

# Filière Technologies du vivant

Orientation Chimie analytique

## Diplôme 2011

*Laurence Lachat*

Caractérisation  
des composés phénoliques  
présents dans deux espèces  
du genre *Alchemilla*

Professeur      Alain-François Grogg

Experts          Karine Bourgeois  
Jean-Pierre Droz

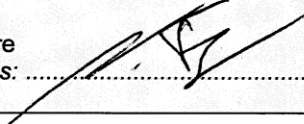
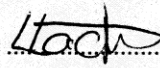
SI	TV
X	X

<input type="checkbox"/> FSI <input checked="" type="checkbox"/> FTV	Année académique / Studienjahr <b>2010/2011</b>	No TD / Nr. DA <b>ca/2011/37</b>
Mandant / Auftraggeber <input type="checkbox"/> HES—SO Valais <input checked="" type="checkbox"/> Industrie <b>D&amp;A diffusion Sàrl</b> <input type="checkbox"/> Ecole hôte	Etudiant / Student <b>Laurence Lachat</b>	Lieu d'exécution / Ausführungsort <input checked="" type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input type="checkbox"/> Ecole hôte
Professeur / Dozent <b>Alain-François Grogg</b>	Experts / Experte (données complètes) <b>Jean-Pierre Droz   Karine Bourgeois</b>	
Travail confidentiel / vertrauliche Arbeit <input type="checkbox"/> oui / ja <input checked="" type="checkbox"/> non / nein	D&A diffusion Sàrl Rue des Vieilles-Forges 62 2854 Bassecourt	CimArk SA Route du Rawyl 47 1950 Sion

SI	TV
X	X

Laurence Lachat

<p>Titre / Titel</p> <p style="text-align: center;"><b>Caractérisation des composés phénoliques présents dans deux espèces du genre <i>Alchemilla</i></b></p>
<p>Description et Objectifs / Beschreibung und Ziele</p> <p><i>Alchemilla vulgaris</i> était autrefois très prisé des alchimistes qui lui prêtaient la réputation de faire renaître la virginité. Cette plante fait partie du genre <i>Alchemilla</i> qui est composé de 117 espèces dont <i>A. nitida</i> et <i>A. alpina</i>. Ces deux dernières sont proposées en médication populaire, entre autres, pour les insuffisances veineuse et lymphatique. Ces allégations — validées par la pharmacopée française avec <i>A. glabra</i> — ont pour origine principale leur teneur conséquente en composés phénoliques.</p> <p>L'objectif de ce travail de diplôme est d'établir un profil chimique (composés phénoliques) et d'activités redox des parties aériennes de <i>A. nitida</i> et de <i>A. alpina</i> et d'en étudier la variation en fonction du solvant d'extraction. Les différentes étapes sont:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>— l'établissement d'une pharmacognosie restreinte sur les composés phénoliques du genre <i>Alchemilla</i>, plus particulièrement sur <i>A. nitida</i> et <i>A. alpina</i></li> <li>— la production d'extraits standardisés des espèces <i>A. nitida</i> et <i>A. alpina</i> à partir de leurs parties aériennes (récolte 2010) et la mise en évidence des familles de métabolites secondaires présentes</li> <li>— l'identification focalisée sur les composés phénoliques, en particulier sur les phénoloïdes, les phénylpropanoïdes, les flavonoïdes et les tanins, des extraits standardisés, la quantification d'au moins cinq constituants phénoliques majoritaires et l'extrapolation aux teneurs présentes dans le matériel végétal</li> <li>— le dosage d'activités redox des extraits standardisés obtenus</li> <li>— la production d'extraits purifiés en composés phénoliques, la quantification des constituants majoritaires (au moins cinq) et le dosage d'activités redox de ces nouveaux extraits</li> <li>— pour <i>A. nitida</i>, la production d'extraits bruts aqueux et glycéric (30 %) complémentaires et la comparaison des profils chimiques et des activités redox obtenus avec ceux déterminés avec les extraits standardisés.</li> </ul>

Délais / Termine	
Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags: 02.05.2011	Exposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten: 02.09.2011
Fin des travaux de diplôme dans les laboratoires de l'école / Ende der Diplomarbeiten in den Labors der Schule: 15.07.2011	Défense orale / Mündliche Verteidigung: dès la semaine 35 / ab Woche 35
Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts: 19.08.2011   12h00	
Signature ou visa / Unterschrift oder Visum	
Responsable de la filière Leiter des Studiengangs: 	<sup>1</sup> Etudiant/Student: 

<sup>1</sup> Par sa signature, l'étudiant-e s'engage à respecter strictement la directive et le caractère confidentiel du travail de diplôme qui lui est confié et des informations mises à sa disposition.

Durch seine Unterschrift verpflichtet sich der Student, die Richtlinie einzuhalten sowie die Vertraulichkeit der Diplomarbeit und der dafür zur Verfügung gestellten Informationen zu wahren.

Rapport reçu le / Schlussbericht erhalten am ..... Visa du secrétariat / Visum des Sekretariats .....



## Caractérisation des composés phénoliques présents dans deux espèces du genre *Alchemilla*

Diplômante Laurence Lachat

### Objectif du projet

L'objectif de ce travail est de séparer, d'isoler, de caractériser et de quantifier les composés phénoliques majoritaires d'extraits de drogues du genre *Alchemilla* puis d'évaluer leurs activités antioxydantes et anti-radicalaires.

### Méthodes | Expériences | Résultats

Après extraction sélective des phytoactifs d'*A. conjuncta aggr.*, ces derniers sont séparés par RP-HPLC afin d'être identifiés et quantifiés par UV, MS et RMN.

Trois composés majoritaires sont identifiés: un tanin hydrolysable, la  $\beta$ -D-glucuronyl-O-3-quercétine et la  $\beta$ -D-glucuronyl-O-3-isorhamnétine. Les teneurs respectives dans la drogues sèche sont de 2.5% (en équivalent quercétine), 0.9% et 0.2%.

L'efficacité d'extraction de quatre systèmes aqueux (éthanol 30%, méthanol 80%, eau 100% et glycérol 55%) est comparée. Le glycérol à 55% est le système le plus sélectif pour les trois molécules.

La valeur EC<sub>50</sub> d'un extrait hydroalcoolique d'*A. conjuncta aggr.* pour son activité antiradicalaire est de 11.4  $\mu$ g MS/ml quant à celle de son activité antioxydante, elle est de 4.0  $\mu$ g MS/ml.

La teneur en actifs majoritaires est évaluée dans les extraits hydroalcooliques de trois espèces: *A. conjuncta aggr.*, *A. xanthochlora aggr.* et *A. alpina aggr.* L'extrait possédant la plus grande teneur en phytoactifs et étant le plus actif est celui obtenu à partir d'*A. conjuncta aggr.*

Travail de diplôme  
| édition 2011 |

Filière

Technologies du vivant

Domaine d'application

Chimie analytique

Professeur responsable

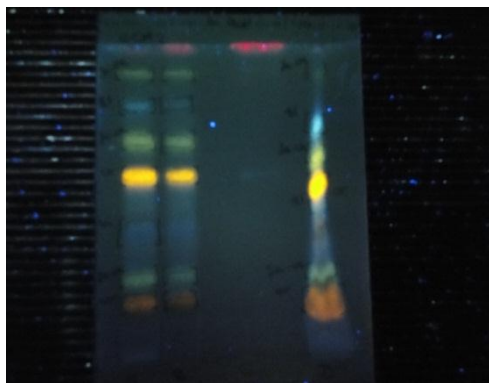
Dr Grogg Alain-François

afrancois.grogg@hevs.ch

Partenaire

D&A diffusion Sàrl

Jean-Pierre Droz



Chromatographie sur couche mince des extraits d'*Alchemilla conjuncta aggr.*



*Alchemilla conjuncta aggr.*

HES-SO Valais  
Route du Rawyl 47  
1950 Sion

Tél. 027 606 85 11  
URL www.hevs.ch

## I. Table des abréviations

ACN	Acétonitrile
aggr.	Aggrégat : regroupement de petites espèces très proches
CCM	Chromatographie sur couche mince
COSY	Spectroscopie de corrélation
$\delta$	Déplacement chimique
d, dd	Doublet, doublet de doublet
DAD	Détecteur à barrettes de diodes
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
EC <sub>50</sub>	Concentration effective qui induit une activité de 50%
EtOH	Ethanol
H <sub>2</sub> O dem	Eau déminéralisée
HCl	Acide chlorhydrique
HCOOH	Acide formique
HD	Haute densité
HSQC	Corrélation hétéronucléaire quantum simple
FREC	Ferric reducing ability EC <sub>50</sub> , Test antioxydant par réduction du Fe <sup>3+</sup> en Fe <sup>2+</sup>
LOD/LOQ	Limite de détection / Limite de quantification
MeOH/MeOD	Méthanol / méthanol deutéré
MS	Spectromètre de masse
MTBE	Methyl <i>tert</i> -butyl ether
MW	Masse molaire (g/mol)
n/a	Non applicable
PEG	Polyéthylène glycol
Ph. Eur.	Pharmacopée Européenne
ppm	Partie par million (mg/kg)
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RP- HPLC	Chromatographie liquide à haute pression en phase inverse
sensu latiore	Au sens large
sh	Shoulder, épaulement
UV	Ultra-violet

## II. Table des matières

I.	Table des abréviations.....	I
II.	Table des matières.....	II
1.	Introduction.....	1
2.	Partie théorique.....	2
2.1.	Le genre <i>Alchemilla</i> .....	2
2.1.1.	Pharmacognosie.....	3
2.2.	Les composés phénoliques.....	4
2.2.1.	Extraction.....	6
3.	Résultats et discussion.....	7
3.1.	Mise en évidence des métabolites secondaires.....	7
3.2.	Identification des composés majoritaires.....	8
3.2.1.	Composé 1.....	8
3.2.2.	Composé 2.....	11
3.2.3.	Composé 3.....	12
3.3.	Quantification des composés majoritaires dans <i>A. conjuncta aggr.</i> .....	15
3.3.1.	Longueurs d'onde de mesure.....	15
3.3.2.	Détermination des paramètres statistiques de la méthode.....	16
3.3.3.	Epuisement.....	17
3.4.	Extractions.....	17
3.4.1.	Stabilité.....	18
3.4.2.	Activité.....	20
3.5.	Screening de différentes espèces.....	21
3.5.1.	Influence de l'espèce et de l'altitude.....	22
3.5.2.	Influence du stade de maturité.....	23
3.5.3.	Influence du terrain de culture.....	24
3.5.4.	Influence du conditionnement de l'échantillon.....	24
3.5.5.	Influence de l'année de croissance.....	25
4.	Conclusion et perspectives.....	26
5.	Partie expérimentale.....	27
5.1.	Produits.....	27
5.2.	Matériel général.....	27
5.3.	Matériel végétal.....	28

5.3.1.	Broyage.....	28
5.3.2.	Extraction.....	28
5.4.	Matières sèches.....	28
5.5.	Hydrolyse d'un extrait.....	29
5.6.	Méthodes chromatographiques analytiques.....	29
5.6.1.	Analyse qualitative par CCM.....	29
5.6.2.	Développement d'une méthode par RP-HPLC/DAD-UV.....	29
5.7.	Chromatographie préparative.....	30
5.8.	Identification des composés par RP-HPLC-MS.....	30
5.9.	Identification des composés par RMN.....	31
5.10.	Activité anti-radicalaire / antioxydante.....	31
5.11.	Mesure de la quantité en tanins.....	31
6.	Bibliographie.....	32
7.	Remerciements.....	34

## 1. Introduction

Le monde végétal est constitué d'une grande quantité d'espèces. Chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents et d'intérêts variés. Ces derniers sont couramment appelés métabolites secondaires. Dans ce travail, l'attention est portée sur le genre *Alchemilla*.

De toutes les alchémilles, l'alchémille vulgaire (*Alchemilla xanthochlora* Rothm.), souvent appelée « Manteau de Notre-Dame », est la plus connue (Figure 1). Historiquement, cette plante était présumée faire renaître la virginité. Les alchimistes pensaient aussi que sa rosée était un ingrédient pour la fabrication de la pierre philosophale. Ils lui donnaient d'ailleurs le nom d'eau céleste [1]. Aujourd'hui, l'alchémille est toujours couramment employée en médecine populaire pour ses nombreuses propriétés : elle est réputée astringente, anti-inflammatoire et vulnéraire. Ces allégations ont pour principale origine une teneur élevée en composés phénoliques [1, 2].

Deux espèces, beaucoup moins bien connues, sont arborées dans ce travail : *A. conjuncta* aggr. et *A. alpina* aggr. D'autre part, *A. xanthochlora* aggr., qui peut avoir des propriétés intéressantes et qui faisait partie de la flore lors des cueillettes, a été ajoutée aux deux espèces précédemment sélectionnées.



Figure 1 : *A. xanthochlora* Rothm.

Pour la réalisation de ce travail, les connaissances actuelles sur le genre *Alchemilla* sont d'abord rassemblées, puis, les composés phénoliques majoritaires d'*A. conjuncta* aggr. présents dans un extrait hydro-alcoolique sont séparés par RP-HPLC et, le cas échéant, isolés par chromatographie préparative afin d'être caractérisés par spectrométrie, MS et RMN.

Ensuite, les phytoactifs identifiés sont quantifiés dans le matériel végétal ainsi que dans différents extraits par spectrométrie. L'activité antiradicalaire et antioxydante de chaque extrait est aussi mesurée.

Finalement, un criblage est effectuée pour déterminer l'influence de certains paramètres (tels qu'espèce, stade de maturité, altitude, conditionnement du matériel après récolte - frais, sec - terrain, année de croissance) sur les concentrations en phytoactifs et sur l'activité de différentes plantes.



## 2. Partie théorique

Une brève description du genre *Alchemilla* est suivie d'une étude de la pharmacognosie du genre. Ensuite, les différents composés phénoliques sont décrits ainsi que leurs modes d'extraction.

### 2.1. Le genre *Alchemilla*

L'alchémille fait partie de la grande famille des rosacées. Toutefois, sa systématique est encore peu comprise, notamment à cause de confusions résultant d'apomixies, polyploïdisations et hybridations qui sont fréquemment observées dans le genre. D'ailleurs, *Alchemilla* est probablement le genre le plus connu, capable de faire des apomixies autonomes. De plus, beaucoup d'espèces peuvent se multiplier par clonage. Ces modes de croissance provoquent de petites variations morphologiques difficiles à interpréter qui ont conduit à la description de nombreuses micro-espèces. Le genre *Alchemilla* a été décrit pour la première fois par Linné en 1753, puis la classification a changé de nombreuses fois. Aujourd'hui, le genre comporte au minimum 250 (max. 1000) espèces réparties sur toute la planète ; la plus grande diversité se trouvant en Eurasie de l'Ouest, plus particulièrement sur les prairies montagneuses et les vergers [3]. Le genre peut être séparé en 4 clades : *Aphanes*, Eurasian *Alchemilla* (subdivisé en clade lobé et clade disséqué), African *Alchemilla* et *Lachemilla*. Les espèces étudiées font partie du clade des Eurasian *Alchemilla* et du clade disséqué. Toutefois, [4] propose de classer toutes les espèces sous le genre *Alchemilla* afin de limiter les confusions (Tableau 1).

Tableau 1 : Classification phylogénétique selon APG III du genre *Alchemilla*

<b>Division</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clade 1</b>	eudicot
<b>Clade 2</b>	fabids
<b>Ordre</b>	<i>Rosales</i>
<b>Famille</b>	<i>Rosaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Alchemilla</i>

D'un point de vue morphologique, le genre *Alchemilla* est caractérisé par ses inflorescences : petites, de couleur vert-jaunâtre, elles n'ont pas de pétales mais un double calice de quatre sépales et de quatre lobes d'épicalyce qui forment un hypanthium (Figure 2). Les fleurs sont regroupées en glomérules ou en panicule de glomérules [5]. Beaucoup d'espèces sont différenciables grâce à la forme des feuilles et au degré de pilosité. [3, 4] La plante a des tiges vertes et peut mesurer jusqu'à 60 cm [3]. Elle est abondante dans les pâturages jusqu'à une altitude conséquente (plus de 2000m) [6].



Figure 2 : Dessin schématisé des fleurs d'*Alchemilla*.

En dépit des difficultés à identifier les différentes espèces, la nomenclature binomiale employée dans ce travail se réfère au livre « Flora Helvetica » [5].

*A. conjuncta* aggr., dont l'un des représentants est *A. nitida* Buser (Figure 3), en français alchémille luisante, pousse sur les étages montagneux et subalpins. Elle est d'une hauteur comprise entre 10 et 50 cm. Ses feuilles sont composées palmées avec 7-9 folioles, argentées en dessous, environ 3 fois plus longues que larges et munies de chaque côté de 2-4 dents convergentes longues de 0.5-1.5 mm. Les fleurs sont de couleur jaune-verdâtre et de diamètre < 0,5 cm. On la trouve sur les pâturages, rochers et éboulis (sol calcaire). Elle fleurit de juin à septembre. [5]



Figure 3 : *Alchemilla nitida* Buser

*A. alpina* aggr., dont l'un des représentants est *A. alpina* L. (Figure 4), en français alchémille des Alpes, se trouve dans le milieu montagneux au Nord,



Figure 4 : *Alchemilla alpina* L.

ainsi qu'au Centre et à l'Ouest de l'Europe. Elle se rencontre sous deux formes dont l'une pousse sur les roches primaires et l'autre sur les sols calcaires. Elle est fréquente dans les pâturages, les terrains rocheux, les éboulis, les forêts clairsemées des Alpes et du Jura, entre 1000 et 2800 m. *A. alpina* est héliophile. Elle préfère les sols pauvres en bases et en éléments nutritifs dont le pH est acide. Elle n'est pas très exigeante en termes d'humidité du sol. C'est une plante vivace qui fleurit de juin à août. [5, 7]

C'est une plante dressée de 10 à 25 cm à rejets stériles rampants avec des feuilles basales digitées à 7 folioles, dentées, soyeuses, argentées en dessous. L'inflorescence dépassant de peu les feuilles [7].

*A. xanthochlora* aggr., dont l'un des représentants est *A. xanthochlora* Rothm., en français alchémille vert-jaunâtre ou alchémille vulgaire, est présente dans les prés, bois et pâturages humides. A pilosité très variable, elle mesure entre 30 et 60 cm. Ses feuilles atteignent 8 cm de largeur et sont divisées jusqu'au tiers ou au quart en 5-9-11 lobes. Les poils des tiges et des pétioles sont la plupart étalés à angle droit. Les pédicelles sont toujours glabres [5] Elles ont un aspect blanc argenté en raison de leur pubescence abondante. Le bord des feuilles est grossièrement dentelé. [2]

### 2.1.1. Pharmacognosie

Peu d'articles révèlent la composition en phytoactifs des drogues de cette espèce. Cela est probablement lié à la difficulté de l'identifier. L'espèce la plus documentée est *Alchemilla vulgaris* L. *sensu latiore*, mentionnée dans la Ph. Eur. Cette drogue est riche en tanins hydrolysables (agrimoniine, pédunculagine, laevigatine F) représentant au minimum 6% de ses constituants exprimés en pyrogallol selon la Ph. Eur. [2, 8]. Elle contient aussi des flavonoïdes (environ 2%) tels que glycosides et quercétine libres [2]. On note aussi la présence de triterpènes [8]. Des proanthocyanidines sont aussi identifiés ainsi que de nombreux composés phénoliques (acides gallique, ellagique, chlorogénique) [9]. L'acide gallique est un précurseur des tanins hydrolysables.

La composition générale d'*A. alpina* L. est la suivante : composés phénoliques, tanins, lipides, glucides, saponines, résines [7]. Des huiles essentielles sont aussi analysées dans *A. alpina* L. em. Buser à une concentration de l'ordre de 0.2% d'huile essentielle dans la plante fraîche [10].

La drogue est couramment employée pour le traitement des diarrhées légères, des insuffisances veineuses et des hémorragies grâce à ses propriétés vulnérinaires et astringentes. Les extraits tanniques de la drogue ont aussi des propriétés antimutagènes. Les extraits aqueux quant à eux ont des propriétés antioxydantes puissantes et des propriétés de piégeages des anions superoxydes. [2]

## 2.2. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques présents dans les plantes peuvent être de différentes natures : flavonoïdes, tanins et dérivés phénylpropanoïdes tels que lignanes et coumarines, stilbénoloïdes, phénoloïdes et xanthonoïdes. Ils ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. Ce sont des dérivés non azotés dont le ou les cycles aromatiques sont principalement issus du métabolisme de l'acide shikimique ou/et de celui d'un polyacétate (voie acétate). Ce groupe comporte pas moins de 8000 composés. [8]

Les molécules les plus communes au genre *Alchemilla*, à savoir les flavonoïdes et les tanins, sont brièvement développés ci-dessous.

### Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments hydrophiles souvent jaunes (chalcones, aurones, flavonols jaunes), rouges ou mauves (anthocyanidines). Dans certains cas, la zone d'absorption de la molécule est située dans le proche ultra-violet, ceci pour attirer les insectes dans la fleur et ainsi assurer sa pollinisation. Les flavonoïdes sont également présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles pour assurer la protection des tissus contre les rayonnements ultra-violets B du soleil. Ils peuvent aussi participer à la résistance des végétaux aux maladies. [8] Tous les flavonoïdes (plus de 4000) ont une origine biosynthétique commune, la chalcone. Les flavonoïdes d'intérêt considérés dans ce travail possèdent un squelette de base commun de type 2-phénylchromane (Figure 5). Les formes hétérosidiques sont principalement localisées dans les vacuoles et dans l'épiderme des feuilles. Dans les fleurs, il y a essentiellement des molécules aglycones dont la lipophilie est accrue par la méthylation partielle ou totale des groupes hydroxyles.

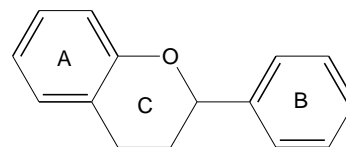


Figure 5 : 2-phénylchromane

Les flavonoïdes sont répartis en fonction du degré d'oxydation du cycle pyranique en 15 catégories à savoir [11]: aurones, flavanones, flavones, dihydroglavonols, flavonols, flavandiols, flavanols, anthocyanidines, isoflavanones, isoflavones, roténoïdes, isoflavanes, ptérocarpanes, isoflavènes et coumestanes.

La solubilité des flavonoïdes dépend de leur glycosylation. Les aglycones sont plutôt solubles dans des solvants organiques apolaires tandis que les hétérosides sont hydrosolubles et solubles dans les alcools. L'extraction des hétérosides nécessite des précautions : basse température, inactivation des enzymes.

D'un point de vue médical, les flavonoïdes possèdent des propriétés anticoagulantes et antihépatotoxique. Beaucoup d'entre eux ont aussi des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, antibactériennes et spasmolytiques.

## Tanins

Les tanins sont des composés phénoliques hydrosolubles. En solution, ils facilitent la formation de complexes entre les protéines et les macromolécules aussi bien que de petits cations et précipitent ainsi les protéines. C'est pourquoi, historiquement, ils étaient employés pour tanner le cuir. Ils sont largement distribués dans les plantes afin de lutter contre les agents pathogènes ou les herbivores. [9]

Ils sont classés en deux groupes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés. Les tanins hydrolysables sont subdivisés en trois sous-groupes : gallotanins, ellagitanins et tannins complexes. [11]

Les **tanins hydrolysables** (Figure 6) sont des oligo- ou des polyestesters d'un sucre (ou d'un polyol apparenté) et d'un nombre variable de molécules d'acide-phénol. Le sucre est très généralement le glucose. L'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des tanins galliques, soit l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP) et ses dérivés dans le cas des tanins classiquement dénommés tanins ellagiques. Depuis 1985, plusieurs représentants d'une nouvelle catégorie de tanins ont été isolés. Ces tanins, nommés tanins complexes, sont des ellagitanins modifiés résultant de l'addition d'un dérivé phénylchromanique sur une molécule d'esters HHDP du glucose. [8]

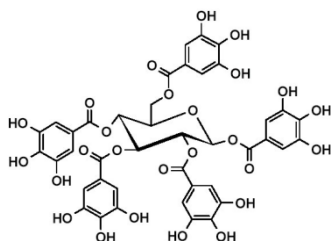


Figure 6 : Tanin hydrolysable (1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose)

Les **tanins condensés** ou proanthocyanidines (Figure 7) sont des polymères flavaniques. Ils sont constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. [8]

Les tanins sont solubles dans les alcools et dans l'acétone. Ils sont extraits en général avec un mélange d'eau et d'acétone. Le méthanol provoque la méthanolyse des depsides galliques. Un rendement optimal est obtenu par extraction des tissus frais ou conservés par congélation ou lyophilisation. Les solutions aqueuses ont une stabilité généralement modérée, variable selon la structure. [8]

En thérapeutique, les polyphénols sont employés pour leur propriété antioxydante régularisant la quantité de radicaux libres et d'oxygène libres dans le corps. Ainsi, ils développent des activités antibactériennes et antivirales, induisent l'inhibition d'enzymes et ont des effets astringents, vasoconstricteurs et hémostatiques locaux. De plus, ils peuvent avoir des propriétés antimutagènes et antitumorales [2, 8, 12]. Toutefois, ils ne sont pas dénués d'effets indésirables, certains ayant la particularité de former des complexes avec les métaux réduisant ainsi leur résorption et pouvant engendrer des anémies de type hémolytique [2, 13].

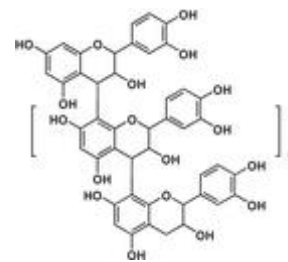


Figure 7 : Structure générale des tanins condensés

### 2.2.1. Extraction

La présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques hydroxylés chez tous les composés phénoliques est responsable de certaines propriétés communes utilisées pour les extraire à partir de matériel végétal, les caractériser chimiquement et les doser. La plupart des phénols simples, présents dans la vacuole, peuvent être extraits avec des solvants hydroalcooliques. Comme ils sont facilement oxydables, il est recommandé de travailler à basse température et d'ajouter un agent réducteur (acide ascorbique) en milieu d'extraction. L'adjonction d'un inhibiteur permet en outre d'éviter l'hydrolyse des hétérosides phénoliques. Différentes étapes de purification peuvent ensuite être effectuées. [14]

#### Extraction au glycérol

L'extrait au glycérol comporte certains avantages par rapport aux extraits hydroalcooliques : d'une saveur sucrée, il peut être donné aux enfants, aux personnes intolérantes à l'alcool et aux diabétiques car il se métabolise en glycogène. Le glycérol a les propriétés d'extraction et de conservation à la fois de l'eau et de l'éthanol. Il extrait bien les tanins, les glycosides, les enzymes, les composés amers et les saponines. Le glycérol étant aussi un substrat pour les bactéries, il faut s'assurer que les plantes soient propres avant toute extraction. La concentration de glycérine doit être d'environ 60%. [15]

L'extrait glycériné d'*A. vulgaris* L. pourrait cicatrifier les aphtes et ulcérations buccales mineures [8]. Des essais sur des rats portant sur l'efficacité de l'application de cet extrait pour favoriser la guérison de lésions cutanées se sont montrés plus que prometteurs ; la cicatrisation s'est faite plus rapidement. D'autre part, aucun changement morphologique ou cytotoxicité n'a été constaté. [16]

### 3. Résultats et discussion

Cette partie présente les résultats significatifs de ce travail. Elle comporte une étude approfondie sur



la composition d'*A. conjuncta aggr.* (Figure 8), récoltée en Valais (Mayens d'Ovronnaz) en 2010. Ensuite, différents extraits de cette drogue sont effectués et la stabilité des phytoactifs présents dans ces extraits est déterminée. Les activités antiradicalaires et antioxydantes de chaque extrait sont aussi évaluées. En dernier lieu, une analyse corrélative est effectuée avec différents paramètres de variation. Tous les échantillons ont été identifiés par [17].

Figure 8 : *A. conjuncta aggr.*

Tous les résultats bruts sont disponibles dans [18].

#### 3.1. Mise en évidence des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont mis en évidence à l'aide de CCM de différents extraits d'*A. conjuncta aggr.* (Figure 9a et Figure 9b). La révélation employée est spécifique aux flavonoïdes (voir section 6.6.1).

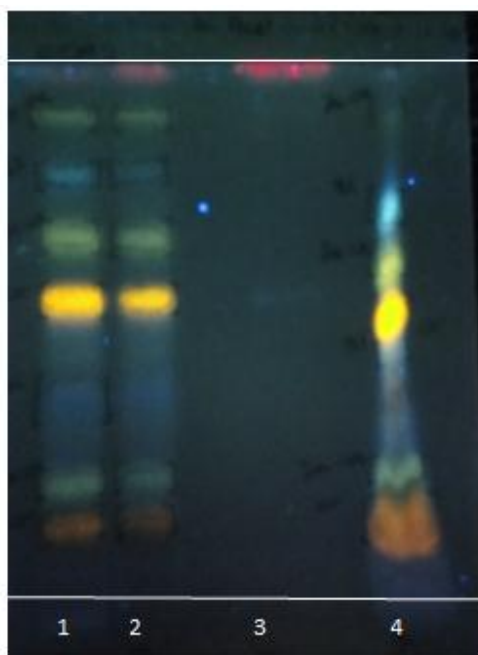


Figure 9a : CCM des extraits d'*A. conjuncta aggr.*, après révélation avec NP/PEG, sous lampe UV à 366nm

- 1 : Extrait à EtOH 30%
- 2 : Extrait à MeOH 80%
- 3 : Extrait à ACN
- 4 : Extrait à l'eau dem.

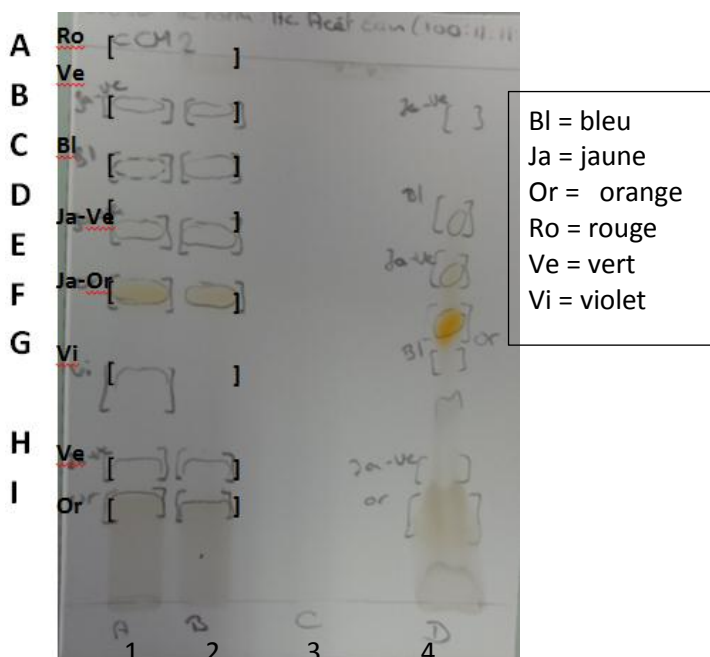


Figure 9b : CCM de l'extrait d'*A. conjuncta aggr.*, après révélation avec NP/PEG, à la lumière visible

- 1 : Extrait à EtOH 30%
- 2 : Extrait à MeOH 80%
- 3 : Extrait à ACN
- 4 : Extrait à l'eau dem.

L'extrait à l'eau a une moins bonne résolution que les autres extraits car des traînées se forment sur la plaque lors de la migration.

L'acétonitrile n'extrait aucune molécule d'intérêt. En effet, seule de la chlorophylle est révélée (rouge après révélation). Les autres extraits possèdent de nombreuses molécules d'intérêt :

- Les bandes jaune-vert des composés B, D et H peuvent correspondre à du kaempférol ou de l'isorhamnétine et leurs glycosides ou encore à de l'apigénine et ses glycosides [19].
- La couleur jaune-orange de la bande E peut correspondre à de la quercétine ou de la myricétine [19].
- La bande orange de la substance I peut être de la lutéoline et ses glycosides [19].
- La bande du composé A de couleur rouge est typique de la chlorophylle. Ce composé est vert avant révélation.

Avec cette méthode de détection, aucune différence concernant l'efficacité d'extraction entre les solvants (éthanol 30%, méthanol 80% et eau déminéralisée) ne peut être constatée. C'est pourquoi il est essentiel d'effectuer une séparation par RP-HPLC pour déterminer leur efficacité respective.

### 3.2. Identification des composés majoritaires

Les phytoactifs d'*A. conjuncta agr.* sont séparés par RP-HPLC (voir section 6.2.2). Après séparation, les molécules sont identifiées par UV et MS. Dans un deuxième temps, une chromatographie préparative est effectuée pour isoler les molécules d'intérêt et les identifier par RMN. Ainsi, trois composés (1, 2 et 3) sont identifiés (Figure 10 et Figure 11).

#### 3.2.1. Composé 1

Ce composé a un temps de rétention de  $14.7 \pm 1.0$  minutes pour 25 mesures. Les spectres correspondant à ce composé sont présentés à la Figure 10.

Le spectre DAD dévoile deux longueurs d'ondes caractéristiques : 236 nm et 255 nm (sh). Ce profil n'est pas caractéristique de la majorité des flavonoïdes, ces derniers ayant généralement deux maxima à environ 250 et 350 nm [20]. Toutefois, ce spectre indique qu'il pourrait s'agir d'un hydrocarbure aromatique [21]. Ce profil pourrait aussi correspondre à une flavanone ou un isoflavone [22].

Le spectre MS en mode négatif présente deux pics d'intérêt : l'un à  $m/z = 934$  ainsi qu'un second à  $m/z = 1870$ . Ces masses laissent suggérer qu'il s'agit d'une grande molécule, il ne peut donc pas s'agir d'une flavanone ou d'un isoflavone. Parmi les molécules déjà identifiées dans le genre *Alchemilla*, le seul groupe de molécules ayant une masse comparable sont les tanins hydrolysables. Il est difficile de dire si le pic à  $m/z = 1870$  est le pic moléculaire ou s'il s'agit d'un dimère formé lors de l'ionisation. Néanmoins, l'agrimoniine a une masse moléculaire de 1871. De plus, un fragment caractéristique de cette molécule apparaît à une masse de 934. Ainsi, il pourrait s'agir de cette molécule. C'est pourquoi un spectre  $^1\text{H}$  RMN de l'extrait purifié par chromatographie préparative est effectué afin de connaître le nombre de protons de la molécule.

Sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  de l'extrait purifié, l'intégration correspond à un équivalent de 25 protons [18]. Ce qui réaffirme qu'il pourrait s'agir d'agrimoniine. De plus, mis à part les signaux caractéristiques du ou des sucres, apparaissant entre 4.5 et 5.5 ppm, ces signaux sont pour la plupart des singulets. Confirmant qu'il s'agit probablement d'un tanin hydrolysable, ces molécules ayant peu de protons couplant en RMN  $^1\text{H}$ . En observant les signaux caractéristiques des protons phénoliques

sur le spectre HSQC ( $^1\text{H}$  : 6.5-7.5 ppm /  $^{13}\text{C}$  : 100-130 ppm [21]), seuls 6 singulets sont observés alors que 8 devraient être présents pour l'agrimoniine. Ainsi il ne s'agit probablement pas de cette molécule mais probablement d'une molécule semblable.

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et HSQC permet d'obtenir d'autres informations :

- Le carbone anomérique d'un sucre apparait aux alentours de 95 ppm [21] or deux signaux apparaissent à ce déplacement chimique. Ces derniers sont des doublets sur le spectre 1H discernables à 6.48 et 6.60 ppm. Ainsi, il s'agit de deux carbones anomériques, laissant à supposer que la molécule comporte deux sucres.
- Un proton apparait à un déplacement chimique de 8.27 ppm mais il n'est pas visible sur le spectre HSQC. Il n'est donc pas sur un carbone et est moins acide qu'un phénol étant donné qu'il n'a pas été échangé avec le deutérium du solvant (MeOD) comme tous les protons phénoliques. Il pourrait s'agir d'un groupe hydroxy libre sur un sucre ou d'un proton sur une autre molécule telle que l'azote [21].

Pour permettre une meilleure interprétation de ces résultats, il serait indispensable de compléter ces analyses avec, par exemple, une analyse RMN  $^{13}\text{C}$ . Ainsi, il serait possible de connaître précisément le nombre de carbones de la molécule et en déduire sa formule brute. Mais cela nécessite une grande quantité de produit purifié.

Toutes ces constatations ne permettant pas de déterminer la structure de cette molécule, il est toutefois fort probable qu'il s'agisse d'un tanin hydrolysable. C'est pourquoi cette molécule sera nommée **tanin 1** dans la suite de ce travail.



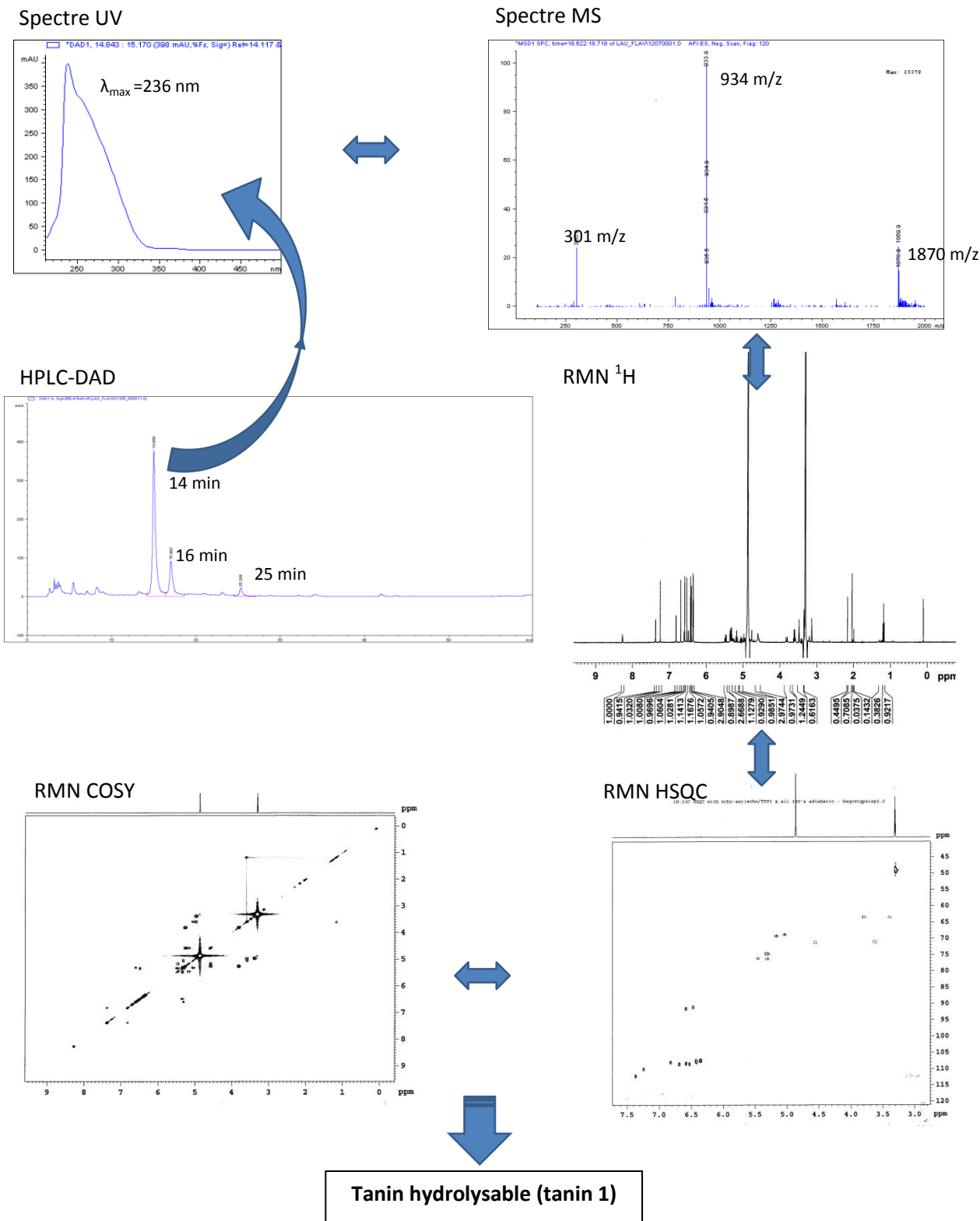


Figure 10 : Représentation des spectres UV, MS et RMN du composé 1, ayant un temps de rétention de 14 minutes

### 3.2.2. Composé 2

Ce composé a un temps de rétention de  $16.9 \pm 0.8$  minutes pour 25 mesures. Les spectres correspondant à ce composé sont présentés en bas de la Figure 11.

Le spectre DAD dévoile quatre longueurs d'ondes caractéristiques : 256 nm, 266 nm (sh), 296 nm (sh) et 353 nm. Ce profil est caractéristique d'un flavonol tel que la rhamnétine, le kaempférol ou la quercétine [22]. Le spectre MS présente deux pics d'intérêt : le pic moléculaire à  $m/z = 477$  ( $[M-H]^-$ ) ainsi qu'un fragment à  $m/z = 301$ . Le fragment correspond vraisemblablement au flavonol aglycone, ce qui exclut la rhamnétine et ses dérivés de masse moléculaire 316 ainsi que le kaempférol de masse moléculaire 286. Il s'agit donc probablement d'un composé glycosylé de la quercétine (MW = 302). Une hydrolyse sur un extrait éthanolique permet de confirmer cette hypothèse. En effet, le temps de rétention du standard de quercétine est de 37.6 min et un pic caractéristique au même temps de rétention apparaît sur le chromatogramme de l'hydrolysat extrait au MTBE [18].

Le spectre UV du composé comporte un déplacement de la bande I par rapport au spectre de la quercétine aglycone : il passe de 370 nm pour la quercétine à 353 nm pour le composé 2 ce qui indique que le composé est glycosilé sur le cycle B ou C plus précisément sur les groupes hydroxyle 3, 3' ou 4'. Le site le plus stable chimiquement pour une glycosylation est le 3 [22].

Pour permettre la détermination de la stéréochimie, deux analyses RMN de l'extrait purifié sont effectuées :  $^1H$  et COSY [18]. Les signaux sont regroupés ci-dessous (Tableau 2). L'aglycone ne comporte que 5 protons visibles en RMN. Les protons du cycle B sont plus déblindés que ceux du cycle A [22]. Ainsi, les signaux à 6.2 et 6.4 ppm qui couplent ensemble font partie du cycle A. Leur constante de couplage de 2,4 Hz indique qu'ils sont placés en position méta [21]. Ils peuvent être placés en position 5 et 7 ou en position 6 et 8. Le plus courant est la seconde solution [22]. De plus, un proton placé en 5 apparaît à un champ plus faible (7.9 - 8.2 ppm). Le proton 6 est généralement plus déblindé que le proton 8, ainsi le proton 6 a un déplacement chimique de 6.21 ppm tandis que celui du proton 8 est de 6.40 ppm [22].

**Tableau 2 : Déplacements chimiques ( $\delta$ ) des protons du composé 2 obtenus par RMN  $^1H$ , accompagnés des constantes de couplage (J) ainsi que du proton attribué**

Flavonoïde			Sucre		
Position	$\delta-^1H$ [ppm] (J [Hz])	couple avec	Position	$\delta-^1H$ [ppm] (J [Hz])	couple avec
2'	7.78, 1H, d (2.2)	6'	1''	5.49, 1H, d (7.5)	2''
5'	6.8, 1H, d (8.5)	6'	2''	3.53, 1H, dd (7.5, 9.2)	1'',3''
6'	7.59, 1H, dd (2.2, 8.5)	2',5'	3''	3.48, 1H, dd (8.5, 9.2)	2'',4''
6	6.21, 1H, d (2,1)	8	4''	3.59, 1H, dd (8.5, 9.8)	3'',5''
8	6.40, 1H, d (2.1)	6	5''	3.70, 1H, d (9.8)	4''

Le signal du proton 5' est un doublet apparaissant généralement entre 6.7-7.1 ppm [22]. Il s'agit ainsi du doublet à 6.85 ppm. Ce dernier couple avec le proton 6' uniquement ( $J = 8.5$  Hz). Ainsi le signal du proton 6' est à 7.59 ppm. Ce signal est un doublet de doublet ayant un couplage à longue distance avec le proton 2' ( $J = 2.2$  Hz) dont le signal apparaît à 7.78 ppm.

Les signaux présents entre 3.4 et 3.8 ppm sont caractéristique du sucre. Ces signaux couplent avec le proton 1'' (5.49 ppm, d, J= 7.5 Hz). Le déplacement chimique de ce proton informe de l'endroit de la glycolyse. En effet, un déplacement chimique de 5.0 ppm indique un glycosylation en 4', 5 ou 7 [22]. Ainsi, ce signal apparaissant à un déplacement chimique plus élevé démontre que le flavonol est glycosylé en position 3 [22]. D'autre part, la constante de couplage de ce dernier (J= 7.5 Hz) est caractéristique de l'anomère  $\beta$  [22].

La constante de couplage du proton 1'' (5.49 ppm, d, J= 7.5 Hz) doit être retrouvée dans le proton 2'' (3.53 ppm, dd, J= 7.5, 9.2 Hz). Ce raisonnement est appliqué pour attribuer tous les protons du saccharide (Tableau 2).

Toutes les constantes de couplage sont comprises entre 8.5 et 9.8 Hz, ce qui indique que les protons couplant entre eux sont en position axial-axial sur le cycle [23]. S'ils étaient placés de manière équatoriale-équatoriale ou équatoriale-axiale, la constante de couplage serait plus petite (de l'ordre de 2-3 Hz). Ce qui permet d'identifier avec certitude le sucre.

Il est maintenant possible de connaître la structure exacte du saccharide : la différence de masse de 176 obtenue sur le spectre de masse pour la perte du sucre est caractéristique d'un fragment d'acide uronique et l'analyse RMN permet d'identifier le sucre comme étant du glucose qui est alors transformé en acide uronique. Ainsi, il est possible de caractériser entièrement la molécule. Le sucre est alors de l'acide glucuronique et le flavonoïde est de la  **$\beta$ -D-glucuronyl-O-3-quercétine**.

La quercétine ainsi que la rutine sont reconnues pour être parmi les plus actifs des flavonoïdes. Bien qu'on soit loin de tout connaître au sujet de la quercétine, ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antihistaminiques ont été observées au cours de nombreuses études *in vitro* et sur les animaux. Toutefois, la quercétine pourrait nuire à l'action de certains antibiotiques (famille des quinolones) [24].

### 3.2.3. Composé 3

Ce composé a un temps de rétention de  $25.4 \pm 0.8$  minutes sur 25 mesures. Les spectres correspondant à ce composé sont présentés en haut de la Figure 11.

Le spectre DAD dévoile quatre longueurs d'ondes caractéristiques : 254nm, 266nm (sh), 299nm (sh) et 352nm. Ce profil est similaire à celui du composé 2 et est donc caractéristique d'un flavonol [22]. Le spectre MS présente deux pics d'intérêt : le pic moléculaire à  $m/z = 491$  ( $[M-H]^-$ ) ainsi qu'un fragment à  $m/z = 315$ . Le fragment correspond vraisemblablement au flavonol aglycone. Sa masse correspond à la rhamnétine ou à un isomère (MW = 316). L'épaule observé à 299 nm étant orienté du côté de la bande II indique qu'il est plus probable qu'il s'agisse de l'isorhamnétine. En effet, l'inverse est observé pour la rhamnétine [22]. De plus, une hydrolyse sur un extrait éthanolique permet de confirmer cette hypothèse. En effet, le temps de rétention du standard d'isorhamnétine est de 42.0 min et un pic caractéristique au même temps de rétention apparait sur le chromatogramme de l'hydrolysate extrait au MTBE [18].

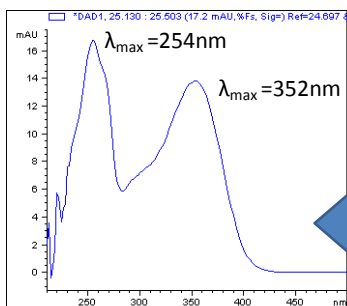
Le spectre UV du composé comporte un déplacement de la bande I par rapport au spectre de l'isorhamnétine aglycone : il passe de 370 nm pour l'isorhamnétine à 352 nm pour le composé 3, ce qui indique que le composé est glycosylé sur le cycle B ou C plus précisément sur les groupes hydroxyle 3 ou 3'. Le site le plus stable chimiquement pour une glycosylation est le 3 [22].

Aucune analyse RMN n'a pu être effectuée, la quantité de composé purifié obtenue étant trop faible. Toutefois, étant donné que les plantes emploient régulièrement la même voie biosynthétique pour la synthèse des composés, les observations effectuées pour le composé 2 sont applicables [8].

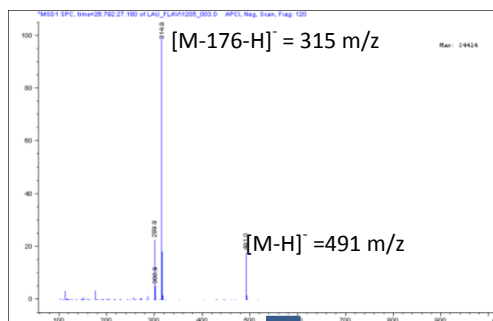
D'après l'analyse MS, le saccharide a une masse de 176, comme obtenu précédemment. Il est alors vraisemblable qu'il s'agisse de l'acide glucuronique. Le flavonoïde identifié est alors le  **$\beta$ -D-glucuronyl-O-3-isorhamnétine**.

L'isorhamnétine est dotée des activités antioxydantes et antigénitoxiques. Cette molécule posséderait des propriétés anticancéreuses en inhibant certains facteurs de croissance épidermique induisant des transformations cellulaires néoplasiques. [6, 25]

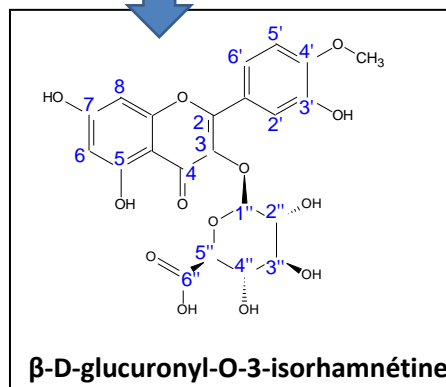
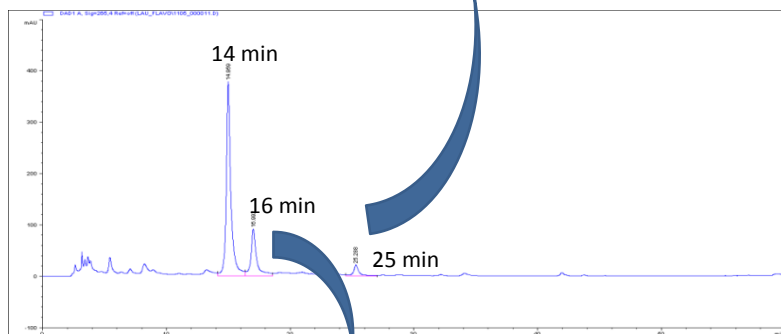
Spectre UV



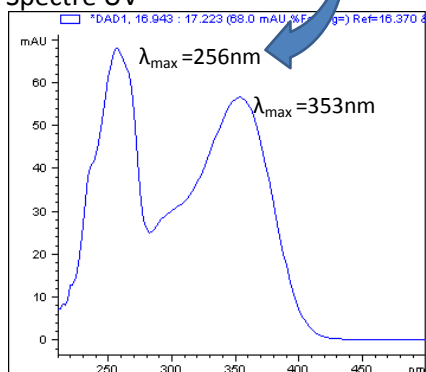
Spectre MS



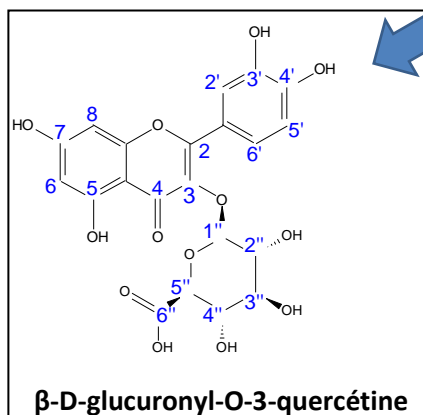
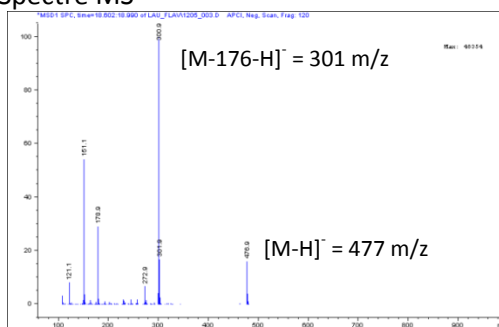
HPLC-DAD



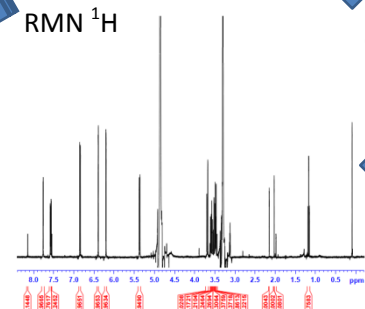
Spectre UV



Spectre MS



RMN <sup>1</sup>H



RMN COSY

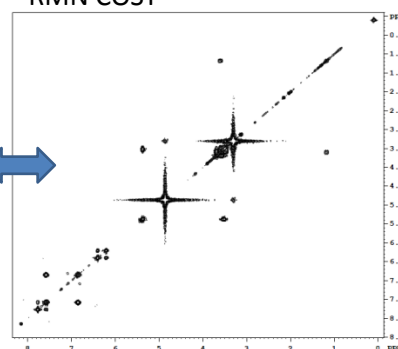


Figure 11 : Représentation des spectres UV, MS et RMN des composés 2 et 3, ayant respectivement des temps de rétention de 16 et 25 minutes.

### 3.3. Quantification des composés majoritaires dans *A. conjuncta* aggr.

Une brève description des propriétés de la méthode analytique est donnée avant d'aborder la quantification des composés majoritaires.

#### 3.3.1. Longueurs d'onde de mesure

La longueur d'onde de mesure doit être adaptée en fonction de chaque composé. C'est pourquoi un chapitre y est dédié.

Les deux composés  $\beta$ -D-glucuronyl-O-3-quercétine et  $\beta$ -D-glucuronyl-O-3-isorhamnétine ont un maximum identique à 255 nm avec le même coefficient d'extinction molaire, c'est pourquoi ces deux composés peuvent être quantifiés à 255 nm en prenant, comme standard, de la quercitrine et en effectuant une correction avec les masses molaires.

Le tanin 1, quant à lui, est quantifié en équivalent quercétine. Etant donné qu'un composé co-élue avec cette molécule et qu'il n'a pas été possible de les séparer, une correction sur la mesure doit être effectuée. Par comparaison des spectres des deux composés purs, une longueur d'onde où le tanin 1 n'absorbe pas est recherchée. Ceci est le cas au-dessus de 340 nm. Ce point doit aussi avoir un second endroit ayant le même coefficient d'extinction molaire (obtenu par la recherche d'une intersection avec une droite horizontale). L'absorbance étant seulement proportionnelle à la concentration, au coefficient d'absorption molaire et à la longueur de la cellule, qui sont fixes dans ce cas, il est ainsi possible de soustraire l'aire due au composé non désiré. La longueur d'onde choisie pour mesurer l'aire de ce composé est donc 374 nm et cette aire est soustraite à celle mesurée à 284 nm. (Figure 12 et Figure 13)

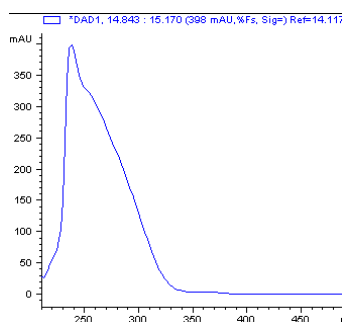


Figure 12 : Spectre UV du tanin 1

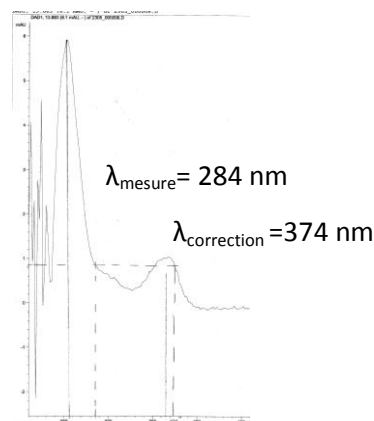


Figure 13 : Spectre UV de la molécule co-éluant avec le composé 1

Avec cette correction, le coefficient de variation sur l'aire du pic pour trois mesures passe de 2.6 % à 1.6 %.

### 3.3.2. Détermination des paramètres statistiques de la méthode

Pour permettre toute quantification, il est essentiel de connaître au préalable certains paramètres statistiques tels que linéarité, LOD, LOQ ainsi que répétabilité et reproductibilité de la méthode.

#### Linéarité

La linéarité est déterminée en mesurant l'aire de cinq standards de quercétine et en la reportant en fonction de la concentration du standard (2.7-106 mg quercétine/l). Le coefficient de Pearson (R) permet d'évaluer la linéarité de la droite. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 3.

#### LOD, LOQ

La LOD et la LOQ sont déterminées en équivalent quercétine, étant donné qu'il s'agit du composé employé pour la quantification. La détermination de la LOD est effectuée en mesurant la concentration produisant un signal 3x plus haut que la hauteur moyenne du bruit de fond du système et la LOQ est définie pour une réponse 10 x plus haute que le bruit [26]. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 3.

#### Répétabilité/Reproductibilité

La répétabilité est évaluée par cinq mesures du même échantillon. Ce paramètre est évalué en fonction du coefficient de variation.

Pour la reproductibilité, le même échantillon est mesuré sur trois jours différents. La reproductibilité est évaluée par calcul du coefficient de variation des trois moyennes. Entre chaque mesure, il est stocké au frigo. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 3.

**Tableau 3 : Résumé des paramètres statistiques de la méthode chromatographique : linéarité, LOD et LOQ, répétabilité et reproductibilité**

Molécule	Tanin 1 (284nm-corr.374)	$\beta$ -D-glucuronyl-O-3- quercétine (255nm)	$\beta$ -D-glucuronyl-O-3- isorhamnétine (255nm)
Linéarité	Aire= 33.83* C-10.87 <sup>a</sup> R=0.9998	Aire= 93.51* C-28.03 <sup>a</sup> R=0.9999	Aire= 93.51* C-28.03 <sup>a</sup> R=0.9999
LOD (quercétine) [mg/l]	0.29	0.13	0.13
LOQ (quercétine) [mg/l]	0.70	0.20	0.20
Répétabilité (CV) [%]	1.8	1.3	2.7
Reproductibilité(CV) [%]	2.1	2.7	5.1

<sup>a</sup> Aire en [mAu\*s] et concentration (c) en [mg quercétine/l]

Il est possible de quantifier dans le domaine de concentration choisi, étant donné que le coefficient de Pearson est proche de 1 dans les trois cas. La limite inférieure de la droite de calibration est supérieure à la LOQ. La répétabilité et la reproductibilité ont un CV inférieur à 5% et sont considérés comme analytiquement acceptables. Bien que restant dans les normes, dans le cas de la  $\beta$ -D-glucuronyl-O-3-isorhamnétine, les CV sont plus élevés. Ceci peut provenir du fait que le composé est élué plus lentement et qu'il y a plus de diffusion.

### 3.3.3. Epuisement

Pour déterminer la quantité totale de chaque composé dans la plante, un épuisement est effectué avec du méthanol 30% comme solvant d'extraction. Trois extractions consécutives sont effectuées sur trois échantillons d'*A. conjuncta aggr.* Les quantités obtenues sont indiquées ci-dessous (Tableau 4).

Tableau 4 : concentration de chaque composé majoritaire dans la plante en % de phytoactif par kg de matière sèche

molécule	% [m/m]
tanin 1 <sup>a</sup>	2.5%
β-D-glucuronyl-O-3-quercétine	0.9%
β-D-glucuronyl-O-3-isorhamnétine	0.2%

<sup>a</sup>en équivalent quercétine

### 3.4. Extractions

Différents solvants d'extraction sont évalués pour déterminer leur efficacité. Les solvants employés sont l'éthanol 30% (m/V), le méthanol 80% (V/V), l'eau déminéralisée ainsi que le glycérol à 55% (m/m) (Tableau 5). La méthode d'extraction est la même pour chaque essai, seul le solvant est changé.

Tableau 5 : Masse de phytoactif extrait en fonction du solvant d'extraction.

Extrait	tanin 1 <sup>a</sup>		β-D-glucuronyl-O-3-quercétine		β-D-glucuronyl-O-3-isorhamnétine	
	m [g/kg de drogue]	recouvrement [%]	m [g/ kg de drogue]	recouvrement [%]	m [g/ kg de drogue]	recouvrement [%]
EtOH 30%	16.7	67	9.3	100	2.0	100
MeOH 80%	24.3	97	7.5	83	1.7	85
H <sub>2</sub> O dem.	7.7	31	8.2	91	1.8	90
Glycérol 55%	24.3	97	7.5	83	1.9	95

<sup>a</sup>en équivalent quercétine

L'éthanol à 30 % est un solvant approprié pour l'extraction de la β-D-glucuronyl-O-3-quercétine ainsi que la β-D-glucuronyl-O-3-isorhamnétine étant donné que le recouvrement se monte à 100 %. Toutefois, pour le tanin 1, les meilleurs solvants d'extraction sont le méthanol ainsi que le glycérol qui extrait 97% du produit.

Le glycérol est un excellent compromis entre efficacité et toxicité. En effet, comme déjà mentionné, il regroupe à la fois les avantages de l'eau et de l'éthanol pour l'extraction et n'a pas de toxicité avérée. Toutefois, il faut être attentif à la pureté microbiologique de l'extrait pour éviter toute dégradation.



Dans un deuxième temps, la teneur totale en tanins dans chaque extrait est évaluée à l'aide de la méthode référencée dans la Ph. Eur. (chap 2.8.14, 6<sup>ème</sup> édition). Les résultats sont indiqués dans le Tableau 6. Ils sont exprimés en pyrogallol.

**Tableau 6 : Teneur en tanins dans les extraits à l'éthanol 30%, au méthanol 80% et à l'eau déminéralisée**

Extrait	c <sub>mél</sub> [%MS]	c <sub>MS</sub> [ppm]
EtOH 30%	7.2	22000
MeOH 80%	3.9	10000
H <sub>2</sub> O dem.	7.0	17000

La teneur minimale recommandée par la pharmacopée de 6.0% est respectée dans les cas des extraits à l'éthanol 30% et à l'eau déminéralisée. Dans ces deux extraits, la teneur en tanin 1 est plus faible que dans l'extrait au méthanol 80%. Il est probable que le méthanol soit plus spécifique au tanin 1 qu'aux autres tanins. Il est aussi possible qu'une certaine partie des tanins ait été méthanolysée après l'extraction (voir page 5). Ce qui expliquerait la faible teneur en tanins obtenus dans le cas de cet extrait (3.9%). Il faut rappeler que ce test est non spécifique et donc que la teneur obtenue englobe une grande quantité de molécules.

#### 3.4.1. Stabilité

La stabilité des phytoactifs majoritaires est déterminée par analyse du même échantillon après 1 mois et 2 mois. Les extraits étudiés sont ceux obtenus avec du méthanol 80% (Figure 14), de l'éthanol 30% (Figure 15) ainsi que de l'eau déminéralisée (Figure 16).

De manière générale, le mode de conservation semble avoir peu d'importance sur les deux flavonols. Le solvant influence aussi peu la conservation. En effet, dans les trois extraits, leur concentration respectives diminuent de l'ordre de 10% le premier mois et semble se stabiliser par la suite.

Dans les trois extraits, le tanin 1 diminue rapidement le premier mois, d'environ 30% pour les extraits au méthanol et à l'éthanol, et il disparaît presque totalement dans l'extrait à l'eau. Il s'agit donc d'une molécule instable qui est fortement dégradée par les microorganismes pouvant se développer dans l'extrait à l'eau. Il semble que le tanin 1 puisse aussi être un produit de dégradation car dans les extraits à l'éthanol et au méthanol conservés au frigo, sa teneur augmente entre le 1<sup>er</sup> et le 2<sup>ème</sup> mois de conservation. Ainsi, il est possible que cette molécule soit aussi présente sous forme de polymère ou sous forme glycosylée.

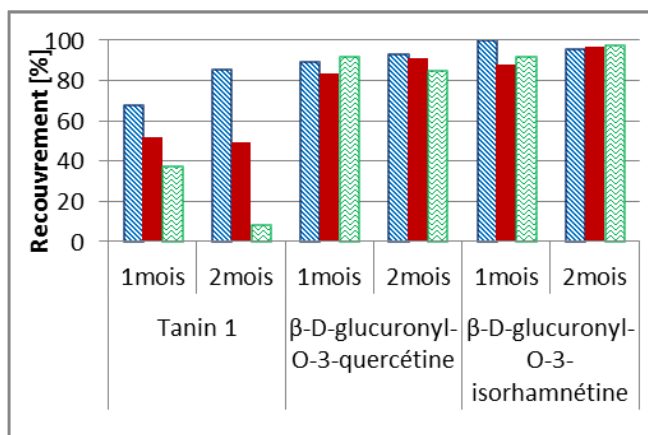


Figure 14 : Stabilité des trois phytoactifs majoritaires dans l'extrait au méthanol

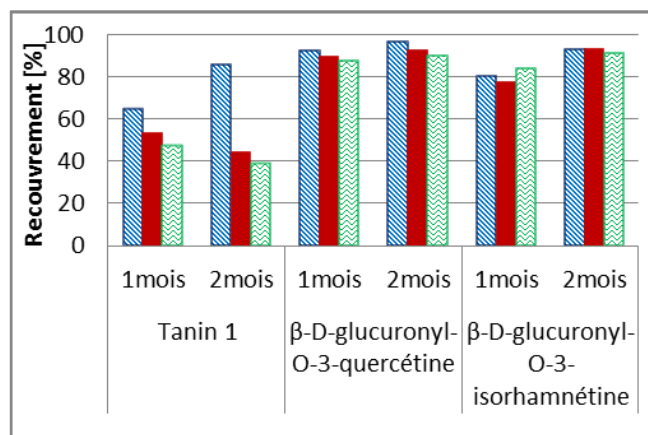


Figure 15 : Stabilité des trois phytoactifs majoritaires dans l'extrait à l'éthanol

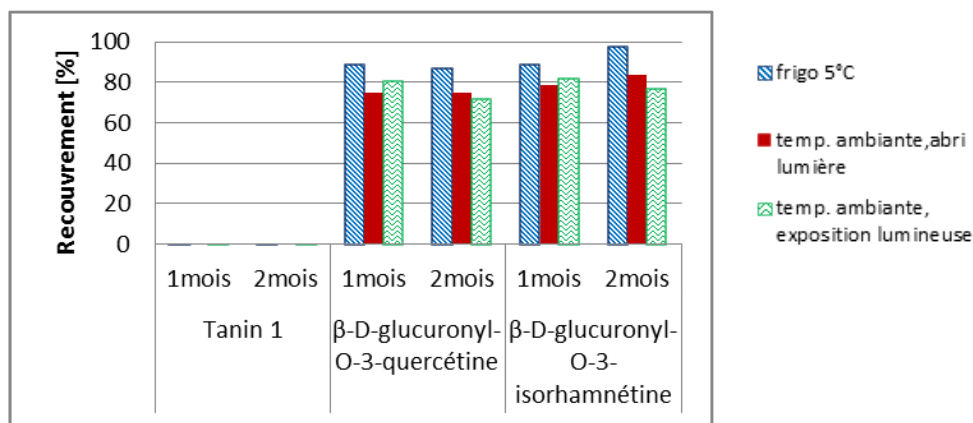


Figure 16 : Stabilité des trois phytoactifs majoritaires dans l'extrait à l'eau déminéralisée

### 3.4.2. Activité

Deux types d'activité sont évalués sur les extraits à l'éthanol 30%, au méthanol 80% et à l'eau déminéralisée (Tableau 7). Il s'agit des activités anti-radicalaires (DPPH) et antioxydantes (FREC) dont la méthode est décrite à la section 6.11. Le coefficient de variation de méthode DPPH est 1.3% tandis que celui de la méthode FREC est de 3.4%.

**Tableau 7 : Activités anti-radicalaires et antioxydantes des extraits d'*A. conjuncta aggr.* au méthanol 80%, à l'éthanol 30% et à l'eau déminéralisée après extraction et un mois après extraction**

Plante	Solvant d'extraction	EC <sub>50</sub> [µg MS/ml]	
		DPPH	FREC (test antioxydant)
<b>A. conjuncta aggr.</b>	MeOH 80%	11.6	5.2
	EtOH 30%	11.4	4.0
	H <sub>2</sub> O dem	13.7	7.7
<b>A. conjuncta aggr. (après 1 mois)</b>	MeOH 80%	13.9	3.6
	EtOH 30%	12.3	3.3
	H <sub>2</sub> O dem	>100	>100

Ces extraits ont une activité anti-radicalaire intéressante puisqu'il faut seulement 11.4 µg MS/ ml (de solution de DPPH) pour que 50% des molécules soient réduites. En comparaison, il en faut 8.9 µg pour l'extrait de *Corylus avellana* L. (noisetier commun), l'extrait le plus actif référencé [27] ou encore 16.6 µg pour l'extrait de *Monarda fistulosa* L. (monarde fistuleuse).

De plus, l'activité antioxydante est aussi importante puisque, dans ce cas, 4.0 µg MS/ ml (de solution de fer) seulement sont nécessaires. A titre d'exemple, il en faut 3.3 µg pour l'extrait de *Saxifrage rotundifolia* L. (saxifrage à feuilles rondes), l'extrait le plus actif référencé [27] ou encore 8.6 µg pour un extrait de *Leontopodium alpinum* Cass. (edelweiss).

Ainsi, les activités anti-radicalaires et antioxydantes de cette plante s'avèrent très intéressantes. D'autre part, en comparant les extraits au méthanol et à l'eau déminéralisée, il semble que l'activité soit positivement influencée par la teneur en tanin 1 (Tableau 5 et Tableau 7).

L'analyse de l'activité après un mois est effectuée sur les extraits conservés au frigo. Elle semble indiquer que l'activité anti-radicalaire diminue tandis que l'activité antioxydante augmente dans les extraits à l'éthanol et au méthanol, ce qui est inattendu. Il est probable qu'il y ait une formation de monomères à partir de polymères, ce qui augmenterait l'activité. Cette tendance est toutefois à vérifier. Quant à l'extrait à l'eau, il perd toute activité, probablement à cause des microorganismes pouvant se développer dans ce milieu.

### 3.5. Screening de différentes espèces

Un screening est effectué afin de connaître l'influence de certains paramètres sur les concentrations en phytoactifs ainsi que sur l'activité des différents échantillons. L'influence des paramètres suivants est étudiée: espèce, stade de maturité, altitude, conditionnement du matériel après récolte (frais-sec), terrain, année de croissance. Pour évaluer les interférences, une analyse de variance est effectuée. Les plantes employées pour cette analyse sont référencées ci-dessous (Tableau 8).

Tableau 8 : Plantes récoltées pour l'analyse de variance

Espèce	date de cueillette	Lieu de cueillette	Altitude [m]
<i>A. conjuncta aggr.</i>	2010	Petit Pré (Mayens d'Ovronnaz)	1767
<i>A. alpina aggr.</i>	2010	Le Devindre (Mayens de Fully)	2145
<i>A. conjuncta aggr.</i>	03.06.2011	Tsarein (Mayens de Savièse)	1643
<i>A. conjuncta aggr.</i>	03.06.2011	Grand'Zour (Mayens de Savièse)	1448
<i>A. conjuncta aggr.</i>	10.06.2011	L'Erié (Mayens de Fully)	1930
<i>A. conjuncta aggr.</i>	10.06.2011	Prampé (Mayens de Fully),	2129
<i>A. xanthochlora aggr.</i>	10.06.2011	L'Erié (Mayens de Fully)	1930
<i>A. xanthochlora aggr.</i>	10.06.2011	Prampé (Mayens de Fully)	2129
<i>A. conjuncta aggr.</i>	21.06.2011	L'Erié (Mayens de Fully)	1930
<i>A. conjuncta aggr.</i>	21.06.2011	Prampé (Mayens de Fully)	2129
<i>A. xanthochlora aggr.</i>	21.06.2011	L'Erié (Mayens de Fully)	1930
<i>A. xanthochlora aggr.</i>	21.06.2011	Prampé (Mayens de Fully)	2129
<i>A. alpina aggr.</i>	21.06.2011	Le Devindre (Mayens de Fully)	2145
<i>A. conjuncta aggr.</i> (frais)	21.06.2011	L'Erié (Mayens de Fully)	1930
<i>A. conjuncta aggr.</i> (frais)	21.06.2011	Prampé (Mayens de Fully)	2129

### 3.5.1. Influence de l'espèce et de l'altitude

Trois espèces sont comparées : *A. alpina aggr.*, *A. conjuncta aggr.* et *A. xanthochlora aggr.*, en considérant la teneur en phytoactifs ainsi que sur leurs activités respectives. L'influence de l'altitude est aussi évaluée (Tableau 9).

**Tableau 9 : Teneurs respectives des trois espèces en polyphénols totaux, tanin 1,  $\beta$ -D-glucuronyl-O-3-quercétine et  $\beta$ -D-glucuronyl-O-3-isorhamnétine ainsi qu'activité anti-radicalaire et antioxydante**

Drogue	polyphénols totaux [%MS]	Conc. drogue [ppm]			Activité [ $\mu$ g MS/ml]	
		tanin 1 <sup>a</sup>	$\beta$ -D-glucuronyl-O-3-quercétine	$\beta$ -D-glucuronyl-O-3-isorhamnétine	DPPH [EC <sub>50</sub> ]	FREC [EC <sub>50</sub> ]
<i>A. alpina aggr. bas</i>	3.4	8000	7200	900	16.1	9.0
<i>A. alpina aggr.</i> (2010 et 2011, Le Devindre)	3.0	10300	7200	1600	16.2	8.0
<i>A. conjuncta aggr.</i> (2011, L'Erié)	3.4	28300	9300	2500	14.2	7.2
<i>A. conjuncta aggr.</i> (2011, Prampé)	3.7	31000	10200	3600	13.5	5.6
<i>A. xanthochlora aggr.</i> (2011, L'Erié)	4.9	14500	9200	600	15.0	6.3
<i>A. xanthochlora aggr.</i> (2011, Prampé)	3.9	16500	8300	1000	16.0	5.9

<sup>a</sup> en équivalent quercétine

L'espèce influence très fortement la composition en phytoactifs. Ainsi la teneur en tanins 1 est influencée avec un niveau de signification  $\alpha$  de 0.03%, tout comme la teneur en  $\beta$ -D-glucuronyl-O-3-quercétine ( $\alpha = 4\%$ ) et celle en  $\beta$ -D-glucuronyl-O-3-isorhamnétine ( $\alpha = 2\%$ ). Un effet est aussi observé pour les activités anti-radicalaires ( $\alpha = 4\%$ ) et antioxydantes ( $\alpha = 5\%$ ).

L'espèce contenant la plus grande concentration en molécules d'intérêt est *A. conjuncta aggr.*, celle en contenant le moins est *A. alpina aggr.* *A. conjuncta aggr.* est aussi l'espèce ayant la plus forte activité antioxydante et anti-radicalaire.

L'altitude a aussi une influence sur la concentration en phytoactifs, notamment sur la concentration en tanins 1 ( $\alpha = 0.7\%$ ). Elle semble aussi avoir un léger effet sur la concentration en  $\beta$ -D-glucuronyl-O-3-isorhamnétine ( $\alpha = 7\%$ ).

### 3.5.2. Influence du stade de maturité

L'influence du stade de maturité est analysée en comparant les deux espèces *A. conjuncta aggr.* et *A. xanthochlora aggr.* à différents stades de croissance et en effectuant à chaque fois la cueillette sur le même site. Dans cette analyse, les influences de l'espèce et de l'altitude peuvent à nouveau être étudiées (Tableau 10).

**Tableau 10 : Teneurs respectives des deux espèces en polyphénols totaux, tanin 1,  $\beta$ -D-glucuronyl-O-3-quercétine et  $\beta$ -D-glucuronyl-O-3-isorhamnétine et activités anti-radicales et antioxydantes**

Drogue	polyphénols totaux [%MS]	Conc. drogue [ppm]			Activité [ $\mu$ g MS/ml]	
		tanin 1 <sup>a</sup>	$\beta$ -D-glucuronyl- O-3-quercétine	$\beta$ -D-glucuronyl-O- 3-isorhamnétine	DPPH [EC <sub>50</sub> ]	FREC [EC <sub>50</sub> ]
<i>A. conjuncta aggr.</i> (2011, L'Erié)	3.4	26000	10000	3300	12.0	8.3
<i>A. conjuncta aggr.</i> (2011, Prampé)	3.6	30000	9500	3500	13.9	6.1
<i>A. conjuncta aggr.</i> (2011, L'Erié)	2.9	23000	7100	1900	16.1	7.5
<i>A. conjuncta aggr.</i> (2011, Prampé)	3.7	32000	10000	3100	14.0	5.8
<i>A. xanthochlora aggr.</i> (2011, L'Erié)	5.2	16000	9700	500	15.1	6.3
<i>A. xanthochlora aggr.</i> (2011, Prampé)	4.0	21000	8300	1000	16.1	5.0
<i>A. xanthochlora aggr.</i> (2011, L'Erié)	4.5	13000	8600	600	14.8	6.2
<i>A. xanthochlora aggr.</i> 2011, Prampé)	3.7	12000	8200	1000	15.9	6.8

<sup>a</sup> en équivalent quercétine

Le stade de maturité influe sensiblement sur la teneur en polyphénol totaux ( $\alpha = 14\%$ ) et en  $\beta$ -D-glucuronyl-O-3-quercétine. Un effet mixte mixte altitude-maturité sur la teneur en  $\beta$ -D-glucuronyl-O-3-quercétine est aussi constaté. Toutefois, cette tendance doit être confirmée en augmentant, par exemple, le nombre de paramètres.

Comme précédemment, un effet de l'espèce est observé pour les teneurs en polyphénols totaux ( $\alpha = 0.8\%$ ), en tanin 1 ( $\alpha = 0.4\%$ ) et en  $\beta$ -D-glucuronyl-O-3-isorhamnétine ( $\alpha = 0.2\%$ ). De nouveau, la faveur est donnée à *A. conjuncta aggr.* D'autre part, un effet conjugué de l'espèce et de l'altitude sur la concentration en polyphénols totaux est constaté ( $\alpha = 2\%$ ).

### 3.5.3. Influence du terrain de culture

Pour déterminer l'influence du terrain de culture, quatre lieux sont sélectionnés en Valais : Grand'Zour, Tsarein, Prampé et L'Erié. Sur ces quatre sites, la même espèce est récoltée, à savoir, *A. conjuncta* aggr. (Tableau 11).

**Tableau 11 : Teneurs respectives d'*A. conjuncta* aggr. récoltée à quatre endroits différents en polyphénols totaux, tanin 1,  $\beta$ -D-glucuronyl-O-3-quercétine et  $\beta$ -D-glucuronyl-O-3-isorhamnétine et activités anti-radicalaires et antioxydantes**

Drogue	polyphénols totaux [%MS]	Conc. drogue [ppm]			Activité [ $\mu$ g MS/ml]	
		tanin 1 <sup>a</sup>	$\beta$ -D-glucuronyl-O-3-quercétine	$\beta$ -D-glucuronyl-O-3-isorhamnétine	DPPH [EC <sub>50</sub> ]	FREC [EC <sub>50</sub> ]
<i>A. conjuncta</i> aggr. (2011, Grand'Zour)	3.9	36000	10700	2400	14.4	5.7
<i>A. conjuncta</i> aggr. (2011, Tsarein)	3.8	31000	11000	4200	12.7	4.9
<i>A. conjuncta</i> aggr. (2011, Prampé)	3.2	24500	8600	2600	14.1	7.9
<i>A. conjuncta</i> aggr. (2011, L'Erié)	3.7	31000	9800	3300	14.0	6.0

<sup>a</sup> en équivalent quercétine

Aucune tendance claire du terrain de culture n'est démontrée. Ainsi, ce paramètre n'a pas d'incidence sur la composition de la drogue.

### 3.5.4. Influence du conditionnement de l'échantillon

L'influence du conditionnement de l'échantillon est étudiée en comparant l'extraction d'une plante fraîche et d'une plante sèche (drogue) et en employant la même plante et le même solvant d'extraction (Tableau 12).

**Tableau 12 : Teneurs respectives des deux types d'extraction en en polyphénols totaux, tanin 1,  $\beta$ -D-glucuronyl-O-3-quercétine et  $\beta$ -D-glucuronyl-O-3-isorhamnétine et activités anti-radicalaires et antioxydantes**

Drogue	polyphénols totaux [%MS]	Conc. drogue [ppm]			Activité [ $\mu$ g MS/ml]	
		tanin 1 <sup>a</sup>	$\beta$ -D-glucuronyl-O-3-quercétine	$\beta$ -D-glucuronyl-O-3-isorhamnétine	DPPH [EC <sub>50</sub> ]	FREC [EC <sub>50</sub> ]
<i>A. conjuncta</i> aggr. (2011, L'Erié)	2.9	23000	7100	1900	16.1	7.5
<i>A. conjuncta</i> aggr. (2011, Prampé)	3.7	32000	10000	3100	14.0	5.8
<i>A. conjuncta</i> aggr. (2011, L'Erié, frais)	0.5	300	5500	2200	34.9	23.2
<i>A. conjuncta</i> aggr. (2011, Prampé, frais)	0.9	1400	7000	2900	25.2	18.1

<sup>a</sup> en équivalent quercétine

Une influence du mode de conditionnement de la drogue est constatée sur la teneur en polyphénols totaux ( $\alpha = 5\%$ ). D'autre part, une sensible influence est constatée sur la teneur en tanin 1 ( $\alpha = 9\%$ ) mais aussi sur l'activité antioxydante ( $\alpha = 5\%$ ).

Toutefois, lors du broyage de la drogue, la plante fraîche a subi un léger échauffement. Sous l'effet de la chaleur, il se pourrait que le tanin 1 se soit dégradé. En effet, comme démontré précédemment, cette molécule est instable. Il serait utile de refaire cette expérience avec des extraits obtenus par macération pour vérifier cette hypothèse.

### 3.5.5. Influence de l'année de croissance

Pour l'observation de l'influence de l'année de croissance, les espèces *A. conjuncta aggr* et *A. alpina aggr.* ont été récoltées deux années consécutives, à savoir 2010 et 2011 (Tableau 13).

**Tableau 13 : Teneurs respectives des deux espèces en polyphénols totaux, tanin1,  $\beta$ -D-glucuronyl-O-3-quercétine et  $\beta$ -D-glucuronyl-O-3-isorhamnétine et activités anti-radicalaires et antioxydantes**

Drogue	polyphénols totaux [%MS]	Conc. drogue [ppm]			Activité [ $\mu$ g MS/ml]	
		tanin 1 <sup>a</sup>	$\beta$ -D-glucuronyl-O-3-quercétine	$\beta$ -D-glucuronyl-O-3-isorhamnétine	DPPH [EC <sub>50</sub> ]	FREC [EC <sub>50</sub> ]
<i>A. conjuncta aggr.</i> (2010, Petit Pré)	3.3	17000	9300	2000	11.8	2.5
<i>A. alpina aggr.</i> (2010, Le Devindre)	1.9	2500	3200	2000	19.7	11.3
<i>A. conjuncta aggr.</i> (2011, Mayens de Fully)	3.4	27800	9200	3000	14.0	6.9
<i>A. alpina aggr.</i> (2011, Le Devindre)	4.0	18000	11100	1200	12.6	4.7

<sup>a</sup> en équivalent quercétine

Aucune tendance claire n'est constatée en ce qui concerne l'influence de l'année de croissance. Un léger effet est constaté en ce qui concerne la teneur en tanin 1 ( $\alpha = 11\%$ ). Ce fait est surprenant, étant donné que le printemps 2011 a été particulièrement chaud et sec, des conditions qui favorisent la synthèse des polyphénols par la plante. Ces composés servent en effet à sa protection [14]. Il est possible qu'aucune influence ne soit remarquée car la plante croît à l'étage alpin, endroit où les conditions sont reconnues extrêmes en tout temps.



## 4. Conclusion et perspectives

Trois composés phénoliques majoritaires sont identifiés dans *A. conjuncta aggr.* à savoir :

- tanin hydrolysable nommé tanin 1
- $\beta$ -D-glucuronyl-O-3-quercétine
- $\beta$ -D-glucuronyl-O-3-isorhamnétine

La teneur de ces trois composés dans la drogue est de 2.5% pour le tanin 1 (en équivalent quercétine), 0.9% pour la  $\beta$ -D-glucuronyl-O-3-quercétine et 0.2% pour la  $\beta$ -D-glucuronyl-O-3-isorhamnétine.

L'efficacité d'extraction de quatre solvants (éthanol 30%, méthanol 80%, eau déminéralisée, glycérol 55%) est étudiée. Ainsi, le solvant extrayant le plus sélectivement les trois molécules est le glycérol 55%. L'éthanol est aussi très efficace pour les deux flavonols puisqu'ils sont totalement extraits. Toutefois, dans ce cas seuls 67% du tanin 1 sont extraits. D'autre part, l'extraction au glycérol est intéressante, non seulement pour ses propriétés d'extraction, mais également pour son absence de toxicité.

L'étude de la stabilité révèle que le tanin 1 est particulièrement instable. Une conservation au frigo est conseillée pour ce composé. Dans un développement futur, il serait intéressant de faire une analyse de stabilité pour l'extrait au glycérol 55% mais aussi d'évaluer l'erreur de cette méthode.

Le genre *Alchemilla* est doté de nombreuses propriétés très intéressantes :

- Les activités anti-radicalaires et antioxydantes semblent fortement liées à la teneur en tanin 1, il serait très intéressant de connaître sa structure exacte en effectuant d'autres analyses d'identification, telles qu'une analyse  $^{13}\text{C}$  pour connaître le nombre de carbone, NOESY qui permettrait d'observer les corrélations dans l'espace entre proton d'une même molécule ou encore une analyse HMBC qui permettrait de déterminer les couplages longue distance entre proton et carbone.
- L'activité anticancéreuse sur les cellules épidermiques de la  $\beta$ -D-glucuronyl-O-3-isorhamnétine mérite d'être étudiée étant donné que 1900 personnes développent le cancer de la peau chaque année en Suisse. Cela représente 5% des cas diagnostiqués de cancer [28]. Il serait donc intéressant d'examiner cette activité dans un extrait brut.

Des trois espèces étudiées (*A. alpina aggr.*, *A. conjuncta aggr.* et *A. xanthochlora aggr.*), *A. conjuncta aggr.* est l'espèce possédant le plus d'avantages : elle est la plus concentrée en phytoactifs majoritaires mais elle a aussi les plus fortes activités anti-radicalaires et antioxydantes. Au vu des potentialités découvertes lors ce travail et dans l'optique d'une valorisation commerciale de la plante, la domestication entre dans une continuité logique et représente une étape clé.

Si cette démarche devait être poursuivie, il serait aussi intéressant de développer une technique de purification des extraits permettant de concentrer les effets et ainsi d'en augmenter l'efficacité mais aussi d'évaluer l'activité de chaque molécule séparée.

## 5. Partie expérimentale

### 5.1. Produits

Tous les produits employés ainsi que leurs qualités sont présentés ci-dessous :

Produit	Pureté	Fournisseur
Terre diatomée	<i>ISOLUTE-HM-N Bulk</i>	<i>Biotage</i>
Eau déminéralisée	<i>n/a</i>	<i>Hes-so</i>
Eau Ultrapure	<i>gradient A10</i>	<i>Millipore</i>
Acétonitrile	<i>Ph.Eur Lichrosolv®</i>	<i>Merck</i>
Méthanol	<i>LiChrosolv® for LC &gt;= 99,8%</i>	<i>Merck</i>
Ethanol	<i>Absolu</i>	<i>Cochimy</i>
Glycérol 85%	<i>Ph. Eur.</i>	<i>Merck</i>
Acétate d'éthyle	<i>min 99%</i>	<i>Brenntag</i>
Acide acétique glacial	<i>Reag. Ph Eur, p. analyses</i>	<i>Panreac PA</i>
Acide formique 98-100 %	<i>ASC, Reag.Ph. Eur.</i>	<i>Merck</i>
2-Aminoethyl diphenylborinate (NP)	<i>Purum p.a.</i>	<i>Fluka</i>
Polyéthylèneglycol 4000 (PEG)	<i>Ph. Eur.</i>	<i>Fluka</i>
Quercitrine hydrate	<i>98%</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
Isorhamnétine	<i>analytical standard, ≥99% (HPLC)</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
Azote liquide		<i>PanGas</i>

### 5.2. Matériel général

Le matériel employé pour une grande partie des expérimentations est décrit ci-dessous :

Produit	Marque	Désignation	N° article
Balance	<i>Mettler Toledo</i>	<i>analytique</i>	<i>AE 240</i>
Balance	<i>Mettler Toledo</i>	<i>préparative</i>	<i>PM 4800 Delta Range</i>
Micropipettes	<i>Biohit</i>	<i>Proline, 20-200 µl</i>	<i>n/a</i>
Micropipettes	<i>Socorex</i>	<i>Calibra 200-1000 µl</i>	<i>n/a</i>
Embouts pour micropipettes	<i>Axygen</i>	<i>1-200 µl</i>	<i>T-200-Y</i>
Embouts pour micropipettes	<i>Ratiolab</i>	<i>200-1000 µl</i>	<i>2100610</i>
Seringues	<i>Romed-Holland</i>	<i>5ml, plastique</i>	<i>3SYR-5ml</i>
Filtres	<i>Exapure™</i>	<i>Syringe filter, 13mm, membrane PTFE 0,45µm</i>	<i>ATSY13TF4</i>
Filtres	<i>Exapure™</i>	<i>Syringe filter, 25mm, membrane PTFE 0,45µm</i>	<i>ATSY25TF4</i>

### 5.3. Matériel végétal

Les échantillons étudiés ont été récoltés entre juillet 2010 et juillet 2011 en Valais. Ils ont été identifiés par [17].

#### 5.3.1. Broyage

La plante est broyée à l'aide d'un découpeur centrifuge de la marque Retsch (Haan, Allemagne) - ZM100 à une vitesse de rotation de  $14'000 \text{ tours} \cdot \text{min}^{-1}$  et avec un tamis de 1,0 mm. La poudre est stockée sous vide, à température ambiante et à l'abri de la lumière et de l'humidité.

Pour les plantes fraîches, ces dernières sont tout d'abord gelées à l'azote liquide avant d'être découpées.

#### 5.3.2. Extraction

Les extraits sont obtenus par extraction avec un extracteur haute pression ASE 200 de marque Dionex (Sunnyvale, Etats-Unis). Pour chaque extraction de drogue, 3 g de plante broyée ainsi que 7 g de terre diatomée sont homogénéisés. Pour l'extraction de plante fraîche, 5 g de plante broyée sont mélangés avec 5 g de terre diatomée. Le tout est ensuite inséré dans une cellule d'extraction. Différents solvants à diverses concentrations sont employés (MeOH, EtOH, H<sub>2</sub>O, ACN et glycérol). Les paramètres de l'extraction sont les suivants :

- Pression : 100 bar / température : 40°C
- Extraction statique pendant 10 min
- Rinçage avec 60% du volume de la cellule
- Purge avec N<sub>2</sub> pendant 60 secondes
- 1 seul cycle est effectué

Pour les extraits au glycérol, le temps de purge est augmenté à 180 secondes.

### 5.4. Matières sèches

La matière sèche est déterminée en introduisant 2.0 ml d'extrait dans un tube de 10 ml. L'évaporation s'effectue à 105°C dans une étuve SalvisLab (Rotkreuz, Suisse), Vacucenter-VC pendant 3 heures. (Méthode *Ph. Eur.*, chap. 2.2.32, 6<sup>e</sup> éd.)

La matière sèche de la drogue est déterminée de la même manière, mais en pesant 1 g de plante broyée.

## 5.5. Hydrolyse d'un extrait

L'hydrolyse s'effectue sur 2.0 ml d'extrait d'*Alchemilla nitida* B. Le solvant d'extraction est tout d'abord évaporé à sec au moyen d'un évaporateur rotatif de la marque Heidolph (Schwabach, Allemagne) VV 2000 et le résidu est repris dans 3 ml d'eau déminéralisée et 1 ml d'HCl 3M. La solution est portée à reflux pendant 1 heure. L'extraction des composés polaires s'effectue ensuite par 2x2 ml de MTBE. La phase aqueuse est ensuite à nouveau extraite par 2x2 ml de BuOH. Chaque phase organique est alors évaporée à sec au moyen d'un évaporateur rotatif et le résidu est repris dans de l'ACN 15%. Les deux solutions sont filtrées sur filtre à membrane PTFE 0.45µm dans un vial HPLC.

## 5.6. Méthodes chromatographiques analytiques

### 5.6.1. Analyse qualitative par CCM

Les analyses sur couche mince sont réalisées en phase normale sur des plaques d'aluminium recouvertes d'un gel de silice Silicagel 60 F254 (Merck, Etats-Unis). Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié.

La phase mobile est constituée d'un mélange quaternaire d'acétate d'éthyle : acide formique : acide acétique glacial : eau (100:11:11:26 ; v/v/v/v). Environ 20 µl d'extrait est déposé en bande.

Pour la mise en évidence des flavonoïdes, l'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm), avant et après révélation par le réactif NEU : 1% diphénylboryloxyéthylamine dans méthanol - 5% polyéthylène glycol dans éthanol (NP/PEG).

Observés à 365 nm, les flavonoïdes apparaissent sous forme de taches fluorescentes jaune, vert et orange [19].

### 5.6.2. Développement d'une méthode par RP-HPLC/DAD-UV

Les analyses HPLC/UV(DAD) sont effectuées à l'aide d'un appareil Agilent technologies (Santa Clara, Etats-Unis) 1200 Series munis d'un détecteur UV à barrettes de diodes. Les analyses ont été réalisées en phase inverse avec une colonne 250/3 Nucleosil 100-5 C18 HD (5 µm, 250 x 3 mm) sans contrôle de température (T ambiante). Les solvants utilisés sont de qualité HPLC et le débit est fixé à 0.5 ml/min. Les conditions chromatographiques consistent en un gradient ACN/HCOOH 1% décrit ci-dessous :

La phase mobile est composée du solvant A (ACN) et du solvant B (HCOOH 1%) avec le gradient d'éluant suivant: 0-5 min, 15% A (élution isocratique) ; 5-30 min, 15-23% A (gradient linéaire) ; 30-55min, 23-90% A (gradient linéaire), 55-60 min, 90% A (élution isocratique). Chaque injection est suivie d'une période d'équilibrage de 7 min.

Les extraits bruts sont dilués 10x avec une solution d'ACN à 15%. Ils sont ensuite filtrés sur un filtre à membrane en PTFE (pores 0,45 µm) EXAPURE™. Le volume d'injection est de 10 µl.

Le détecteur UV est réglé sur les signaux à  $\lambda_{\text{signal}}$  : 255 nm et 285 (avec correction à 374 nm). La gamme du scan du détecteur DAD est de 200 à 500 nm avec un incrément de 2.0 nm.

## 5.7. Chromatographie préparative

Les analyses HPLC/UV sont effectuées à l'aide d'un appareil Knauer (Berlin, Allemagne) muni d'une pompe péristaltique WellChrome Maxi-Star K1000, d'un autosampler Marathon et d'un détecteur YMCK-2500. Les analyses ont été réalisées en phase inverse avec une colonne de marque YMC-PACK R&D ODS (120 Å, 5 µm, 250 x 10 mm) sans contrôle de température (T ambiante). Les solvants utilisés sont de qualité HPLC et le débit est fixé à 3.5 ml/min. Les conditions chromatographiques ont été adaptées à l'aide du programme [29] et consistent en un gradient ACN/HCOOH 1% décrit ci-dessous :

La phase mobile est composée du solvant A (ACN) et du solvant B (HCOOH 1%) avec le gradient d'élution suivant: 0-1 min, 15% A (élution isocratique) ; 1-26 min, 15-23% A (gradient linéaire) ; 26-51 min, 23-90% A (gradient linéaire), 51-56 min, 90% A (élution isocratique).

La pureté des fractions est contrôlée par HPLC, les fractions semblables sont assemblées et séchées à l'aide d'un évaporateur rotatif avant d'être analysée par RMN ou par MS/MS.

## 5.8. Identification des composés par RP-HPLC-MS

Les analyses LC-MS ont été effectuées sur un appareillage chromatographique identique à celui décrit dans la section 3.3.2. L'élution est également identique mais avec seulement 0.1% d'acide formique tout le long de l'élution.

### Analyses MS

Le spectromètre de masse (Quadrupol) est équipé d'une interface d'ionisation ESI en mode négatif. Un balayage des masses est effectué aux m/z comprises entre 100-2000.

L'énergie de fragmentation est de 120 V, le flux du gaz de séchage est de 12.0 l/min, la pression de nébulisation est de 50 psi, la température du gaz de séchage est de 320°C et la température de la source n'est pas contrôlée.

### Analyse tandem

Le spectromètre de masse à trappe d'ions Thermo scientific (Waltham, Etats-Unis) - LCQ Finnigan est équipé d'une interface d'ionisation ESI et contrôlé par le logiciel Xcalibur. La température de la source est de 420 °C et l'énergie de collision appliquée pour les fragmentations en MS/MS équivaut à 37% de l'énergie totale.

## 5.9. Identification des composés par RMN

Les spectres ont été effectués sur un appareil de type Brüker (Etats-Unis) Avance 400 à 400 MHz pour le proton et 100 MHz pour le carbone. Les échantillons ont été solubilisés dans du méthanol deutérés (MeOD) dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre.

Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS) ; les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

Corrélations homonucléaires

**-COSY** ( $^1\text{H} - ^1\text{H}$ ): cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires 2J et 3J (protons séparés par deux ou trois liaisons) entre les protons voisins et ceux qui sont adjacents.

Corrélations hétéronucléaires

**-HSQC** ( $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ ) : cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés entre eux.

## 5.10. Activité anti-radicalaire / antioxydante

### DPPH

Cette analyse permet de déterminer l'activité anti-radicalaire des extraits de plante. Elle est basée sur une réaction chimique entre les capteurs de radicaux et un radical stable, le DPPH. Le DPPH est de couleur violette. Cette dernière disparaît rapidement lors de la réduction de la molécule. La détermination de l'activité est définie comme la réduction de 50% du DPPH. Il s'agit d'une méthode colorimétrique non spécifique. Le protocole est indiqué dans [30].

### FREC

Cette analyse permet de déterminer l'activité antioxydante des extraits de plante par une réaction d'oxydo-réduction. Une substance antioxydante est capable, par sa réactivité, de prévenir l'oxydation des principes actifs et ce même en petite quantité. Dans cette méthode, un complexe ferrique de tripyridyltriazine fait office d'oxydant et les antioxydants contenus dans les extraits bruts font office de réducteurs. A un pH acide, la réduction du complexe de tripyridyltriazine ferrique en complexe ferreux induit une coloration caractéristique bleue foncée. La valeur EC50 est alors définie comme la concentration équivalente en Fe(II) nécessaire à l'augmentation de 50% de l'absorbance. Il s'agit d'une méthode colorimétrique non spécifique. Le protocole est indiqué dans [31].

## 5.11. Mesure de la quantité en tanins

Cette méthode est une méthode référencée dans la *Ph. Eur.* (chap. 2.8.14, 6<sup>ème</sup> édition). Il s'agit d'un protocole dérivé de la méthode de Folin et Denis qui est retenu pour doser les phénols totaux, extraits par décoction aqueuse : l'ion phénolate-formé par addition du carbonate et phosphomolybdique qui, simultanément est réduit en donnant une solution colorée bleue dont on détermine l'absorbance. Parallèlement à ce dosage des phénols totaux, on détermine, par la même méthode et sur une fraction du décocté traitée par la poudre de peau, les phénols qui ne sont pas absorbés sur cette poudre de peau. La différence d'absorption correspond à la teneur en tanins (on opère en référence à un témoin de pyrogallol). [8]

## 6. Bibliographie

- [1] Collectif, **Secrets et vertus des plantes médicinales**, Sélections du Reader's Digest, Paris, (1977, 2<sup>ème</sup> édition), 51
- [2] Wichtl M. et al., **Plantes thérapeutiques, tradition, pratique officinale, science et thérapeutique**, Ed. TEC & DOC, 2<sup>ème</sup> édition, (2003), 14-16
- [3] Tobyn G. et al., **The Western Herbal Tradition: 2000 Years of Medicinal Plant Knowledge**, Ed. Churchill Livingstone, Philadelphia (2010), 57
- [4] Gehrke B. et al., **Molecular phylogenetics of *Alchemilla*, *Alphanes* and *Lachemilla* (Rosaceae) interfered from plastid and nuclear intron and spacer DNA sequences, with comments on genetic classification**, Molecular Phylogenetics and Evolution, 47, (2008), 1030-1044
- [5] Lauber K. et al., **Flora helvetica, Flore illustrée de Suisse**, Edition Paul Haupt, Berne (2000)
- [6] Jong-Eun K. et al., **Isorhamnetin suppresses skin cancer through direct inhibition of MEK1 and PI3-K**, Cancer Prev Res, 4, (2011), 582-591
- [7] Pharmacie plus, *Alchemilla alpine*,  
[http://www.pharmacielauber.ch/medias/docs/media\\_355.pdf](http://www.pharmacielauber.ch/medias/docs/media_355.pdf), consulté le 18.06.2011
- [8] Bruneton J., **Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales**, Ed. TEC & DOC, Paris (2009), 445-453 et ss ; 469 ; 365 et ss
- [9] Moller C. et al., **Characterisation of Tannin-Containing Herbal Drugs by HPLC**, Phytochemical analysis, 20 (2009), 231–239
- [10] Falchero L., **Essential Oil Composition of *Alchemilla alpina* L. em. Buser from Western Alpine Pastures**, Journal of essential oil research, 20, (2008), 542-545
- [11] Grogg, P.A., **Introduction à la phytoanalytique**, HES-SO/Valais, 2010
- [12] De Bruyne T. et al, **Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities**, Biochemical Systematics and Ecology, 27, (1999), 445-459
- [13] Tondi G. et al., **Metal adsorption of tannin based rigid foams**, Industrial Crops and Products 29, (2009), 336-340
- [14] Macheix J-J. et al., **Les composés phénoliques des végétaux**, Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, (2005), 18-21
- [15] Phillips N. et al., **The Herbalist's Way: The Art and Practice of Healing with Plant Medicines**, Chelsea Green Publishing, White River Junction, (2005), 234-235
- [16] Shrivastava R. et al., **Effects of *Alchemilla vulgaris* and glycerine on epithelial and myofibroblast cell growth and cutaneous lesion healing in rats**, Phytotherapy Research, 21, (2007), 369-273
- [17] M. Xavier Simonnet, chargé de projet Médiplant, Centre de recherche Conthey, contact personnel, 2011
- [18] Lachat L., **Classeur de résultats expérimentaux**, HES-SO Valais, 2011

- [19] Wagner H. et al., **Plant Drug Analysis : A Thin Layer Chromatography Atlas**, Springer-Verlag, Berlin, second edition, (1996) 196-197 ; 362
- [20] de Rijke E. et al., **Analytical separation and detection methods for flavonoids**, Journal of Chromatography A, 1112, (2006), 31-63
- [21] Pretsch E. et al., **Structure Determination of Organic Compounds**, Springer-Verlag, Berlin, (2009), 4<sup>ème</sup> édition, 52 ; 148 ; 234
- [22] Mabry, T. J et al., **The systematic identification of flavonoids**, Springer-Verlag, Berlin, (1970)
- [23] Silverstein R. M. et al., **Identification spectrométrique de composés organiques**, Ed. De Boeck, Bruxelles, 2<sup>ème</sup> édition, (2007), 172
- [24] Passeportsanté, Quercétine  
[http://www.passeportsante.net/fr/Solutions/PlantesSupplements/Fiche.aspx?doc=quercetine\\_ps](http://www.passeportsante.net/fr/Solutions/PlantesSupplements/Fiche.aspx?doc=quercetine_ps)  
; consulté le 13.08.2011
- [25] Bouhlel I, et al., **Antigenotoxic and antioxidant activities of isorhamnetin 3-O neohesperidoside from *Acacia salicina***, Drug and Chemical Toxicology, 32, (2009), 258-267
- [26] Kalman F., **Cour de validation de méthodes**, (2011), HES-SO Valais
- [27] Marcon N. et al., **Mesure de l'activité redox réelle de phyto-extraits bruts**, document interne à la HES-SO Valais, Institut Life Technologies, (2006)
- [28] Ligue suisse contre le cancer, cancer de la peau,  
[http://www.krebsliga.ch/fr/a\\_propos\\_du\\_cancer/types\\_de\\_cancer/cancer\\_de\\_la\\_peau/](http://www.krebsliga.ch/fr/a_propos_du_cancer/types_de_cancer/cancer_de_la_peau/);  
consulté le 04.08.2011
- [29] Davy G., **HPLC Calculator software**, Uni de Genève, version 3.0
- [30] **Analyse de l'activité anti-radicalaire au moyen du radical stabilisé DPPH**, version 1, Protocole interne à la HES-SO Valais, Institut Life Technologies, 2005
- [31] **Activité antioxydante (FREC)**, version 1 Protocole interne à la HES-SO Valais, Institut Life Technologies, 2005



## 7. Remerciements

Je tiens à remercier le Dr. Alain-François Grogg pour sa disponibilité, son soutien et son intérêt lors de ce travail de diplôme. Je tiens aussi à remercier M. Xavier Simonet, pour son aide précieuse en ce qui concerne l'identification des différentes espèces d'alchémilles.

Je remercie également Mme Nadia Marcon, ingénieure HES-SO, pour sa précieuse aide lors de la réalisation de ce travail ainsi que sa disponibilité et sa bonne humeur mais aussi pour la relecture de ce travail. Merci aussi à Jean-Martin Denis pour son aide en ce qui concerne l'interprétation des résultats MS et pour la relecture de ce travail.

Je tiens aussi à remercier MM. Pasqual Jacquemettaz, Antoine Fornage et Fabrice Micaux pour tous les conseils dispensés et les explications fournies ainsi que toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merci enfin à toute ma famille qui m'a toujours soutenue pendant ces années de formation.

Sion, le 19 août 2011

Laurence Lachat