage à 70 °C influence peu les activités biologiques (Figure 209).



**Figure 209 :** Influence de la température d'extraction sur les activités biologiques des extraits PD\_PG

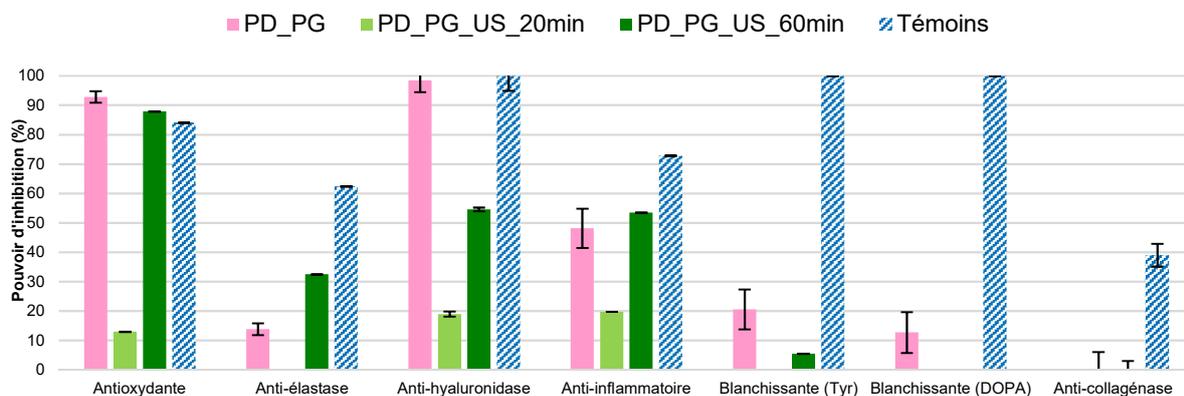
L'activation de l'extraction par ultra-sons a également été testée pour cet extrait liquide, dans les mêmes conditions que lors des études précédentes ; à savoir des durées d'extraction sans agitation de 20 min et 60 min, et à température fixée par le double manteau. Les extractions ont été réalisées en triplicat, avec une fréquence des ultra-sons fixée à 25 kHz.

D'après les profils phytochimiques des extraits obtenus après concentration par SPE, il apparaît que ces derniers présentent des compositions similaires en ce qui concerne les composés des groupes B et C (Figure 210). Les ultra-sons permettent ainsi d'accélérer l'extraction des composés d'intérêt, puisque malgré des durées d'extractions plus courtes qu'une macération classique, les profils sont comparables. Les ultra-sons favoriseraient également l'extraction des composés lipophiles du groupe C, notamment des composés PD\_3 à PD\_6 qui n'étaient pas extraits avec le propylène glycol seul.



**Figure 210 :** Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 366 nm des extraits obtenus par extraction activée par ultra-sons

L'extrait PD\_PG\_US\_60min présente des activités antioxydantes et anti-inflammatoires similaires à celles de l'extrait PD\_PG (Figure 211). Les ultra-sons permettent d'accélérer l'extraction des composés responsables de ces activités, à savoir les composés du groupe B et principalement les composés PD\_1 et PD\_2. Il présente également de meilleures activités anti-élastase, qui s'expliquent par la présence des composés du groupe C. En revanche, ses activités anti-hyaluronidase sont plus faibles. Les composés responsables de ces activités doivent nécessiter une durée d'extraction plus longue, ce qui expliquerait également les plus faibles activités anti-hyaluronidase de l'extrait PD\_PG\_US\_20min.



**Figure 211 :** Activités biologiques des extraits obtenus par extraction activée par ultra-sons

Les ultra-sons permettent d'activer l'extraction des composés d'intérêt puisqu'une durée d'extraction de 60 min permet d'obtenir un extrait aux propriétés presque aussi intéressantes qu'un extrait obtenu par macération de 7 h. Cette durée de 60 min semble toutefois la durée minimale nécessaire pour obtenir des activités intéressantes. Il serait intéressant d'augmenter la durée d'extraction à 90 minutes afin de voir si les composés responsables des activités anti-hyaluronidase sont extraits.

Cette étude d'optimisation a permis de sélectionner les paramètres optimaux d'extraction de feuilles de prunier au propylène glycol pour le développement d'un extrait dédié à un usage cosmétique : ratio massique matière végétale/solvant 1/10, macération de 4 à 7 h réalisée à température ambiante. Ces conditions permettent d'obtenir un extrait actif à l'impact environnemental et économique moindre.

Les ultra-sons sont également intéressants pour accélérer l'extraction des composés d'intérêt de type d'extrait, lorsque la durée d'extraction est suffisante.

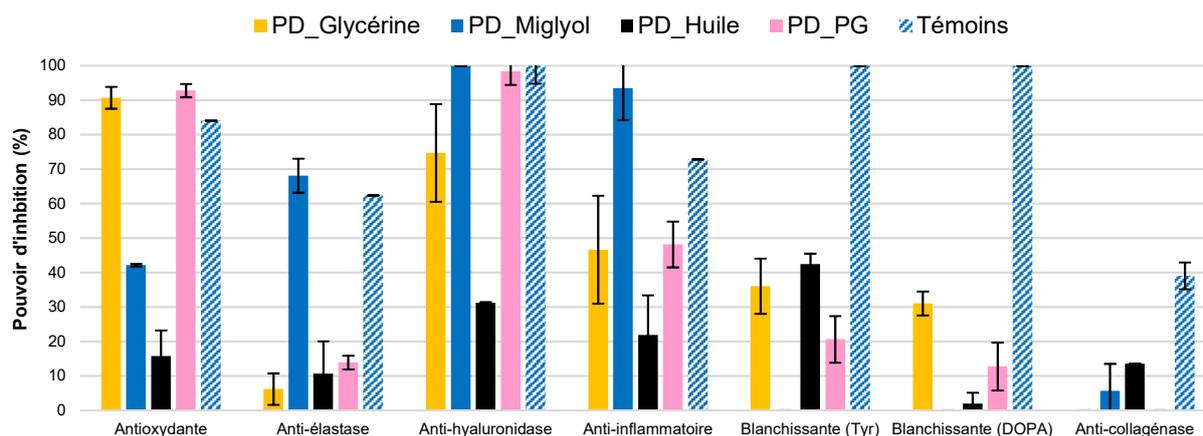
#### 4.3.2.6.3. Extraction avec d'autres solvants

L'extraction de feuilles de prunier avec la glycérine, le miglyol et l'huile de tournesol a également été testée. Ces extractions ont été réalisées en triplicat dans les conditions définies précédemment (ratio matière végétale/solvant 1/10, 7 h, TA). Comme observé dans le cas du chêne, l'extrait PD\_Glycérine est obtenu avec un rendement inférieur aux autres extraits, en raison de la viscosité de la glycérine.

L'extrait glycéринé PD\_Glycérine présente des activités antioxydantes et anti-inflammatoires comparables à celles de l'extrait PD\_PG (Figure 212). Ses activités blanchissantes sont légèrement plus intéressantes que celles de l'extrait PD\_PG, contrairement à son activité anti-hyaluronidase qui est plus faible que celle de l'extrait PD\_PG. Les profils phytochimiques des extraits PD\_Glycérine et PD\_PG étant comparables, les différences d'activités doivent s'expliquer par l'extraction préférentielle de certains composés actifs de par leurs propriétés physico-chimiques différentes.

L'extrait PD\_Miglyol se démarque par son activité anti-élastase très intéressante, ainsi que par ses activités anti-hyaluronidase et anti-inflammatoires plus fortes que les extraits PD\_Glycérine et PD\_PG. Sa composition phytochimique est proche de celles de ces derniers (présence des composés du groupe B), mais elle se démarque par la présence de composés du groupe C, responsables de son activité anti-élastase. Il est important ici de rappeler que le miglyol présente à lui seul certaines activités. Par ailleurs, la présence conjointe de composés des deux groupes B et C explique les meilleures activités de cet extrait.

Comme dans le cas du chêne, l'extrait PD\_Huile ne présente que de faibles activités biologiques.



**Figure 212 :** Activités biologiques des extraits de prunier obtenus avec d'autres solvants utilisés en cosmétique

L'utilisation de solvants compatibles avec les formulations cosmétiques tels que le propylène glycol, la glycérine et le miglyol, permettent d'obtenir des extraits liquides aux activités biologiques diverses. Afin de développer des extraits plus « verts », ces solvants pourraient être remplacés par leurs homologues biosourcés.

L'extrait obtenu par macération au propylène glycol est sélectionné pour la suite du développement de l'ingrédient.

#### 4.3.2.7. Etude de formulabilité : décoloration sur charbon actif

##### 4.3.2.7.1. Décoloration de l'extrait éthanolique

L'éthanol, de par sa polarité, favorise l'extraction de molécules colorées. Ainsi, l'extrait éthanolique de feuilles de prunier qui présente les activités biologiques les plus intéressantes, est de couleur vert foncé (couleur qui peut s'expliquer par la présence de dérivés de la chlorophylle et notamment du composé PD\_6) (Figure 213). L'intégration de cet extrait dans une formulation cosmétique induit une coloration de la formule cosmétique, et ce, même à de faibles concentrations.

Différents tests de décoloration sur charbon actif ont été réalisés en étudiant l'influence de 3 paramètres : le ratio massique adsorbant/extrait, le temps de contact, ainsi que la température à laquelle est réalisée la décoloration. L'efficacité de la décoloration a été évaluée selon les 2 critères utilisés lors de la décoloration de l'extrait de chêne QP\_PG : la distance euclidienne  $\Delta E^*_{ab}$  et les activités biologiques de l'extrait décoloré (en comparaison de l'extrait non décoloré). Le rendement de décoloration correspondant aux pertes dues à l'adsorption des composés sur le charbon actif a également été pris en considération.

Un extrait éthanolique de feuilles de prunier PD\_D a été réalisé pour cette étude. A partir de cet extrait, une première étude de décoloration à température ambiante a été effectuée en faisant varier la teneur massique en charbon actif entre 1 et 10 %, en fixant le temps de contact à 15 min (Tableau 85). Les extraits décolorés, numérotés PD\_D1 à PD\_D10 selon la teneur en CA, sont obtenus par évaporation du solvant après filtration du charbon actif. Tous les

essais de décoloration ont été réalisés en triplicat, tout comme les mesures de colorimétrie. Quelles que soient les conditions de décoloration, le charbon actif adsorbe entre 10 et 20 % des composés contenus dans l'extrait PD\_D.

**Tableau 85** : Conditions expérimentales utilisées pour la décoloration de l'extrait PD\_D au charbon actif, rendements et distances euclidiennes obtenus

Conditions	PD_D1	PD_D3	PD_D5	PD_D10	PD_D10_4h	PD_D10_70°C
Teneur en CA	1 %	3 %	5 %	10 %	10 %	10 %
Temps de contact	15 min	15 min	15 min	15 min	4 h	15 min
Température	TA	TA	TA	TA	TA	70 °C
Rendement	87 ± 5	85 ± 4	79 ± 11	84 ± 9	92 ± 1	87 ± 5
$\Delta E^*_{ab}$	41 ± 3	56 ± 1	57 ± 3	72 ± 9	89 ± 1	87 ± 7

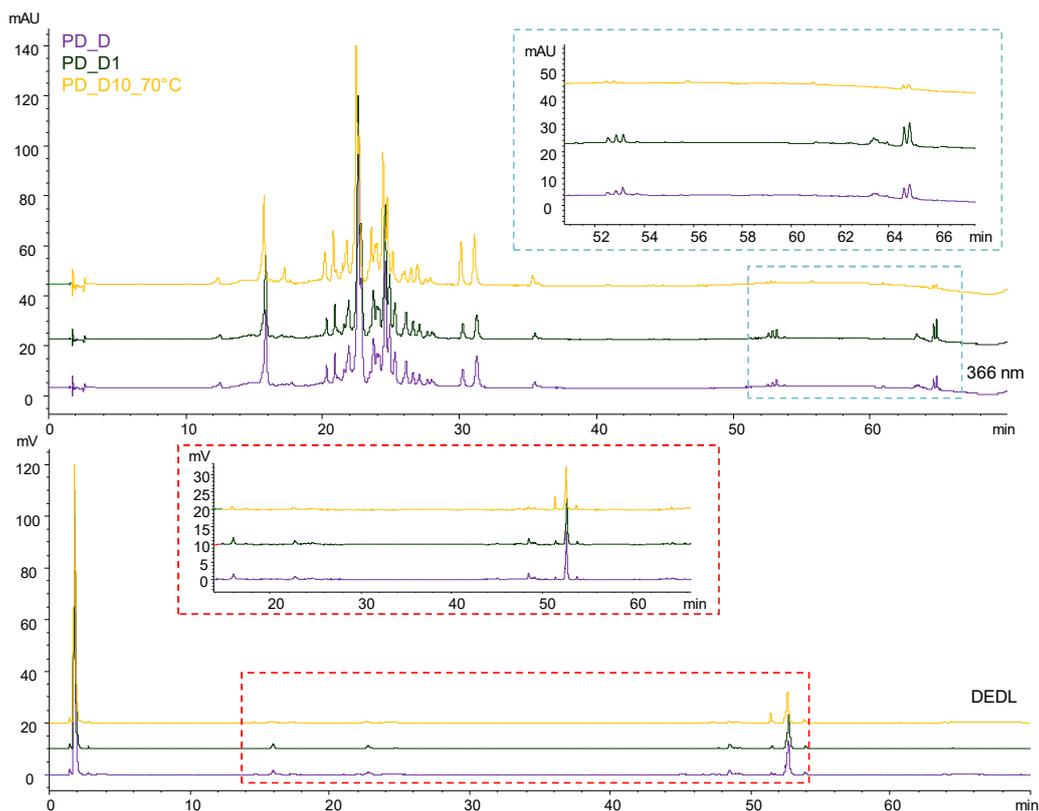
Plus le pourcentage de charbon actif est important, plus la décoloration est visuelle (Figure 213). Ces observations sont confirmées par les mesures de colorimétrie, puisque la distance euclidienne augmente progressivement entre ces différents extraits : l'extrait PD\_D4 présente une distance de  $72 \pm 9$ , presque deux fois supérieure à celle de l'extrait PD\_D1 ( $41 \pm 3$ ).



**Figure 213** : Extraits obtenus après décoloration sur charbon actif de l'extrait PD\_D (gauche)

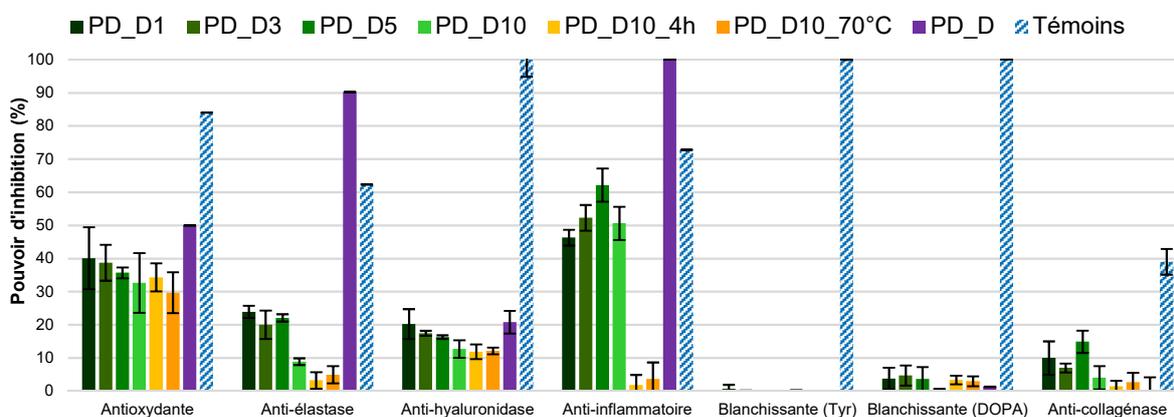
La décoloration de l'extrait PD\_D10 étant très efficace, un ratio de 10 % a été sélectionné pour étudier l'influence du temps de contact (décoloration pendant 4 h : PD\_D10\_4h) et de la température (décoloration à 70 °C : PD\_D10\_70°C). En comparaison avec l'extrait PD\_D10, ces paramètres ne semblent pas affecter la décoloration (Tableau 85, Figure 213) [273]. Les distances euclidiennes de ces deux extraits sont comparables, et légèrement supérieures à celles de l'extrait PD\_D10.

La composition phytochimique de ces extraits est comparable ; ils sont caractérisés par la présence de composés des 3 groupes A, B et C, et plus particulièrement des 6 composés principaux PD\_1 à PD\_6. Les extraits PD\_D1, PD\_D3 et PD\_D5 présentent des profils chromatographiques identiques ; de la même manière, les extraits PD\_D10, PD\_D10\_4h et PD\_D10\_70°C présentent des compositions similaires, c'est pourquoi seuls les extraits PD\_D1 et PD\_D10\_70°C sont comparés à l'extrait PD\_D non décoloré (Figure 214). La principale différence entre ces extraits concerne les composés peu polaires (encadré bleu) qui semblent présents en quantité moins importante dans les extraits PD\_D10. Ces composés peu polaires correspondent aux pigments responsables de la coloration des extraits, ce qui explique la différence de couleur observée.



**Figure 214 :** Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 366 nm des extraits PD\_D (violet), PD\_D1 (vert) et PD\_D10\_70°C (jaune)

Bien que les profils phytochimiques semblent comparables, ces décolorations s'accompagnent de pertes d'activités, particulièrement des activités anti-élastase et anti-inflammatoires (Figure 215). Le charbon actif adsorbe une partie des composés du groupe C qui contribuent principalement à ces activités, ainsi qu'une partie des composés du groupe B qui participent davantage aux activités anti-inflammatoires. Ces pertes d'activités sont particulièrement importantes dans le cas des extraits décolorés à 70 °C et durant 4 h. Ces paramètres favorisent ainsi l'adsorption des composés d'intérêt, sans influencer plus fortement sur la décoloration. L'influence de la décoloration est moindre sur les activités antioxydantes et anti-hyaluronidase. Le charbon actif doit présenter de plus faibles affinités avec les composés responsables de ces dernières.



**Figure 215 :** Activités biologiques des extraits décolorés PD\_D

Le charbon actif permet de décolorer les extraits éthanoliques de feuilles de prunier sans perte de rendement significative. Le ratio charbon actif/extrait impacte la décoloration de l'extrait, qui est très significative au-delà de 10 %. La température et le temps de contact ont en revanche peu d'influence sur cette décoloration. L'adsorption non sélective de chromophores, mais aussi de composés d'intérêt, par le charbon actif induit des pertes d'activités biologiques pour les extraits décolorés quelle que soit la teneur en charbon actif. Ces pertes d'activités s'avèrent plus importantes lorsque le temps de contact est augmenté et lorsque la décoloration est réalisée à 70 °C.

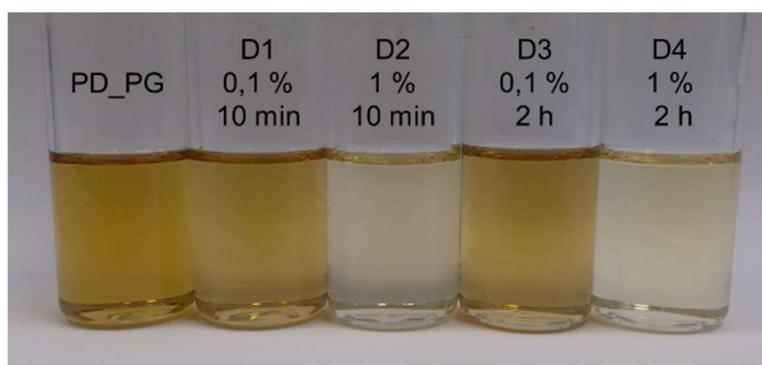
Une solution possible à ces problèmes de décoloration liés à l'adsorption des composés d'intérêt pourrait être la mise sur support solide de l'extrait. En effet, le dépôt de l'extrait sur un matériau support de couleur blanche tel que la maltodextrine peut induire une diminution de la couleur de l'ingrédient solide, par « dilution » de ce dernier. L'étude de mise sur support par atomisation n'ayant pu être réalisée sur cet extrait éthanolique, elle sera menée ultérieurement afin de déterminer les conditions expérimentales permettant l'obtention d'une poudre de bonne qualité (apparence et taux d'humidité), obtenue avec un rendement intéressant et qui préserve les activités biologiques de l'extrait sec. Des mesures de colorimétrie et des essais de formulation de cet ingrédient seront réalisés afin d'évaluer l'impact de la couleur sur les formules cosmétiques.

#### 4.3.2.7.2. Décoloration de l'extrait liquide

De la même manière, une étude de décoloration de l'extrait liquide de feuilles de prunier a été réalisée. Les conditions de décoloration utilisées sont identiques à celles employées pour l'extrait liquide du chêne (Tableau 86). Les décolorations ainsi que les mesures de colorimétrie ont été réalisées en triplicat. Les rendements de décoloration de ces extraits sont proches de 85 %, comparables à ceux obtenus pour lors de l'étude du chêne.

**Tableau 86** : Conditions de décoloration testées sur l'extrait PD\_PG et distances euclidiennes calculées par mesure de colorimétrie

	PD_PG_D1	PD_PG_D2	PD_PG_D3	PD_PG_D4
Temps de contact	10 min	10 min	2 h	2 h
Teneur en CA	0,1 %	1,0 %	0,1 %	1,0 %
$\Delta E^*_{ab}$	14,2 ± 0,9	33,4 ± 0,3	14,6 ± 0,4	33,2 ± 0,7

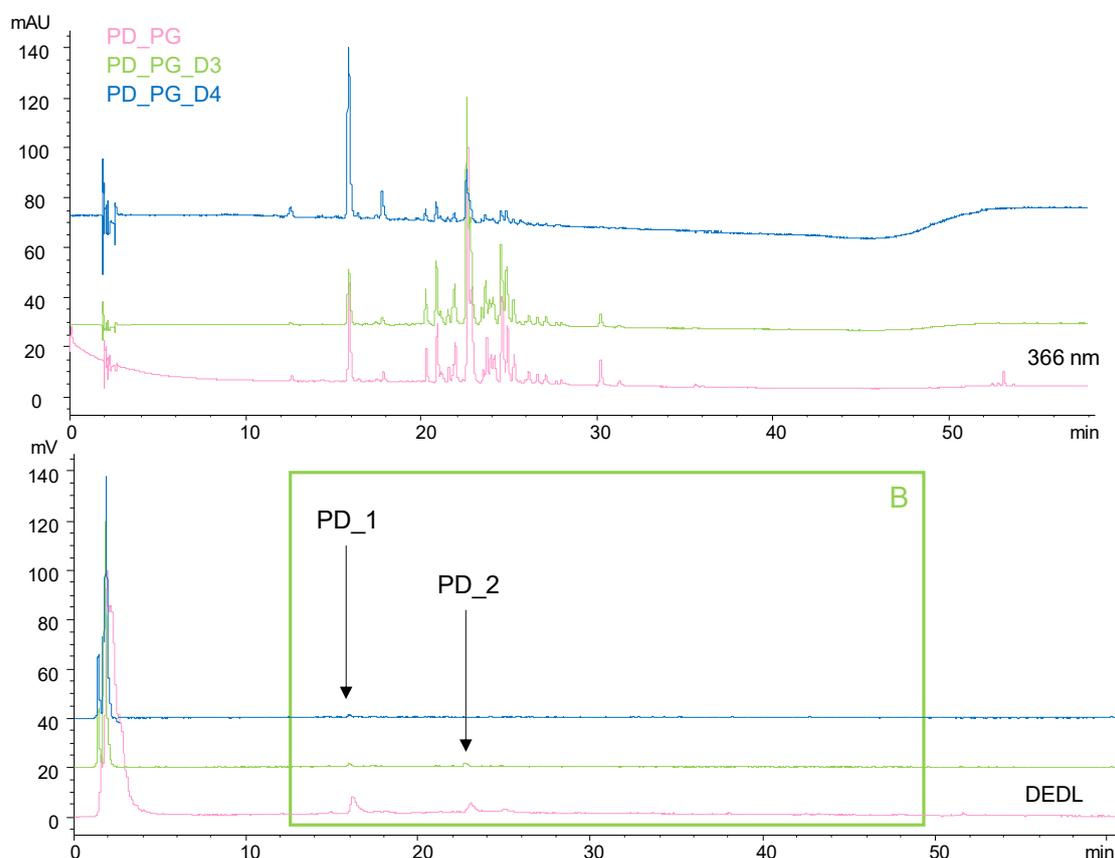


**Figure 216** : Extrait non décoloré PD\_PG (gauche) et extraits décolorés PD\_PG\_D1 à PD\_PG\_D4 (droite)

Des observations similaires à celles réalisées lors de la décoloration de l'extrait liquide de chêne, sont réalisables pour cet extrait de feuilles de prunier. La teneur en charbon actif influence davantage la décoloration de l'extrait, que la durée de décoloration (Figure 216). Les distances euclidiennes calculées pour les extraits décolorés avec 0,1 % de charbon actif sont deux fois inférieures à celles des extraits décolorés avec 1 % (14 vs 33).

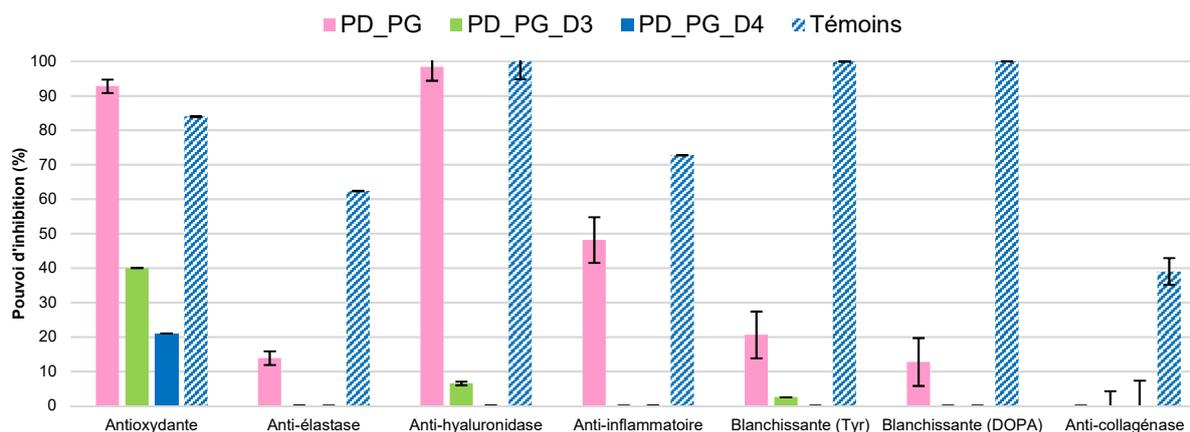
En plus d'adsorber les chromophores, le charbon actif présente des affinités avec les composés d'intérêt du groupe B, puisque les extraits PD\_PG\_D3 et PD\_PG\_D4 sont appauvris en ces composés (Figure 217). Les composés PD\_1 et PD\_2 sont adsorbés par le charbon actif, tout particulièrement dans le cas de l'extrait PD\_PG\_D4.

Comme observé lors des études précédentes, le charbon actif adsorbe de manière non spécifique les composés, induisant des pertes significatives d'activités de ces extraits (Figure 218).

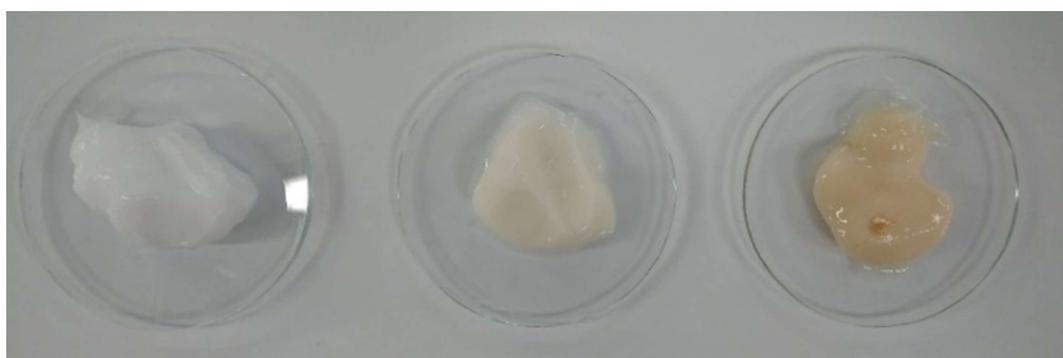


**Figure 217** : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 366 nm de l'extrait PD\_PG non décoloré (rose) et décolorés PD\_PG\_D3 (vert) et PD\_PG\_D4 (bleu)

Des essais complémentaires sont nécessaires afin de déterminer les conditions permettant une décoloration effective de l'ingrédient tout en préservant ses activités. Comme pour le chêne, l'extrait de prunier a été intégré dans des formulations cosmétiques à hauteur de 1 % et 4,5 % (Figure 219). Là encore, les Laboratoires JYTA ont considéré la coloration beige de la formule par ajout de l'ingrédient à hauteur de 4,5 % comme acceptable. En revanche, il est nécessaire de poursuivre cette étude de décoloration afin de satisfaire les attentes d'autres formulateurs qui pourraient être gênés par cette coloration.



**Figure 218** : Activités biologiques des extraits liquides de feuilles de prunier décolorés



**Figure 219** : Emulsions huile/eau formulées sans actif (gauche) et avec 1 % et 4,5 % d'extrait PD\_PG (milieu et droite)

La décoloration sur charbon actif est effective mais induit des pertes d'activités biologiques significatives. Une optimisation de cette étape de décoloration est ainsi nécessaire.

#### 4.3.2.8. Etudes de stabilité et de toxicité

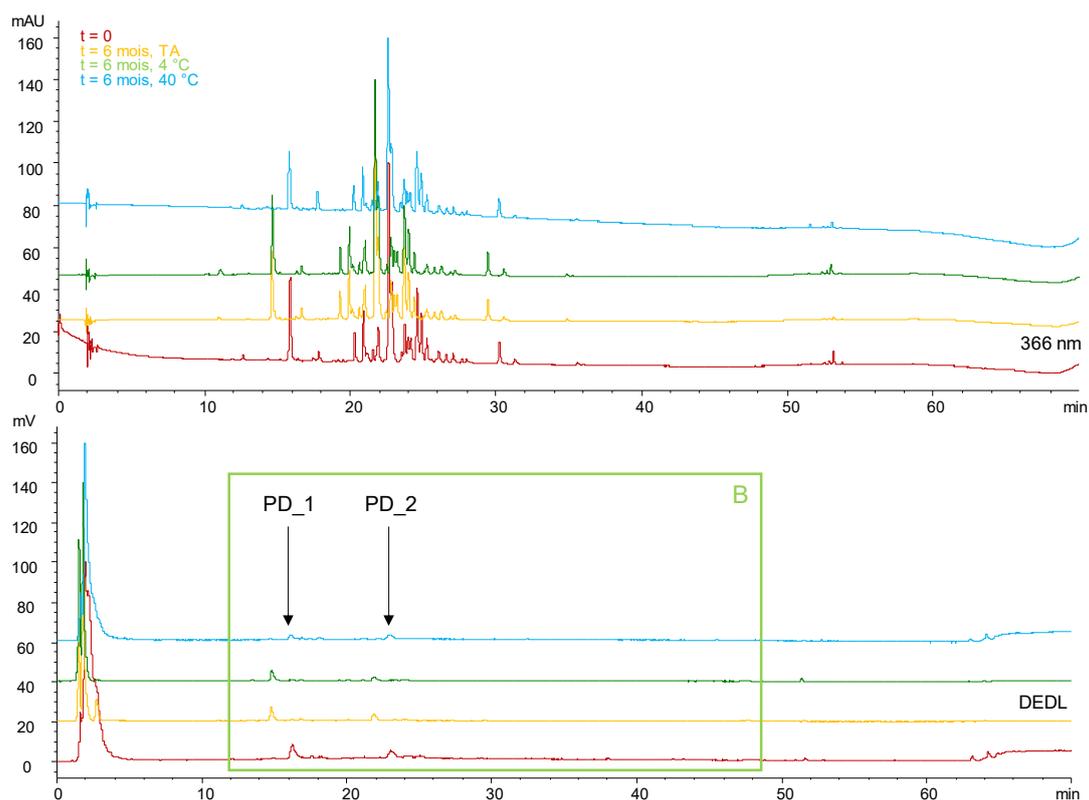
Comme dans le cas du chêne, un extrait liquide à l'échelle pilote a été réalisé afin d'étudier sa stabilité et sa toxicité. Les conditions opératoires utilisées sont présentées dans le Tableau 87. Après pressage mécanique de la matière végétale, cet extrait a été obtenu avec un rendement de 81 %. Ce rendement est plus faible que celui obtenu pour l'extrait QP\_Pilote car les feuilles de prunier absorbent davantage le propylène glycol que les parties aériennes du chêne qui contiennent des petites ramures.

Le profil phytochimique de l'extrait PD\_Pilote et ses activités biologiques sont comparables à ceux de l'extrait PD\_PG obtenu à l'échelle laboratoire, ce qui traduit la réussite de la transposition de ces paramètres à l'échelle pilote.

**Tableau 87** : Conditions opératoires et rendement obtenu pour l'extrait de feuilles de prunier à l'échelle pilote

Provenance	Masse matière végétale	Conditions	Rendement
Brignoles, 2017	1,078 kg	7 h, TA, agitation mécanique 1500 rpm	81 %

Une étude de stabilité similaire à celle réalisée pour l'extrait QP\_Pilote a été réalisée pour l'extrait PD\_Pilote. Les extraits de prunier conservés à température ambiante, à 4 °C et à 40 °C présentent une composition relativement comparable à celle de l'extrait pilote ; ils sont caractérisés par la présence des composés PD\_1 (acide chlorogénique) et PD\_2 (Figure 220). Les activités biologiques de ces ingrédients sont également préservées. De la même manière, les paramètres organoleptiques restent inchangés après 8 mois de stockage dans des conditions différentes. L'ingrédient développé à partir de feuilles de prunier semble donc stable selon les 3 conditions de stockage.



**Figure 220** : Chromatogrammes HPLC-DAD/DEDL à 366 nm de l'extrait PD\_Pilote conservé selon différentes conditions de stockage pendant 6 mois

La cytotoxicité, le potentiel d'irritation cutanée et le potentiel d'irritation oculaire de l'extrait ont été évalués ; les résultats de ces tests sont encourageants pour la commercialisation de l'ingrédient (Tableau 88). En effet, les potentiels irritants cutané et oculaire présentent des valeurs conformes à la réglementation. De la même manière, l'échantillon induit une réduction relative de la viabilité des cellules seulement lorsque celles-ci sont exposées à des doses extrêmement importantes ( $DL_{50} > 5000$  mg/kg) ; le test *in vitro* 3T3 NRU permet donc de conclure quant à l'absence de cytotoxicité de l'échantillon.

**Tableau 88** : Résultats des tests de toxicité de l'ingrédient PD\_Pilote

Test de toxicité	Résultats	Règlementation
Cytotoxicité <i>in vitro</i> 3T3 NRU	$CI_{50} = 40,25$ mg/mL $DL_{50} = 5457$ mg/kg	$DL_{50} > 2000$ mg/kg
Potentiel irritant cutané <i>in vitro</i>	Viabilité tissulaire $> 50$ %	Viabilité tissulaire $> 50$ %
Potentiel irritant oculaire <i>in vitro</i>	Viabilité tissulaire $> 60$ %	Viabilité tissulaire $> 60$ %

Les études de stabilité et de toxicité de l'ingrédient PD\_Pilote sont prometteuses. Ces résultats confirment l'intérêt de développer un tel ingrédient cosmétique à partir d'un extrait de feuilles de prunier. Le calcul du coût de production et les étapes d'objectivation de cet ingrédient seront à réaliser par la suite afin de finaliser le développement de cet ingrédient en vue de sa commercialisation prochaine.

**Ce deuxième exemple a permis de valider la méthodologie de développement mise en place avec l'étude du chêne pubescent. Elle a également permis d'illustrer la nécessité d'ajuster chacune des étapes en fonction de la matière première végétale utilisée.**

**L'étude de formulabilité de l'extrait éthanolique de feuilles de prunier est à compléter par une étude de décoloration, ainsi que par la mise sur support de l'extrait par atomisation. Lorsque ces étapes seront finalisées, un extrait à l'échelle pilote doit être réalisé afin d'évaluer la transposition d'échelle. Une étude de stabilité est également nécessaire pour cet ingrédient.**

**L'ingrédient obtenu avec le propylène glycol est en cours de transposition à l'échelle industrielle en vue d'une commercialisation fin 2019. Une étape de décoloration sera également à prévoir.**

**Le développement d'autres ingrédients à partir de glycérine, de miglyol ou encore d'alternatives biosourcés est envisagé pour la suite.**

Cette étude a conduit à la publication d'un article :

H. Plainfossé *et al.*, Design methodology for the development of a new cosmetic active based on *Prunus domestica* L. leaves extract, *Cosmetics*, 6(1), **2019**.



---

## Chapitre 5

### Matériels et méthodes

---

## 5.1. Matériel végétal, extraction et traitement des extraits

### 5.1.1. Collecte et identification du matériel végétal

La germandrée lisse a été récoltée en août 2016 à Valdebore-La Colmiane (06) par l'association Biophyto et a été identifiée par le botaniste Jean-Louis Polidori. Elle a été séchée à l'air libre puis conservée au laboratoire à température ambiante et à l'abris de la lumière. Un échantillon de cette matière végétale a été déposé dans l'herbier du Muséum National d'Histoire Naturelle de Nice sous la référence NICE-D-4445.

Les feuilles de prunier, fournies par l'association « La Prune de Brignoles », ont été récoltées en septembre 2015, 2016 et 2017, à Brignoles (83). Elles ont été séchées sur place à l'air libre, avant d'être transportées à Nice et conservées au laboratoire à température ambiante et à l'abris de la lumière.

Un échantillon de la matière première récoltée en 2017 a été déposé dans l'herbier du Muséum National d'Histoire Naturelle de Nice sous la référence NICE-D-4432.

Les parties aériennes du chêne pubescent (feuilles et ramures) ont été récoltées sur deux sites : à Vinon-sur-Verdon (83) en décembre 2016, et dans le parc Valrose à Nice (06) en juin et décembre 2017, puis en décembre 2018.

Un échantillon de la matière première récoltée à Nice en juin 2017, a été déposé dans l'herbier du Muséum National d'Histoire Naturelle de Nice sous la référence NICE-D-4382.

Les informations relatives à la provenance des autres matières premières criblées lors de cette étude sont présentées dans le Tableau 90.

Les parties aériennes (fleurs, feuilles) ont été broyées jusqu'à obtenir une poudre fine. Les branches et parties aériennes contenant des ramures ont quant à elles été broyées finement (particules de taille comprise entre 5 mm et 8 mm).

### 5.1.2. Extraction

Les produits chimiques et solvants ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich, VWR Prolabo et Dutscher. Pour les principaux solvant utilisés lors des extractions, leur pureté est précisée dans le Tableau 89.

**Tableau 89** : Pureté des solvants utilisés lors des extractions

Solvant	Pureté
Eau	Eau milli-Q, purifiée par un système Elix® (Merck Millipore)
Ethanol	Grade HPLC, 99,8 %
Propylène glycol	99,5 %

### **5.1.2.1. Extraction à l'aide d'un mélange hydroalcoolique**

Les extraits hydroalcooliques ont été obtenus par macération de la matière végétale broyée dans un mélange H<sub>2</sub>O/EtOH 50/50 (m/m) sous agitation magnétique (500 rpm) à température ambiante pendant 2 h. Après filtration sur papier filtre de porosité 8-12 µm, les extraits ont été obtenus par évaporation du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le code ES-M est associé aux extraits ainsi obtenus (Tableau 90).

### **5.1.2.2. Extraction accélérée par solvant**

Certains extraits ont été obtenus par extraction accélérée par solvant (ASE) à l'aide d'un système Dionex ASE 350 (Thermo Scientific) : 5,0 g de matière végétale broyée ont été mélangés avec 3,0 g de terre de diatomée et placés dans une cellule de 66 mL en acier inoxydable. Après 5 minutes de chauffage de la cellule d'extraction à 70 °C, trois extractions statiques successives de 5 minutes ont été réalisées à 70 °C avec de l'éthanol sous une pression de 100 bars. Entre chaque extraction, du solvant a été pompé à travers le système, avant d'être purgé à l'aide d'azote comprimé.

L'extrait résultant a été collecté dans un flacon équipé d'un septum. Le rendement d'extraction a été calculé après évaporation du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le code ES-ASE est associé aux extraits obtenus ainsi (Tableau 90).

Les extractions réalisées à l'aide d'un mélange hydroalcoolique et par ASE ont permis d'obtenir des extraits « secs » se présentant sous forme de pâtes plus ou moins visqueuses, selon leur composition.

### **5.1.2.3. Extraction au propylène glycol**

D'autres extractions ont été réalisées par macération de la matière végétale dans du propylène glycol pendant 7 h sous agitation magnétique (500 rpm) à température ambiante. Les extraits ont ensuite été obtenus par filtration des résidus végétaux sur papier filtre de porosité 8-12 µm. Le propylène glycol n'étant pas volatil, ces extraits se présentent sous forme liquide ; ils sont caractérisés d'extraits « liquides ». Le rendement obtenu pour ce type d'extraction n'est pas significatif avec ce protocole : en effet, en raison de sa forte viscosité, une partie du propylène glycol est retenue sur la matière végétale. Une étape de pressage est alors nécessaire afin de récupérer ce propylène glycol retenu, et ainsi obtenir le rendement d'extraction plus proche de la réalité. Cette étape n'a pas été réalisée lors des études effectuées à l'échelle laboratoire. Le code EL est associé aux extraits ainsi obtenus (Tableau 90).

**Tableau 90** : Provenance des matières végétales et techniques d'extraction utilisées pour obtenir les extraits étudiés

Nom botanique	Provenance	Technique d'extraction
<i>Angelica sylvestris</i> L.	P1	ES-SX
<i>Anthyllis vulneraria</i> L.	P1	ES-SX
<i>Aphyllanthes monspeliensis</i> L.	P3	EL
		ES-M
<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (L.) Spreng.	P4	ES-M
		EL
<i>Artemisia absinthium</i> L.	P1	ES-SX
<i>Artemisia vulgaris</i> L.	P1	ES-SX
<i>Calendula arvensis</i> M.Bieb.	P1	ES-SX
<i>Centranthus ruber</i> L.	P8	ES-M
		EL
<i>Cistus albidus</i> L.	P1	ES-SX
	P3	ES-M
<i>Cistus creticus</i> L. subsp. <i>corsicus</i>	P1	ES-M
<i>Cistus monspeliensis</i> L.	P1	ES-SX
<i>Clematis vitalba</i> L.	P1	ES-SX
<i>Coffea</i> spp. (pelure)	P5	ES-M
		EL
<i>Coffea</i> spp. (poudre)	P5	ES-M
		EL
<i>Coronilla emerus</i> L.	P1	ES-M
<i>Echium vulgare</i> L.	P1	ES-ASE
<i>Eupatorium cannabinum</i> L.	P1	ES-SX
<i>Ficus carica</i> L.	P1	ES-ASE
<i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim	P1	ES-SX
<i>Galium verum</i> L.	P1	ES-SX
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	P1	ES-SX
<i>Hypericum perforatum</i> L.	P1	ES-M
<i>Iris lutescens</i> Lam.	P1	ES-SX
<i>Juniperus communis</i> L.	P1	ES-ASE
		ES-SX
<i>Laurus nobilis</i> L.	P1	ES-M
<i>Liriodendron tulipifera</i> L.	P3	ES-M
		EL
<i>Malus domestica</i> 'Golden delicious'	P10	ES-M
<i>Melilotus officinalis</i> (L.) Lam	P1	ES-SX
<i>Myrrhis odorata</i> (L.) Scop.	P1	ES-SX
<i>Myrtus communis</i> L.	P1	ES-M
<i>Olea europaea</i> L.	P1	ES-M
<i>Ornithogalum umbellatum</i> L.	P1	ES-SX
<i>Ostrya carpinifolia</i> Scop. (feuilles)	P6	ES-M
<i>Ostrya carpinifolia</i> Scop. (tiges)		ES-M
<i>Ostrya carpinifolia</i> Scop. (fruits)		ES-M (EtOAc)
<i>Ostrya carpinifolia</i> Scop. (fruits)		ES-M
<i>Persicaria tinctoria</i> (Aiton) Spach	P1	ES-ASE
<i>Peucedanum ostruthium</i> (L.) W.D.J.Koch	P1	ES-SX
<i>Pinus halepensis</i> Mill.	P1	ES-SX
<i>Pinus sylvestris</i> L.	P1	ES-ASE
<i>Pistacia lentiscus</i> L.	P8	EL
		ES-M

<i>Pistacia terebinthus</i> L.	P1	ES-M
<i>Primula veris</i> L.	P1	EL
<i>Prunus domestica</i> L. (feuilles)	P1	ES-ASE
	P2	ES-M (EtOH) EL
<i>Prunus domestica</i> L. (peaux)	P2	ES-ASE
		EL
<i>Quercus ilex</i> L.	P1	ES-ASE
<i>Quercus pubescens</i> Willd.	P3	ES-M
		EL
<i>Quercus robur</i> L.	P1	ES-M
<i>Reseda luteola</i> L.	P1	ES-SX
<i>Rhamnus alaternus</i> L.	P1	ES-M
	P8	ES-M EL
<i>Ribes nigrum</i> L.	P6	ES-M
		EL
<i>Rosa canina</i> L.	P1	ES-M
<i>Rosa x centifolia</i> L.	P9	EL
		ES-M
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	P1	ES-SX
<i>Rubia tinctorum</i> L.	P1	ES-ASE
<i>Ruta chalepensis</i> L.	P1	ES-ASE
<i>Ruta graveolens</i> L.	P1	ES-M
<i>Salvia sclarea</i> L.	P1	ES-M
<i>Salvia verbenaca</i> L.	P1	ES-M
<i>Sanguisorba minor</i> Scop.	P8	ES-M
		EL
	P1	ES-M
<i>Santolina chamaecyparissus</i> L.	P1	ES-M
<i>Silene italica</i> (L.) Pers.	P1	ES-SX
<i>Silene latifolia</i> subsp <i>alba</i> (Mill.) Greuter & Brudet	P1	ES-SX
<i>Teucrium chamaedrys</i> L.	P4	ES-M
		EL
<i>Teucrium lucidum</i> L.	P1	ES-SX
	P8	ES-M
<i>Thymus vulgaris</i> L.	P1	ES-SX
<i>Tuber melanosporum</i> Vittad.	P10	EL
		ES-M
<i>Urospermum dalechampii</i> (L.) Scop. ex F.W.Schmidt	P3	ES-M
		EL
<i>Vitis vinifera</i> L.	P1	ES-ASE

n.d. : non déterminé.

**Provenance** : P1 : extraits provenant de l'extractothèque - P2 : approvisionnement via l'association « La Prune de Brignoles » - P3 : approvisionnement via l'association « Fleurs d'Exception du Pays de Grasse » - P4 : approvisionnement via l'association Biophyto - P5 : approvisionnement via la société GMR (Green Molecular Response) - P6 : récolte réalisée dans le Parc Valrose (Nice) - P7 : récolte réalisée dans différents lieux de la région Sud - P8 : achat de la matière végétale auprès de l'herboristerie Cailleau - P9 : approvisionnement par la société Malongo - P10 : autres sources sporadiques d'approvisionnement (achats, fournisseurs, etc.).

**Types d'extrait et méthodes d'extraction** : EL : extrait liquide - ES : extrait sec - M : macération – SX : soxhlet – ASE : extraction accélérée par solvant.

#### 5.1.2.4. Extraction activée par ultra-sons

L'activation de l'extraction par les ultra-sons a été réalisée à l'aide d'un système PEX 3 Sonifier (R.E.U.S.) composé d'une cuve en inox d'une capacité maximale de 3 L. La fréquence des ultra-sons est fixée à 25 kHz. La température de la cuve est contrôlée au moyen d'un double manteau, maintenu à température fixée à l'aide d'un système de refroidissement (à - 5°C). Les extractions ont été réalisées en triplicat, à partir de 3,0 g de matière végétale, sans agitation. Les béchers contenant le mélange matière végétale + solvant d'extraction ont été placés dans l'extracteur préalablement rempli d'eau. Les extraits liquides ont été obtenus par filtration sur papier filtre de porosité 8-12 µm, et les extraits secs par filtration sur papier filtre de porosité 8-12 µm suivie de l'évaporation du solvant.

#### 5.1.3. Décoloration des extraits

La décoloration des extraits a été réalisée par adsorption sur charbon actif. Le charbon actif (CA) (Merck) a été ajouté à l'extrait sec préalablement dilué dans du méthanol à une concentration de 10 mg/mL.

Pour ce qui est des extraits liquides, le charbon actif a été ajouté directement à l'extrait. La teneur en charbon actif est déterminée selon l'équation (3) :

$$(3) \text{ Teneur en CA} = \frac{\text{Masse de charbon actif}}{\text{Masse de matière végétale}} \times 100$$

Après macération à température ambiante (ou à 70 °C si précisé) sous agitation à 500 rpm pendant une durée déterminée, le charbon actif a été retiré par filtration sur papier filtre 8-12 µm. Le rendement de décoloration de l'extrait sec a été obtenu en concentrant l'extrait filtré par évaporation du solvant au moyen d'un évaporateur rotatif. Le rendement de décoloration de l'extrait liquide n'est pas significatif puisque des pertes sont observées lors de la filtration en raison de la viscosité du propylène glycol.

Les décolorations de l'extrait éthanolique de prunier PD\_D ont été réalisées à partir de 1,0 g d'extrait dilué dans 100 mL d'éthanol. Les conditions opératoires testées lors de cette étude sont présentées dans le Tableau 91. Chacune de ces conditions a été réalisée en triplicat.

**Tableau 91** : Conditions expérimentales utilisées pour la décoloration de l'extrait PD\_D au charbon actif

Conditions	PD_D1	PD_D3	PD_D5	PD_D10	PD_D10_4h	PD_D10_70°C
Teneur en CA	1 %	3 %	5 %	10 %	10 %	10 %
Temps de contact	15 min	15 min	15 min	15 min	4 h	15 min
Température	TA	TA	TA	TA	TA	70 °C

Pour les extraits liquides QP\_PG et PD\_PG, les décolorations ont été réalisées à partir 10,0 g d'extrait. Les conditions opératoires sont présentées dans le Tableau 92, tous les essais de décoloration ont été réalisés en triplicat.

**Tableau 92** : Conditions de décoloration testées pour les extraits liquides PD\_PG et QP\_PG

Conditions	PG_D1	PG_D2	PG_D3	PG_D4
Temps de contact	10 min	10 min	2 h	2 h
Teneur en CA	0,1 %	1,0 %	0,1 %	1,0 %

#### 5.1.4. Atomisation des extraits secs

La mise sur support solide de l'extrait sec a été réalisée par atomisation à l'aide d'un système Büchi B-290.

L'extrait sec et la maltodextrine ont été dissouts selon un ratio massique extrait/maltodextrine 2/1, dans un mélange hydroalcoolique (80/20 v/v) afin d'obtenir une concentration totale en solide de 0,15 mg/mL. L'azote a été choisi comme gaz de pulvérisation avec un débit 473 L/h. L'aspiration du mélange à atomiser a été fixée à 100 % et le débit de la pompe à 20 % de sa puissance maximale. La température d'entrée était la principale variable : les températures 160°C, 180 °C et 200 °C ont été testées. Lorsque la température du système était stable, le mélange (eau + éthanol + maltodextrine + extrait sec) a été atomisé. La poudre récupérée en sortie de système dans le flacon collecteur a été pesée afin de déterminer le rendement d'atomisation selon l'équation (4) :

$$(4) \text{ Rendement d'atomisation} = \frac{\text{Masse de poudre atomisée}}{\text{Masse de solide (extrait + maltodextrine)}} \times 100$$

Les conditions opératoires utilisées lors des essais d'atomisation de l'extrait hydroalcoolique de chêne QP\_ha\_80/20 sont présentées dans le Tableau 93.

**Tableau 93** : Conditions opératoires testées pour l'atomisation de l'extrait QP\_ha\_80/20

Masse extrait	Masse maltodextrine	Volume eau	Volume éthanol	Température d'entrée
18,1 g	36,1 g	284 mL	72 mL	160 °C
20,0 g	40,0 g	320 mL	80 mL	180 °C
20,0 g	40,0 g	320 mL	80 mL	200 °C

## 5.2. Méthodes de chromatographie

Les solvants utilisés pour les analyses HPLC, HPTLC et GC, achetés auprès de Sigma-Aldrich, étaient de qualité analytique ; ils ont été utilisés sans purification supplémentaire.

### 5.2.1. Chromatographie liquide haute performance

#### 5.2.1.1. Conditions d'analyses

Les extraits et fractions ont été analysés à l'aide d'une HPLC Agilent 1200 équipée d'un détecteur à barrettes de diodes G1315D (DAD) et d'un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL). Ce système est composé d'une pompe quaternaire G1311A, d'un passeur

automatique d'échantillons G1329A, d'un four thermostaté G1316A et d'un dégazeur G1322A. Le système est contrôlé par le logiciel ChemStation. Le détecteur DEDL est paramétré ainsi : température de 40 °C, pression du gaz nébuliseur (azote) de 3,7 bars et gain de 4.

Deux types de séparation ont été utilisés durant cette étude.

La première séparation a été réalisée avec une colonne Phenomenex C18 Luna® 250 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å équipée d'une pré-colonne. Les échantillons ont été préparés à 10 mg/mL dans du méthanol et filtrés sur filtre PTFE (polytétrafluoroéthylène) 0,45 µm avant analyse. La phase mobile était constituée d'eau (A), d'acétonitrile (B) et d'isopropanol (C), acidifiés avec 0,1 % d'acide formique. Le débit d'élution a été fixé à 1 mL/min et le gradient de solvants utilisé pour ces analyses (sauf précision) a été le suivant : 0 min : 5 % B ; 0 - 5 min, 5 % B ; 5 - 40 min, 5 - 55 % B ; 40 - 50 min, 55 - 100 % B ; 50 - 55 min, 100 % B ; 55 - 68 min, 0 - 100 % C ; 68 - 70 min, 100 % C, avec un post-time de 10 min. Ces conditions ont été définies comme « conditions standards d'analyse » pour cette étude.

La seconde séparation a été réalisée avec une colonne Phenomenex NH<sub>2</sub> Luna® 150 x 4,6 mm, 3 µm, 100 Å. Les échantillons ont été préparés à 10 mg/mL dans un mélange acétonitrile/eau (80/20 v/v) et filtrés sur filtre PTFE 0,45 µm avant analyse. La phase mobile se constituait d'eau (A) et d'acétonitrile (B), acidifiés avec 0,1 % d'acide formique. Le débit d'élution a été fixé à 1 mL/min et le gradient de solvants utilisé est le suivant : 0 min : 80 % B ; 0 - 20 min, 80 - 40 % B ; 20 - 25 min, 40 % B, avec un post-time de 5 min.

### 5.2.1.2. Dosage des composés identifiés par HPLC

Le dosage de certains actifs identifiés dans les extraits/fractions a été réalisé à l'aide de standards analytiques (Sigma-Aldrich). La méthode de séparation utilisée est celle décrite précédemment avec la colonne C18 Luna® (paragraphe 5.2.1.1.). Les courbes d'étalonnage ont été établies à partir de 6 solutions méthanoliques du standard analytique à doser dont les concentrations s'échelonnaient de 0,05 mg/mL à 5,00 mg/mL. Les analyses ont été réalisées en triplicat. Les équations des courbes obtenues par régression linéaire pour les différents standards utilisés sont présentées dans le Tableau 94. La concentration de l'actif dans l'échantillon a été obtenue à partir de la moyenne de l'aire du pic correspondant. La teneur en actif dans l'extrait ou la fraction a ensuite été déterminée selon l'équation (5) et exprimée en pourcent :

$$(5) \text{ Teneur en actif} = \frac{\text{Concentration de l'actif dans l'échantillon}}{\text{Concentration de l'échantillon}} \times 100$$

**Tableau 94** : Courbes d'étalonnage par HPLC des standards identifiés dans les extraits

Standard	Détection	Equation	Coefficient de corrélation
Acide chlorogénique	366 nm	Y = 0,0003 X	r <sup>2</sup> = 0,9991
Acide bétulinique	DEDL	Y = 0,00037 X	r <sup>2</sup> = 0,9892
Acide oléanolique	DEDL	Y = 0,0011 X	r <sup>2</sup> = 0,9993
Acide palmitique	DEDL	Y = 0,0012 X	r <sup>2</sup> = 0,9821

avec X = aire sous la courbe du composé identifié, Y = concentration du composé identifié dans l'échantillon

### 5.2.1.3. Séparation par HPLC semi-préparative

Les séparations réalisées par HPLC semi-préparative ont été effectuées à l'aide d'une colonne Phenomenex C18 Luna® 250 x 10 mm, 5 µm.

Les extraits QP2\_ha et TL\_ha, ainsi que les fractions TL\_ha\_F3, TL\_ha\_F4 et TL\_ha\_F6, ont été dissouts dans du méthanol à 50 mg/mL, filtrés sur filtre PTFE 0,45 µm, avant que 30 µL de solution soient injectés. La phase mobile se constituait d'eau (A) et d'acétonitrile (B) acidifiés avec 0,1 % d'acide formique, et le débit employé était de 3 mL/min. Les gradients utilisés pour la séparation des extraits et des fractions ont été les suivants :

- Gradient A - *Extrait TL\_ha* : 0 - 5 min, 5 % B ; 5 - 12 min, 100 % B ; 12 - 17 min, 100 % B.
- Gradient B - *Fraction TL\_ha\_F3* : 0 - 40 min, 35 - 50 % B ; 40 - 45 min, 50 - 100 % B ; 45 - 50 min, 100 % B.
- Gradient C - *Fraction TL\_ha\_F4* : 0 - 5 min, 15 - 20 % B ; 5 - 23 min, 20 - 30 % B ; 23 - 34 min, 30 - 42 % B ; 34 - 36 min, 42 % B, 36 - 42 min, 42 - 100 % B.
- Gradient D - *Fraction TL\_ha\_F6* : 0 - 40 min, 15 - 15,5 % B ; 40 - 58 min, 15,5 - 25 % B ; 58 - 70 min, 25 - 100 % B.
- Gradient E - *Extrait QP2\_ha* : 0 - 5 min, 5 % B ; 5 - 10 min, 100 % B ; 10 - 14 min, 100 % B.

### 5.2.2. Chromatographie sur couche mince de haute performance

Les analyses par HPTLC ont été réalisées à l'aide d'un système Camag équipé d'un passeur automatique d'échantillon (ATS 4), d'une chambre de développement automatisée ADC2 avec contrôle de l'humidité, d'un visualiseur et d'un scanner (Scanner 4), contrôlés par le logiciel WinCATS. La migration des composés a été réalisée par élution dans la chambre automatisée saturée par le solvant de migration durant 20 min sous contrôle d'humidité (l'humidité régnant dans la chambre variait entre 33 et 38 %). Les plaques utilisées sont des plaques en verre recouvertes d'un gel de silice 60 F<sub>254</sub> 0,20 mm, de dimensions 20 x 10 cm. La migration de la phase mobile a été réalisée jusqu'à 70 mm depuis le bord inférieur (front de solvant), sauf pour la révélation avec la DAPA pour laquelle elle a été réalisée jusqu'à 60 mm afin de reproduire les conditions expérimentales utilisées dans l'étude de Ruppel *et al.* [134]. Une inspection visuelle des plaques a systématiquement été réalisée à 254 nm, 366 nm et sous lumière blanche, avant et après dérivation, en mode réflexion avec des lampes D (deutérium) et W (tungstène).

Les extraits à séparer ont été dilués à 10 mg/mL et les standards analytiques à 1 mg/mL dans du méthanol. Ils ont été filtrés à l'aide de filtres PTFE 0,45 µm. Le nombre d'échantillons appliqués sur la plaque variait selon les analyses. Pour les révélations qualitatives, 18 ou 20 échantillons ont été appliqués (20 µL, largeur de bande : 8 mm, vitesse de dépôt : 50 nL/s, distance du bord inférieur : 8 mm, distance du bord gauche : 12 mm). La distance entre les échantillons est respectivement de 10,3 mm et 9,2 mm.

Pour les révélations quantitatives, 15 échantillons ont été appliqués sur chaque plaque (largeur de bande : 8 mm, vitesse de dépôt : 50 nL/s, distance entre les échantillons : 11,4 mm, distance des bords externes : 20 mm). Les volumes appliqués pour les standards étaient de 1,0, 2,0, 4,0, 7,0 et 9,0  $\mu\text{L}$  pour une calibration en 5 points ; ceux des extraits étaient de 0,5, 1,0 et 2,0  $\mu\text{L}$ .

La mesure de l'absorbance a été réalisée avec le scanner aux longueurs d'ondes comprises entre 300 et 500 nm, tous les 20 nm, et une dimension de fente fixée à 4,0 mm x 0,1 mm. La vitesse de balayage a été prédéfinie à 10 mm/s, avec une résolution de 100  $\mu\text{m}$ /étape.

Les différents protocoles utilisés pour mettre en évidence les familles de composés présents dans les extraits/fractions sont résumés dans le Tableau 95.

### 5.2.3. Chromatographie en phase gazeuse

#### 5.2.3.1. Analyses par GC-MS

Les analyses par GC-MS ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Agilent 6890 équipé d'un détecteur de masse Agilent MSD5973N et d'un passeur automatique d'échantillons (Combi-Pal, CTC Analytics). Toutes les analyses ont été réalisées sur colonne capillaire HP-1 (100 % diméthylpolysiloxane ; 0,2 mm x 50 m ; épaisseur du film : 0,33  $\mu\text{m}$ ). L'extrait brut de prunier PD\_EtOH a également été analysé à l'aide de la colonne DB-5HT (5%-phénylméthylpolysiloxane ; 0,25 mm x 30 m ; épaisseur du film : 0,10  $\mu\text{m}$ ). Un liner pacqué avec 10 % OV-1 sur Chromosorb W HP a été utilisé avant injection dans la colonne.

Les extraits et fractions ont été dilués à 0,1 g/mL dans le méthanol et filtrés à l'aide de filtres PTFE 0,45  $\mu\text{m}$ . Les échantillons ont été injectés (1  $\mu\text{L}$ ) sans fractionnement (mode *splitless*). La température de l'injecteur a été fixée à 250 °C et le débit de l'hélium utilisé comme gaz vecteur, était fixé à 1 mL/min. La température du four a été programmée selon le gradient suivant : augmentation de 60 °C à 180 °C à raison de 2 °C/min, puis de 180 °C à 300 °C à raison de 6 °C/min. La température a été maintenue à 300 °C pendant 5 minutes. L'acquisition a été réalisée en mode balayage (35 - 500 u.m.a. (unité de masse atomique)/s, selon une fréquence de balayage de 3,15 scans/s) et les spectres de masse ont été générés à 70 eV.

L'identification des composés repose sur la comparaison des données spectrales avec les données disponibles dans la littérature, les bibliothèques commerciales (NIST, Wiley) et les bibliothèques de données spectrales du laboratoire, construites à partir de substances pures [325, 326].

Cette caractérisation est confirmée par comparaison de l'indice de rétention du composé avec ceux disponibles dans les bases de données d'indices de rétention. Ils sont calculés par interpolation logarithmique à partir des temps de rétention d'une série d'alcane C8-C24 analysés dans les mêmes conditions et utilisés comme références [128].

**Tableau 95** : Conditions expérimentales utilisées lors des analyses par HPTLC

Révéléateur	Composition	Phase mobile	Protocole	Révélation	Standards	Composés révélés
Ninhydrine	0,6 g de ninhydrine 190 mL d'isopropanol 10 mL d'acide acétique	ACN/H <sub>2</sub> O (75/25 v/v)	Après dérivation, chauffage à 120 °C pendant 8 à 10 minutes.	Lumière blanche	L-sérine L-valine	Acides aminés
Orcinol – acide sulfurique	250 mg d'orcinol 95 mL d'éthanol 5 mL d'H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ACN/H <sub>2</sub> O (75/25 v/v)	Après dérivation, chauffage à 100 °C pendant 5 à 15 minutes.	Lumière blanche	Fructose Glucose Saccharose	Glucides
Diphénylamine - aniline - acide phosphorique (DAPA)	4 g de diphénylamine 160 mL d'acétone 4 mL d'aniline 30 mL d'acide o- phosphorique	<i>n</i> -butanol/propan-1-ol/ acide borique/acide formique (10/26/5/0,2 v/v/v/v)	Après dérivation, chauffage à 110 °C pendant 10 minutes.	Lumière blanche	Fructose Glucose Saccharose	Glucides
Réactif de Neu	1 g de 2-aminoéthyl diphénylborinate 200 mL d'acétate d'éthyle	Acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau (100/11/11/26 v/v/v/v)	Après dérivation, la plaque est chauffée à 105 °C pendant 3 minutes.	366 nm	Acide gallique Kaempférol Hypéroside	Polyphénols, flavonoïdes
PEG 400	5 g de PEG 400 100 mL d'éthanol		/			
<i>p</i> -Anisaldéhyde - acide sulfurique	170 mL de méthanol glacé 20 mL d'acide acétique 10 mL d'acide sulfurique 1 mL d'anisaldéhyde	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O (90/20/1,5 v/v/v)	Après dérivation, chauffage à 100 °C pendant 5 à 10 minutes.	Lumière blanche et 366 nm	Acide oléanolique Acide bétulinique	Composés peu polaires (monoterpènes, triterpènes, stéroïdes)
Sel Fast blue B	0,5 g de sel Fast blue B 100 mL d'eau	Toluène/acétone/ acide formique (45/45/10 v/v/v)	/	254 nm et à la lumière blanche	Procyanidine A2	Proanthocyanidines, alcaloïdes

### 5.2.3.2. Analyses par GC/FID

Les analyses par GC/FID ont été réalisées sur colonne capillaire HP-1, selon le gradient de températures présenté précédemment. Les standards analytiques (Sigma-Aldrich), préparés en solution dans un mélange MeOH/DCM (2/1 v/v), ont été injectés en triplicat, à différentes concentrations (Tableau 96). Les droites d'étalonnage obtenues pour les deux standards sont présentées dans le Tableau 96.

Les extraits et fractions de germandrée ont été dilués à 0,1 g/mL dans le méthanol et filtrés à l'aide de filtres PTFE 0,45 µm. Les échantillons ont été injectés en triplicat sans fractionnement (mode *splitless*) (volume d'injection de 1 µL).

**Tableau 96** : Conditions expérimentales et droites d'étalonnages des standards identifiés dans l'extrait et les fractions de germandrée

Standard	Gamme étalon	Equation	Coefficient de corrélation
Acide palmitique	1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 et 20 mg/mL	$Y = 72\ 441\ 356,94 X$	$r^2 = 0,94$
Gaïacol	0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 1, 2 et 4 mg/mL	$Y = 264\ 549\ 276,20 X$	$r^2 = 0,97$

avec X = aire sous la courbe du composé identifié, Y = concentration du composé identifié dans l'échantillon

## 5.3. Techniques de séparation et/ou d'isolement

### 5.3.1. Séparation sur colonne ouverte de silice

Les fractionnements ont été effectués par chromatographie liquide sur une colonne ouverte de silice en phase normale (Geduran Si 60, 40 – 63 µm, Merck). Les solvants utilisés lors de cette séparation ont préalablement été distillés.

Les extraits ont préalablement été déposés sur de la silice et le solvant a été éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif, selon un ratio massique extrait/silice 1/3 (dépôt solide). L'extrait ainsi sous forme solide a été déposé en tête de colonne et différents systèmes de solvants ont été utilisés afin d'éluer les composés présents. Une pompe à vide (Bioblock Scientific) a permis d'accélérer l'élution des solvants visqueux en insufflant de l'air en tête de colonne.

Les conditions opératoires de fractionnement des extraits sont présentées dans le Tableau 97. Les solvants/mélanges de solvants des fractions obtenues ont ensuite été évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif et les rendements ont été calculés selon l'équation (6) :

$$(6) \text{ Rendement de fractionnement} = \frac{\text{Masse de la fraction}}{\text{Masse d'extrait à fractionner}} \times 100$$

**Tableau 97** : Conditions expérimentales pour le fractionnement des extraits bruts

Extrait	TL_ha	QP1_ha	PD_EtOH
Masse extrait	12,51 g	3,55 g	7,93 g
Masse silice	250 g	71 g	159 g
Volume de chaque solvant utilisé pour l'élution	400 mL	250 mL	300 mL

### 5.3.2. Extraction liquide-liquide

Des extractions liquide-liquide ont été réalisées sur l'extrait TL\_ha avec deux systèmes de solvants non miscibles : eau/acétate d'éthyle et eau/butanone. Trois extractions successives ont été réalisées pour chaque système de solvant en augmentant à chaque extraction le ratio volumique eau/solvant organique selon le schéma suivant : 1/2, 1/3 et 1/4. L'extrait TL\_ha a préalablement été dilué dans l'eau puis le solvant organique a été ajouté. Après agitation de ce mélange dans une ampoule à décantier, les deux phases ont été collectées séparément après décantation. La phase organique a ensuite été lavée à deux reprises avec de l'eau afin de récupérer les éventuels composés restants. Les phases aqueuses ont été rassemblées. Les solvants ont ensuite été évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif. Les conditions expérimentales utilisées pour l'extraction liquide-liquide de l'extrait TL\_ha sont présentées dans le Tableau 98.

**Tableau 98** : Conditions expérimentales utilisées pour les extractions liquide-liquide

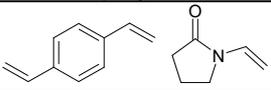
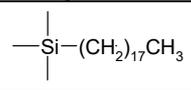
Paramètres	TL_ha_ ELL1_ orga	TL_ha_ ELL1_ aq	TL_ha_ ELL2_ orga	TL_ha_ ELL2_ aq
Solvant organique	Acétate d'éthyle		Butanone	
Masse d'extrait TL_ha	114 mg		104 mg	
Volume solvant	125,0 mL	45,0 mL	20,0 mL	7,5 mL

### 5.3.3. Extraction sur phase solide

#### 5.3.3.1. Séparation de l'extrait TL\_ha

La séparation de l'extrait TL\_ha a été réalisée à l'aide de deux phases stationnaires dont les caractéristiques sont présentées dans le Tableau 99. L'extrait a préalablement été dilué dans de l'eau à une concentration de 5 mg/mL. La cartouche a été fixée sur un collecteur Supelco Visiprem™ et le vide au sein de l'enceinte a été obtenu à l'aide d'une pompe à vide (Bioblock Scientific) maintenant la pression à 40 kPa. Après conditionnement de la phase stationnaire avec 10 mL de méthanol puis 10 mL d'eau, le mélange à séparer a été chargé. Les composés retenus par la phase stationnaire ont ensuite été élués avec respectivement 10 mL de 4 solvants/mélanges de solvants : MeOH/H<sub>2</sub>O (1/1 v/v), MeOH, MeOH/DCM (1/1 v/v) et DCM. Ces solvants ont ensuite été évaporés au moyen d'un évaporateur rotatif ; le rendement de chaque fraction a été calculé selon l'équation (6) (partie 5.3.2).

**Tableau 99** : Caractéristiques des phases stationnaires utilisées

Cartouche	OASIS HLB 6cc (Waters)	Discovery C18 (Supelco)
Phase stationnaire	Co-polymère 	Silice greffée C18 
Masse de sorbant	500 mg	1 g
Capacité de charge	10 à 15 %	1 à 5 %
Taille des particules	60 µm	50 µm
Taille des pores	80 Å	70 Å
Volume de la phase	6 mL	12 mL
Masse d'extrait chargé	50 mg	100 mg

### 5.3.3.2. Concentration des extraits liquides

Les différentes phases stationnaires testées afin de concentrer les extraits liquides sont présentées dans le Tableau 100. Ces dernières présentant des volumes/capacités de rétention différents, le ratio volumique extrait/masse de sorbant a été fixé à 5 afin de charger une quantité équivalente d'extrait pour chaque essai. L'échantillon a préalablement été dilué dans de l'eau selon un ratio volumique extrait/eau 1/3 afin de diminuer sa viscosité.

Avant de charger l'échantillon, les colonnes ont été préalablement conditionnées et équilibrées avec des volumes d'eau et de méthanol définis. Après avoir chargé l'échantillon, 5 mélanges de solvants ont été utilisés afin d'éluer les différents composés : H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O/MeOH (90/10 v/v), MeOH, MeOH/DCM (50/50 v/v) et DCM. Un volume de 10 mL de chaque solvant/mélange de solvants a été utilisé pour les phases stationnaires de 6 mL ; ce volume a été ajusté de manière proportionnelle selon le volume de la phase stationnaire. Un protocole similaire a été utilisé pour réaliser les études de répétabilité avec des cartouches composées de phases stationnaires de particules de diamètres différents, ainsi que pour l'étude de l'influence du solvant de conditionnement et d'élution (méthanol vs. acétonitrile). Les paramètres opératoires les plus intéressants ont été sélectionnés en comparant les rendements partiels et les profils HPLC des différentes fractions obtenues.

Le volume de fin de fixation de la phase stationnaire de la cartouche HLB 6 cc sélectionnée pour concentrer les extraits liquides a été déterminé en chargeant millilitre par millilitre l'extrait dilué selon un ratio volumique extrait/eau 1/3. Chaque millilitre élué a été analysé par HPLC-DAD/DEDL. Lorsque des composés autres que les composés polaires du groupe A ont été observés sur le chromatogramme, la phase stationnaire était considérée comme saturée. Le volume de fin de fixation correspond à la somme des volumes chargés avant d'observer ces composés.

Différents volumes de solvants ont ensuite été élués à travers la phase stationnaire afin de récupérer les composés retenus. Une élution millilitre par millilitre a été réalisée avec du méthanol, et chaque fraction obtenue a été analysée par HPLC-DAD/DEDL. Lorsque les fractions ne semblaient plus contenir de composés, la même démarche a été réalisée avec un mélange MeOH/DCM (50/50 v/v) puis avec du DCM pur afin de s'assurer d'avoir élué l'ensemble des composés retenus.

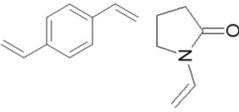
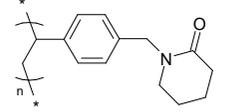
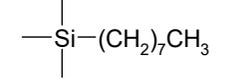
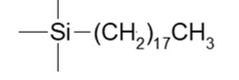
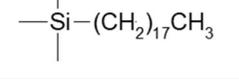
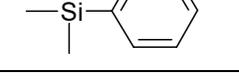
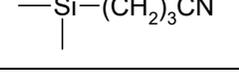
## 5.4. Techniques de caractérisation

### 5.4.1. Spectrométrie de masse

#### 5.4.1.1. Analyses par HPLC-HRMS

Les analyses par LC-HRMS ont été réalisées à l'Université de Nantes sur système de chromatographie liquide ultra rapide (UFLC) Shimadzu couplé à un spectromètre de masse haute résolution avec un système d'ionisation par électrospray combiné à des analyseurs à trappe ionique et à temps de vols (UFLC-HRESIMS IT-TOFMS).

**Tableau 100** : Caractéristiques des phases stationnaires contenues dans les cartouches SPE testées pour l'étude de concentration de l'échantillon QP\_PG

Cartouche	Phase stationnaire	Sélectivité	Masse de sorbant	Capacité de charge	Taille des particules	Surface spécifique	Taille des pores	Volume de phase
Type de phase : Co-polymère								
HLB 6 cc OASIS (Waters)		Universelle (composés acides, basiques et neutres)	200 mg	10 à 15 % selon la masse de sorbant	30 µm	800 m <sup>2</sup> /g	80 Å	6 mL
			500 mg		60 µm	800 m <sup>2</sup> /g	80 Å	6 mL
HLB 20 cc OASIS (Waters)			1 g		60 µm	800 m <sup>2</sup> /g	80 Å	20 mL
Strata-XL (Phenomenex)		Composés neutres et aromatiques présents dans les échantillons visqueux	500 mg	10 à 15 % selon la masse de sorbant	100 µm	520 m <sup>2</sup> /g	n.d.	6 mL
Strata X (Phenomenex)		Composés neutres et aromatiques, acides et basiques	200 mg		33 µm	800 m <sup>2</sup> /g	n.d.	3 mL
			2 g		33 µm	800 m <sup>2</sup> /g	n.d.	20 mL
Type de phase : Discovery® – Phase silice								
DSC-8 (Supelco)		Elution des composés hydrophobes (même les plus retenus par DSC-18 et DSC-18Lt)	500 mg	9 % C chargé	50 µm	480 m <sup>2</sup> /g	70 Å	3 mL
DSC-18 (Supelco)		Phase la moins sélective : retient les composés organiques des matrices aqueuses	500 mg	18 % C chargé	50 µm	480 m <sup>2</sup> /g	70 Å	12 mL
DSC-18Lt (Supelco)		Utilisée pour éluer les composés hydrophobes trop retenus sur les phases stationnaires DSC-18	500 mg	11 % C chargé	50 µm	480 m <sup>2</sup> /g	70 Å	3 mL
DSC-Ph (Supelco)		Retient les composés apolaires et aromatiques	500 mg	7 % C chargé	50 µm	480 m <sup>2</sup> /g	70 Å	3 mL
DSC-CN (Supelco)		Elution des composés très hydrophobes qui seraient irréversiblement retenus sur une phase stationnaire DSC-18	500 mg	7 % C chargé	50 µm	480 m <sup>2</sup> /g	70 Å	3 mL

2 µL de chaque fraction de l'extrait de germandrée préparées à 10 mg/mL dans le méthanol (grade UPLC) ont été analysées. La séparation a été réalisée à l'aide d'une colonne C18 Kinetex™ (100 x 2,1 mm ; 2,6 µm) maintenue à 40 °C. La phase mobile était constituée d'un mélange d'eau (A) et d'acétonitrile (B), acidifiés avec 0,1 % d'acide formique. Le débit a été fixé à 0,3 mL/min. Les différents gradients utilisés en fonction des fractions analysées ont été les suivants :

- Gradient HRMS - *Fraction TL\_ha\_F3* : 0 min : 5 % B ; 0 - 2 min, 5 - 45 % B ; 2 - 11,63 min, 5 - 45 % B ; 11,63 - 14,6 min, 45 - 100 % B ; 14,6 - 15,89 min, 100 % B ; 15,89 - 15,9 min, 100 - 5 % B ; 15,9 - 22 min, 5 % B.
- Gradient MS3B - *Sous-fraction TL\_ha\_F3B* : 0 - 8,34 min, 30 - 50 % B ; 8,34 - 12,5 min, 50 - 100 % B ; 12,5 - 13,89 min, 100 % B ; 13,9 - 20 min, 100 - 30 % B.

La détection, réalisée selon les modes d'ionisation positif et négatif, a été effectuée pour la gamme de  $m/z$  comprises entre 100 et 1000, avec une précision de 5 ppm et une résolution de 10 000 à  $m/z$  500 [236]. Des acquisitions MS<sup>2</sup> ont été obtenues en mode d'ionisation positif. Les données ont été traitées à l'aide de la plateforme ThalassOMICS Metabolomics facility, Plateforme Corsaire, Nantes (44).

#### 5.4.1.2. Analyses par HPLC-ESI-MS

Les analyses par HPLC-ESI-MS ont été réalisées à l'aide d'un système HPLC Agilent 1100 équipé d'un détecteur DAD et couplé à un spectromètre de masse Thermo Finnigan LCQ Advantage équipé d'une source d'ionisation ESI. Les fractions/sous-fractions ont été diluées à 10 mg/mL dans du méthanol et filtrées sur filtres PTFE 0,45 µm ; 5 µL de fractions/sous-fractions ont été analysés.

La séparation a été obtenue au moyen d'une colonne analytique C18 Luna® (Phenomenex, 250 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å). La phase mobile était constituée d'eau (A) et d'acétonitrile (B) acidifiés avec 0,1 % d'acide formique ; le gradient suivant a été utilisé (débit de 0,3 mL/min) : 0 - 15 min, 10 - 100 % B ; 15 - 17 min, 100 - 10 % B ; 17 - 20 min, 10 % B. Les conditions d'ionisation par électrospray en modes positif et négatif ont été les suivantes : température du capillaire 275 °C, tension du capillaire ± 4,5 kV et tension de cône ± 10 V. L'azote a été utilisé comme gaz de nébulisation, avec un débit de gaz de cône de 50 L/h et un débit de désolvatation de 10 L/h. Les scans ont été réalisés sur une gamme de  $m/z$  allant de 50 à 1000. Les expériences de MS/MS ont été réalisées avec une énergie de collision de ± 35 eV afin de fragmenter l'ion le plus intense.

#### 5.4.2. Résonance magnétique nucléaire

Les spectres de RMN ont été enregistrés soit sur la plateforme du spectropôle de l'Université Aix-Marseille avec un système Bruker Avance II + 600® équipé d'une cryosonde TCL (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N), soit sur des appareils Bruker Avance 400® et 500® de l'Institut de Chimie de Nice. Les spectres ont été traités avec le logiciel Topspin™. Les échantillons ont été solubilisés selon leur polarité dans du chloroforme CDCl<sub>3</sub>, de l'eau D<sub>2</sub>O ou du DMSO-d<sub>6</sub> (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO. L'acide

triméthylsilylpropanoïque (TMSP) sous forme de sel de sodium dans l'eau deutérée est utilisé comme étalon interne.

Des séquences à une et deux dimension(s) ont été utilisées lors de cette étude, en fonction des composés isolés :

- RMN-<sup>1</sup>H : elle apporte des informations sur l'environnement chimique du proton par l'analyse de la multiplicité d'un pic obtenu sur le spectre.
- RMN-<sup>13</sup>C : le déplacement chimique d'un singulet (caractérisant la présence d'un carbone) donne des informations sur la nature des groupements substituant ce carbone. En fonction du mode de spin, il est possible de distinguer les carbones quaternaires des groupements CH<sub>2</sub>, ainsi que des groupements CH et CH<sub>3</sub>.
- COSY (*CORrelation SPECTROSCOPY*) : séquence homonucléaire <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H qui présente des taches de corrélation entre deux protons vicinaux.
- HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) : séquence hétéronucléaire <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C mettant en évidence des taches de corrélation entre un proton et le carbone qui le porte.
- HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*) : séquence hétéronucléaire <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C qui présente des taches de corrélation entre des noyaux séparés par deux ou trois liaisons. Ces données permettent de déterminer l'enchaînement des carbones et la présence de carbones quaternaires.
- NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) : séquence homonucléaire <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H qui apporte des informations sur l'arrangement dans l'espace des protons dont la proximité spatiale est comprise entre 2 et 5 Å.

### 5.4.3. Colorimétrie

Les mesures de colorimétrie des extraits ont été réalisées à l'aide d'un spectrocolorimètre Color I 5 (Xrite), par mesure de la transmission totale de l'échantillon contenu dans une cuve en verre, afin d'en déterminer les coordonnées CIE L\*a\*b\*. La calibration de l'appareil a été réalisée par la mesure de la transmission d'une plaque en plastique noir. Les extraits secs ont été dilués dans l'éthanol à une concentration de 50 mg/mL, tandis que les extraits liquides ont été analysés sans traitement. Les mesures de colorimétrie ont été réalisées en triplicat. Les coordonnées CIE L\*a\*b\* des extraits sont calculées à partir des celles obtenues pour l'extrait non décoloré considéré comme l'extrait de référence.

### 5.4.4. Mesure du taux d'humidité des poudres

Le taux d'humidité des poudres obtenues par atomisation a été évalué à l'aide d'un montage Dean-Stark. Pour cela, 20,0 g de poudre (extrait déposé sur maltodextrine) ont été dilués dans 400 mL de toluène, puis le mélange est porté à ébullition, et l'eau évaporée est ensuite recondensée. Le volume d'eau recueilli permet alors de calculer la teneur en eau dans la poudre et ainsi de déterminer son pourcentage d'humidité.

## 5.5. Tests d'activité biologique

Les tests d'activités ont été réalisés à l'aide de plaques 96 puits non traitées, fournies par Thermo Nunc, et de plaques transparentes aux UV fournies par Costar, Sigma-Aldrich. Des films adhésifs (Greiner Bio-One) ont été utilisés pour couvrir les plaques lors des périodes d'incubation. Un système de pipetage automatique Eppendorf epMotion® 5075 a été utilisé pour réaliser les dépôts ; un lecteur de microplaques Spectramax Plus 384 (Molecular Devices) est utilisé pour les mesures d'absorbance. Les données ont été recueillies à l'aide du logiciel SoftMaxPro (Molecular Devices) et le logiciel Prism (GraphPad Software) a été utilisé pour calculer les pourcentages d'inhibition enzymatique.

Les échantillons (extraits, fractions, standards et contrôles) ont été préparés à une concentration de 3,433 mg/mL dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL, adaptés à l'utilisation du système de pipetage automatique epMotion® 5075 (Eppendorf). Les extraits liquides obtenus dans le propylène glycol (ou dans tout autre solvant non volatil) ont été considérés à une concentration de 10 mg/mL, avant d'être dilués dans le DMSO afin d'atteindre une concentration finale de 3,433 mg/mL. Avant dépôt, les extraits ont été centrifugés.

Le protocole expérimental qui a été suivi pour les différents tests est le suivant :

- Ajout de 150 µL de l'enzyme contenue dans une solution tampon adaptée ;
- ajout de 7,5 µL de l'extrait à analyser (concentration finale de l'extrait dans le puits : 100 µg/mL) ;
- après avoir scellé la plaque, incubation sous agitation durant un temps et à température déterminés ;
- mesure de l'absorbance à la longueur d'onde définie (densité optique 1 – DO<sub>1</sub>) ;
- ajout de 100 µL de substrat contenu dans une solution tampon adaptée ;
- après avoir scellé la plaque, nouvelle incubation durant un temps et à température déterminés ;
- mesure de l'absorbance à la longueur d'onde définie (densité optique 2 – DO<sub>2</sub>) ;
- calcul du pourcentage d'inhibition selon l'équation (7) pour les activités anti-collagénase et anti-hyaluronidase et l'équation (8) pour les autres activités :

$$(7) \text{ I \%} = \frac{DO_{\text{échantillon}}}{DO_{\text{blanc}} - DO_{\text{contrôle}}} \times 100 \quad (8) \text{ I \%} = \frac{DO_{\text{contrôle}} - DO_{\text{échantillon}}}{DO_{\text{contrôle}}} \times 100$$

avec  $DO_{\text{échantillon}} = DO_2 - DO_1$ ,  $DO_{\text{contrôle}} = DO$  du DMSO et  $DO_{\text{blanc}} = DO$  de la solution tampon

La valeur DO<sub>1</sub> pour l'activité anti-inflammatoire a été prise une fois le substrat ajouté. La valeur DO<sub>échantillon</sub> correspond à DO<sub>2</sub> pour le test de l'activité anti-hyaluronidase. Sauf indication contraire, une molécule pure et un extrait cosmétique commercial ont servi de contrôles positifs, et le DMSO seul, de témoin négatif (DO<sub>contrôle</sub>) pour chaque test. Les conditions expérimentales de chacun des tests sont présentées dans le Tableau 101.

Les différents tampons utilisés ont été préparés selon les protocoles suivants, puis filtrés à l'aide d'un filtre Stericup-GP 0,22 µm (polyéthersulfone, 150 mL, radio-stérilisé, Millipore) :

- Le tampon acétate pH = 5,4 a été obtenu par mélange de 86 mL d'une solution d'acétate de sodium (0,1 M dans l'eau milli-Q) et de 14 mL d'une solution d'acide acétique (0,1 M dans l'eau milli-Q).
- Le tampon phosphate pH = 6,8 a été obtenu par mélange de 122 mL d'une solution d'hydrogénophosphate de sodium (0,17 M dans l'eau milli-Q), de 127 mL de dihydrogénophosphate de sodium (0,24 M dans l'eau milli-Q) et de 250 mL d'eau milli-Q.
- Le tampon phosphate pH = 8 a été obtenu par mélange goutte à goutte de 30 mL d'une solution de dihydrogénophosphate de sodium (0,1 M dans l'eau milli-Q) dans 500 mL d'une solution d'hydrogénophosphate de sodium (0,1 M dans l'eau milli-Q) en surveillant le pH, à laquelle 500 mL d'eau milli-Q ont été ajoutés.
- Le tampon acide hyaluronique pH = 5,35 correspond à une solution de phosphate de potassium monobasique à 0,3 M dans l'eau milli-Q. Son pH a été ajusté à 5,35 à l'aide d'une solution de NaOH à 1 M.
- Le tampon hyaluronidase pH = 7 a été obtenu en mélangeant une solution de phosphate de potassium monobasique à 20 mM et une solution de NaCl à 77 mM. Le pH a été ajusté avec une solution de NaOH à 1 M, avant d'ajouter 0,01 % d'albumine sérique bovine (BSA - *Bovine Serum Albumin*).
- Le tampon tricine pH = 7,5 a été obtenu par mélange d'une solution de tricine à 0,50 mM dans l'eau milli-Q, d'une solution de NaCl à 400 mM dans l'eau milli-Q et d'une solution de CaCl<sub>2</sub> à 10 mM dans l'eau milli-Q. Le pH a été ajusté à 7,5 à l'aide d'une solution de NaOH à 4 %.

**Tableau 101** : Conditions expérimentales pour les tests d'activités biologiques *in vitro*

Activité évaluée (test)	Enzyme/Réactif	Substrat	Contrôle positif (concentration dans le DMSO)	Protocole
Activité antioxydante (test au DPPH)	Solution éthanol/tampon acétate à 0,1 M pH = 5,4 ; 50/50 v/v.	Solution de DPPH à 386,25 µM dans l'éthanol.	Trolox : 3607,8 µM, Extrait commercial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. : 3,433 mg/mL.	Incubation : 2 min Lecture DO <sub>1</sub> à 517 nm. Ajout du substrat. Incubation : 30 min dans l'obscurité. Lecture DO <sub>2</sub> à 517 nm.
Activité blanchissante	Solution de tyrosinase de champignons à 171,66 U/mL pour tester l'activité monophénolase et à 85,83 U/mL pour tester l'activité diphénolase dans un tampon phosphate pH = 6,8.	L-Tyrosine (monophénolase) ou L-DOPA (diphénolase) à 1 mM dans le tampon phosphate.	Acide kojique : 3,433 mM, Phényléthyl résorcinol : 3,433 mg/mL.	Incubation : 20 min. Lecture DO <sub>1</sub> à 480 nm. Ajout du substrat. Incubation : 20 min. Lecture DO <sub>2</sub> à 480 nm.
Activité anti-inflammatoire	Solution de lipoxygénase de soja préparée à 686,66 U/mL dans un tampon phosphate (50 mM, pH = 8).	Solution d'acide linoléique préparée dans du tampon phosphate pH = 8.	Quercétine hydratée : 1000 µM, Extrait commercial d' <i>Arnica montana</i> L. : 3,433 mg/mL	<i>Plaque 96 puits transparente aux UV.</i> Incubation : 10 min. Ajout du substrat. Lecture DO <sub>1</sub> à 235 nm. Incubation : 50 min. Lecture DO <sub>2</sub> à 235 nm.
Activité anti-élastase (anti-âge)	Solution d'élastase pancréatique porcine à 0,171 U/mL dans un tampon Tris (50 mM, pH = 8).	Solution de Suc-AAA-pNA à 2,06 mM dans le tampon Tris.	Quercétine hydraté : 8583,33 µM, Extrait commercial de <i>Rubus idaeus</i> L. à 3,433 mg/mL.	Incubation : 20 min. Lecture DO <sub>1</sub> à 410 nm. Ajout du substrat. Incubation : 40 min. Lecture DO <sub>2</sub> à 410 nm.
Activité anti-hyaluronidase (anti-âge)	Solution de hyaluronidase à 13,3 U/mL dans un tampon hyaluronidase pH = 7.	Solution d'acide hyaluronique à 150 µg/mL dans un tampon acide hyaluronique pH = 5,35. Après la seconde incubation, ajout de 50 µL d'une solution de CTAB préparée à 40 mM dans une solution de NaOH à 2 %.	Acide tannique : 0,435 mg/mL, Extrait commercial de <i>Rubus idaeus</i> L. : 3,433 mg/mL ; Contrôle négatif : 150 µL de tampon acide hyaluronique + 7,5 µL de DMSO.	Incubation à 37 °C : 20 min. Ajout du substrat. Incubation à 37 °C : 30 min. Ajout de la solution de CTAB. Incubation entre 2 et 10 min. Lecture DO <sub>échantillon</sub> à 405 nm.
Activité anti-collagénase (anti-âge)	Solution de collagénase à 53 U/mL dans un tampon tricine (pH = 7,5).	Solution de FALGA préparée à 5,15 mM dans le tampon tricine.	Acide bétulinique : 3,433 mg/mL ; Contrôle négatif : 150 µL de tampon tricine + 7,5 µL de DMSO.	Incubation : 15 min. Lecture DO <sub>1</sub> à 345 nm. Ajout du substrat. Incubation : 30 min. Lecture DO <sub>2</sub> à 345 nm.

---

## Conclusions et perspectives

---

Le secteur cosmétique est gouverné par les demandes des consommateurs en quête de produits naturels à l'efficacité démontrée, auxquelles les formulateurs répondent en intégrant à ces produits finis des actifs naturels et éco-conçus. Ces travaux de thèse, financés par les Laboratoires JYTA, portent sur le développement de tels actifs cosmétiques innovants favorisant la réparation cutanée à partir de matières premières naturelles d'origine méditerranéenne.

La première étape de cette étude a consisté à cribler différentes matières végétales afin de sélectionner les plus intéressantes pour poursuivre le développement d'ingrédients cosmétiques. Une première sélection a été effectuée en évaluant les activités biologiques de 91 extraits obtenus à partir de 77 matières premières naturelles. Un extrait présentant des pouvoirs d'inhibition sur différents facteurs intervenant lors du processus de réparation cutanée s'avère particulièrement intéressant pour cette étude. Ainsi, afin de cibler ce mécanisme, les activités antioxydantes, anti-inflammatoires, blanchissantes, anti-hyaluronidase, anti-élastase et anti-collagénase des extraits ont été évaluées à l'aide de tests *in vitro*. Au total, 28 matières végétales se sont révélées particulièrement intéressantes en termes d'activités biologiques.

Afin d'affiner cette sélection, 7 critères supplémentaires de choix ont été définis : la toxicité potentielle de la matière première, sa répartition géographique, la facilité d'approvisionnement de cette matière, le potentiel « marketing » véhiculé par celle-ci, la littérature existante portant sur cette matière première, ainsi que les brevets cosmétiques existants, et enfin l'existence sur le marché d'ingrédients cosmétiques développés à partir de plantes appartenant au même genre, voire à la même espèce. Selon ces 7 critères, 9 matières végétales se sont démarquées parmi les 28 présélectionnées, et trois ont été sélectionnées pour la poursuite de cette étude : la germandrée lisse (*Teucrium lucidum* L.) a été choisie car il s'agit d'une plante endémique de la région méditerranéenne qui a été très peu étudiée précédemment ; le chêne pubescent (*Quercus pubescens* Willd.) et le prunier de Brignoles (*Prunus domestica* L.) ont été sélectionnés car il s'agit de co-produits de l'agriculture régionale, qu'il est par conséquent très intéressant de valoriser pour développer des actifs cosmétiques.

Cette étude a porté principalement sur la caractérisation phytochimique d'extraits de germandrée lisse. L'extrait hydroalcoolique obtenu par macération de ses parties aériennes, favorise la réparation cutanée (activités antioxydantes, anti-hyaluronidase et anti-inflammatoires). Cet extrait est caractérisé par la présence de deux groupes de composés : d'une part des composés très polaires (des sucres notamment) qui ne présentent aucune activité, et d'autre part des composés phénoliques identifiés comme étant les composés d'intérêt qui contribuent aux activités biologiques.

La complexité du profil phytochimique de l'extrait de germandrée lisse, associée au caractère innovant de cette matière première dans le domaine cosmétique, ont impliqué de multiples étapes de fractionnement afin d'identifier les principaux composés présents dans cet extrait. Huit composés ont été isolés puis identifiés par RMN, parmi lesquels 5 n'avaient jamais été décrits dans le genre *Teucrium*. Ils correspondent aux isomères (*Z*) et (*E*) du *p*-acide-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside coumarique, à la 5,2',4'-trihydroxyflavone-7-*O*- $\beta$ -D-xylosyl-(1'' $\rightarrow$ 6'')- $\beta$ -D-

glucopyranoside, à la diosmetin-7-O-β-D-xylosyl-(1'''→6'')-β-D-glucopyranoside et à l'angoroside A. Les trois autres composés identifiés par RMN avaient déjà été décrits dans le genre *Teucrium* : il s'agit de l'acide *trans*-chlorogénique, de la teuponine et de la teufline (ces deux *néo*-clérodanes sont caractéristiques du genre *Teucrium*).

Ces différents composés isolés et identifiés contribuent aux activités antioxydantes, anti-hyaluronidase et anti-inflammatoires de l'extrait hydroalcoolique. D'autres composés plus lipophiles ont également été identifiés, notamment l'acide bétulinique, l'acide oléanolique, l'acide palmitique, le palmitate de méthyle et l'acide myristique. Ils ont déjà été décrits dans le genre *Teucrium* et contribuent davantage aux activités anti-élastase et anti-inflammatoires.

De nombreuses difficultés ont été rencontrées lors de l'étude de cette plante en raison de la faible quantité de matière végétale à disposition, mais aussi en raison de la richesse et de la complexité de cet extrait. L'étude déréplicative utilisée afin de faciliter cette caractérisation phytochimique s'est avérée très limitée : elle a seulement permis d'identifier avec certitude 3 composés. Le temps consacré à cette étude a donc été considérable en comparaison des informations obtenues et il aurait finalement été plus pertinent de consacrer du temps à l'isolement des actifs et à leur caractérisation structurale qui reste la technique la plus performante pour de telles identifications.

Afin de finaliser cette étude, la caractérisation des 3 composés principaux de l'extrait brut sera à poursuivre, une fois les composés isolés en plus grande quantité. Des quantités plus importantes de certains composés identifiés doivent également être isolées afin de confirmer certaines identifications (analyses de RMN complémentaires) et d'évaluer leurs activités biologiques. Par ailleurs, il sera nécessaire de confirmer ces conclusions avec des extraits de germandrée lisse obtenus à partir d'autres lots de matière première. Une étude de variabilité liée à la localisation et l'année de récolte pourrait également être réalisée afin de s'assurer de la reproductibilité de ces activités.

La deuxième partie de ce travail a consisté à mettre en place une méthodologie de développement d'un ingrédient cosmétique naturel, de l'approvisionnement en matière première jusqu'à son intégration dans un produit cosmétique fini. Deux formes (liquide et solide) d'ingrédients ont été développées, chacune présentant des aspects particuliers. Cette méthodologie a été mise en place à l'aide de deux autres matières premières naturelles sélectionnées lors du criblage, à savoir le chêne pubescent et le prunier de Brignoles. L'étude conjointe de ces deux co-produits a permis de mettre en évidence les étapes particulières à adapter à chaque matière première, selon sa composition phytochimique. Elle servira par la suite pour le développement d'ingrédients cosmétiques naturels à partir des autres matières premières criblées, qui se sont révélées au cours de cette étude tout aussi intéressantes que les trois matières sélectionnées.

Le chêne pubescent (*Quercus pubescens* Willd.) est un co-produit de la trufficulture. L'extrait hydroalcoolique obtenu par macération de ses parties aériennes présente des activités antioxydantes et anti-hyaluronidase très intéressantes, ainsi qu'une activité anti-élastase plus modérée. Il est caractérisé par la présence majoritaire de composés très polaires correspondant majoritairement à des sucres, qui ne sont pas responsables de ces activités.

Les activités antioxydantes et anti-hyaluronidase de cet extrait sont liées à la présence de flavonoïdes. Les activités anti-élastase sont quant à elles dues à la présence des composés lipophiles (triterpénoïdes et acides gras) parmi lesquels l'acide bétulinique, l'acide oléanolique, l'acide palmitique et l'acide myristique ont été identifiés. Ces différentes informations ont alors permis de sélectionner les paramètres d'extraction les plus intéressants pour extraire sélectivement ces composés d'intérêt, à savoir une macération à température ambiante pendant 2 h avec un mélange hydroalcoolique 50/50 (m/m). L'étude de mise sur support par atomisation a permis de définir les paramètres pour obtenir une poudre de qualité, mais elle s'accompagne de pertes d'activités anti-hyaluronidase.

Pour la suite, il sera nécessaire d'optimiser ces conditions d'atomisation afin de limiter ces pertes d'activités. Des études de décoloration et de stabilité seront également à réaliser afin de poursuivre ce développement à l'échelle industrielle. Il reste également un des composés lipophiles à identifier.

L'extrait liquide obtenu par macération de parties aériennes de chêne pubescent dans le propylène glycol pendant 7 h présente des activités antioxydantes et anti-hyaluronidase remarquables, qui peuvent être dues à la présence des flavonoïdes mis en évidence dans l'extrait hydroalcoolique. Le profil phytochimique de cet extrait a été obtenu par extraction sur phase solide, un protocole mis en place lors de cette étude. Par ailleurs, l'utilisation des ultrasons lors de l'extraction permet d'accélérer l'extraction des composés d'intérêt (60 min vs 7 h). La décoloration par adsorption au charbon actif de cet extrait est efficace mais conduit à des pertes d'activités anti-hyaluronidase.

La transposition à l'échelle pilote des conditions d'extraction optimisées pour l'extrait liquide au propylène glycol a été validée. Les études de stabilité et de toxicité de cet extrait à l'échelle pilote ont confirmé l'intérêt du développement d'un tel ingrédient à l'échelle industrielle. Sa commercialisation est prévue fin 2019.

Afin de poursuivre le développement de cet ingrédient, les étapes de décoloration seront à optimiser pour diminuer les pertes d'activités observées. D'autres solvants d'extraction tels que la glycérine qui a permis d'obtenir un extrait aux propriétés intéressantes, ou des alternatives biosourcées, pourraient également être utilisés pour extraire des composés d'intérêt et ainsi développer d'autres ingrédients cosmétiques.

Les feuilles de Prunier de Brignoles (*Prunus domestica* L.) sont des co-produits de la fruiticulture régionale. L'extrait éthanolique obtenu par macération de ces feuilles présente des activités antioxydantes et anti-élastase très intéressantes, ainsi que des activités anti-hyaluronidase, anti-inflammatoires et blanchissantes notables. Il est caractérisé par la présence de trois grandes familles de composés : des composés très polaires (sucres et acides aminés), des flavonoïdes et des composés lipophiles (terpénoïdes, acides gras et dérivés de la chlorophylle). Parmi ces groupes de composés, 6 composés principaux ont été mis en évidence, parmi lesquels 4 ont été identifiés : l'acide chlorogénique, l'acide bétulinique, l'acide oléanolique et l'acide palmitique. Les deux autres composés correspondraient au kampférol-pentoside-rhamnoside et à un dérivé de la chlorophylle. Trois autres composés ont été mis en évidence lors du fractionnement de cet extrait ; ils correspondraient à l'acide *p*-

coumaroylquinique, au kampférol-rhamnoside et à un terpénoïde. L'isolement de ces 5 composés sera nécessaire afin de les caractériser.

Le fractionnement de cet extrait a permis de relier les activités anti-inflammatoires, anti-hyaluronidase et anti-élastase à la présence des composés lipophiles. Les composés phénoliques contribuent quant à eux aux activités antioxydantes, anti-hyaluronidase et anti-inflammatoires. Ainsi, la nature de ces composés d'intérêt a permis de sélectionner l'éthanol comme solvant d'extraction.

Les activités caractéristiques de ces deux groupes de composés de polarités différentes, ont conduit à réaliser une double extraction de la matière première afin d'obtenir deux ingrédients aux activités diverses. Un solvant de type éther permet d'extraire préférentiellement les composés lipophiles, et l'éthanol permet d'extraire les flavonoïdes. Cette double extraction est particulièrement intéressante afin de diminuer les coûts liés à l'achat de la matière première.

La décoloration de l'extrait éthanolique par adsorption au charbon actif s'est révélée efficace mais elle s'accompagne d'importantes pertes d'activités.

Pour la poursuite de cette étude, il sera nécessaire d'isoler les cinq composés restants dans l'extrait éthanolique afin de les caractériser. Les études de la mise sur support de ce dernier et de sa décoloration sont également à compléter afin de le rendre formulable. Un extrait à l'échelle pilote, et une étude de la stabilité de ce dernier, seront également nécessaires afin de poursuivre le développement de cet extrait avant sa commercialisation.

L'extrait liquide obtenu au propylène glycol présente des activités antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-hyaluronidase, principalement dues à la présence des composés phénoliques. Les ultra-sons se sont révélés particulièrement intéressants pour favoriser l'extraction des composés d'intérêt, notamment ceux responsables des activités anti-élastase. La glycérine et le miglyol se sont avérés être des solvants intéressants pour le développement d'autres ingrédients liquides. L'étude de décoloration par adsorption au charbon actif a conduit à des pertes d'activités considérables. Les études de stabilité et de toxicité de l'ingrédient liquide obtenu au propylène glycol à l'échelle pilote se sont révélées favorables à la commercialisation de sa forme non décolorée prévue fin 2019.

Pour ce qui est de la poursuite de ce travail, il s'agira d'optimiser la décoloration de l'extrait. L'utilisation d'autres solvants biosourcés pourrait également être envisagée afin de développer des ingrédients plus verts.

Ainsi, en perspectives de ce travail et dans l'objectif de développer des ingrédients toujours plus verts, l'intérêt d'autres techniques d'éco-extraction favorisant l'extraction des molécules actives sera évalué. L'extraction par fluide sub-critique (l'eau par exemple) ou l'activation de l'extraction par les ultra-sons ou par les micro-ondes sont des techniques qui pourront être utilisées afin de développer des ingrédients actifs, tout en minimisant l'impact environnemental de la production de ces derniers.

L'étape d'identification des actifs reste l'étape la plus fastidieuse lors du développement des ingrédients naturels, particulièrement pour les espèces les plus innovantes, pour lesquelles peu de littérature existe. De nouvelles techniques telles que la dérégulation sont développées pour faciliter cette étape, mais elles présentent encore de nombreuses limites comme cela a

été démontré dans le cas de la germandrée. Afin d'améliorer l'efficacité de ce type d'étude, il paraît crucial de compléter les bases de données utilisées pour proposer des hypothèses de structure plus fiables. Il semble également nécessaire d'ajuster les différents scores utilisés pour affiner cette recherche, et de se questionner sur la pertinence de certains de ces scores. C'est le cas notamment du score de taxonomie ; il paraît en effet restrictif d'attribuer un faible score à une hypothèse de structure lorsque le composé n'a pas été identifié dans l'espèce ou dans la famille de la plante étudiée car de nombreux métabolites secondaires sont retrouvés dans des espèces appartenant à différents règnes. Pour l'heure, ce score entraîne le rejet non-justifié de certaines hypothèses qui pourraient s'avérer intéressantes. Une amélioration continue de cette technique est nécessaire afin que l'utilisation de la déréplication puisse être démocratisée pour ce type d'étude.

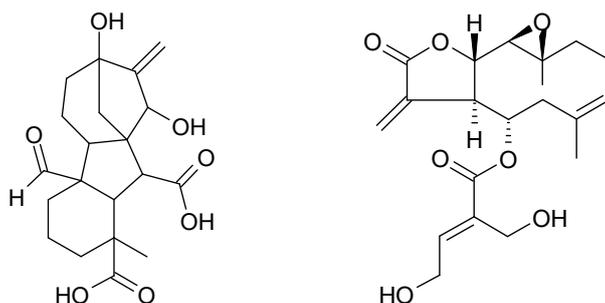
---

# Annexes

---

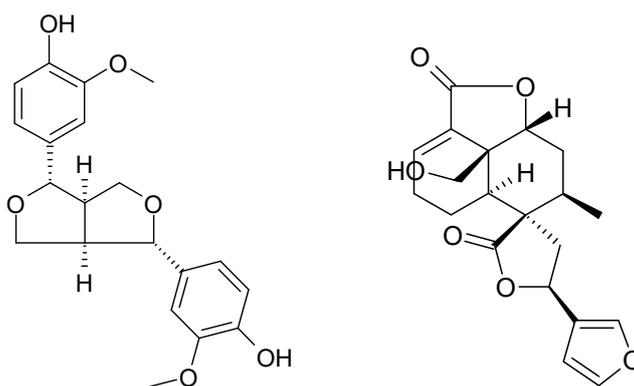
## Annexe 1 - Etude de déréplication de la fraction TL\_ha\_F4

La formule brute  $C_{20}H_{26}O_7$  est la plus probable pour le composé **F4\_MS1** pour lequel deux hypothèses de structure sont proposées : la gibbéreline A102 et la stizolicine. Elles présentent des scores intéressants mais une faible correspondance phylogénique (Figure 221). Aucun de ces composés n'est décrit dans le genre *Teucrium* et les données de fragmentation n'ont pas permis de sélectionner préférentiellement l'une de ces hypothèses : elles sont donc toutes les deux conservées.



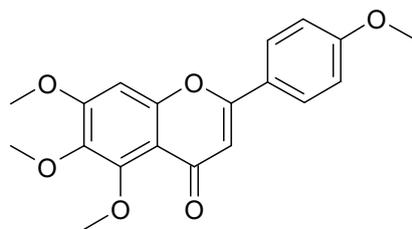
**Figure 221** : Structures de la gibbéreline A102 (gauche) et la stizolicine (droite) proposées pour le composé F4\_MS1

La formule brute  $C_{20}H_{22}O_6$  retenue pour le composé **F4\_MS2** peut correspondre à la teuscorodonine ou au pinorésinol qui présentent tous deux des scores intéressants, et notamment une forte correspondance phylogénique (respectivement de 9 et de 8) (Figure 222). La teuscorodonine a déjà été décrite dans les parties aériennes de *T. scorodonia* [327] et le pinorésinol dans les parties aériennes de *T. viscidum* [328]. La fragmentation de ce composé **F4\_MS2** n'est pas discriminante, elle n'a pas permis de favoriser une identification plutôt que l'autre.



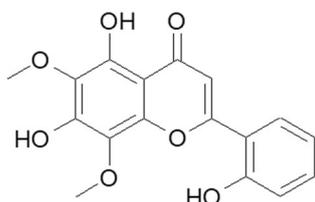
**Figure 222** : Structures du pinorésinol (gauche) et de la teuscorodonine (droite) proposées pour le composé F4\_MS2

La formule brute  $C_{19}H_{18}O_6$  est la plus probable pour le composé **F4\_MS3** ; ce dernier correspondrait à la 5-méthoxysalvigénine (Figure 223). Ce composé jamais décrit dans le genre *Teucrium*, présente des scores intéressants, hormis celui correspondant à la fragmentation MS/MS.



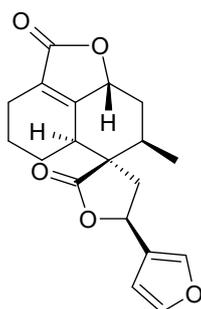
**Figure 223** : Structure de la 5-méthoxysalviginine proposée pour le composé F4\_MS3

La formule brute  $C_{17}H_{14}O_7$  est proposée pour le composé **F4\_MS7**. Il est très probable qu'il s'agisse d'un composé de type « trihydroxy-diméthoxyflavone » puisque 4 composés présentant cette structure ont été proposés avec des scores très intéressants. La 5,7,2'-trihydroxy-6,8-diméthoxyflavone se démarque des autres propositions, car elle a été proposée par la plateforme selon les deux modes d'ionisation (Figure 224). La littérature ne fait cependant mention d'aucune structure de ce type dans le genre *Teucrium*.



**Figure 224** : Structure de la 5,7,2'-trihydroxy-6,8-diméthoxyflavone proposée pour le composé F4\_MS7

La formule brute  $C_{19}H_{20}O_5$  est proposée pour le composé **F4\_MS8** ; ce dernier pourrait correspondre à la teufline qui présente des scores intéressants, notamment le score phylogénique, mais on observe une faible correspondance du score de fragmentation (Figure 225). Comme mentionné précédemment, certains de ses stéréoisomères ont déjà été décrits dans l'espèce *T. lucidum*, ce qui conforte cette hypothèse [200]. Les identifications de la teufline et de la 1,2-*epi*-teucvine par GC-MS confortent également cette hypothèse.

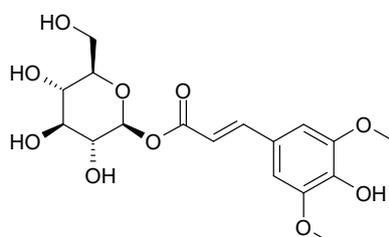


**Figure 225** : Structure de la teufline proposée pour le composé F4\_MS8

Les formules brutes des 3 autres composés mis en évidence par UFLC-HRMS/MS, ont été déterminées à partir des masses exactes : le composé **F4\_MS4** présenterait la formule brute  $C_{15}H_{10}O_6$ , le composé **F4\_MS5**, la formule brute  $C_{21}H_{24}O_9$ , et le composé **F4\_MS6**, la formule brute  $C_{23}H_{20}O_4$ .

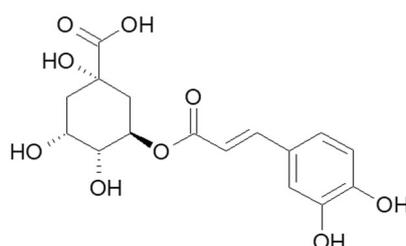
## Annexe 2 - Etude de déréplication de la fraction TL\_ha\_F6

La formule brute  $C_{17}H_{22}O_{10}$  est la plus probable pour le composé **F6\_MS2** ; la structure du 1-O-sinapoyl- $\beta$ -D-glucopyranoside a été proposée (Figure 226). Ce composé présente toutefois des scores de phylogénie et de fragmentation relativement faibles et n'a jamais été décrit dans le genre *Teucrium*.



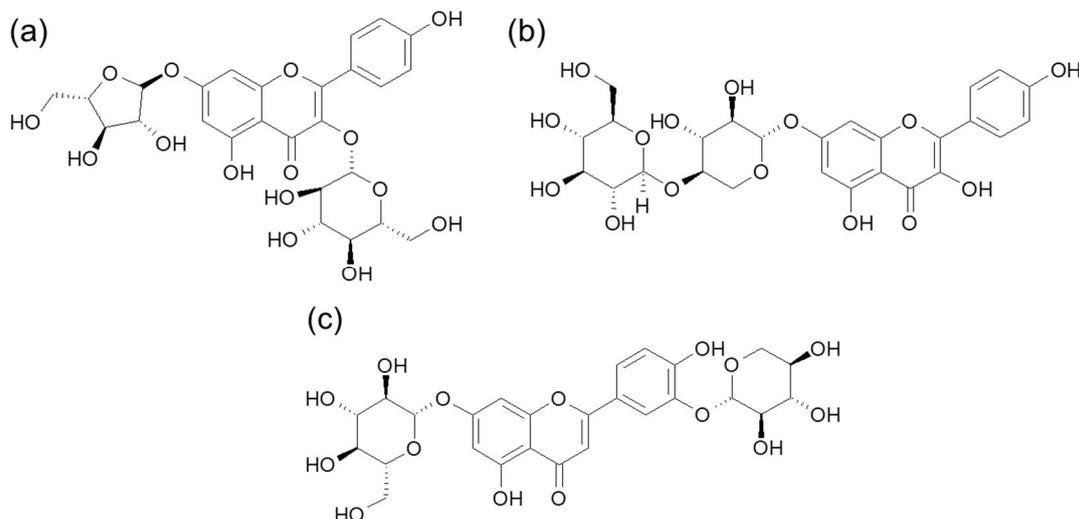
**Figure 226** : Structure du 1-O-sinapoyl- $\beta$ -D-glucopyranoside proposée pour le composé F6\_MS2

La formule brute  $C_{16}H_{18}O_9$  est proposée pour le composé **F6\_MS3** ; selon les scores proposés, ce composé pourrait correspondre à l'acide chlorogénique (Figure 227).



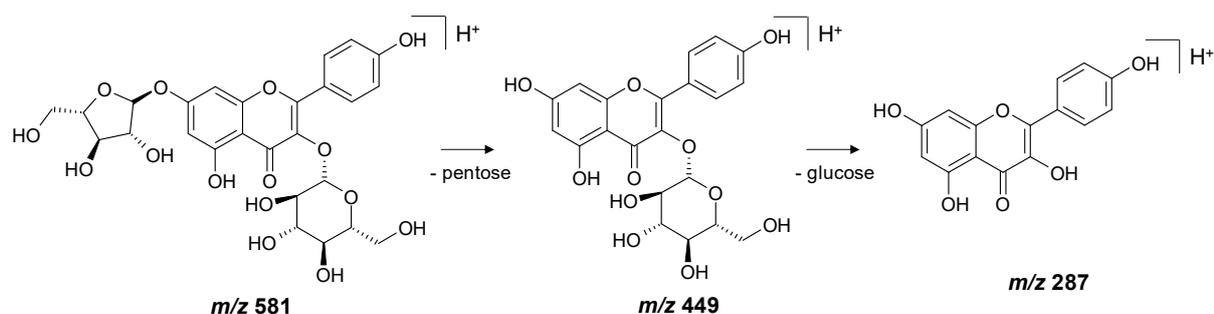
**Figure 227** : Structure de l'acide chlorogénique proposée pour le composé F6\_MS3

La formule brute  $C_{26}H_{28}O_{15}$  est proposée pour le composé **F6\_MS4**. ; trois dérivés glycosylés de flavonoïdes, présentant chacun des scores plus ou moins intéressants selon le critère étudié pourraient correspondre. Il s'agit du kaempférol 7-arabinofuranoside-3-glucoside (a), du kaempférol 7-(4-glucosylxyloside) (b) et de la lutéoline 3'-xyloside-7-glucoside (c) (Figure 228). Aucun d'entre eux n'a été décrit dans le genre *Teucrium*.



**Figure 228** : Structures des composés proposés pour F6\_MS4

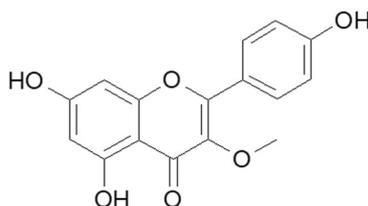
D'après l'étude du spectre de masse du composé **F6\_MS4**, les hypothèses de structures (a) et (c) semblent les plus probables. Un schéma de fragmentation possible de ces composés consisterait dans les pertes successives d'un groupement pentose (perte de 132, correspondant à l'ion de  $m/z$  449,1046), et d'un groupement glucose (perte de 162, correspondant à l'ion de  $m/z$  287,0568) (Figure 229). Il s'agirait d'une fragmentation avec rétention de charge [242]. Des analyses complémentaires sont nécessaires afin de privilégier l'une de ces identifications structurales.



**Figure 229** : Proposition de fragmentation du kaempférol 7-arabinofuranoside 3-glucoside (similaire à celle de la lutéoline 3'-xyloside-7-glucoside)

La formule brute  $C_{19}H_{20}O_5$  est proposée pour le composé **F6\_MS6**. La structure de la teufline est proposée pour ce composé. Cependant, hormis un score phylogénique intéressant de 8, les autres scores de ce composé sont faibles. Il n'y a par ailleurs pas de correspondance entre les temps de rétention du composé **F6\_MS6** (9,53 min) et celui de la teufline identifiée dans la fraction TL\_ha\_F4 (13,54 min). Le composé **F6\_MS6** correspond donc plus probablement à un isomère de la teufline.

Deux formules brutes obtenues à partir de deux masses exactes sont associées au composé **F6\_MS5** : cela signifie qu'il y a co-élution de deux composés. La formule brute proposée par ThalassOMICS est  $C_{16}H_{12}O_6$ , à laquelle sont associées deux propositions de structures : le kaempférol 3-O-méthyl éther et le kaempféride (Figure 230). Aucun de ces composés n'ayant été décrit dans le genre *Teucrium*, la première hypothèse a été retenue car elle présente des scores plus intéressants. Ces deux composés avaient déjà été proposés pour le composé **F3\_MS9** lors de l'étude de déréplication de la fraction TL\_ha\_F3, or, ils présentent des temps de rétention différents (**F3\_MS9** : 11,89 min ; **F6\_MS5** : 8,72 min), mettant en lumière les limites de l'étude de déréplication.

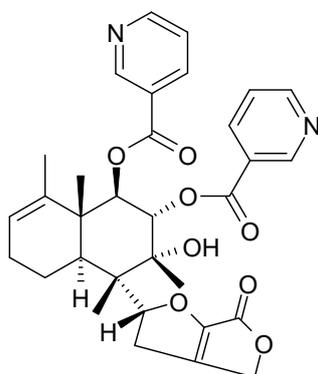


**Figure 230** : Structure du kaempférol 3-O-méthyl éther proposée pour le composé F6\_MS5

La formule brute correspondant au second composé est  $C_{27}H_{30}O_{15}$  mais aucune hypothèse de structure n'est proposée. En étudiant le spectre de masse correspondant, ce composé pourrait

être formé de deux groupements glycosylés : un groupement pentose correspondant à l'ion de  $m/z$  463,1290 et un groupement hexose correspondant à l'ion de  $m/z$  301,0706. Des analyses complémentaires sont nécessaires afin d'identifier ce composé puisque de nombreux composés présentent ces caractéristiques de fragmentation.

La formule brute proposée pour le composé **F6\_MS7** est  $C_{32}H_{34}N_2O_8$ . La structure proposée est celle de la 7-O-nicotinoylscutébarbatine, un alcaloïde diterpénique appartenant à la classe des *néo*-clérodanes (Figure 231). Hormis un score de fragmentation relativement faible, ce composé présente des scores intéressants ; il n'a pas été décrit dans le genre *Teucrium*. Une révélation par HPTLC à l'aide du réactif de Dragendorff permettrait de révéler la présence d'alcaloïdes dans cette fraction pour éventuellement confirmer cette hypothèse [129].



**Figure 231** : Structure de la 7-O-nicotinoylscutébarbatine H proposée pour le composé F6\_MS7

L'étude du spectre de masse du composé **F6\_MS1** renseigne sur le fait que la formule brute  $C_{12}H_{22}O_{11}$  pourrait lui être associée.

---

## Références bibliographiques

---

- [1] Nardello-Rataj, V., Bonté, F. Chimie et cosmétiques : une longue histoire ponctuée d'innovations. *L'actualité chimique*, **2008**, 323–324, 10–12.
- [2] Bardiés, I., Bimbenet-Privat, M., Walter, P. *Le bain et le miroir: soins du corps et cosmétiques de l'antiquité à la Renaissance*; Gallimard: Paris, **2009**; ISBN 978-2-07-012454-1.
- [3] Moulinier-Brogi, L. Esthétique et soins du corps dans les traités médicaux latins à la fin du Moyen Âge. *Médiévales. Langues, Textes, Histoire*, **2004**, 55–72.
- [4] Règlement (CE) n° 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques. *Journal Officiel de l'Union Européenne*, **2009**, L342, 59–206.
- [5] Carli, B. Consumer trends in cosmetics, Available online: <https://news.in-cosmetics.com/2018/01/23/consumer-trends-in-cosmetics/> (accessed on Oct 3, 2018).
- [6] Khoury, R. Significant beauty trends that began outside the beauty industry, Available online: <https://news.in-cosmetics.com/2019/01/29/significant-beauty-trends-that-began-outside-the-beauty-industry-part-1/> (accessed on Aug 23, 2019).
- [7] Guidelines for the evaluation of the efficacy of cosmetic products. *Colipa - The european cosmetic and perfumery association*, **2008**.
- [8] Couteau, C., Coiffard, L. Les dermocosmétiques, qu'est-ce que c'est ?, Available online: <http://theconversation.com/les-dermocosmetiques-quest-ce-que-cest-53133> (accessed on Oct 3, 2018).
- [9] Plainfossé, H., Burger, P., Michel, T., Landreau, A., Fernandez, X. Actifs cosmétiques pour la réparation cutanée. *Techniques de l'ingénieur*, **2017**, J3002 v1.
- [10] Dermocosmetics the 'next big thing' in skincare, Available online: <https://news.in-cosmetics.com/2019/05/13/dermocosmetics-the-next-big-thing-in-skincare/> (accessed on Aug 23, 2019).
- [11] Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B., Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **2000**, 403, 853–858.
- [12] Médail, F., Quezel, P. Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean basin. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **1997**, 84, 112.
- [13] Médail, F., Quezel, P. Biodiversity hotspots in the Mediterranean basin: setting global conservation priorities. *Conservation Biology*, **1999**, 13, 1510–1513.
- [14] Soares, J. The Nagoya protocol and natural product-based research. *ACS Chemical Biology*, **2011**, 6, 289–289.
- [15] Secretariat of the convention on biological diversity The Nagoya protocol on access to genetic resources and the fair and equitable sharing of benefits arising from their utilization to the convention on biological diversity **2010**.
- [16] Article L5111-1 du Code de la santé publique. **2007**.
- [17] Newburger, A.E. Cosmeceuticals: myths and misconceptions. *Clinics in Dermatology*, **2009**, 27, 446–452.
- [18] Dreno, B., Araviiskaia, E., Berardesca, E., Bieber, T., Hawk, J., Sanchez-Viera, M., Wolkenstein, P. The science of dermocosmetics and its role in dermatology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, **2014**, 28, 1409–1417.
- [19] Directive 76/768/CEE du Conseil du 27 juillet 1976 concernant le rapprochement des législations des États membres relatives aux produits cosmétiques. *Journal Officiel*, **1976**, 169–200.
- [20] Loi n° 2014-201 du 24 février 2014 portant diverses dispositions d'adaptation au droit de l'Union européenne dans le domaine de la santé. *Journal Officiel de la République Française*, **2014**, 3250.
- [21] Yahya, N.A., Attan, N., Wahab, R.A. An overview of cosmeceutically relevant plant extracts and strategies for extraction of plant-based bioactive compounds. *Food and Bioproducts Processing*, **2018**, 112, 69–85.
- [22] Recommandation produits cosmétiques. *Autorité de régulation professionnelle de la publicité*, **2019**, Version 8.

- [23] Règlement (UE) n° 655/2013 de la Commission du 10 juillet 2013 établissant les critères communs auxquels les allégations relatives aux produits cosmétiques doivent répondre pour pouvoir être utilisées. *Journal Officiel de l'Union Européenne*, **2013**, L190, 31–34.
- [24] Directive 2005/29/CE du Parlement européen et du Conseil du 11 mai 2005 relative aux pratiques commerciales déloyales des entreprises vis-à-vis des consommateurs dans le marché intérieur et modifiant la directive 84/450/CEE du Conseil et les directives 97/7/CE, 98/27/CE et 2002/65/CE du Parlement européen et du Conseil et le règlement (CE) n° 2006/2004 du Parlement européen et du Conseil. *Journal Officiel de l'Union Européenne*, **2005**, 22–39.
- [25] Communication de la Commission dans le cadre de la mise en œuvre du Règlement (CE) n° 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques. *Journal Officiel de l'Union Européenne*, **2011**, 3–4.
- [26] ISO 22716:2007 - Cosmétiques - Lignes directrices relatives aux Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF). *Organisation Internatinalne de Normalisation*, **2007**.
- [27] Loboda, M., Lopaciuk, A. Global beauty industry trends in XXI century. In *Active citizenship by knowledge management & innovation: proceedings of the management, knowledge and learning international conference 2013*; ToKnowPress, **2013**; pp. 1079–1087.
- [28] Cosmetics market size, share, industry trends and analysis, Available online: <https://www.alliedmarketresearch.com/cosmetics-market> (accessed on Oct 15, 2019).
- [29] Latimer, A. Skin care products market to reach \$177 billion by 2024, Available online: <https://www.gcimagazine.com/marketstrends/segments/skincare/Skin-Care-Products-Market-to-Reach-177-Billion-by-2024-483336711.html> (accessed on Aug 29, 2018).
- [30] Skin care industry: global skincare market size 2012-2024 Available online: <https://www.statista.com/statistics/254612/global-skin-care-market-size/> (accessed on Oct 3, 2018).
- [31] Peut-on prévenir le vieillissement de la peau ? *CosmeticOBS 2018*.
- [32] Skin care products market size, share & trends analysis report by product and segment forecasts, 2018 - 2024, Available online: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/skin-care-products-market> (accessed on Aug 29, 2018).
- [33] FEBEA. Le secteur cosmétique français confirme sa position de leader mondial avec 13,6 milliards d'euros d'exportations Available online: <https://www.febea.fr/fr/vos-produits-cosmetiques/actualites/le-secteur-cosmetique-francais-confirme-sa-position-leader> (accessed on Aug 29, 2018).
- [34] Delmas, J.-L. La cosmétique est l'excellent élève du made in France, marketing et vente, Available online: [https://business.lesechos.fr/entrepreneurs/marketing-vente/0600077394405-la-cosmetique-est-l-excellent-eleve-du-made-in-france-324746.php?fbclid=IwAR16Kdmuq26gGRjgdZtHBv9ui7FT-aU\\_oxcB7B7KPbj9VXYftsNg7I0zM](https://business.lesechos.fr/entrepreneurs/marketing-vente/0600077394405-la-cosmetique-est-l-excellent-eleve-du-made-in-france-324746.php?fbclid=IwAR16Kdmuq26gGRjgdZtHBv9ui7FT-aU_oxcB7B7KPbj9VXYftsNg7I0zM) (accessed on Dec 5, 2018).
- [35] U.S. Embassy - U.S. Commercial service commercial specialist France country commercial guide - Cosmetics, Available online: <https://www.export.gov/article?id=France-Cosmetics> (accessed on Aug 24, 2019).
- [36] CBI Ministry of foreign affairs. Which trends offer opportunities on the European market for natural ingredients for cosmetics?, Available online: <https://www.cbi.eu/market-information/natural-ingredients-cosmetics/trends/> (accessed on Aug 24, 2019).
- [37] Natural cosmetics market size, share, trends, industry report, 2025, Available online: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/natural-cosmetics-market> (accessed on Aug 23, 2019).
- [38] Le Baromètre de la biodiversité 2018 de l'UEBT. *CosmeticOBS 2018*.
- [39] Special report: the state of beauty, 2018, Available online: <https://www.gcimagazine.com/marketstrends/segments/cosmetics/Special-Report-The-State-of-Beauty-2018-478569213.html> (accessed on Aug 29, 2018).
- [40] Herich, D. The natural organic beauty consumer: 2008-2018. *Global Cosmetic Industry*, **2018**.

- [41] BDIH : les cosmétiques naturels et bio ont une charte, Available online: <https://bleu-vert.fr/cosmetiques-naturels/label-BDIH.html> (accessed on Sep 1, 2019).
- [42] ISO 16128-1:2016 - Lignes directrices relatives aux définitions techniques et aux critères applicables aux ingrédients et produits cosmétiques naturels et biologiques - Partie 1 : Définitions des ingrédients. *Organisation Internationale de Normalisation*, **2016**.
- [43] ISO 16128-2:2017 - Cosmétiques - Lignes directrices relatives aux définitions techniques et aux critères applicables aux ingrédients et produits cosmétiques naturels et biologiques - Partie 2 : Critères relatifs aux ingrédients et aux produits. *Organisation Internationale de Normalisation*, **2017**.
- [44] Herich, D. Consumer survey: natural/organic beauty and personal care preferences. *Global Cosmetic Industry*, **2018**.
- [45] Whitehouse, L. Proving claims to maximise on beauty trends. *Cosmeticsdesign-europe.com*, **2017**.
- [46] Herbal cosmetics market - industry trends, competitive landscape and forecast by 2026, Available online: <https://www.transparencymarketresearch.com/herbal-cosmetics-market.html> (accessed on Aug 24, 2019).
- [47] Aburjai, T., Natsheh, F.M. Plants used in cosmetics. *Phytotherapy Research*, **2003**, *17*, 987–1000.
- [48] Wynberg, R., Laird, S. Access and benefit sharing: key points for policy- makers. *The Cosmetics Industry*, **2015**, 11 p.
- [49] d'Enfert, V. Règlementation Nagoya. *Expressions cosmétiques*, **2013**, *24*, 40–43.
- [50] Barbulova, A., Colucci, G., Apone, F. New trends in cosmetics: by-products of plant origin and their potential use as cosmetic active ingredients. *Cosmetics*, **2015**, *2*, 82–92.
- [51] Dell'acqua, G. Recycling natural by-products from food and agriculture waste into powerful active ingredients for cosmetic applications. *TKS Publisher*, 13.
- [52] Chemat, F., Abert Vian, M., Cravotto, G. Green extraction of natural products: concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, **2012**, *13*, 8615–8627.
- [53] Burton, Natasha. Why organic products can be more expensive - but are worth it, Available online: <http://stylecaster.com/beauty/why-organic-products-are-expensive/> (accessed on Oct 23, 2018).
- [54] Dayan, N., Kromidas, L. *Formulating, packaging, and marketing of natural cosmetic products: dayan/formulating cosmetics*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, **2011**; ISBN 978-1-118-05680-6.
- [55] Dufreuil, A. Cosmétique - vers une formulation plus verte. *Agrobiobase, la vitrine des produits biosourcés*, **2011**.
- [56] La recherche d'actifs verts stimule l'innovation cosmétique, Available online: <https://www.premiumbeautynews.com/la-recherche-d-actifs-verts,6793> (accessed on Oct 4, 2018).
- [57] Liam Chee, T., Abdul Gaffar, R., Abdul Majid, F.A., Sarmidi, M.R. Herbal extract decolourization device using activated carbon. *Jurnal Teknologi*, **2013**, *61*, 73–79.
- [58] Singer, A.J., Clark, R.A. Cutaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine*, **1999**, *341*, 738–746.
- [59] Tortora, G., Grabowski, S. *Principles of anatomy and physiology*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, **2000**; ISBN 978-0-471-36692-8.
- [60] Inc, D. Structure de la peau humaine : illustration vectorielle, Available online: <http://fr.depositphotos.com/24521671/stock-illustration-human-skin-structure-vector-illustration.html> (accessed on Apr 10, 2017).
- [61] Wysocki, A.B. Skin anatomy, physiology and pathophysiology. *The Nursing Clinics of North America*, **1999**, *34*, 777–797.
- [62] Almqvist, S. In vitro wound healing characteristics of amelogenins; Institute of Clinical Sciences at Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg: Göteborg, **2011**; ISBN 978-91-628-8262-4.

- [63] Järveläinen, H., Sainio, A., Koulu, M., Wight, T.N., Penttinen, R. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews*, **2009**, *61*, 198–223.
- [64] Martini, M.-C., Seiller, M. *Actifs et additifs en cosmétologie*; Lavoisier: Paris, **2006**; ISBN 978-2-7430-0711-9.
- [65] McPherson, J.M., Piez, K.A. Collagen in dermal wound repair. In *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*; Clark, R.A.F., Henson, P.M., Eds.; Springer US: Boston, MA, **1988**; pp. 471-496; ISBN 978-1-4615-1795-5.
- [66] Couchman, J.R., Höök, M. Proteoglycans and wound repair. In *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*; Clark, R.A.F., Henson, P.M., Eds.; Springer US: Boston, MA, **1988**; pp. 437-470; ISBN 978-1-4613-5725-4.
- [67] Gall, Y. Acide hyaluronique : structure, métabolisme et implication dans la cicatrisation. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, **2010**, *137*, S30–S39.
- [68] Kanitakis, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European Journal of Dermatology*, **2002**, *12*, 390–399.
- [69] Fournier, N., Mordon, S. Nonablative remodeling with a 1.540 nm erbium: glass laser. *Dermatologic Surgery*, **2005**, *31*, 1227–1235.
- [70] Guo, S., DiPietro, L.A. Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*, **2010**, *89*, 219–229.
- [71] Gonzalez, A.C. de O., Costa, T.F., Andrade, Z. de A., Medrado, A.R.A.P. Wound healing - A literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, **2016**, *91*, 614–620.
- [72] Wallace, H.A., Bashemore, B., Zito, P. Wound Healing Phases. *StatPearls Publishing*, **2019**.
- [73] Tarnuzzer, R.W., Macauley, S.P., Farmerie, W.G., Caballero, S., Ghassemifar, M.R., Anderson, J.T., Robinson, C.P., Grant, M.B., Humphreys-Beher, M.G., Franzen, L. Competitive RNA templates for detection and quantitation of growth factors, cytokines, extracellular matrix components and matrix metalloproteinases by RT-PCR. *BioTechniques*, **1996**, *20*, 670–674.
- [74] Zielins, E.R., Atashroo, D.A., Maan, Z.N., Duscher, D., Walmsley, G.G., Hu, M., Senarath-Yapa, K., McArdle, A., Tevlin, R., Wearda, T., et al. Wound healing: an update. *Regenerative Medicine*, **2014**, *9*, 817–830.
- [75] Koh, T.J., DiPietro, L.A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, **2011**, *13*, 1–12.
- [76] Smigiel, K.S., Parks, W.C. Macrophages, wound healing, and fibrosis: recent insights. *Current Rheumatology Reports*, **2018**, *20*, 7 p.
- [77] Wulff, B.C., Wilgus, T.A. Mast cell activity in the healing wound: more than meets the eye? *Experimental Dermatology*, **2013**, *22*, 507–510.
- [78] Broughton, G., Janis, J.E., Attinger, C.E. The basic science of wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, **2006**, *117*, 12S-34S.
- [79] desJardins-Park, H.E., Foster, D.S., Longaker, M.T. Fibroblasts and wound healing: an update. *Regenerative Medicine*, **2018**, *13*, 491–495.
- [80] Pilcher, B.K., Dumin, J.A., Sudbeck, B.D., Krane, S.M., Welgus, H.G., Parks, W.C. The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *The Journal of Cell Biology*, **1997**, *137*, 1445–1457.
- [81] Bugge, T.H., Kombrinck, K.W., Flick, M.J., Daugherty, C.C., Danton, M.J.S., Degen, J.L. Loss of fibrinogen rescues mice from the pleiotropic effects of plasminogen deficiency. *Cell*, **1996**, *87*, 709–719.
- [82] Desmouliere, A., Darby, I.A., Laverdet, B., Bonté, F. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, **2014**, *7*, 301–311.
- [83] Chambers, A.C., Leaper, D.J. Role of oxygen in wound healing: a review of evidence. *Journal of Wound Care*, **2011**, *20*, 160–164.
- [84] Gosain, A., DiPietro, L.A. Aging and wound healing. *World Journal of Surgery*, **2004**, *28*, 321–326.
- [85] Sgonc, R., Gruber, J. Age-related aspects of cutaneous wound healing: a mini-review. *Gerontology*, **2013**, *59*, 159–164.

- [86] Brown, K.L., Phillips, T.J. Nutrition and wound healing. *Clinics in Dermatology*, **2010**, 28, 432–439.
- [87] Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, **2013**, 117, 426–436.
- [88] Perino, S., Makerri, C., Abert Vian, M., Chemat, F. Extraction d'actifs cosmétiques. *Techniques de l'ingénieur*, **2016**, J2215 v1.
- [89] Argyropoulou, A., Aligiannis, N., Trougakos, I.P., Skaltsounis, A.-L. Natural compounds with anti-ageing activity. *Natural Product Reports*, **2013**, 30, 1412–1437.
- [90] Wolfender, J.-L., Nuzillard, J.-M., van der Hoof, J.J.J., Renault, J.-H., Bertrand, S. Accelerating metabolite identification in natural product research: toward an ideal combination of liquid chromatography–high-resolution tandem mass spectrometry and NMR profiling, *in silico* databases, and chemometrics. *Analytical Chemistry*, **2019**, 91, 704–742.
- [91] Tiwari, R., Rana, C.S. Plant secondary metabolites: a review. *International Journal of Engineering Research and General Science*, **2015**, 3, 10.
- [92] Norme ISO 4720 - AFNOR T75-005. *Association Française de Normalisation*, **2019**, T75-005.
- [93] Garnero, J. Huiles essentielles. *Techniques de l'ingénieur*, **1996**, K345 v1.
- [94] Burger, P., Plainfossé, H., Brochet, X., Chemat, F., Fernandez, X. Extraction of natural fragrance ingredients: history overview and future trends. *Chemistry & Biodiversity*, **2019**, 16, e1900424.
- [95] Fernandez, X., Chemat, F., Thi Kieu, T.D. *Les huiles essentielles - Vertus et applications*; Vuibert: Paris, **2015**; ISBN 978-2-311-01029-9.
- [96] Fernandez, X., Michel, T., Kerdudo, A. Conservateurs pour cosmétiques - Antioxydants et anti-UV. *Techniques de l'ingénieur*, **2012**, J2285 v1.
- [97] Scientific committee on consumer safety. The SCCS notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation, 9th revision, **2016**.
- [98] Süntar, I., Küpeli Akkol, E., Tosun, A., Keleş, H. Comparative pharmacological and phytochemical investigation on the wound healing effects of the frequently used essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, **2014**, 26, 41–49.
- [99] Fernandez, X., Chemat, F. *La chimie des huiles essentielles - Tradition et innovation*; Vuibert: Paris, **2012**; ISBN 978-2-311-01028-2.
- [100] Carson, C.F., Riley, T.V. Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Letters in Applied Microbiology*, **1993**, 16, 49–55.
- [101] Franchomme, P., Pénéol, D. *L'aromathérapie exactement*; Jollois Roger Eds.; Limoges, **2001**; ISBN 978-2-87819-001-4.
- [102] Tumen, I., Süntar, I., Keleş, H., Küpeli Akkol, E. A therapeutic approach for wound healing by using essential oils of *Cupressus* and *Juniperus* species growing in Turkey. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2012**, 2012, 1–7.
- [103] Abu-Al-Basal, M.A. Healing potential of *Rosmarinus officinalis* L. on full-thickness excision cutaneous wounds in alloxan-induced-diabetic BALB/c mice. *Journal of Ethnopharmacology*, **2010**, 131, 443–450.
- [104] Morin, O., Pagès-Xatart-Parès, X. Vegetable oils & fats: functional resources and nutritional interest. *Oilseeds and Fats*, **2012**, 19, 63–75.
- [105] Burlando, B., Verotta, L., Cornara, L., Bottini-Massa, E. *Herbal principles in cosmetics: Properties and mechanisms of action*; CRC Press: Boca Raton, **2010**; ISBN 978-0-429-09221-3.
- [106] Nayak, B.S., Raju, S.S., Chalapathi Rao, A.V. Wound healing activity of *Persea americana* (avocado) fruit: a preclinical study on rats. *Journal of Wound Care*, **2008**, 17, 123–125.
- [107] Shivananda Nayak, B., Dan Ramdath, D., Marshall, J.R., Isitor, G., Xue, S., Shi, J. Wound healing properties of the oils of *Vitis vinifera* and *Vaccinium macrocarpon*. *Phytotherapy Research*, **2011**, 25, 1201–1208.

- [108] Ranzato, E., Martinotti, S., Burlando, B. Wound healing properties of jojoba liquid wax: an *in vitro* study. *Journal of Ethnopharmacology*, **2011**, *134*, 443–449.
- [109] Smith, R.M. Before the injection-modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A*, **2003**, *1000*, 3–27.
- [110] Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K.M., Yoga Latha, L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, **2010**, *8*, 1–10.
- [111] Anastas, P., Warner, J. Green chemistry: theory and practice. In *Green chemistry: theory and practice*; Oxford University Press: New York, **1998**; p. 30 ISBN 978-0-19-850698-0.
- [112] Anastas, P.T., Zimmerman, J.B. Design through the 12 principles of green engineering. *Environmental Science & Technology*, **2003**, *37*, 94A-101A.
- [113] Chemat, F. *Eco-extraction du végétal: procédés innovants et solvants alternatifs*; Dunod: Paris, **2014**; ISBN 978-2-10-072209-9.
- [114] Herrero, M., Cifuentes, A., Ibañez, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by-products, algae and microalgae: a review. *Food Chemistry*, **2006**, *98*, 136–148.
- [115] Serra, A.T., Seabra, I.J., Braga, M.E.M., Bronze, M.R., de Sousa, H.C., Duarte, C.M.M. Processing cherries (*Prunus avium*) using supercritical fluid technology. Part 1: Recovery of extract fractions rich in bioactive compounds. *The Journal of Supercritical Fluids*, **2010**, *55*, 184–191.
- [116] Jovanović, A.A., Đorđević, V.B., Zdunić, G.M., Pljevljakušić, D.S., Šavikin, K.P., Gođevac, D.M., Bugarski, B.M. Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. *Separation and Purification Technology*, **2017**, *179*, 369–380.
- [117] Li, Y., Skouroumounis, G.K., Elsey, G.M., Taylor, D.K. Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. *Food Chemistry*, **2011**, *129*, 570–576.
- [118] Casanova, F., Santos, L. Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application – a review. *Journal of Microencapsulation*, **2016**, *33*, 1–17.
- [119] Caliskan, G., Nur Dirim, S. The effects of the different drying conditions and the amounts of maltodextrin addition during spray drying of sumac extract. *Food and Bioprocess Technology*, **2013**, *91*, 539–548.
- [120] Ezhilarasi, P.N., Indrani, D., Jena, B.S., Anandharamakrishnan, C. Microencapsulation of *Garcinia* fruit extract by spray drying and its effect on bread quality: effect of spray dried microencapsulates on bread quality characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2014**, *94*, 1116–1123.
- [121] Osbourn, A.E., Lanzotti, V. *Plant-derived natural products: synthesis, function, and application*; Springer: Dordrecht, New York, **2009**; ISBN 978-0-387-85497-7.
- [122] Ingle, K.P., Deshmukh, A.G., Padole, D.A., Khelurkar, V.C. Phytochemicals: extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, **2017**, *6*, 32–36.
- [123] US EPA, O. Separation techniques. In *MARLAP Manual and supporting documents*; Chapitre 14; **2015**; Vol. 2.
- [124] Coskun, O. Separation techniques: chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*, **2016**, *3*, 156–160.
- [125] Fan, X.-H., Cheng, Y.-Y., Ye, Z.-L., Lin, R.-C., Qian, Z.-Z. Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines. *Analytica Chimica Acta*, **2006**, *555*, 217–224.
- [126] Caude, M., Jardi, A. Chromatographie en phase liquide - Théorie et méthodes de séparation. *Techniques de l'ingénieur*, **1994**, P1455 v2.
- [127] Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D., Lightfoot, D. Phytochemicals: extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants*, **2017**, *6*, 42.

- [128] Bouville, A.-S., Scotto, C., Burger, P., Fernandez, X. Chromatographie en phase gazeuse Intuvo : une nouvelle technologie au service de l'analyse des composés odorants. *Spectra Analyse*, **2018**, 323, 53–59.
- [129] Shivatare, R.S., Nagore, D.H., Nipanikar, S.U. "HPTLC" an important tool in standardization of herbal medical product: a review. *Journal of Scientific and Innovative Research*, **2013**, 2, 1086–1096.
- [130] Bladt, S. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, **1996**; ISBN 978-3-642-00573-2.
- [131] Mondolot-Cosson, L., Andary, C., Dai, G.-H., Roussel, J.-L. Histolocalisation de substances phénoliques intervenant lors d'interactions plante-pathogène chez le tournesol et la vigne. *Acta Botanica Gallica*, **1997**, 144, 353–362.
- [132] Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J., Kowalska, T. *Thin layer chromatography in phytochemistry*; CRC Press: Boca Raton, **2008**; ISBN 978-1-4200-4678-6.
- [133] Morlock, G.E., Sabir, G. Comparison of two orthogonal methods for quantitation of sugars in food. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **2011**, 34, 902–919.
- [134] Ruppel, A., Morlock, G. Content of carbohydrates in tropical rainforest nectars of *Marantaceae* using high-performance thin-layer chromatography. *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, **2015**, 28, 162–166.
- [135] Kocourek, J., Tichá, M., Kostir, J. The use of diphenylamine-alanine-phosphoric acid reagent in the detection and differentiation of monosaccharides and their derivatives on paper chromatograms. *Journal of Chromatography*, **1966**, 24, 117–124.
- [136] Gerlach, A., Gadea, A., Silveira, R.M.B., Clerc, P., Dévéhat, F.L. The use of anisaldehyde sulfuric acid as an alternative spray reagent in TLC analysis reveals three classes of compounds in the genus *Usnea Adans* (Parmeliaceae, lichenized Ascomycota). *Preprints*, **2018**, doi:10.20944/preprints201802.0151.v1.
- [137] Pedan, D.V., Jedrys, K., Weber, C. HPTLC quantification of cocoa ingredients and their changes during different chocolate manufacturing steps. *Camag Bibliography Service*, **2018**, 120, 4.
- [138] Cummins, P.M., Rochfort, K.D., O'Connor, B.F. Ion-exchange chromatography: basic principles and application. In *Protein Chromatography: Methods and Protocols*; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, **2017**; pp. 209-223; ISBN 978-1-4939-6412-3.
- [139] Determann, H. *Gel chromatography, gel filtration, gel permeation, molecular sieves: a laboratory Handbook*; Springer: Berlin, Heidelberg, **1969**; ISBN 978-3-642-95082-7.
- [140] Sarker, S.D., Nahar, L. An introduction to natural products isolation. In *Natural Products Isolation*; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, **2012**; pp. 1-25; ISBN 978-1-61779-624-1.
- [141] Cote, G. Extraction liquide-liquide - Présentation générale. *Techniques de l'ingénieur*, **2017**, J2760 v2.
- [142] Simpson, N.J.K. *Solid-phase extraction: principles, techniques, and applications*; CRC Press; Dekker: New York, **2000**; ISBN 978-0-8247-0021-8.
- [143] Mamatha Rani, E., Shilpa, K., Umamaheswara Rao, V. Flash chromatography and its advancement: an overview. *International Journal of Pharmaceutical Research & Analysis*, **2014**, 4, 328–334.
- [144] Mahugo Santana, C., Sosa Ferrera, Z., Esther Torres Padrón, M., Juan Santana Rodríguez, J. Methodologies for the extraction of phenolic compounds from environmental samples: new approaches. *Molecules*, **2009**, 14, 298–320.
- [145] Marchal, L., Legrand, J., Foucault, A. Centrifugal partition chromatography: a survey of its history, and our recent advances in the field. *The Chemical Record*, **2003**, 3, 133–143.
- [146] Faure, K. Chromatographie de partage centrifuge - Principes et applications. *Techniques de l'ingénieur*, **2016**, P1496 v1.

- [147] Oka, F., Oka, H., Ito, Y. Systematic search for suitable two-phase solvent systems for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1991**, 538, 99–108.
- [148] Breton, R.C., Reynolds, W.F. Using NMR to identify and characterize natural products. *Natural Product Reports*, **2013**, 30, 501–524.
- [149] Dincheva, I., Badjakov, I., Kondakova, V., Dobson, P., McDougall, G., Stewart, D. Identification of the phenolic components in Bulgarian raspberry cultivars by LC-ESI-MSn. *International Journal of Agricultural Science and Research*, **2013**, 3, 127–137.
- [150] Ghosh, P.K., Gaba, A. Phyto-extracts in wound healing. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, **2013**, 16, 760–820.
- [151] Ribeiro, A., Estanqueiro, M., Oliveira, M., Sousa Lobo, J. Main benefits and applicability of plant extracts in skin care products. *Cosmetics*, **2015**, 2, 48–65.
- [152] Migdal, C., Serres, M. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Médecine/Sciences*, **2011**, 27, 405–412.
- [153] Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységu, L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, **2011**, 50, 586–621.
- [154] Balasaheb Nimse, S., Pal, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, **2015**, 5, 27986–28006.
- [155] Burger, P., Plainfossé, H., Fernandez, X. Actifs cosmétiques anti-pollution - Tests d'efficacité et formulations. *Techniques de l'ingénieur*, **2019**, J3007 v1.
- [156] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, **1995**, 28, 25–30.
- [157] Liyanaarachchi, G.D., Samarasekera, J.K.R.R., Mahanama, K.R.R., Hemalal, K.D.P. Tyrosinase, elastase, hyaluronidase, inhibitory and antioxidant activity of Sri Lankan medicinal plants for novel cosmeceuticals. *Industrial Crops and Products*, **2018**, 111, 597–605.
- [158] Pintus, F., Spanò, D., Corona, A., Medda, R. Anti-tyrosinase activity of *Euphorbia characias* extracts. *PeerJ*, **2015**, 3:e1305, doi : 10.7717/peerj.1305.
- [159] Burger, P., Landreau, A., Azoulay, S., Michel, T., Fernandez, X. Skin whitening cosmetics: feedback and challenges in the development of natural skin lighteners. *Cosmetics*, **2016**, 3, 24 p.
- [160] Fernandez, X., Michel, T., Azoulay, S. Actifs cosmétiques à effet blanchissant - Nature, efficacité et risques. *Techniques de l'ingénieur*, **2015**, J2300 v1.
- [161] Kim, Y.-J., Uyama, H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **2005**, 62, 1707–1723.
- [162] Thring, T.S., Hili, P., Naughton, D.P. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **2009**, 9, 11 p.
- [163] Baylac, S., Racine, P. Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts. *International Journal of Aromatherapy*, **2003**, 13, 138–142.
- [164] Onar, H.C., Yusufoglu, A., Turker, G., Yanardag, R. Elastase, tyrosinase and lipoxygenase inhibition and antioxidant activity of an aqueous extract from *Epilobium angustifolium* L. leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*, **2012**, 6, 716–726.
- [165] Nuñez, A., Foglia, T.A., Piazza, G.J. Characterization of lipoxygenase oxidation products by high-performance liquid chromatography with electron impact-mass spectrometric detection. *Lipids*, **2001**, 36, 851–856.
- [166] Losso, J.N., Munene, C.N., Bansode, R.R., Bawadi, H.A. Inhibition of matrix metalloproteinase-1 activity by the soybean Bowman-Birk inhibitor. *Biotechnology Letters*, **2004**, 26, 901–905.
- [167] Iswarya, S., Radhakrishnan, N., Kavitha, V., Mandal, A., Gnanamani, A. Collagenase inhibition activity of Indian medicinal plants: an approach to moderate collagen turnover. *International Journal of Bioassays*, **2014**, 3, 2075–2078.

- [168] Roy, A., Sahu, R.K., Matlam, M., Deshmukh, V.K., Dwivedi, J., Jha, A.K. *In vitro* techniques to assess the proficiency of skin care cosmetic formulations. *Pharmacognosy Reviews*, **2013**, *7*, 97–106.
- [169] McCook, J., Dorogi, P., Vasily, D., Cefalo, D. *In vitro* inhibition of hyaluronidase by sodium copper chlorophyllin complex and chlorophyllin analogs. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, **2015**, *8*, 443–448.
- [170] Neuman, M.G., Nanau, R.M., Oruña-Sanchez, L., Coto, G. Hyaluronic acid and wound healing. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, **2015**, *18*, 53–60.
- [171] Girish, K., Kemparaju, K., Nagaraju, S., Vishwanath, B. Hyaluronidase inhibitors: a biological and therapeutic perspective. *Current Medicinal Chemistry*, **2009**, *16*, 2261–2288.
- [172] Oueslati, N., Leblanc, P., Harscoat-Schiavo, C., Rondags, E., Meunier, S., Kapel, R., Marc, I. CTAB turbidimetric method for assaying hyaluronic acid in complex environments and under cross-linked form. *Carbohydrate Polymers*, **2014**, *112*, 102–108.
- [173] Chen, Y.-H., Wang, Q. Establishment of CTAB turbidimetric method to determine hyaluronic acid content in fermentation broth. *Carbohydrate Polymers*, **2009**, *78*, 178–181.
- [174] Araújo, L.U., Grabe-Guimarães, A., Mosqueira, V.C.F., Carneiro, C.M., Silva-Barcellos, N.M. Profile of wound healing process induced by allantoin. *Acta Cirurgica Brasileira*, **2010**, *25*, 460–461.
- [175] Pazyar, N., Yaghoobi, R., Rafiee, E., Mehrabian, A., Feily, A. Skin wound healing and phytomedicine: a review. *Skin Pharmacology and Physiology*, **2014**, *27*, 303–310.
- [176] Yaman, I., Derici, H., Kara, C., Kamer, E., Diniz, G., Ortac, R., Sayin, O. Effects of resveratrol on incisional wound healing in rats. *Surgery Today*, **2013**, *43*, 1433–1438.
- [177] Georgescu, M., Marinas, O., Popa, M., Stan, T., Lazar, V., Bertesteanu, S.V., Chifiriuc, M.C. *Natural compounds for wound healing; Worldwide wound healing - innovation in natural and conventional methods; InTech*, **2016**; ISBN 978-953-51-2805-2.
- [178] Daburkar, M., Lohar, V., Rathore, A.S., Bhutada, P., Tangadpaliwar, S. An *in vivo* and *in vitro* investigation of the effect of *Aloe vera* gel ethanolic extract using animal model with diabetic foot ulcer. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, **2014**, *6*, 205–212.
- [179] Akkol, E.K., Süntar, I., Orhan, I.E., Keles, H., Kan, A., Çoksari, G. Assessment of dermal wound healing and *in vitro* antioxidant properties of *Avena sativa* L. *Journal of Cereal Science*, **2011**, *53*, 285–290.
- [180] Sowa, I., Paduch, R., Strzemiński, M., Zielińska, S., Rydzik-Strzemska, E., Sawicki, J., Kocjan, R., Polkowski, J., Matkowski, A., Latalski, M., et al. Proliferative and antioxidant activity of *Symphytum officinale* root extract. *Natural Product Research*, **2018**, *32*, 605–609.
- [181] Kimura, Y., Sumiyoshi, M., Kawahira, K., Sakanaka, M. Effects of ginseng saponins isolated from *Red Ginseng* roots on burn wound healing in mice. *British Journal of Pharmacology*, **2006**, *148*, 860–870.
- [182] Maver, T., Maver, U., Stana Kleinschek, K., Smrke, D.M., Kreft, S. A review of herbal medicines in wound healing. *International Journal of Dermatology*, **2015**, *54*, 740–751.
- [183] Wu, F., Bian, D., Xia, Y., Gong, Z., Tan, Q., Chen, J., Dai, Y. Identification of major active ingredients responsible for burn wound healing of *Centella asiatica* herbs. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2012**, *2012*, 13 p.
- [184] Xu, L., Choi, T.H., Kim, S., Kim, S.-H., Chang, H.W., Choe, M., Kwon, S.Y., Hur, J.A., Shin, S.C., Chung, J.I., et al. Anthocyanins from black soybean seed coat enhance wound healing. *Annals of Plastic Surgery*, **2013**, *71*, 415–420.
- [185] Parente, L.M.L., Lino Júnior, R. de S., Tresvenzol, L.M.F., Vinaud, M.C., de Paula, J.R., Paulo, N.M. Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of *Calendula officinalis* L. growing in Brazil. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, **2012**, 375671, 7 p.

- [186] Chen, X., Wu, X., Chai, W., Feng, H., Shi, Y., Zhou, H., Chen, Q. Optimization of extraction of phenolics from leaves of *Ficus virens*. *Journal of Zhejiang University - Science B*, **2013**, *14*, 903–915.
- [187] Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Jakobek, L., Šeruga, M. Influence of solvent and temperature on extraction of phenolic compounds from grape seed, antioxidant activity and colour of extract. *International Journal of Food Science & Technology*, **2009**, *44*, 2394–2401.
- [188] Aris, N.I.A., Morad, N.A.M. Effect of extraction time on degradation of bioactive compounds (*Zingiber Officinale* Roscoe). *Jurnal Teknologi*, **2014**, *67*, 63–66.
- [189] Plainfossé, H., Burger, P., Verger-Dubois, G., Fernandez, X. Eco-conception of an anti-age ingredient based on *Quercus pubescens* Willd. leaves extract. *Household and Personal Care Today*, **2018**, *13*, 5 p.
- [190] Tison, J.-M., Foucault, B. de, Guiol, F. *Flora Gallica : flore de France*; Biotope Éditions: Mèze, **2014**; ISBN 978-2-36662-012-2.
- [191] INPN - Inventaire National du Patrimoine Naturel, Available online: <https://inpn.mnhn.fr/accueil/index> (accessed on Oct 12, 2019).
- [192] Novaretti, R., Lemordant, D. Plants in the traditional medicine of the Ubaye valley. *Journal of Ethnopharmacology*, **1990**, *30*, 1–34.
- [193] Vainoriene, R. Floristic structure of mountain plants collection and the present situation in botanical garden of Siauliai University. *Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis*, **2010**, *10*, 165–172.
- [194] Natura 2000. *Connaissance et gestion des habitats et des espèces d'intérêt communautaire - Habitats rochers*; Documentation française: Paris, **2004**; Vol. 5; ISBN 978-2-11-005245-2.
- [195] eFlore – Tela Botanica - *Teucrium lucidum* L., Available online: <https://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-67385-synthese> (accessed on Nov 5, 2018).
- [196] Julve, P. Listes départementales des plantes de France. Version 2018.04 du 24 avril 2018. Programme chorologie départementale de Tela Botanica. **2018**.
- [197] UICN France, FCBN, AFB & MNHN Flore vasculaire de France métropolitaine. In *La liste rouge des espèces menacées en France*; **2018**.
- [198] Bruneton, J. *Plantes toxiques : végétaux dangereux pour l'Homme et les animaux*; 3rd edition.; Tec & doc: Paris, **2010**; ISBN 978-2-7430-0806-2.
- [199] Nencini, C., Galluzzi, P., Pippi, F., Menchiari, A., Micheli, L. Hepatotoxicity of *Teucrium chamaedrys* L. decoction: role of difference in the harvesting area and preparation method. *Indian Journal of Pharmacology*, **2014**, *46*, 181–184.
- [200] Bruno, M., Piozzi, F., Rodriguez, B., Savona, G., Servettaz, O. Ent-clerodane diterpenoids from six further species of *Teucrium*. *Phytochemistry*, **1985**, *24*, 2597–2599.
- [201] Johansson, S., Göransson, U., Luijendijk, T., Backlund, A., Claeson, P., Bohlin, L. A neutrophil multitarget functional bioassay to detect anti-inflammatory natural products. *Journal of Natural Products*, **2002**, *65*, 32–41.
- [202] Michel, T., Destandau, E., Pecher, V., Renimel, I., Pasquier, L., André, P., Elfakir, C. Two-step centrifugal partition chromatography (CPC) fractionation of *Butea monosperma* (Lam.) biomarkers. *Separation and Purification Technology*, **2011**, *80*, 32–37.
- [203] Brassuer, T., Angenot, L. Le mélange diphénylborate d'aminoéthanol - PEG 400 : un intéressant réactif de révélation des flavonoïdes. *Journal of Chromatography A*, **1986**, *351*, 351–355.
- [204] Canadanovic-Brunet, J.M., Djilas, S.M., Cetkovic, G.S., Tumbas, V.T., Mandic, A.I., Canadanovic, V.M. Antioxidant activities of different *Teucrium montanum* L. extracts. *International Journal of Food Science and Technology*, **2006**, *41*, 667–673.
- [205] Vlase, L., Benedec, D., Hanganu, D., Damian, G., Csillag, I., Sevastre, B., Mot, A., Silaghi-Dumitrescu, R., Tilea, I. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities and phenolic profile for *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum* and *Teucrium chamaedrys*. *Molecules*, **2014**, *19*, 5490–5507.

- [206] Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A.A., Khan, G.J., Shumzaid, M., Ahmad, F., Babazadeh, D., FangFang, X., Modarresi-Ghazani, F., et al. Chlorogenic acid (CGA): a pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **2018**, *97*, 67–74.
- [207] Reich, E., Schibli, A., Widmer, V., Jorns, R., Wolfram, E., DeBatt, A. HPTLC methods for identification of green tea and green tea extract. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **2006**, *29*, 2141–2151.
- [208] Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Russo, A., Maggio, A., Piozzi, F. Chemical composition of the essential oil of *Teucrium flavum* ssp *flavum* from Zakynthos, Greece. *Records of Natural Products*, **2012**, *6*, 306–310.
- [209] Weast, R.C., Lide, D.L. *Handbook of chemistry and physics*; 70th edition.; CRC Press: Boca Raton, **1989**; ISBN 978-0-8493-0470-5.
- [210] de Villiers, A., Lynen, F., Crouch, A., Sandra, P. Development of a solid-phase extraction procedure for the simultaneous determination of polyphenols, organic acids and sugars in wine. *Chromatographia*, **2004**, *59*, 403–409.
- [211] Istasse, T., Jacquet, N., Berchem, T., Haubruge, E., Nguyen, B.K., Richel, A. Extraction of honey polyphenols: method development and evidence of cis isomerization. *Analytical Chemistry Insights*, **2016**, *11*, 49–57.
- [212] Morteza-Semnani, K., Saeedi, M., Akbarzadeh, M. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Teucrium hyrcanicum* L. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **2011**, *14*, 770–775.
- [213] Özel, M.Z., Göğüş, F., Lewis, A.C. Determination of *Teucrium chamaedrys* volatiles by using direct thermal desorption – comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2006**, *1114*, 164–169.
- [214] Özek, G., Özek, T., Dinç, M., Doğu, S., Başer, K.H.C. Chemical diversity of volatiles of *Teucrium orientale* L. var. *orientale*, var. *puberulens*, and var. *glabrescens*, determined by simultaneous GC/FID and GC-MS techniques. *Chemistry & Biodiversity*, **2012**, *9*, 1144–1154.
- [215] Saeed, N.M., El-Demerdash, E., Abdel-Rahman, H.M., Algandaby, M.M., Al-Abbasi, F.A., Abdel-Naim, A.B. Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2012**, *264*, 84–93.
- [216] Passannanti, S., Paternostro, M., Piozzi, F. Triterpene acids from *Salvia* and *Teucrium* species. *Phytochemistry*, **1983**, *22*, 1044–1045.
- [217] Rizvi, T.S., Hussain, I., Ali, L., Mabood, F., Khan, A.L., Shujah, S., Rehman, N.U., Al-Harrasi, A., Hussain, J., Khan, A., et al. New gorgonane sesquiterpenoid from *Teucrium mascatense* Boiss, as  $\alpha$ -glucosidase inhibitor. *South African Journal of Botany*, **2019**, *124*, 218–222.
- [218] Michel, P., Owczarek, A., Matczak, M., Kosno, M., Szymański, P., Mikiciuk-Olasik, E., Kilanowicz, A., Wesolowski, W., Olszewska, M.A. Metabolite profiling of eastern teaberry (*Gaultheria procumbens* L.) lipophilic leaf extracts with hyaluronidase and lipoxigenase inhibitory activity. *Molecules*, **2017**, *22*, 16 p.
- [219] Byeon, S.-H., Lee, N.H. Triterpenes from *Meliosma oldhamii* Miquel branches and their elastase inhibitory activities. *Records of Natural Products*, **2015**, *9*, 576–579.
- [220] Gilabert, M., Marcinkevicius, K., Andujar, S., Schiavone, M., Arena, M.E., Bardón, A. Sesqui- and triterpenoids from the liverwort *Lepidozia chordulifera* inhibitors of bacterial biofilm and elastase activity of human pathogenic bacteria. *Phytomedicine*, **2015**, *22*, 77–85.
- [221] Sun, H.H., Kaplita, P.V., Houck, D.R., Stawicki, M.B., McGarry, R., Wahl, R.C., Gillum, A.M., Cooper, R. A metalloproteinase inhibitor from *Doliocarpus verruculosus*. *Phytotherapy Research*, **1996**, *10*, 194–197.
- [222] Dictionary of Natural Products 27.2, Available online: <http://dnp.chemnetbase.com/faces/chemical/ChemicalSearch.xhtml?jsessionid=32DAEC9561E03356A52B44E1CD81229D> (accessed on Feb 22, 2019).

- [223] Bertrand, S., Guitton, Y., Roullier, C. Successes and pitfalls in automated dereplication strategy using liquid chromatography coupled to mass spectrometry data: A CASMI 2016 experience. *Phytochemistry letters*, **2017**, *21*, 297–305.
- [224] Bertrand, S., Roullier, C., Guitton, Y. Successes and pitfalls in automated dereplication strategy using mass spectrometry data: a CASMI experience. *Current Metabolomics*, **2017**, *5*, 25–34.
- [225] Smith, C., Tautenhahn, R., Neumann, S. xcms, Available online: <https://bioconductor.org/packages/xcms> (accessed on Apr 10, 2019).
- [226] Tautenhahn, R., Böttcher, C., Neumann, S. Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. *BMC Bioinformatics*, **2008**, *9*, 16 p.
- [227] Kuhl, C., Tautenhahn, R., Böttcher, C., Larson, T.R., Neumann, S. CAMERA: an integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets. *Analytical Chemistry*, **2012**, *84*, 283–289.
- [228] Lehrstuhl Bioinformatik Jena. SIRIUS, Available online: <https://bio.informatik.uni-jena.de/software/sirius/> (accessed on Feb 22, 2019).
- [229] Böcker, S., Letzel, M.C., Lipták, Z., Pervukhin, A. SIRIUS: decomposing isotope patterns for metabolite identification. *Bioinformatics*, **2009**, *25*, 218–224.
- [230] Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI), Available online: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/> (accessed on May 14, 2019).
- [231] KNApSACk Available online: <http://www.knapsackfamily.com/KNApSACk/> (accessed on May 14, 2019).
- [232] The Universal Natural Products Database (UNPD), Available online: <http://pkuxj.pku.edu.cn/UNPD/introduction.php>.
- [233] Rutz, A., Dounoue-Kubo, M., Ollivier, S., Bisson, J., Bagheri, M., Saesong, T., Nejad Ebrahimi, S., Ingkaninan, K., Wolfender, J.-L., Allard, P.-M. Taxonomically informed scoring enhances confidence in natural products annotation. *bioRxiv* **2019**.
- [234] Chamberlain, S.A., Szöcs, E. Taxize: taxonomic search and retrieval in R. *F1000Research*, **2013**, *2*, 30 p.
- [235] Allard, P.-M., Péresse, T., Bisson, J., Gindro, K., Marcourt, L., Pham, V.C., Roussi, F., Litaudon, M., Wolfender, J.-L. Integration of molecular networking and *in silico* MS/MS fragmentation for natural products dereplication. *Analytical Chemistry*, **2016**, *88*, 3317–3323.
- [236] Roullier, C., Bertrand, S., Blanchet, E., Peigné, M., Robiou du Pont, T., Guitton, Y., Pouchus, Y., Grovel, O. Time dependency of chemodiversity and biosynthetic pathways: an LC-MS metabolomic study of marine-sourced penicillium. *Marine Drugs*, **2016**, *14*, 15 p.
- [237] Ulubelen, A., Topcu, G., Kaya, Ü. Steroidal compounds from *Teucrium chamaedrys* subsp. *chamaedrys*. *Phytochemistry*, **1994**, *36*, 171–173.
- [238] Barberán, F.A.T., Gil, M.I., Tomás, F., Ferreres, F., Arques, A. Flavonoid aglycones and glycosides from *Teucrium gnaphalodes*. *Journal of Natural Products*, **1985**, *48*, 859–860.
- [239] Esmaeili, M., Zohari, F., Sadeghi, H. Antioxidant and protective effects of major flavonoids from *Teucrium polium* on  $\beta$ -cell destruction in a model of streptozotocin-induced diabetes. *Planta Medica*, **2009**, *75*, 1418–1420.
- [240] Simmonds, M.S.J., Blaney, W.M., Ley, S.V., Savona, G., Bruno, M., Rodriguez, B. The antifeedant activity of clerodane diterpenoids from *Teucrium*. *Phytochemistry*, **1989**, *28*, 1069–1071.
- [241] Papanov, G., Malakov, P. 2-keto-19-hydroxyteuscordin, a neo-clerodane diterpene from *Teucrium scordium*. *Phytochemistry*, **1985**, *24*, 297–299.
- [242] Demarque, D.P., Crotti, A.E.M., Vessecci, R., Lopes, J.L.C., Lopes, N.P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Natural Product Reports*, **2016**, *33*, 432–455.

- [243] Turek, C., Stintzing, F.C. Stability of essential oils: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2013**, *12*, 40–53.
- [244] Reid, K.A., Jäger, A.K., van Staden, J. Isolation of the anti-bacterial vernodalin from traditionally used *Vernonia colorata*. *South African Journal of Botany*, **2001**, *67*, 71–73.
- [245] Simoes, F., Rodríguez, B., Bruno, M., Piozzi, F., Savona, G., Arnold, N.A. Neoclerodane diterpenoids from *Teucrium kotschyianum*. *Phytochemistry*, **1989**, *28*, 2763–2768.
- [246] Zhi-Daz, M., Ning, X., Pei, Z., Shou-Xun, Z., Shu-Chong, W., Qi-Tai, Z. A neo-O-clerodane diterpene from *Teucrium japonicum*. *Phytochemistry*, **1991**, *30*, 4175–4177.
- [247] Venditti, A., Frezza, C., Trancanella, E., Zadeh, S.M.M., Foddai, S., Sciubba, F., Delfini, M., Serafini, M., Bianco, A. A new natural neo-clerodane from *Teucrium polium* L. collected in Northern Iran. *Industrial Crops and Products*, **2017**, *97*, 632–638.
- [248] Kisiel, W., Piozzi, F., Grzybek, J. Terpenoids from *Teucrium montanum* subsp. *pannonicum*. *Planta Medica*, **1995**, *61*, 191–192.
- [249] Proestos, C., Sereli, D., Komaitis, M. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chemistry*, **2006**, *95*, 44–52.
- [250] Node, M., Sai, M., Fujita, E. Isolation of the diterpenoid teuflin (6-epiteucvin) from *Teucrium viscidum* var. *miquelianum*. *Phytochemistry*, **1981**, *20*, 757–760.
- [251] Rodríguez, B., Jimeno, M.L. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectral assignments and conformational analysis of 14 19-*nor*-neoclerodane diterpenoids. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **2004**, *42*, 605–616.
- [252] Savona, G., Paternostro, M.P., Piozzi, F., Hanson, J.R., Hitchcock, P.B., Thomas, S.A. The structure of teuflin, a diterpenoid from *Teucrium flavum*; X-ray crystallographic and spectroscopic determination. *Journal of the Chemical Society, Perkin transactions 1*, **1979**, 1915–1917.
- [253] Krishna Kumari, G.N., Aravind, S., Balachandran, J., Ganesh, M.R., Soundarya Devi, S., Rajan, S.S., Malathi, R., Ravikumar, K. Antifeedant neo-clerodanes from *Teucrium tomentosum* Heyne. (Labiatae). *Phytochemistry*, **2003**, *64*, 1119–1123.
- [254] Bedir, E., Manyam, R., Khan, I.A. Neo-clerodane diterpenoids and phenylethanoid glycosides from *Teucrium chamaedrys* L. *Phytochemistry*, **2003**, *63*, 977–983.
- [255] Lv, H., Luo, J., Zhu, M., Shan, S., Kong, L. Teucvisins A–E, five new neo-clerodane diterpenes from *Teucrium viscidum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **2014**, *62*, 472–476.
- [256] Guo, X., Chen, X., Li, L., Shen, Z., Wang, X., Zheng, P., Duan, F., Ma, Y., Bi, K. LC–MS determination and pharmacokinetic study of six phenolic components in rat plasma after taking traditional chinese medicinal-preparation: guanxinning lyophilized powder for injection. *Journal of Chromatography B*, **2008**, *873*, 51–58.
- [257] Pauli, G.F., Kuczkowiak, U., Nahrstedt, A. Solvent effects in the structure dereplication of caffeoyl quinic acids. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **1999**, *37*, 827–836.
- [258] Garayev, E., Di Giorgio, C., Herbette, G., Mabrouki, F., Chiffolleau, P., Roux, D., Sallanon, H., Ollivier, E., Elias, R., Baghdikian, B. Bioassay-guided isolation and UHPLC-DAD-ESI-MS/MS quantification of potential anti-inflammatory phenolic compounds from flowers of *Inula montana* L. *Journal of Ethnopharmacology*, **2018**, *226*, 176–184.
- [259] Foo, L.Y., Lu, Y., Molan, A.L., Woodfield, D.R., McNabb, W.C. The phenols and prodelphinidins of white clover flowers. *Phytochemistry*, **2000**, *54*, 539–548.
- [260] Shrestha, S., Lee, D.-Y., Park, J.-H., Cho, J.-G., Lee, D.-S., Li, B., Kim, Y.-C., Kim, G.-S., Bang, M.-H., Baek, N.-I. Phenolic components from *Rhus parviflora* fruits and their inhibitory effects on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *Natural Product Research*, **2013**, *27*, 2244–2247.
- [261] Syed, A.S., Jeon, J.-S., Kim, C.Y. A new diacetylated flavonol triglycoside from the aerial parts of *Actinidia polygama*. *Natural Product Research*, **2017**, *31*, 1501–1508.
- [262] Ravikumar, S., Raja, M., Gnanadesigan, M. Antibacterial potential of benzoate and phenylethanoid derivatives isolated from *Acanthus ilicifolius* L. leaf extracts. *Natural Product Research*, **2012**, *26*, 2270–2273.

- [263] Al-Shammari, L.A., Hassan, W.H.B., Al-Youssef, H.M. Phytochemical and biological studies of *Carduus pycnocephalus* L. *Journal of Saudi Chemical Society*, **2015**, *19*, 410–416.
- [264] Park, H.Y. Aldose reductase inhibitors from the leaves of *Salix hulteni*. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, **2009**, *52*, 493–497.
- [265] de Santos Galíndez, J., Diaz-Lanza, A.M., Matellano, L.F., Sánchez, A.R. A new phenylpropanoid glycoside isolated from *Scrophularia scorodonia* L. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **2000**, *38*, 688–691.
- [266] Pasdaran, A., Hamed, A. The genus *Scrophularia*: a source of iridoids and terpenoids with a diverse biological activity. *Pharmaceutical Biology*, **2017**, *55*, 2211–2233.
- [267] Hammami, S., El Mokni, R., Faidi, K., Falconieri, D., Piras, A., Procedda, S., Mighri, Z., El Aouni, M.H. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from aerial parts of *Teucrium flavum* L. subsp. *flavum* growing spontaneously in Tunisia. *Natural Product Research*, **2015**, *29*, 2336–2340.
- [268] Djabou, N., Battesti, M.-J., Allali, H., Desjobert, J.-M., Varesi, L., Costa, J., Muselli, A. Chemical and genetic differentiation of corsican subspecies of *Teucrium flavum* L. *Phytochemistry*, **2011**, *72*, 1390–1399.
- [269] Radulović, N., Dekić, M., Joksović, M., Vukićević, R. Chemotaxonomy of serbian *Teucrium* species inferred from essential oil chemical composition: the case of *Teucrium scordium* L. ssp. *scordioides*. *Chemistry & Biodiversity*, **2012**, *9*, 106–122.
- [270] Pi, K., Zhang, Q.-J., Mou, M.-Y., Bai, S., Chen, Q., Yao, R.-J. Study on liposoluble constituents of *Teucrium labiosum*. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, **2008**, *31*, 1003–1005.
- [271] Winter, R. *A consumer's dictionary of cosmetic ingredients - Complete information about the harmful and desirable ingredients found in cosmetics and cosmeceuticals*; Health & Fitness; 7th Edition.; Potter/Ten Speed/Harmony/Rodale: Berkeley, California, USA, **2009**; ISBN 978-0-307-45986-2.
- [272] Fernandez, X., Merck, F., Kerdudo, A. Conservateurs pour cosmétiques - Généralités et conservateurs antimicrobiens. *Techniques de l'ingénieur*, **2012**, *J 2284 v1*.
- [273] Anisuzzaman, S.M., Bono, A., Krishnaiah, D., Hussin, N.A. Decolorization of low molecular compounds of Seaweed by using activated carbon. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, **2014**, *5*, 100–103.
- [274] Azeez, O.S. Decolourization of gum arabic using activated charcoal. *Journal of Science*, **2005**, *7*, 23–32.
- [275] Ren, J.-N., Zhang, Y., Fan, G., Wang, M.-P., Zhang, L.-L., Yang, Z.-Y., Pan, S.-Y. Study on the optimization of the decolorization of orange essential oil. *Food Science and Biotechnology*, **2018**, *27*, 929–938.
- [276] CIE Colorimetry - Part 4: CIE 1976 L\*a\*b\* Colour space. *CIE Central Bureau: Vienna, Austria*, **2007**.
- [277] Rhein, L., O'Lenick, A., Schlossman, M., Somasundaran, P. *Surfactants in personal care products and decorative cosmetics*; Surfactant Science Series; 3rd edition.; CRC Press: Boca Raton, **2007**; ISBN 978-1-57444-531-2.
- [278] OCDE, Essai n° 129 : Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests **2010**.
- [279] United Nations *Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals: GHS*; 4th revised edition.; New York and Geneva, **2011**; ISBN 978-92-1-117042-9.
- [280] OCDE, Essai n° 439 : Irritation cutanée *in vitro* : essai sur épiderme humain reconstitué **2010**.
- [281] OCDE, Essai n° 492 : Méthode d'essai sur modèle d'épithélium cornéen humain reconstitué pour l'identification de produits chimiques ne nécessitant aucune classification ni étiquetage pour irritation oculaire ou lésions oculaires graves **2019**.
- [282] Apostol, E.N., Dinu, C.G., Apostol, B., Ciuvăţ, A.L., Lorent, A., Pleşca, I., Postolache, D., Leca, Ş., Enescu, C.M. Importance of pubescent oak (*Quercus pubescens* Willd.) for Romanian forests in the context of climate change. *Revista de Silvicultură și Cinegetică*, **2016**, *21*, 29–33.

- [283] *Quercus pubescens* - EUFORGEN European forest genetic resources programme, Available online: <http://www.euforgen.org/species/quercus-pubescens/> (accessed on Dec 14, 2018).
- [284] Sourzat, P. Truffle cultivation in the south of France: technical progress and prospects. *Scientia Fungorum*, **2018**, *46*, 63–72.
- [285] UL Prospector, Available online: <https://www.ulprospector.com/en/eu/PersonalCare>.
- [286] Commission d'études des ennemis des arbres, des bois abattus et des bois mis en oeuvre, Les blessures des arbres. *Ministère de l'agriculture*, **1929**, *Bulletin n°25*.
- [287] Yang, L., Wen, K.-S., Ruan, X., Zhao, Y.-X., Wei, F., Wang, Q. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*, **2018**, *23*, 26 p.
- [288] Engel, R., Gülz, P.-G., Herrmann, T., Nahrstedt, A. Glandular trichomes and the volatiles obtained by steam distillation of *Quercus robur* leaves. *Zeitschrift für Naturforschung C*, **1993**, *48c*, 736–744.
- [289] Pérez-Coello, M.S., Sanz, J., Cabezudo, M.D. Determination of volatile compounds in hydroalcoholic extracts of French and American oak wood. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1999**, *50*, 162–165.
- [290] Jordão, A.M., Ricardo-da-Silva, J.M., Laureano, O., Adams, A., Demyttenaere, J., Verhé, R., Kimpe, N.D. Volatile composition analysis by solid-phase microextraction applied to oak wood used in cooperage *Quercus pyrenaica* and *Quercus petraea*: effect of botanical species and toasting process. *Journal of Wood Science*, **2006**, *52*, 514–521.
- [291] Palma-Fleming, H.A., Kepner, R.E. Volatile components of California live oak *Quercus agrifolia*. *Phytochemistry*, **1983**, *22*, 1503–1505.
- [292] Kameoka, H., Tsujino, H., Aso, Y. Constituents of essential oil of leaves of *Quercus dentata* Thunb. *Nippon Nōgeikagaku Kaishi*, **1983**, *57*, 135–138.
- [293] Mosedale, J.R., Feuillat, F., Baumes, R., Dupouey, J.-L., Puech, J.-L. Variability of wood extractives among *Quercus robur* and *Quercus petraea* trees from mixed stands and their relation to wood anatomy and leaf morphology. *Canadian Journal of Forest Research*, **1998**, *28*, 994–1006.
- [294] Fengel, D., Wegener, G. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*; Walter de Gruyter.; Berlin, **1983**; ISBN 978-3-11-083965-4.
- [295] Gul, F., Khan, K.M., Adhikari, A., Zafar, S., Akram, M., Khan, H., Saeed, M. Antimicrobial and antioxidant activities of a new metabolite from *Quercus incana*. *Natural Product Research*, **2017**, *31*, 1901–1909.
- [296] Chauhan, S., Singh, M., Kumar, A. Isolation and characterization of selected secondary metabolites from dry leaves of *Quercus semicarpifolia*. *Indian Journal of Chemistry-B*, **2004**, *43B*, 223–226.
- [297] Rocha, S., Coimbra, M., Delgadillo, I. Occurrence of furfuraldehydes during the processing of *Quercus suber* L. cork. Simultaneous determination of furfural, 5-hydroxymethylfurfural and 5-methylfurfural and their relation with cork polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, **2004**, *56*, 287–293.
- [298] Lorenz, P., Heinrich, M., Garcia-Käufer, M., Grunewald, F., Messerschmidt, S., Herrick, A., Gruber, K., Beckmann, C., Knoedler, M., Huber, R., et al. Constituents from oak bark (*Quercus robur* L.) inhibit degranulation and allergic mediator release from basophils and mast cells *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*, **2016**, *194*, 642–650.
- [299] Grzesik, M., Naparło, K., Bartosz, G., Sadowska-Bartosz, I. Antioxidant properties of catechins: comparison with other antioxidants. *Food Chemistry*, **2018**, *241*, 480–492.
- [300] Choi, J.-H., Chai, Y.-M., Joo, G.-J., Rhee, I.-K., Lee, I.-S., Kim, K.-R., Choi, M.-S., Rhee, S.-J. Effects of green tea catechin on polymorphonuclear leukocyte 5'-lipoxygenase activity, leukotriene B<sub>4</sub> synthesis and renal damage in diabetic rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*, **2004**, *48*, 151–155.
- [301] Khan, M.K., Abert Vian, M., Fabiano-Tixier, A.-S., Dangles, O., Chemat, F. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, **2010**, *119*, 851–858.

- [302] Chew, K., Khoo, M., Ng, S., Thoo, Y., Wan Aida, W., Ho, C. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *International Food Research Journal*, **2011**, *18*, 571–578.
- [303] Grisel, M., Savary, G., Aimonetti, J.-M., Baligan, A. *Matières premières cosmétiques - Ingrédients sensoriels*; Tec & Doc Lavoisier.; Paris, **2017**; ISBN 978-2-7430-2249-5.
- [304] Büchi, Protection of bioactive oils using encapsulation. **2017**, *302/2017*.
- [305] Mayer, P. L'agrobiodiversité fruitière du Verdon : ethnologie et histoire **2018**.
- [306] Lenchyk, L.V. Determination of phenolic compounds in *Prunus domestica* leaves extract. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*, **2016**, *2*, 31–35.
- [307] Stierlin, E., Azoulay, S., Massi, L., Fernandez, X., Michel, T. Cosmetic potentials of *Prunus domestica* L. leaves. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2018**, *98*, 726–736.
- [308] Zhu, J., Wang, Z., Zhu, T. *Prunus mume* leaf extract, preparation method and application thereof, CN105902440, **2016**.
- [309] Shimizu, K. Composition containing *Prunus persica* extract, JP2018016599 **2018**.
- [310] Mediani, A., Abas, F., Tan, C., Khatib, A. Effects of different drying methods and storage time on free radical scavenging activity and total phenolic content of *Cosmos caudatus*. *Antioxidants*, **2014**, *3*, 358–370.
- [311] Pino, J.A., Quijano, C.E. Study of the volatile compounds from plum (*Prunus domestica* L. cv. Horvin) and estimation of their contribution to the fruit aroma. *Food Science and Technology*, **2012**, *32*, 76–83.
- [312] Mahmood, A., Ifzal, R., Kosar, S. Phytochemical screening and biological activities of the oil components of *Prunus domestica* Linn. *Journal of Saudi Chemical Society*, **2009**, *13*, 273–277.
- [313] Mehta, S., Soni, N., Satpathy, G., Gupta, R. Evaluation of nutritional, phytochemical, antioxidant and antibacterial activity of dried plum (*Prunus domestica*). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, **2014**, *3*, 166–171.
- [314] Sharma, Y., Jeyabalan, G., Singh, R. Potential wound healing agents from medicinal plants : a review. *Pharmacologia*, **2013**, *4*, 349–358.
- [315] Alma, M.H., Karaogul, E., Ertas, M., Altuntas, E., Karaman, S., Diraz, E. Chemical composition of seed oil from Turkish *Prunus mahaleb* L. *Analytical Chemistry Letters*, **2012**, *2*, 182–185.
- [316] Sharma, S., Satpathy, G. Nutritional, phytochemical, antioxidant and antimicrobial activity of *Prunus armenicus*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, **2014**, *3*, 23–28.
- [317] Marchelak, A., Owczarek, A., Matczak, M., Pawlak, A., Kolodziejczyk-Czepas, J., Nowak, P., Olszewska, M.A. Bioactivity potential of *Prunus spinosa* L. flower extracts: phytochemical profiling, cellular safety, pro-inflammatory enzymes inhibition and protective effects against oxidative stress *in vitro*. *Frontiers in Pharmacology*, **2017**, *8*, 15 p.
- [318] Olszewska, M., Wolbiś, M. Flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **2001**, *58*, 367–372.
- [319] Čechovská, L., Cejpek, K., Konečný, M., Velíšek, J. On the role of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-(4H)-pyran-4-one in antioxidant capacity of prunes. *European Food Research and Technology*, **2011**, *233*, 367–376.
- [320] Jerković, I., Marijanović, Z., Staver, M.M. Screening of natural organic volatiles from *Prunus mahaleb* L. honey: coumarin and vomifoliol as nonspecific biomarkers. *Molecules*, **2011**, *16*, 2507–2518.
- [321] Karioti, A., Bilia, A.R., Skaltsa, H. *Quercus ilex* L.: a rich source of polyacylated flavonoid glucosides. *Food Chemistry*, **2010**, *123*, 131–142.
- [322] Venter, A., Joubert, E., De Beer, D. Characterisation of phenolic compounds in South African plum fruits (*Prunus salicina* Lindl.) using HPLC coupled with diode-array, fluorescence, mass spectrometry and on line antioxidant detection. *Molecules*, **2013**, *18*, 5072–5090.

- [323] Fang, N., Yu, S., Prior, R.L. LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, *50*, 3579–3585.
- [324] de Gonzalo, G., Alcántara, A.R., Domínguez de María, P. Cyclopentyl methyl ether (CPME): a versatile eco-friendly solvent for applications in biotechnology and biorefineries. *ChemSusChem*, **2019**, *12*, 2083–2097.
- [325] McLafferty, F.W., Stauffer, D.B. *The Wiley/NBS registry of mass spectral data*; A Wiley-Interscience Publication; Wiley: New York, **1989**; ISBN 978-0-471-62886-6.
- [326] Boelens Aroma Chemical Information Service. *BACIS ESO 2000, The complete database of essential oils*; Leffingwell & Associates: Canton, GA, USA, **1999**;
- [327] Marco, J.L., Rodríguez, B., Pascual, C., Savona, G., Piozzi, F. Teuscorodin, teuscorodonin and 2-hydroxyteuscorolide, *neo-clerodane* diterpenoids from *Teucrium scorodonia*. *Phytochemistry*, **1983**, *22*, 727–731.
- [328] Hao, X., Zhang, J., Xia, G., Xue, Y., Luo, Z., Si, Y., Yao, G., Zhang, Y. A new triterpenoid from *Teucrium viscidum*. *Molecules*, **2013**, *18*, 1262–1269.

