Thèse de doctorat de l'Université de Strasbourg

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé (ED 414)

Discipline : Sciences de la vie, biologie, biochimie

UPR 2357 Institut de Biologie Moléculaire des Plantes

Approche métabolomique pour une caractérisation plus fine d'extraits de plantes d'intérêts pour la santé humaine

Présentée par

Julien DELECOLLE

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Strasbourg

Soutenance le 03 mars 2017

Membres de la commission d'examen

Pr. Raphaël DUVAL	Rapporteur externe
Pr. Alain HEHN	Rapporteur externe
Dr. Christine SCHAEFFER-REISS	Examinateur interne
Dr. Dimitri HEINTZ	Directeur de thèse

Table des matières

INTRODUCTION **1**

I. Contexte de la thèse **1**
II. Les métabolites **3**
III. La métabolomique **4**
IV. Les outils de la métabolomique **6**
1. La chromatographie 6
2. La spectrométrie de masse 7
3. Les couplages GC-MS et LC-MS 12
4. Les banques de données en métabolomique 12
5. La RMN 14
V. Les objectifs du travail de thèse **15**
VI. Bibliographie **16**

PARTIE I MATERIEL ET METHODES **19**

I. Introduction **19**
II. Analyse globale du contenu métabolique de la TM en UPLC-UV-MS ESI+/- **21**
1. Préparation des échantillons 21
2. Méthode chromatographique 21
3. Paramètres de détection DAD et MS 23
III. Analyse de la TM en UPLC-MS APPI+ **24**
1. Méthode chromatographique 24
2. Paramètres de détection DAD et MS 25
IV. Analyse des composés polaires de la TM en GC-EI-MS (avec dérivation) **26**
1. Préparation des échantillons et dérivation des métabolites pour l'analyse GC-MS 26
2. Méthode GC-MS 27
3. Identification des métabolites 28
V. Analyse des composés apolaires de la TM en GC-EI-MS (sans dérivation) **30**
1. Préparation des échantillons 30
2. Méthode GC-MS 30
VI. Mise en place de banques de données internes **30**
1. Banque de données GC-MS polaire avec dérivation 29
2. Banque de données GC-MS apolaire 30
VII. Analyse non ciblée de la TM par spectrométrie de masse haute-résolution UPLC-QTOF **31**
1. Préparation des échantillons 31
2. Méthode UPLC-QTOF 32
3. Méthode de détection HRMS QTOF 33
VIII. Collecte des métabolites d'intérêts par HPLC semi-préparative **33**
1. Préparation des échantillons 33
2. Méthode chromatographique HPLC semi-préparative 34

IX. Vérification par UPLC-UV-MS des fractions collectées **35**
1. Préparation des échantillons 35
2. Méthode UPLC-UV-MS 35

X. Détermination des formules brutes des composés présents dans les fractions collectées par UPLC-QTOF **36**
1. Préparation des échantillons 36
2. Méthode UPLC-QTOF 36
3. Détermination des formules brutes et identification des composés 37

XI. Mise en évidence de métabolites d'intérêts par UPLC-MS/MS en mode MRM **37**
1. Préparation des échantillons 37
2. Méthode chromatographique 37
3. Méthode de détection MS/MS 38

XII. Annexes **39**

XIII. Bibliographie **52**

PARTIE II LES TEINTURES-MERES **55**

Introduction **55**

Chapitre 1 : *Eupatorium perfoliatum* **59**
1. Description générale 59
2. Bibliographie et connaissances scientifiques 60
3. Résultats et Discussion 64
4. Conclusion 77
5. Bibliographie 78

Chapitre 2 : *Aconitum napellus* **79**
1. Description générale 79
2. Bibliographie et connaissances scientifiques 80
3. Résultats et Discussion 82
4. Conclusion 86
5. Annexes 87
6. Bibliographie 88

Chapitre 3 : *Bryonia alba* **89**
1. Description générale 90
2. Bibliographie et connaissances scientifiques 91
3. Résultats et Discussion 92
4. Conclusion 97
5. Bibliographie 98

Chapitre 4 : *Arnica montana* **99**
1. Description générale 99
2. Bibliographie et connaissances scientifiques 99
3. Résultats et Discussion 101
4. Conclusion 110
5. Bibliographie 110

Chapitre 5 : *Gelsemium sempervirens* **111**

1. Description générale 111
2. Bibliographie et connaissances scientifiques 111
3. Résultats et Discussion 114
4. Conclusion 116
5. Bibliographie 117
Chapitre 6 : *China rubra* **119**
1. Description générale 119
2. Bibliographie et connaissances scientifiques 120
3. Résultats et Discussion 121
4. Conclusion 123
5. Bibliographie 123
Chapitre 7 : *Belladonna* **125**
1. Description générale 125
2. Bibliographie et connaissances scientifiques 126
3. Résultats et Discussion 127
4. Conclusion 129
5. Bibliographie 129
Chapitre 8 : *Drosera rotundifolia* **131**
1. Description générale 131
2. Bibliographie et connaissances scientifiques 132
3. Résultats et Discussion 133
4. Conclusion 137
5. Bibliographie 137
Chapitre 9 : *Polygala senega* **139**
1. Description générale 139
2. Bibliographie et connaissances scientifiques 139
3. Résultats et Discussion 141
4. Conclusion 143
5. Bibliographie 143
Chapitre 10 : *Eucalyptus globulus* **145**
1. Description générale 145
2. Bibliographie et connaissances scientifiques 146
3. Résultats et Discussion 147
4. Conclusion 150
5. Bibliographie 150
Chapitre 11 : *Sumbulus moschatus* **151**
1. Description générale 151
2. Bibliographie et connaissances scientifiques 152
3. Résultats et Discussion 153
4. Conclusion 158
5. Annexes 159
6. Bibliographie 160
Chapitre 12 : *Cicuta virosa* **161**
1. Description générale 161
2. Bibliographie et connaissances scientifiques 161
3. Résultats et Discussion 163
4. Focus : la cicutoxine 171

5. Conclusion 175
6. Annexes 176
7. Bibliographie 178
Chapitre 13 : *Asa foetida* **179**
1. Description générale 179
2. Bibliographie et connaissances scientifiques 180
3. Résultats et Discussion 180
4. Conclusion 185
5. Annexes 186
6. Bibliographie 188
Chapitre 14 : *Corydalis* **189**
1. Description générale 189
2. Bibliographie et connaissances scientifiques 189
3. Résultats et Discussion 190
4. Conclusion 194
5. Annexes 195
6. Bibliographie 196
Chapitre 15 : *Ignatia amara* **197**
1. Description générale 197
2. Bibliographie et connaissances scientifiques 198
3. Résultats et Discussion 198
4. Conclusion 201
5. Annexes 202
6. Bibliographie 202
Chapitre 16 : *Valeriana officinalis* **203**
1. Description générale 203
2. Bibliographie et connaissances scientifiques 203
3. Résultats et Discussion 205
4. Conclusion 208
5. Annexes 208
6. Bibliographie 209
Chapitre 17 : *Staphysagria* **211**
1. Description générale 211
2. Bibliographie et connaissances scientifiques 212
3. Résultats et Discussion 213
4. Conclusion 214
5. Bibliographie 214
Chapitre 18 : *Avena sativa* **215**
1. Description générale 215
2. Bibliographie et connaissances scientifiques 215
3. Résultats et Discussion 217
4. Conclusion 219
5. Bibliographie 219
Chapitre 19 : *Hyoscyamus niger* **221**
1. Description générale 221
2. Bibliographie et connaissances scientifiques 222
3. Résultats et Discussion 223

4. Conclusion 227
5. Annexes 228
6. Bibliographie 228

PARTIE III LE L52 231

Introduction 231
Chapitre 1 : analyses LC-MS du L52 233
1. Introduction 233
2. Matériel et méthodes 233
3. Résultats et Discussion 234
4. Conclusion 239
Chapitre 2 : analyses GC-MS du L52 241
1. Introduction 241
2. Analyses GC-MS pour les composés polaires 241
3. Analyses GC-MS pour les composés apolaires 245
4. Analyses GC-MS pour les composés volatils (Headspace) 249
5. Conclusion 252
Chapitre 3 : autres analyses GC-MS 255
1. GC-MS : méthodes d'extractions à l'éthyle acétate 255
2. GC-MS : méthode pour les composés apolaires 258
Chapitre 4 : la microscopie du L52 261
1. Microscopie optique 261
2. Microscopie à fluorescence 261
3. Microscopie électronique à transmission 261
4. Conclusion 262
Chapitre 5 : l'ADN du L52 263
1. Matériel et méthodes 263
2. Résultats et Discussion 263
Chapitre 6 : Le poids du L52 265
1. Matériel et méthodes 265
2. Résultats 265
Chapitre 7 : la composition élémentaire du L52 267
1. Introduction 267
2. Résultats et Discussion 267
Conclusion 269
Annexes 270
Bibliographie 276

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE 279

Remerciements

Ce travail de thèse n'aurait pas pu aboutir sans toutes les rencontres, les échanges et les amitiés faits au cours de ces trois années.

Tout d'abord, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance aux membres du Jury :

- La Docteure Christine Schaeffer-Reiss, du Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (LSMBO) de l'Université de Strasbourg,
- Le Professeur Raphaël Duval, du Laboratoire Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes (SRSMC) de l'Université de Lorraine,
- Le Professeur Alain Hehn, du Laboratoire Agronomie et Environnement de l'Université de Lorraine,
- Le Docteur Jean-Baptiste Mazère, des Laboratoires Lehning,
- Le Docteur Patrick Saindrenan, Institut of Plante Science Paris-Saclay (IPS2), Université Paris Sud,

pour l'attention, l'intérêt et le temps consacré à la lecture de ce mémoire.

Je voudrais remercier les Laboratoires Lehning, pour avoir mis en place et financé ce beau projet. Stéphane Lehning, Jean Baptiste Mazère, Marielle Zemlic, Nadège Garsot et Nicolas Pilon.

Dimitri, merci infiniment pour tout ce que tu as pu m'apporter sur le plan personnel et professionnel pendant ces 3 années (et même avant !). Merci pour tes conseils, ton aide et surtout ta générosité. MERCI.

Merci à la « Team Metabo » : Julie, je te souhaite tout plein de bonheur ! Max, c'est bientôt ton tour ! Arnaud, nous n'avons pas terminé le test comparatif des 1000 feuilles… Chloé, la meilleure des stagiaires ! (et maintenant la meilleure des thésardes ?!?) Merci Elisa pour tes conseils en HRMS et RMN, à Laetitia pour ta bonne humeur.

Je remercie tous les membres de l'IBMP avec qui j'ai pu partager et apprendre et qui m'ont permis d'effectuer ce travail dans les meilleures conditions tout le long de ces trois années : Hubert, Benoit, Claire, François, Laetitia, Pascaline, Manue, Lucie, Etienne, Mathieu, Jérôme, Lisiane, Joëlle, Martine et tous les autres.

Je remercie l'équipe du LSMBO pour tous les échanges, les conseils apportés sur la protéomique et surtout pour leur bonne humeur : François, Danielle, Christine et Alain.

Merci aux trois vieux complices de m'avoir partagé leurs expériences et leurs amitiés.

Merci aux « Roamers » de m'avoir accompagné tout au long d'une autre aventure parallèle…

Merci à mes Bro's, Arthur et Pierro, frère de sang et frère de cœur.

Merci à mes parents sans qui je ne serais pas là aujourd'hui. Merci de m'avoir permis de réaliser tout ce chemin, qui me conduira, j'en suis sûr, vers beaucoup d'autres.

Merci Marraine, toi qui a toujours eu les bons mots et toujours cru en moi. Tu m'as permis de grandir.

Merci Daphné, ma raison.

Abréviations et symboles

Da Dalton 1Da = 1 $g.mol^{-1}$

DAD détecteur à barrette de diode

EI impact électronique

ESI electrospray

EtOH éthanol

g gramme

GC chromatographie gazeuse

HILIC chromatographie liquide à interactions hydrophiles

HPLC chromatographie liquide haute performance

HRMS spectrométrie de masse haute-résolution

H_2O eau

IR indice de rétention

MeOH méthanol

µg microgramme

µL microlitre

mg milligramme

mL millilitre

min minute

mol mole

MS spectrométrie de masse

m/m rapport masse sur masse

m/z rapport masse sur charge

ng nanogramme

nm nanomètre

nM nanomolaire

ppm partie par million

RMN résonance magnétique nucléaire

rpm rotations par minute

sec seconde

TM teinture-mère (**TMs** teintures-mères)

TMS trimethylsilyl

UPLC chromatographie liquide à très haute performance

UV ultraviolet

V volt

INTRODUCTION

I. Contexte de la thèse

Ces trois années de thèse s'inscrivent dans le cadre d'une collaboration entre les Laboratoires Lehning et la plateforme métabolomique de l'Institut de biologie moléculaire des plantes (IBMP, CNRS).

Formé à la médecine homéopathique dans les années 30, René Lehning développe ses premières formulations et ses premiers médicaments à la suite de l'épidémie de grippe espagnole. Il fonde en 1935 à Metz les Laboratoires Lehning, où seront développés par la suite de nombreux médicaments d'homéopathie et de phytothérapie. Les Laboratoires Lehning souhaitent exploiter les propriétés des plantes, mais c'est une époque où la majorité des herboristeries disparaissent au profit des pharmacies. Tirés par leur produit phare, le L52 contre les états grippaux, les Laboratoires Lehning prospèrent alors à travers la France. Gérard Lehning reprend la direction des Laboratoires et entreprend un développement à l'international. Des filiales sont créées en Espagne, en Allemagne et au Portugal. Puis des partenariats sont établis avec des distributeurs en Italie, au Canada et aux USA.

Aujourd'hui, l'entreprise est présente dans plus de 20 pays. Elle est dirigée depuis 2003 par Stéphane Lehning, petit-fils de René Lehning. Les laboratoires ont été délocalisés à Sainte-Barbe, à 15 km de Metz, où 100% des produits sont fabriqués. Le savoir-faire principal des Laboratoires Lehning est la fabrication des teintures-mères (TMs), principalement d'origine végétale, mais aussi minérale et animale. Environ 250 TMs issues de plantes sont fabriquées et permettent d'élaborer une centaine de médicaments.

Une teinture-mère est fabriquée par macération d'une plante entière, d'une partie ou d'un organe particulier de la plante (partie souterraine, partie aérienne fleurie, graines), dans une solution hydro-alcoolique, pendant environ trois à cinq semaines. Le pourcentage d'éthanol peut varier de 25 à 60%, voire jusqu'à 90%. Les macérations sont ensuite pressées, filtrées et stockées en attendant leur utilisation. Les plantes utilisées peuvent être fraiches ou séchées. Si les plantes sont fraiches, elles doivent obligatoirement être utilisées au maximum 48h après la récolte pour fabriquer la TM.

Chaque TM fait l'objet d'une monographie où sont décrits : l'espèce botanique utilisée ; la partie de la plante nécessaire à la fabrication de la TM ; le pourcentage d'éthanol présent dans le mélange hydro-alcoolique et les différentes méthodes de contrôle de la bonne fabrication de la TM. Ces monographies sont régies par les pharmacopées françaises et européennes.

Une fois la TM fabriquée, elle est soit vendue directement aux pharmaciens, soit utilisée pour la conception de médicaments homéopathiques et de phytothérapie. Elle sera, suivant le produit fini, diluée et mélangée à d'autres TMs. C'est le cas des produits L52 et L72, présents sous la forme de solutions buvables en gouttes.

Bien que nous utilisions les TMs depuis des centaines d'années, nous nous sommes aperçus que nous ne connaissions pas la composition précise en métabolites de chacune d'entre elles. En effet, nous connaissons pour chaque TM la molécule ou la famille phytochimique que nous dosons pour le contrôle et la qualité uniquement. Certes, en général, ce sont des molécules biologiquement actives, connues pour leurs propriétés bénéfiques ou toxiques. C'est pour cela que ces plantes sont choisies pour la fabrication des TMs. Mais de nombreuses autres molécules sont potentiellement extraites de la plante. Ces dernières ont probablement un rôle important à jouer dans la TM et dans le produit fini. Elles peuvent permettre, par synergie, d'augmenter les effets thérapeutiques recherchés. Elles peuvent apporter du gout, des arômes et des couleurs intéressantes pour le produit. A l'inverse, certaines d'entre elles peuvent être toxiques et dangereuses pour l'Homme. Il est donc important de connaitre de manière plus approfondie, la composition en métabolites de chaque TM.

Voici pourquoi les Laboratoires Lehning ont mis en place cette collaboration avec la plateforme métabolomique de l'IBMP, créée en 2008 qui disposent d'outils d'analytiques tels que la chromatographie et la spectrométrie de masse. Elle permet l'étude de métabolites, petites molécules constituant le vivant, pour aider à comprendre les mécanismes des systèmes biologiques. Elle développe des méthodes d'analyses ciblées et des profilages métaboliques sur des échantillons biologiques, essentiellement sur les végétaux.

II. Les métabolites

La plante contient différentes molécules : des macromolécules tels que les protéines, les ADN et les ARN ; et des petites molécules que l'on nomme métabolites. Ces derniers sont des intermédiaires du métabolisme, des substrats ou des produits des enzymes. Par convention, le métabolite est une molécule de taille inférieure à 1 000 Da, mais nous pouvons également considérer des molécules de 2 000 voire 3 000 Da comme des métabolites. L'évolution des outils analytiques au cours du temps a fait évoluer cette définition. C'est, en fait, le moyen de détection du métabolite qui détermine la taille minimale et maximale du métabolite. Prenons par exemple un couplage GC-MS classique : à l'aide de cette technique, nous ne pourrons observer des molécules possédant une masse supérieure à 800 Da, car ici la limite est fixée par la volatilité des métabolites au niveau de la GC. A l'opposé, certaines techniques de spectrométrie de masse haute résolution permettent de détecter des métabolites d'une masse d'environ 10 000 Da.

Nous classons en général les métabolites en deux catégories, les métabolites primaires et secondaires :

Les métabolites primaires interviennent dans les mécanismes essentiels à la vie de la plante tels que la croissance, le développement, la reproduction. On y retrouve les acides aminés, les sucres et les lipides. Nous retrouvons près de 300 acides aminés naturels chez les végétaux. Seulement une vingtaine sont des constituants normaux des protéines. Les fonctions biologiques des autres acides aminés au sein de la plante ne sont pas bien connues à l'heure actuelle et ils sont considérés comme métabolites secondaires [1]. Les sucres ont plusieurs rôles essentiels pour les plantes. Ils participent à la structure de l'organisme, comme élément de soutien. Nous retrouvons ainsi la cellulose, polymère de glucose constituant des parois végétales. Les sucres, également sous la forme de polymères, servent de réserves énergétiques, comme l'amidon. Enfin, les sucres sont à la base de tous les composés organiques du monde vivant. Ils sont synthétisés au cours de la photosynthèse à partir du dioxyde de carbone, de l'eau et de la lumière [2]. Les lipides ont également plusieurs fonctions essentielles pour la plante. Ce sont aussi des substances de réserve et une source d'énergie. Ils ont un rôle fondamental comme constituants des membranes des cellules. Ils ont également un rôle de protection en formant les cutines et les cires.

Les métabolites secondaires sont synthétisés dans les mécanismes de défense contre des attaques biotiques (herbivores, insectes, virus,…) ou abiotiques (sècheresse, rayonnement UV,…). Ils participent aux phénomènes d'attraction des pollinisateurs comme les pigments ou les

huiles essentielles. Les principales familles de métabolites secondaires sont les composés phénoliques, les composés terpéniques et les alcaloïdes. La plante étant un organisme sessile, par conséquent, elle est constamment obligée de s'adapter à son environnement. Elle met donc en place de nombreuses voies métaboliques pour produire des milliers de molécules différentes nécessaires à sa survie.

Par ailleurs, suite aux avancées scientifiques dans les domaines de métabolomique, des interactions entre différents organismes et dans l'écologie environnementale, nous commençons à classer les métabolites dans d'autres catégories. Nous parlons :

- Des métabolites endogènes lorsqu'ils sont synthétisés par l'organisme lui-même (c'est le cas des métabolites primaires et secondaires chez les plantes décrites ci-dessus).
- Des métabolites exogènes, produits par un autre organisme que celui étudié mais présent dans ce dernier. Nous pouvons prendre comme exemple les métabolites produits par la flore microbienne chez l'Homme [3].
- Des xenométabolites : ce sont des métabolites étrangers à l'organisme étudié mais présents, tels que les pesticides et les médicaments.

Tous ces métabolites décrits ci-dessus sont potentiellement présents dans les TMs. Nous allons donc utiliser les outils adaptés pour identifier l'ensemble des métabolites.

III. La métabolomique

Par définition, la métabolomique est la mesure qualitative et quantitative de tous les métabolites dans les cellules, les tissus, les organismes. A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode analytique permettant l'analyse de l'ensemble du métabolome. Les métabolomes sont extrêmement complexes. Il existe chez les plantes plusieurs centaines de milliers de métabolites différents [4]. Certains d'entre eux ont des structures similaires (isomères). Ensuite les métabolites sont présents à des concentrations différentes au sein du métabolome. Le glucose, sous la forme de polymère de 15 à 15 000 unités, la cellulose, est la matière organique la plus abondante sur terre et constitue plus de 50% de la biomasse. A l'opposé, la plante synthétise des phytohormones telles que les auxines, les cytokinines, les acides jasmoniques et les brassinostéroïdes, pouvant être présentes à des concentrations très faibles, de l'ordre du nM [5]. Ces différences de concentrations rendent difficile la détection des signaux correspondant aux métabolites de faibles concentrations, parasités par ceux des métabolites de fortes concentrations.

Il existe donc plusieurs approches en métabolomique, utilisées indépendamment ou de manière complémentaire, en fonction de la question biologique posée (***Figure 1***). Nous parlons :

- D'empreinte métabolique (« Fingerprinting »), où le but est de détecter un maximum de métabolites sans les identifier. Cette approche est utilisée lorsque nous voulons observer des différences métaboliques entre deux populations d'individus (sauvage/mutant ; condition 1/condition 2) ou la recherche de biomarqueurs (sain/malade).
- De profilage métabolique, où nous nous concentrons sur plusieurs familles de composés, sans forcément identifier tous les métabolites.
- D'analyse ciblée (« targeting ») où nous identifions et quantifions plusieurs métabolites d'une seule famille.

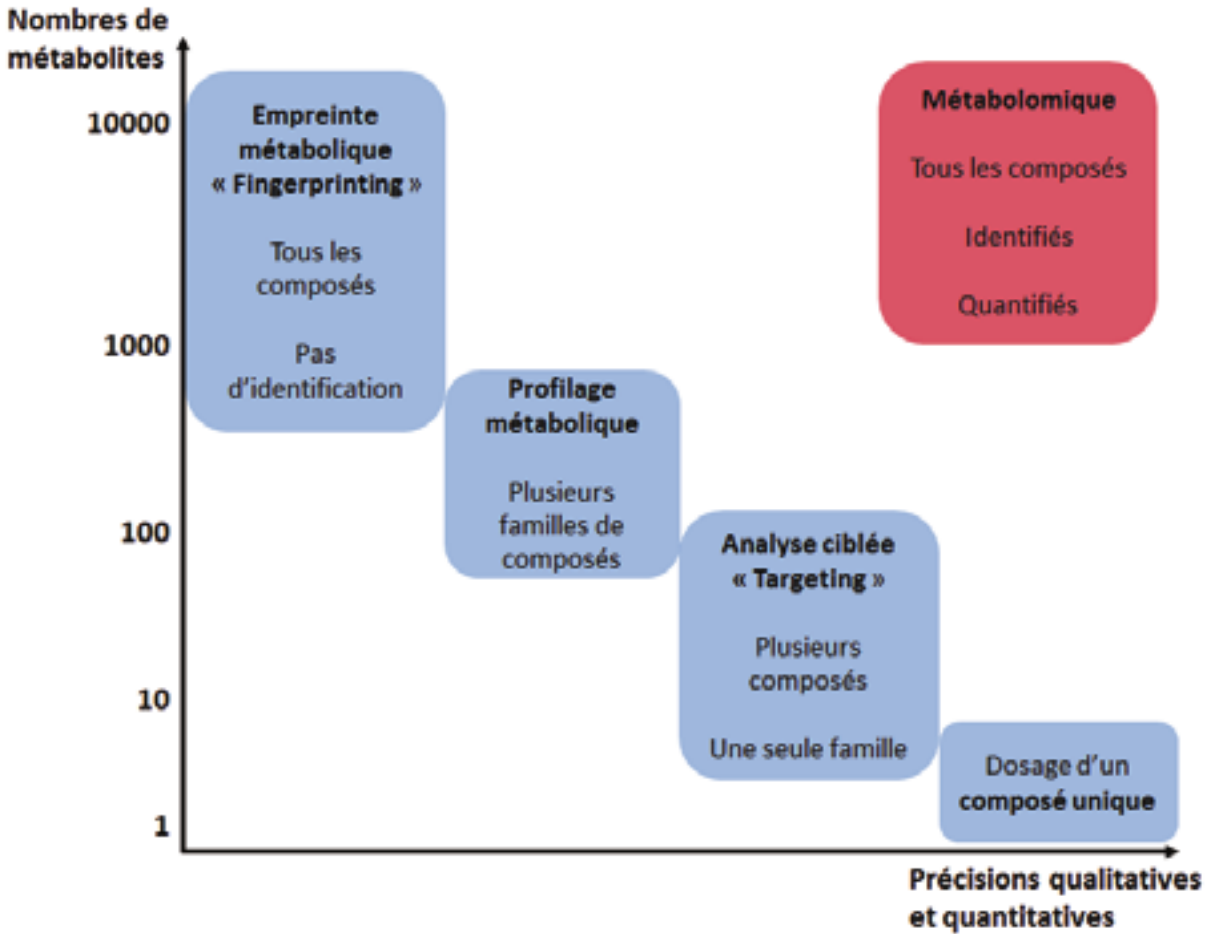


Figure 1*: représentation schématique des différentes approches analytiques en métabolomique.*

Au cours de ces travaux de recherche, nous utiliserons une approche type profilage métabolique, afin d'identifier un maximum de composés issus de familles différentes. Nous verrons les

avantages et les limites de cette approche ainsi que sa complémentarité avec les autres approches plus ciblées. Plusieurs outils analytiques sont nécessaires pour mener ces travaux.

IV. Les outils de la métabolomique

1. La chromatographie

Pour identifier le contenu moléculaire d'un extrait de plante, il est nécessaire de séparer dans un premier temps les molécules entre-elles afin de les identifier dans un second temps. Plusieurs techniques de séparation existent, telles que les filtrations, les gels, les extractions par solvants organiques et les chromatographies.

Il existe de nombreuses techniques de chromatographies telles que la chromatographie sur couche mince (CCM ou TLC pour Thin Layer Chromatography), la chromatographie liquide ou gazeuse. Toutes ces techniques reposent sur le même principe : l'échantillon, composé d'un mélange de métabolites, est entrainé par une phase mobile au contact d'une phase stationnaire. Chaque métabolite migrera à une vitesse qui dépendra de ses propriétés physico-chimiques et de la nature des deux phases. Au cours de ces travaux, nous avons utilisé deux types de chromatographie : la chromatographie liquide et la chromatographie gazeuse.

- ***La chromatographie liquide (LC)***

Nous avons choisi d'utiliser la chromatographie liquide Ultra Performance (UPLC) pour plusieurs raisons. La première est, comme son nom l'indique, plus performante par rapport à la chromatographie liquide classique, c'est-à-dire la chromatographie liquide haute pression ou HPLC. En effet, l'UPLC permet de travailler à des pressions plus élevées et des volumes plus faibles, permettant un gain de temps, de solvants et de travailler avec des volumes d'échantillons plus faibles. Ensuite, nous voulons éviter, dans un premier temps, une préparation de l'échantillon et travailler directement sur les TMs. Les solutions hydroalcooliques se prêtent bien à l'analyse en UPLC et nous voulons garder l'intégrité des métabolites pour ne pas perdre d'informations. Il existe plusieurs phases stationnaires composant les colonnes UPLC. Elles sont composées de billes de silice non greffées (nous parlons alors de colonne HILIC) ou greffées de différents groupements chimiques (chaines carbonées à quatre, huit ou dix-huit carbones par exemple). Nous parlons alors de colonne en phase inverse. Le choix des phases est spécifique à la nature des molécules que nous voulons séparer. Nous avons donc choisi, dans un premier, temps

une colonne UPLC en phase inverse C18, adaptée, dans une approche de profilage métabolique, à la séparation de molécules présentes en solution hydro-alcoolique.

- ***La chromatographie gazeuse (GC)***

La chromatographie gazeuse permet de séparer les molécules sous forme gazeuses, ce qui est différent de la chromatographie liquide où nous séparons les molécules en solution. Les molécules peuvent être sous forme gazeuse à température ambiante, comme les molécules odorantes présentes dans l'air telles que les aromes des huiles essentielles. Ou bien, il sera nécessaire de chauffer les molécules pour les amener sous forme gazeuse. Une fois sous cette forme, elles seront séparées dans une colonne capillaire de chromatographie gazeuse et arriveront une à une dans le spectromètre de masse. Les molécules doivent être volatilisables et thermostables jusqu'à une température de 300°C. Si ce n'est pas le cas, elles ne pourront être analysées en GC-MS. Il est possible de transformer chimiquement une molécule afin de la rendre volatilisable et thermostable, on parle alors de dérivation d'une molécule. C'est le cas lorsque l'on analyse des sucres, des acides aminés, voire des lipides présentant des groupements polaires. La dérivation la plus courante en GC est la silylation, principalement la triméthylsylilation et la tert-butyldimethylsilylation. Le principe chimique de la dérivation est présenté dans la « Partie I Matériel et Méthodes » [6]. La séparation se fait à l'intérieur d'une colonne capillaire de silice. Sur cette dernière y est greffée une phase stationnaire, spécifique à la nature des métabolites que nous voulons séparer.

2. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est basée sur le principe d'une séparation des molécules en fonction de leur rapport masse-sur-charge (m/z). Cette séparation à lieu grâce à la variation de courants et de champs électriques, et cela implique que les molécules doivent être chargées pour être séparées. Un spectromètre de masse est composé de trois parties distinctes (***Figure 2***):

- La source, dans laquelle les molécules sont ionisées, libérées de leur solvant et transférées vers l'analyseur
- L'analyseur, qui sépare les ions en fonction de leur rapport masse-sur-charge (m/z)
- Le détecteur, qui permet la détection et converti le signal électrique en données numériques qui seront envoyées vers un ordinateur.

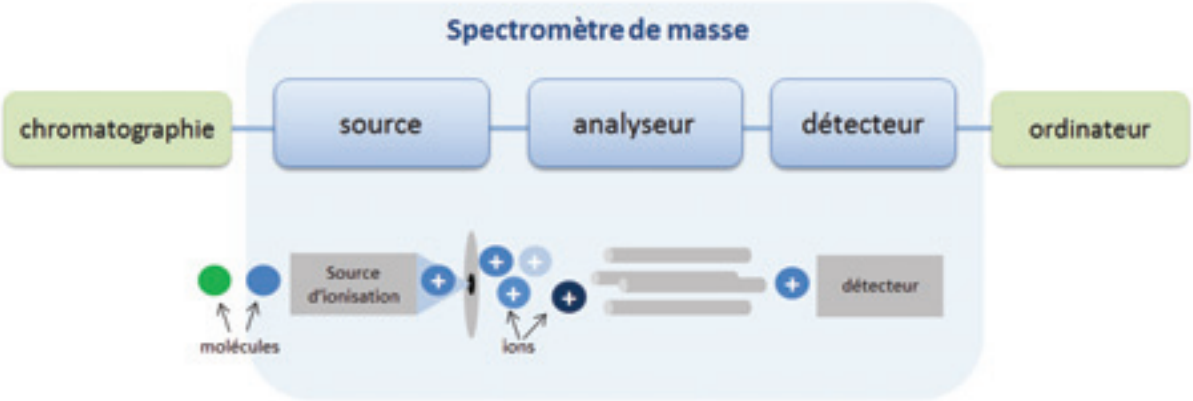


Figure 2 *: illustration schématique d'un spectromètre de masse.*

L'invention de la spectrométrie de masse est attribuée au physicien anglais Joseph John Thomson. En 1897, il démontre l'existence des électrons et des isotopes, lui valant le prix Nobel de physique de 1906 [7]. En 1922, Francis William Aston a reçu le prix Nobel de Chimie « pour sa découverte, au moyen de son spectrographe de masse, des isotopes d'un grand nombre d'éléments non radioactifs et de son énonciation de la règle des nombres entiers ». Parallèlement, les travaux d'Arthur Jeffrey Dempster ont permis de mesurer la masse de l'électron en 1907 puis plusieurs isotopes importants dont celui de l'Uranium 235 ^{235}U [8]. En 1934, les physiciens allemands Joseph Mattauch et Richard Herzog ont intégré le système de focalisation des ions au spectromètre de masse, à l'aide d'un champ électrique [9]. Vers 1940, les spectromètres « magnétiques » se développent, grâce notamment aux travaux de l'américain Alfred O. C. Nier, qui ont permis la séparation des isotopes ^{235}U et ^{238}U et d'augmenter les performances du spectromètre en matière de résolution par rapport à celui de Mattauch-Herzog. Dès lors, les spectromètres de masse n'ont cessé d'évoluer et d'être de plus en plus performant. Différents types de sources, d'analyseurs et de détecteurs ont ainsi été développés et combinés entre eux afin de répondre à des questions biologiques plus spécifiques et complexes comme l'identification de molécules inconnues dans des extraits biologiques complexes ou la détection la plus sensible possible d'une molécule dans un extrait.

Le rôle de la source d'ionisation est de faire passer les métabolites de l'état de matière condensée à un état gazeux et de les transformer en ions, car un spectromètre de masse fonctionne grâce à des champs électriques. Son rôle est également de transférer et focaliser les ions vers l'analyseur via son interface. Il existe différents types de sources, que nous choisissons en fonction principalement de la nature de l'échantillon et des propriétés des métabolites à analyser (***Figure 3***).

NOM	AGENT IONISANT
Torche à plasma (**ICP**)	très haute température
Impact électronique (**EI**)	faisceau d'électron
Ionisation chimique (**CI**)	réactif gazeux
Ionisation chimique à pression atmosphérique (**APCI**)	champ électrique intense
Photo-ionisation à pression atmosphérique (**APPI**)	lumière (photons)
Ionisation/désorption laser assistée par matrice (**MALDI**)	laser
Electrospray (**ESI**)	champ électrique intense

AGRESSIVITE ↑

Figure 3 *: liste des principales sources d'ionisation en spectrométrie de masse. Elles sont classées en fonction de leur agressivité décroissante. Entre parenthèse sont notées leurs abréviations les plus couramment utilisées.*

L'agressivité d'une source dépend de sa capacité à garder la molécule intacte lorsqu'elle l'ionise. Nous parlons de source « douce » lorsqu'elle permet de garder la molécule intacte et d'obtenir majoritairement un ion moléculaire. Cela est très avantageux pour l'identification d'une molécule inconnue, ou pour l'étude d'interactions supramoléculaires [10]. A l'inverse, nous parlons de source « dure » lorsqu'elle fragmente la molécule et produit plusieurs ions-fragments pour une même molécule. Nous obtenons alors un spectre de masse caractéristique de la molécule correspondant à ses fragments.

Nous allons présenter brièvement les différentes sources utilisées lors de ces travaux de recherche, à savoir l'impact électronique (EI) et la torche à plasma (ICP), toutes les deux sont des sources dites « dures », ainsi que l'electrospray (ESI) et la photo ionisation à pression atmosphérique (APPI), qui sont plutôt des sources « douces ».

- ***L'impact électronique (EI)***

C'est la méthode d'ionisation la plus ancienne et la plus utilisée [11]. Les molécules sous formes gazeuses sont bombardées par un faisceau d'électrons, conduisant à la formation de molécules radicalaires. Ces dernières vont se fragmenter et donner un ensemble d'ions positifs caractéristiques à chaque molécule (***Figure 4***). De ce fait, l'ionisation est très reproductible et donne un spectre de masse unique pour chaque molécule. Il est donc possible de créer des banques de données spectrales robustes. L'EI est principalement utilisée en couplage avec la chromatographie gazeuse. Par convention, l'énergie du faisceau d'électrons est réglée à -70 eV, permettant d'obtenir les mêmes spectres de masses d'un laboratoire à un autre. Cette énergie peut être diminuée afin d'obtenir une ionisation plus douce afin d'aider à l'identification de

certains composés. Seulement 0,1% des molécules sont ionisées, entrainant une limite dans le seuil de détection de certaines molécules, ce qui en fait généralement des spectromètres de masse peu sensibles.

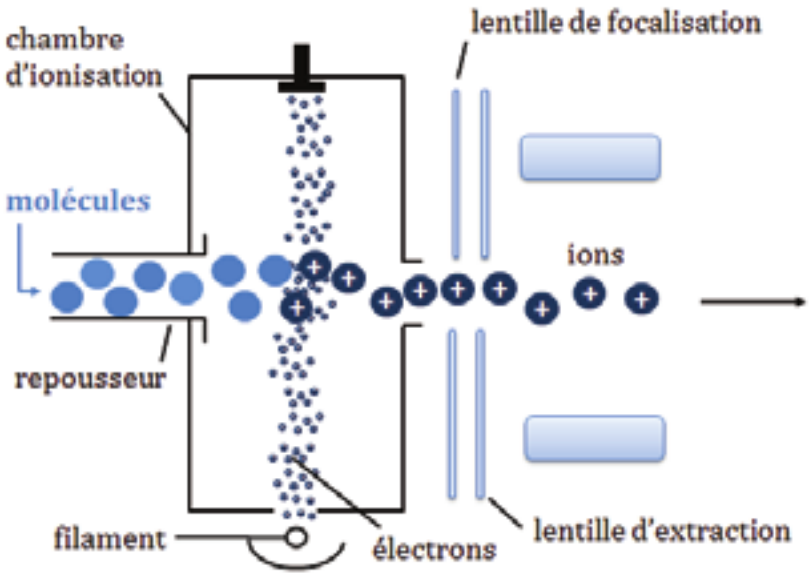


Figure 4 *: schéma d'une source d'ionisation à impact électronique.*

- ***La torche à plasma (ICP pour « Inductively Coupled Plasma »)***

L'ICP est une source d'ionisation (très) « dure ». De l'argon (Ar) sous forme gazeux, dans un tube en quartz, subit un champ magnétique au sein d'une bobine d'induction. Une étincelle créée les premiers électrons libres au sein du flux de gaz qui entrent en collision avec les atomes d'Ar et les ionisent. Par réaction en chaine se créé un plasma d'Ar formant une « flamme ». La température de cette dernière peut atteindre 10 000 K (soit environ 9700 °C). L'introduction des échantillons liquides se fait à l'aide d'un nébuliseur afin d'éliminer un maximum de solvant. L'ICP couplée à la spectrométrie de masse est principalement utilisée pour étudier la composition élémentaire d'un échantillon, c'est-à-dire les principaux atomes que nous retrouvons dans le tableau périodique des éléments.

- ***L'electrospray (ESI)***

La source ESI est apparue fin des années 60 [12] mais ce n'est que vers les années 80 que nous avons découvert le réel potentiel de cette technique. En 1984, Yamashita et Fenn réunissent une source electrospray avec un analyseur quadripolaire et démontrent l'obtention d'ions moléculaires, sans fragmentation, à partir de molécules en solution [13]. Les analyses de biomolécules apparaissent alors rapidement [14, 15]. Sous l'effet d'un champ électrique intense,

la source ESI génère, à pression atmosphérique, des ions en phase gazeuse directement à partir d'ions préformés en solution (*Figure 5*). Le mécanisme d'ionisation comporte trois étapes :

- La production de gouttelettes chargées à partir des molécules chargées en solution.
- La fission des gouttelettes chargées en gouttelettes plus petites par explosions coulombiennes successives.
- Le transfert des ions désolvatés en phase gazeuse.

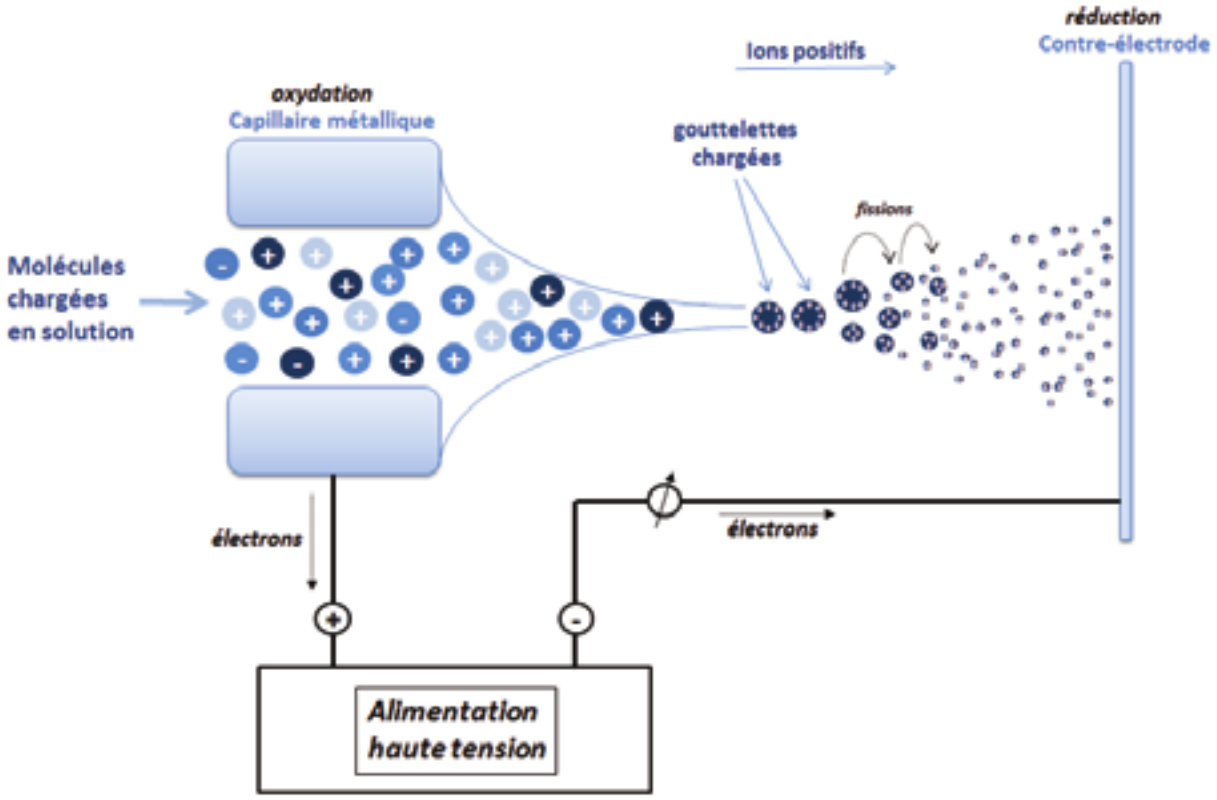


***Figure 5** : Illustration du principe de fonctionnement de la source electrospray à pression atmosphérique en mode positif. D'après [16].*

C'est une source d'ionisation douce. Dans la majorité des cas, la molécule n'est pas cassée, seulement chargée une ou plusieurs fois. Nous parlons d'ion moléculaire « M+H », « M+2H », « M+3H », etc... En métabolomique, il est assez rare d'obtenir des ions tri-chargés ou plus. Nous observons également la présence d'ions du type « $M+Na^+$ », « $M+K^+$ », « $M+NH4^+$ » ou « $M+Ca^+$ », appelés adduits. Ils sont principalement amenés par l'environnement de l'échantillon (bouteille en verre, solvants,…) L'échantillon liquide arrive à la source à un débit compris entre quelques nanolitres par minute (nLC) à un millilitre par minute (LC). Efficacité d'ionisation importante. Il existe une variante, la nanoESI, permettant d'utiliser une quantité d'échantillon moindre. Le capillaire de la source est remplacé par une micropipette formée à partir de cylindres en verre,

d'un diamètre inférieur à 1mm, étirée à chaud pour obtenir un diamètre interne d'environ 2µm. La distance entre la source et l'analyseur est également réduite entrainant une meilleure efficacité de transmission des ions dans l'analyseur.

- ***L'APPI (Atmospheric Pressure Photo Ionization)***

L'APPI, ou photo-ionisation à pression atmosphérique, est une méthode d'ionisation dans laquelle l'échantillon est ionisé par une lampe ultraviolette. Elle est principalement utilisée pour les composés peu à moyennement polaires, ou lorsqu'un composé est réfractaire aux autres modes d'ionisations à pression atmosphérique (ESI et APCI) [17]. Les molécules en solution vont être excitées par les photons produits par la lampe UV et recevoir les protons du solvant. La plupart des ions formés seront sous la forme $[M+H]^+$.

3. Les couplages GC-MS et LC-MS

Nous utilisons donc principalement ces deux outils, la chromatographie et la spectrométrie de masse, pour nos analyses en métabolomique. De nombreuses configurations existent en fonction du type de chromatographie et des différents spectromètres. Pour nos recherches non-ciblées des métabolites présents dans les TMs, nous avons utilisé la GC-MS et l'UPLC-MS/MS.

Le couplage GC-MS présente la particularité d'ioniser et d'analyser les molécules de la même façon sur tous les GC-MS présents dans les laboratoires. Les spectres de masses obtenus par cette technique dépendent donc uniquement de la nature physico-chimique de la molécule, ce qui permet d'obtenir un spectre de masse propre à chaque molécule et donc de construire des banques de données spectrales, facilitant ainsi l'identification des molécules.

Le couplage LC-MS/MS, plus spécifique à un laboratoire donné, permet de construire une banque de données internes où chaque métabolite est identifié par son temps de rétention et sa transition ion parent / ion fils après fragmentation.

4. Les banques de données en métabolomique

- ***Les indices de rétention en GC***

L'indice de rétention de Kovats est utilisé pour convertir les temps de rétention en constantes indépendantes du système. Ervin Kovats chimiste suisse, décrit pour la première fois le concept dans les années 1950 lorsqu'il effectuait des recherches sur la composition des huiles

essentielles [18]. L'indice de rétention d'un composé correspond à son temps de rétention normalisé par le temps de rétention du n-alcane adjacent. On peut parler de système d'étalonnage par des hydrocarbures linéaires.

$$I_i = 100 \cdot \left(\frac{t_r(i) - t_r(n)}{t_r(n+1) - t_r(n)} \right) + 100 \cdot n$$

***Figure 6** : formule utilisée pour le calcul de l'indice de rétention d'un composé. I_i : indice de rétention du composé ; $t_r(i)$: temps de rétention du composé ; $t_r(n)$: temps de rétention de l'alcane élué le plus proche ; $t_r(n+1)$: temps de rétention de l'alcane suivant l'alcane élué le plus proche.*

L'indice de rétention I est utilisé comme paramètre d'identification des solutés. En mode isotherme, les indices de rétention des alcanes augmentent linéairement en fonction du nombre n d'atomes de carbones. La pente de la droite dépend de la colonne et du réglage du chromatographe. L'indice de rétention ne dépend alors que de la phase stationnaire. Nous pouvons retrouver une liste de nombreux composés avec leur indice de rétention sur une colonne DB-5 [19] ou sur plusieurs autres colonnes [20]. Les indices de Kovats sont les plus utilisés mais il en existe d'autres. Van den Dool adapte la formule de Kovats, initialement utilisée pour le mode isothermal, afin de calculer les indices de rétention en mode programmation de températures [21]. Lee propose une nouvelle méthode de calcul des indices de rétention basés, non plus sur une série de n-alcanes, mais sur une série de PAH (polycyclic Aromatic Hydrocarbons) : naphtalene, phenanthrene, chrysene et picene [22]. Lors de nos travaux, nous avons utilisé les indices de Kovats calculés sur une colonne HP-5.

- ***Les banques de données spectrales***

Lorsque nous analysons une molécule pure en GC-MS, nous obtenons un spectre de masse spécifique à la molécule. En effet, son profil de fragmentation est propre à sa nature chimique et donnera toujours le même spectre de masse. Il existe plusieurs banques de données spectrales commerciales. Les plus utilisées et les plus riches sont celles de NIST (National Institute of Standards and Technology) et Wiley. Néanmoins, ces banques ne sont pas exhaustives et il est nécessaire de développer nos propres banques de données afin d'identifier un maximum de métabolites. Cette stratégie n'est pas possible pour les analyses en LC-MS, où les spectres de masses sont moins reproductibles d'un appareil à l'autre. Nous utiliserons alors des méthodes MS/MS en mode MRM ou des banques de formules brutes si nous utilisons de la spectrométrie de masse haute-résolution.

- ***Les banques de formules brutes***

La spectrométrie de masse haute résolution permet de mesurer une masse avec une précision de 0,001 Da et d'observer les différents isotopes d'un même composé, ceci sur la molécule et ses fragments en mode MS/MS. A l'aide de ses informations, le logiciel DataAnalysis nous propose une formule brute avec un certain score. Ce score est calculé principalement en fonction de l'écart entre la masse mesurée et la masse théorique, et de l'écart entre le profil isotopique mesuré et le profil théorique. Ce dernier est appelé le SigmaFit™ et est exprimé en milliSigma (mσ). Le SigmaFit doit être inférieur à 20 et le plus proche possible de 0 pour être significatif. La détermination de la masse et du profil isotopique d'une molécule est possible car nous connaissons la masse de chaque atome (1.00794 pour l'hydrogène, 12.0107 pour le carbone, 15.9994 pour l'oxygène,…) et l'abondance relative de ces isotopes dans la nature (98.93% pour le ^{12}C, 1.07% pour le ^{13}C). Une fois les formules brutes de la molécule et de ses fragments déterminés, nous les comparons avec un profil de fragmentation théorique déterminé *in silico*. Le logiciel en ligne MetFrag permet de faire cette comparaison avec toutes les molécules présentes dans les banques de données KEGG ou PubChem [23]. Nous utiliserons au cours de ces travaux, cette approche plus ciblée, afin d'identifier finement certains composés dans nos TMs et nous observons la puissance mais aussi les limites de cet outil.

5. La RMN (Résonnance magnétique nucléaire)

La RMN est une technique de spectrométrie basée sur la mesure de l'absorption d'une radiofréquence par un noyau atomique dans un champ magnétique fort. Le noyau atomique résonne alors à une fréquence spécifique, caractéristique du noyau et de son environnement chimique. La RMN est un très bon outil pour la caractérisation structurale d'un métabolite pur. Elle permet également d'effectuer des analyses non ciblées du métabolome à partir d'échantillons liquides ou solides. Nous verrons que c'est un outil intéressant et complémentaire à la spectrométrie de masse.

V. Les objectifs du travail de thèse

Comme nous avons pu le voir au cours de cette introduction, nos recherches porteront sur la caractérisation du métabolome de plusieurs TMs fabriquées par les Laboratoires Lehning. Le but étant d'augmenter la connaissance des contenus en métabolites des TMs et de valoriser les produits Lehning. L'identification des métabolites dans les TMs permettra au service contrôle-qualité de développer des études de stabilité en identifiant de meilleurs traceurs. Nous pourrons également identifier des molécules d'intérêts pour la santé humaine. A l'inverse, nous pourrons aussi identifier des molécules pouvant présenter un risque pour la santé humaine. Nous établirons donc une carte d'identité moléculaire pour chaque TM. Nous utiliserons les outils de la métabolomique présentés précédemment, à savoir la chromatographie et la spectrométrie de masse principalement.

Le manuscrit est divisé en trois parties. La première partie, intitulé « Matériel et Méthodes », décrit l'ensemble des outils et des stratégies communs utilisés pour l'étude des TMs et du produit L52. La deuxième partie est composée de dix-neuf chapitres correspondant aux dix-neuf TMs étudiées. Dans chaque chapitre sont présentés : l'espèce végétale utilisée pour la fabrication de la TM, une étude bibliographique sur sa composition phytochimique et les résultats et discussions de l'ensemble des métabolites identifiés. La troisième partie est consacrée aux recherches effectuées sur le produit L52. Nous terminerons ce manuscrit par une discussion et une conclusion générale.

VI. Bibliographie

1. Bell, E.A., *Nonprotein amino acids of plants: significance in medicine, nutrition, and agriculture.* Journal of agricultural and food chemistry, 2003. **51**(10): p. 2854-2865.

2. Jean, Bruneton., *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)*. 2009: Lavoisier.

3. Smirnov, K.S., et al., *Challenges of metabolomics in human gut microbiota research.* International Journal of Medical Microbiology, 2016. **306**(5): p. 266-279.

4. Pichersky, E. and D.R. Gang, *Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective.* Trends in plant science, 2000. **5**(10): p. 439-445.

5. Müller, M. and S. Munné-Bosch, *Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry.* Plant methods, 2011. **7**(1): p. 37.

6. Halket, J.M., et al., *Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS.* Journal of experimental botany, 2005. **56**(410): p. 219-243.

7. *http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1906/thomson-bio.html*.

8. Dempster, A.J., *Isotopic constitution of uranium.* Nature, 1935. **136**(3431): p. 180.

9. Mattauch, J. and R. Herzog, *Über einen neuen Massenspektrographen.* Zeitschrift für Physik, 1934. **89**(11-12): p. 786-795.

10. Lehn, J., *Cryptates: inclusion complexes of macropolycyclic receptor molecules.* Pure and applied Chemistry, 1978. **50**(9-10): p. 871-892.

11. Constantin, E., *Spectrométrie de masse*. 1996: Technique et Documentation.

12. Dole, M., et al., *Molecular beams of macroions.* The Journal of Chemical Physics, 1968. **49**(5): p. 2240-2249.

13. Yamashita, M. and J.B. Fenn, *Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme.* The Journal of Physical Chemistry, 1984. **88**(20): p. 4451-4459.

14. Fenn, J.B., et al., *Electrospray ionization–principles and practice.* Mass Spectrometry Reviews, 1990. **9**(1): p. 37-70.

15. Larsen, B.S. and C.N. McEwen, *An electrospray ion source for magnetic sector mass spectrometers.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1991. **2**(3): p. 205-211.

16. Kebarle, P. and U.H. Verkerk, *Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now.* Mass spectrometry reviews, 2009. **28**(6): p. 898-917.

17. Raffaelli, A. and A. Saba, *Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry.* Mass Spectrometry Reviews, 2003. **22**(5): p. 318-331.

18. Kovats, v.E., *Gas-chromatographische charakterisierung organischer verbindungen. Teil 1: retentionsindices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone.* Helvetica Chimica Acta, 1958. **41**(7): p. 1915-1932.

19. Adams, R.P., *Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy*. 2012: Academic Press.

20. *http://webbook.nist.gov/chemistry/*.

21. Van den Dool, H. and P.D. Kratz, *A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography.* Journal of Chromatography A, 1963. **11**: p. 463-471.

22. Lee, M.L., D.L. Vassilaros, and C.M. White, *Retention indices for programmed-temperature capillary-column gas chromatography of polycyclic aromatic hydrocarbons.* Analytical chemistry, 1979. **51**(6): p. 768-773.

23. Wolf, S., et al., *In silico fragmentation for computer assisted identification of metabolite mass spectra.* BMC bioinformatics, 2010. **11**(1): p. 148.

PARTIE I

MATERIEL ET METHODES

I. INTRODUCTION

Comme nous l'avons développé dans la troisième partie de l'introduction consacrée aux outils de la métabolomique, il n'existe pas de méthode unique pour explorer l'ensemble du métabolome d'un échantillon, que ce soit une cellule, un tissu, un organe ou un organisme entier. Cela est également valable pour nos extraits de plantes, teintures-mères (TMs) et L52. Il est donc nécessaire d'utiliser différentes approches analytiques, à savoir une approche non ciblée et une approche ciblée, pour essayer d'obtenir une réponse la plus complète possible à la question : quels sont les métabolites présents dans nos TMs ?

N'ayant que très peu d'informations sur les compositions phytochimiques des TMs, nous avons commencé par une approche non-ciblée en chromatographie liquide couplée à un détecteur UV et à un spectromètre de masse (UPLC-UV-MS). Cette première analyse globale nous a montré à quel point les contenus des TMs étaient riches et nous a conduit à utiliser trois autres approches complémentaires (***Figure 1***). Une première approche en GC-MS, avec une dérivation de l'échantillon avant analyse ou avec une simple extraction apolaire. Une seconde approche par HPLC semi-préparative, afin de rendre moins complexe l'échantillon par fractionnement et essayer d'obtenir des fractions les plus pures possibles. Ces fractions sont, par la suite, analysées en spectrométrie de masse haute-résolution afin d'identifier, à partir des formules brutes obtenues et l'interrogation des banques de données, les métabolites d'intérêts. Enfin, nous avons utilisé une dernière approche ciblée de LC-MS/MS utilisant des standards commerciaux pour l'identification de métabolites bien précis.

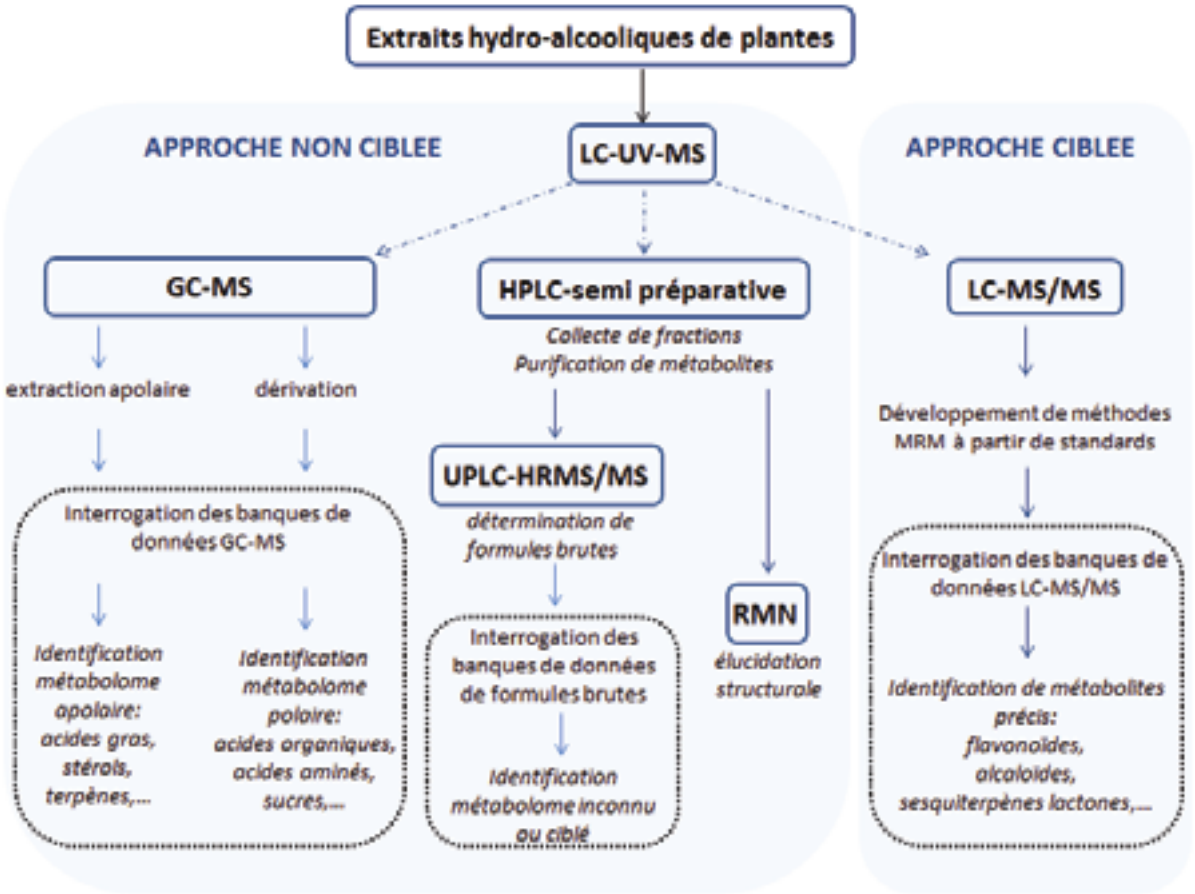


Figure 1 *: schéma représentant la démarche globale suivie pour l'étude métabolomique des différents extraits hydro-alcooliques de plantes. La combinaison des techniques séparatives (LC et GC) couplées à différentes techniques de détections (UV, MS, HRMS et RMN) a permis d'identifier et d'obtenir un large aperçu des métabolites présents dans ces extraits.*

Dans cette partie « Matériel et Méthodes », nous développerons toutes les stratégies communes appliquées aux TMs et au L52. Certaines méthodes analytiques ont été développées spécifiquement pour une TM, par exemple l'analyse de sesquiterpènes lactones chez *Eupatorium Perfoliatum*. Pour faciliter la recherche de ces méthodes, elles seront abordées spécifiquement dans les parties correspondantes aux TMs concernées.

II. Analyse globale du contenu métabolique de la TM en UPLC-UV-MS ESI+/-

1. Préparation des échantillons

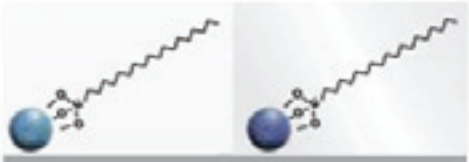
Après homogénéisation de chacun des flacons contenant les teintures-mère, 2mL sont prélevés puis centrifugés à 13 200rpm à 4°C pendant 10min (Centrifuge 5415 R, Eppendorf). Les surnageants sont récupérés et filtrés à 0.2µm (filtre Rotilabo®-Spitzenfilter 13mm PTFE 0.2µm Carl ROTH) puis stockés à 4°C. 1µL est prélevé et mélangé à 999µL d'eau « milli-Q » dans un tube en verre à fond conique. Le tout est fermé par un bouchon pré-percé et vortexé 10 secondes.

***Figure 2** : Chromatographe liquide Ultra Performance (UPLC) Waters Quattro couplé à un spectromètre de masse triple quadrupole et son poste de commandes.*

2. Méthode chromatographique

Les analyses ont été faites sur un système UPLC Waters Acquity (Waters, Mildorf, MA, USA) couplé à un détecteur à barrette de diode et un spectromètre de masse Waters Quattro Premier XE équipé d'une source d'ionisation électrospray (ESI) (***Figure 2***). Nous avons utilisé une colonne Waters Acquity HSS T3 1.8µm, 2.1 x 100mm couplée à une pré-colonne Waters Acquity HSS T3 C18 1.7µm 2.1 x 5mm (***Figure 3***). La température du four colonne était de 35°C. Les solvants utilisés sont eau + 0.1% acide formique (A) et méthanol + 0.1% acide formique (B). Le gradient de solvant était, à un débit constant de 0.35mL.min^{-1}, 2% méthanol pendant 2min puis augmentation du pourcentage de méthanol à 100% pendant 10min, 100% méthanol pendant

2min puis nous revenons à 2% méthanol pendant 2min. La durée totale de l'analyse était de 40min (***Tableau 1***). 3µL de chaque échantillon ont été injectés en mode full loop.



ACQUITY UPLC	BEH C_{18} 1.7 µm	HSS T3 1.8 µm
Ligand Type	Trifunctional C_{18}	Trifunctional C_{18}
Ligand Density*	3.1 µmol/m²	1.6 µmol/m²
Carbon Load*	18%	11%
Endcap Style	proprietary	proprietary
USP Classification	L1	L1
pH Range	1-12	2-8
Low pH Temp. Limit	80 °C	45 °C
High pH Temp. Limit	60 °C	45 °C
Pore Diameter*	130 Å	100 Å
Surface Area*	185 m²/g	230 m²/g

Figure 3 *: caractéristiques techniques des colonnes Waters Acquity BEH C18 et HSS T3 C18 utilisées lors de nos travaux de recherches (source : Waters).*

Temps (min)	débit (ml.min^{-1})	% A	% B
0	0,35	98	2
2	0,35	98	2
12	0,35	0	100
14	0,35	0	100
15	0,35	98	2
17	0.35	98	2

Tableau 1 *: gradient de solvants utilisé pour la méthode UPLC-UV-MS ESI+/-*

3. Paramètres de détection DAD et MS

Le détecteur à barrette de diode était en mode Scan de 190 à 500nm, 10 points/sec pendant 17min. Le spectromètre de masse fonctionnait avec quatre méthodes Full Scan différentes : deux méthodes scannant les masses de 100 à 1000 Da, en mode positif et en mode négatif ; deux méthodes scannant les masses de 1000 à 2000 Da, en mode positif et négatif également. La fréquence d'acquisition était de 1 scan par seconde, le voltage du cône était ± 25V, le solvant delay était de 1,5min.

III. Analyse de la TM en UPLC-MS APPI+

1. Méthode chromatographique

Les analyses ont été faites sur un système UPLC Waters Acquity (Waters, Mildorf, MA, USA) couplé à un détecteur à barrette de diode et un spectromètre de masse Waters Quattro Premier XE équipé d'une source d'ionisation APPI. Nous avons utilisé une colonne Waters Acquity BEH C18 1.7µm 2.1 x 100mm couplée à une pré-colonne Waters Acquity BEH C18 1.7µm 2.1 x 5mm (***Figure 3***). La température du four colonne était de 46°C. Les solvants utilisés sont 75% méthanol + 25% eau + 0.01% acide formique (A) et isopropanol + 0.01% acide formique (B). Le gradient de solvant était, à un débit constant de 0.3mL.min^{-1}, 100% A pendant 2min puis augmentation du pourcentage de B à 50% pendant 25min, 50% B pendant 4min puis nouvelle augmentation du pourcentage de B à 100% pendant 8min, 100% B pendant 3min. Enfin nous revenons à 100% de A en 4min et 100% A pendant 3min. La durée totale de l'analyse était de 49min (***Tableau 2***). 5µL de chaque échantillon ont été injectés en mode full loop.

Temps (min)	débit (mL.min^{-1})	% A	% B
0	0,3	100	0
2	0,3	100	0
27	0,3	50	50
31	0,3	50	50
39	0,3	0	100
42	0,3	0	100
46	0,3	100	0
49	0,3	100	0

Tableau 2 *: gradient de solvants utilisé pour la méthode UPLC-MS APPI+.*

2. Paramètres de détection DAD et MS

Le détecteur à barrette de diode était en mode Scan de 190 à 500nm, 10 points/sec pendant 49min. Le spectromètre de masse fonctionnait avec deux méthodes Full Scan différentes : une méthode scannant les masses de 100 à 1000 Da et une les masses de 1000 à 2000 Da, toutes les deux en mode positif. La fréquence d'acquisition était de 1 scan par seconde. Une troisième méthode a été utilisée en mode SIR en mode positif. L'ion parent [M+ H - H2O] des molécules suivantes ont été sélectionnées: Stigmasterol (m/z: 395); Cycloartenol (m/z: 409); Campesterol (m/z: 383); Sitosterol (m/z: 397); Cholesterol (m/z: 369), 24-methylene-cycloartenol-4-carboxy-4 methyl (m/z: 453).

IV. Analyse des composés polaires de la TM en GC-EI-MS (avec dérivation)

1. Préparation des échantillons et dérivation des métabolites pour l'analyse GC-MS

Après homogénéisation de chacun des flacons, 2mL ont été prélevés et filtrés à 0.2µm (filtre Rotilabo®-Spitzenfilter 13mm PTFE 0.2µm Carl ROTH) puis stockés à 4°C. 50µL ont été prélevés puis déposés dans un tube en verre 1.5mL à fond plat pour l'analyse GC-MS. Enfin les échantillons ont été passés au concentrateur (Thermo Scientific Savant® SPD121P SpeedVac® Concentrator) pendant 1h sous une température constante de 35°C. Parallèlement, un mélange de 9 alcanes (2mg.mL^{-1}) dans de la pyridine est préparé pour être utilisé comme standards interne pour les temps de rétention (Nom/Indice de rétention): Decane/1000 ; Dodecane/1200 ; Pentadecane/1500 ; Octadecane/1800 ; Nonadecane /1900 ; Docosane/2200 ; Octacosane/2800 ; Dotriacontane/3200 ; Hexatriacontane/3600.

La méthode de dérivation comprend 2 étapes (***Figure 4***):

- la méthoxymation : un mélange comprenant 30mg de methoxyamine hydrochloride (Supelco, PA, USA), 1.5mL de pyridine (Sigma Aldrich, MO, USA) et 15µL de la solution des standards alcanes est préparé. 50µL de ce mélange est déposé dans chaque échantillon puis les tubes en verre sont placés à l'agitateur chauffant (Eppendorf Thermomixer Comfort) pendant 90min à 40°C à 900rpm.
- La trimethylsilylation : 80µL de BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, for GC derivatization, Fluka) est ajouté dans chaque tube en verre puis placé à l'agitateur chauffant pendant 30min à 40°C à 900rpm. Les échantillons sont stables. Ils peuvent être analysés directement en GC-MS ou conservés à 4°C. Ce protocole de dérivation est basé sur la publication [1].

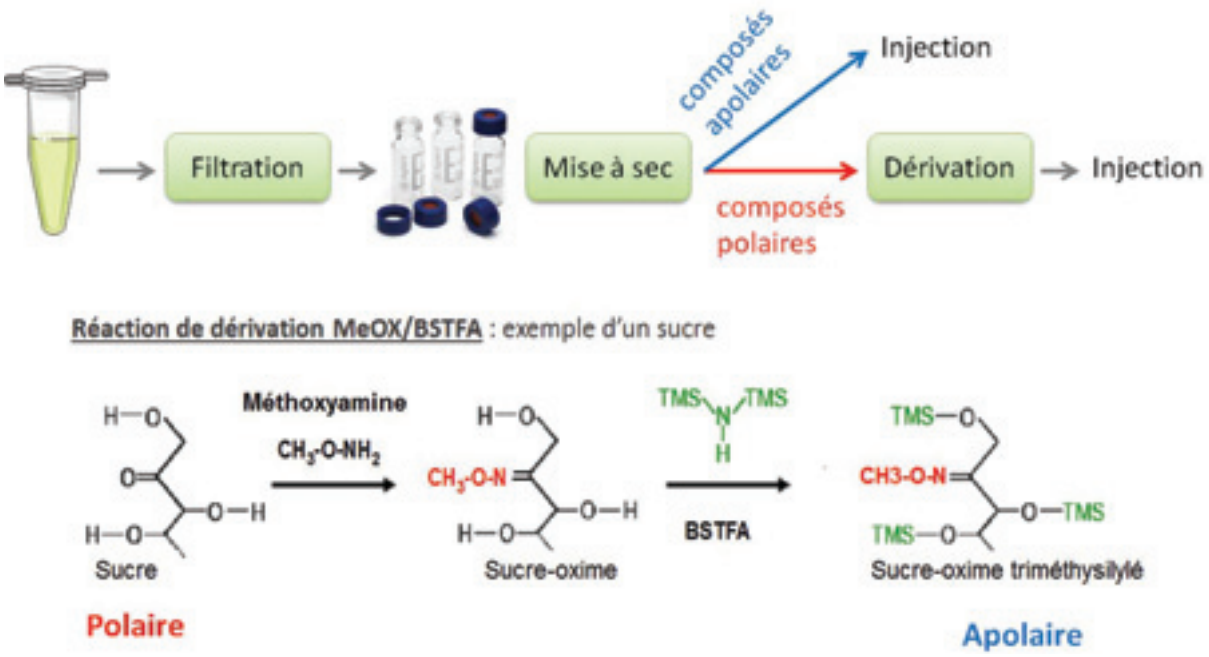


Figure 4 *: principe général de la préparation des échantillons pour les analyses en GC-MS. Principe de la réaction de dérivation des composés polaires afin de les rendre apolaires.*

2. Méthode GC-MS

1µL de chaque échantillon est injecté en mode Splitless. Le système GC-MS comprend un Autosampler et un injecteur Agilent 7683 Series, un GC Agilent G1530A et un spectromètre de masse Agilent G2588A, le tout piloté par le logiciel MSD Chemstation (***Figure 5***). La chromatographie gazeuse s'est faite sur une colonne Agilent HP-5MS 30m de longueur, 0.25mm de diamètre interne et 0.25µm d'épaisseur du film. Une pré-colonne a été installée pour une meilleure reproductibilité entre chaque série d'analyses. La température de l'injecteur était de 230°C. Le gaz vecteur utilisé était de l'Hélium à un débit constant de 0.6 $mL.min^{-1}$. Le programme de température du four était de 1min à 70°C, puis une augmentation de 9°C par min jusqu'à 320°C, enfin 10min à 320°C. Le spectromètre de masse travaillait en mode Scan de 70 à 600 m/z, 2 scans par seconde. La température de la source était de 250°C. Le délai de solvant était réglé à 5 min. Les chromatogrammes et les spectres de masse ont été convertis en format .CDF à l'aide du logiciel Chemstation. Les données ont été traitées par le logiciel libre AMDIS.

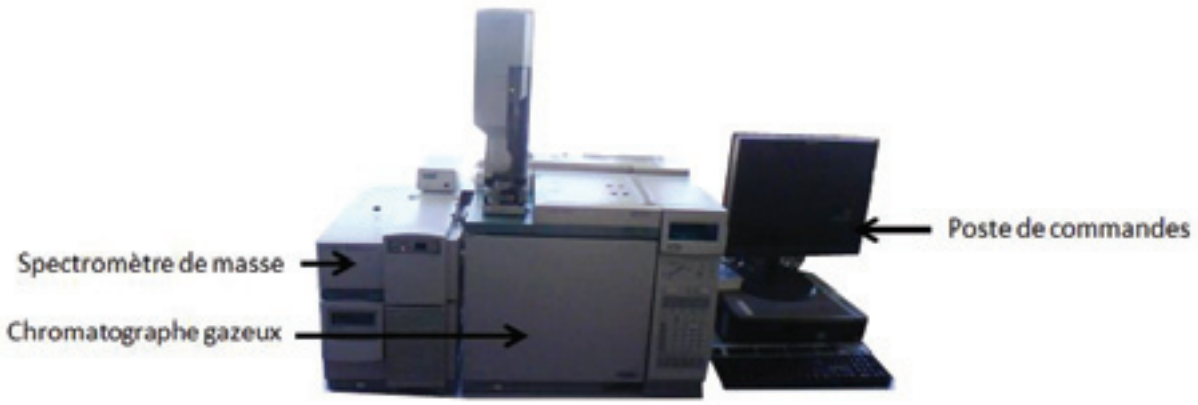


Figure 5 *: Chromatographe gazeux Agilent 6890Series couplé à un spectromètre de masse simple quadrupole 5973N.*

3. Identification des métabolites

Les chromatogrammes et les spectres de masses sont analysés à l'aide du logiciel libre AMDIS. Cela nous permet de recueillir pour chaque métabolite détecté :

- son indice de rétention IR, calculé en fonction du temps de rétention du métabolite et de ceux des alcanes (voir paragraphe « indices de rétention » dans la partie I)
- son ion caractéristique. L'ion est choisi par l'opérateur et doit être, dans le meilleur des cas, le plus grand (car plus spécifique) et le plus intense possible (pour une meilleur détection).

Une fois ce jeu de données collecté, il permet d'interroger les banques de données soit publiques (NIST, Golm, Wiley) soit internes au laboratoire (***Figure 6***). En fonction des résultats, chaque métabolite détecté est classé suivant 5 catégories :

- Identified : le composé est identifié par les bases de données publiques ET confirmé à l'aide d'un standard du laboratoire.
- Putative : le composé est identifié par les bases de données publiques mais n'est pas confirmé par un standard du laboratoire.
- U_putative : le composé n'est pas proprement identifié par les bases de données publiques mais peut présenter des similitudes avec un composé connu ou une famille de composés.
- U (unknown) : le composé n'est pas identifié.
- CONT (contaminant) : Le composé est présent dans le blanc témoin ou est reporté comme contaminant par la Golm DB.

Nous utilisons le logiciel Microsoft Excel afin de lister les métabolites. Cette méthode d'identification est basée sur la publication [2].

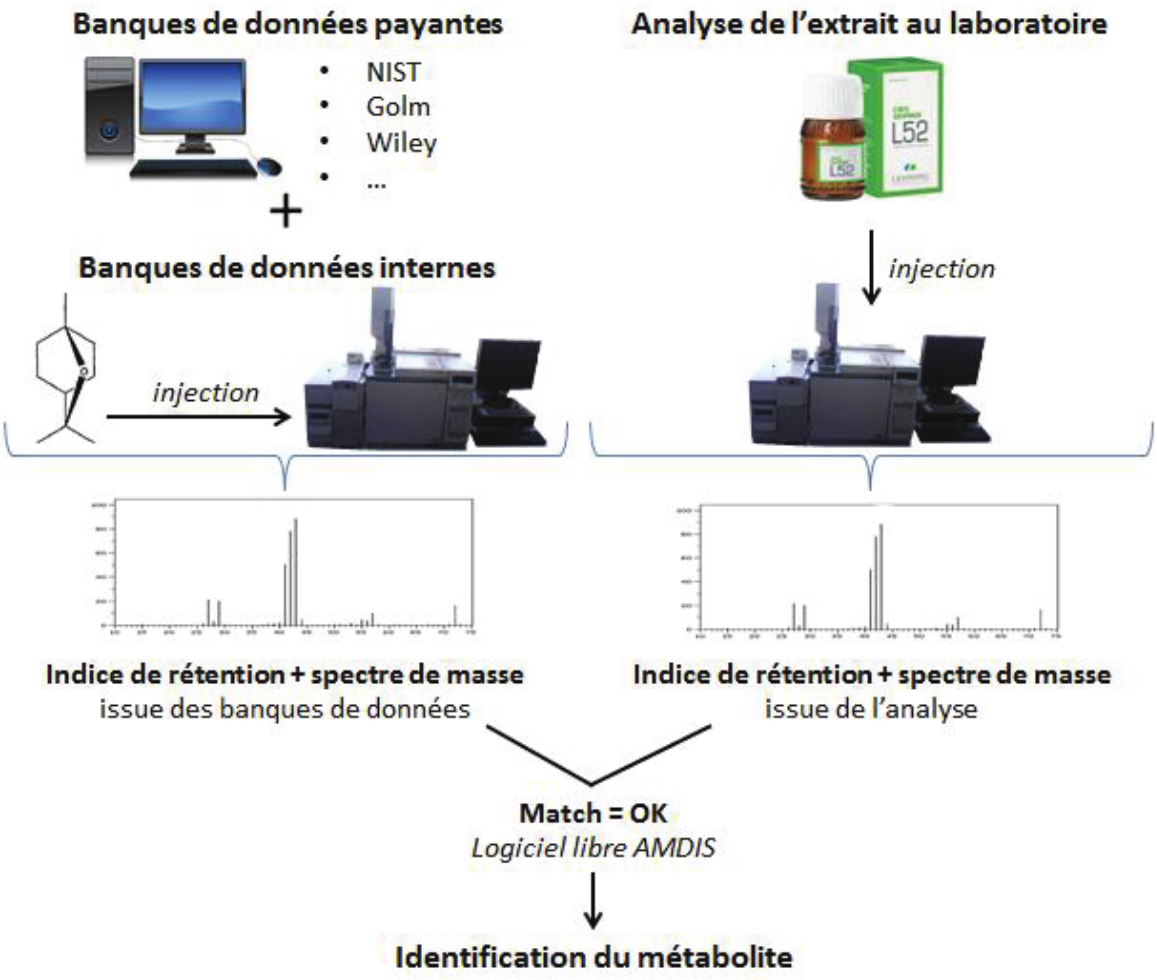


Figure 6 *: Principe d'identification des molécules des TMs par GC-MS à l'aide des banques de données payantes et internes au laboratoire.*

V. Analyse des composés apolaires de la TM en GC-EI-MS (sans dérivation)

1. Préparation des échantillons

500µL de TM sont mélangés à 200µL d'hexane contenant un mélange d'alcanes à 10µg.mL^{-1} dans un tube en verre à fond plat. Le tout est vortexé pendant 1min puis centrifugé 1 min à 13200rpm à T°C ambiante. 150µL de surnageant sont récupérés et placés dans un tube en verre à fond plat avec réducteur de volume. Le tout est fermé par un bouchon non percé.

2. Méthode GC-MS

1µL de chaque échantillon est injecté en mode Splitless. Le système GC-MS comprend un GC Perkin Elmer Clarus 680 et un spectromètre de masse Perkin Elmer 600T, le tout piloté par le logiciel TurboMass Ver.5.4.2. La chromatographie gazeuse s'est faite sur une colonne Agilent HP-5MS 30m de longueur, 0.25mm de diamètre interne et 0.25µm d'épaisseur du film. La température de l'injecteur était de 230°C. Le gaz vecteur utilisé était de l'Hélium à un débit constant de 2mL.min^{-1}. Le programme de température du four était de 0.5min à 50°C, puis une augmentation de 10°C par min jusqu'à 330°C, enfin 6.50min à 330°C. Le spectromètre de masse travaillait en mode Scan de 50 à 600 m/z, 3 scans par seconde. La température de la source était de 250°C. Les données ont été traitées par le logiciel libre AMDIS.

Le principe d'identification des métabolites reste le même que celui employé pour la méthode GC-MS avec dérivation.

VI. Mise en place de banques de données internes

1. Banque de données GC-MS polaire avec dérivation

Les standards ont été préparés à partir de poudres commerciales. La concentration finale de chaque échantillon est fixée à 100µM, en solution dans du méthanol 100%. 50µL de chaque échantillon est ramené à sec et dérivé selon le même protocole de dérivation que

précédemment. La liste des molécules dérivées et intégrées dans la banque de données interne au laboratoire est présente en annexe 1 à la fin de cette partie.

2. Banque de données GC-MS apolaire

Les standards ont été préparés à partir de poudres ou liquides purs, en solution dans de l'hexane, pour une concentration finale de 100µM. 110µL de chaque solution est mélangé à 20µL du mélange d'alcanes et mis dans un tube en verre à fond plat avec insert. La liste des composés apolaires ajoutés dans la banque de données internes est présente en ***Annexe 2***.

VII. Analyse non ciblée de la TM par spectrométrie de masse haute-résolution UPLC- QTOF

Nous avons voulu, dans un premiers temps, identifier directement les métabolites présents dans les extraits à l'aide de la spectrométrie de masse haute-résolution. Une première méthode chromatographique de 20min a été testée, une durée « classique » en UPLC. Or, les premières analyses des données brutes nous ont montré que les échantillons, les TMs, sont riches et complexes. Nous retrouvions plusieurs molécules sous le même pic chromatographique. L'attribution d'une formule brute devient complexe voire impossible à cause des chevauchements des massifs isotopiques. Or, ces derniers sont indispensables pour la détermination des formules brutes. Nous avons donc réinjecté les extraits avec une méthode chromatographique beaucoup plus longue.

1. Préparation des échantillons

Après homogénéisation de chacun des flacons contenant les teintures-mère, 2mL sont prélevés puis centrifugés à 13200rpm à 4°C pendant 10min (Centrifuge 5415R, Eppendorf). Les surnageants sont récupérés et filtrés à 0.2µm (filtre Rotilabo®-Spitzenfilter 13mm PTFE 0.2µm Carl ROTH) puis stockés à 4°C. 1µL est prélevé et mélangé à 99µL d'eau « milli-Q » dans un tube en verre à fond conique. Le tout est fermé par un bouchon pré-percé et vortexé 10 secondes. Une solution de calibration est préparée pour être injectée au début de chaque analyse : 50mL eau/isopropanol 50/50 v/v + 0.5mL 1M NaOH + 75µL acide acétique + 25µL acide formique.

Cette solution permet de former un cluster d'une quarantaine de masses connues entre 90.9766Da ($Na(HCOONa)_1$ et 948.8727Da ($Na(NaAc)_3(NaF)_{10}$.

2. Méthode UPLC-QTOF

Les analyses sont effectuées sur un système RSLC Ultimate™ 3000 Rapid Separation LC Dionex Thermo Bruker, couplé à un spectromètre de masse à haute résolution UHR-QTOF Impact II Bruker équipé d'une source d'ionisation électrospray (ESI), d'un analyseur Qq-TOF (quadripôle + Time Of Flight) et d'un détecteur multiplicateur d'électrons (***Figure 7***). Nous avons utilisé une colonne Waters Acquity HSS T3 1.8µm, 2.1 x 100mm couplée à une pré-colonne Waters Acquity HSS T3 C18 1.7µm 2.1 x 5mm. La température du four colonne était de 35°C.

Figure 7 *: chromatographe liquide UHPLC Thermo couplé au spectromètre de masse haute-résolution Bruker Impact II QTOF utilisée pour les identifications de métabolites inconnus dans les extraits de plantes.*

Les solvants utilisés sont : eau + 0.1% acide formique (A) et méthanol + 0.1% acide formique (B). Le gradient de solvant était, à un débit constant de 0.35mL.min^{-1}, 2% méthanol pendant 2 min puis augmentation du pourcentage de méthanol à 100% pendant 32 min, 100% méthanol pendant 2 min puis nous revenons à 2% méthanol pendant 2 min. La durée totale de l'analyse était de 40 min (***Tableau 3***). 3µL de chaque échantillon ont été injectés.

Temps (min)	débit (mL.min^{-1})	% A	% B
0	0,35	98	2
2	0,35	98	2
34	0,35	0	100
36	0,35	0	100
38	0,35	98	2
40	0.35	98	2

Tableau 3*: gradient de solvants utilisé pour la méthode UPLC-QTOF.*

3. Méthode de détection HRMS QTOF

La source du spectromètre de masse est programmée pour une ionisation positive (ESI+), avec une augmentation progressive des tensions de cônes (CV) au cours de l'analyse. L'analyseur du spectromètre de masse est programmé en mode bbCID de telle sorte à effectuer un SCAN des ions parents de 150 à 1000 m/z, fragmenter les ions dans la cellule de collision en alternant des énergies de collision faibles et élevées et effectuer un SCAN de l'ensemble des ions fils obtenus, de 150 à 1000 m/z. Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel Compass DataAnalysis V4.3 de Bruker.

VIII. Collecte des métabolites d'intérêts par HPLC semi-préparative

1. Préparation des échantillons

Environ 1mL de chaque TM préalablement filtrée à 0.2µm (filtre Rotilabo®-Spitzenfilter 13mm PTFE 0.2µm Carl ROTH) est prélevé et mis dans un tube en verre à fond conique et fermé avec un bouchon pré-percé pour être injecté en HPLC semi-préparative.

2. Méthode chromatographique HPLC semi-préparative

Les analyses sont effectuées sur un système HPLC Waters 2695 XE Separations Module couplé à un détecteur à barrettes de diodes Waters 2998 Photodiode Array Detector et un spectromètre de masse Waters Acquity QDa Detector (***Figure 8***). Ce dernier est composé d'une source d'ionisation électrospray (ESI), d'un analyseur de type simple quadripôle et d'un détecteur multiplicateur d'électrons. En plus des deux moyens de détection, le système HPLC est couplé à un collecteur de fractions Waters Fraction Collector III. La colonne utilisée est une colonne Waters Xbridge™ Prep C18 5µm, 10 x 250mm couplée à une pré-colonne Waters Xbridge™ Prep C18 5µm 10 x 10mm. La température du four colonne est de 35 °C. Les solvants utilisés sont eau + 0.1 % d'acide formique (A), et méthanol + 0.1 % d'acide formique (B). Les gradients de solvants diffèrent en fonction des TMs analysées. Ils seront décrits spécifiquement dans chaque partie correspondant à la TM concernée. 100µL est injecté à chaque cycle. Le détecteur UV à barrettes de diodes est programmé pour scanner l'échantillon de 190 à 500nm, à 10 points/sec, pendant toute la durée de l'acquisition. Le détecteur de masse est programmé pour chaque TM de telle sorte à détecter les masses à collecter, déterminées d'après les données bibliographiques ainsi que les résultats des premières injections en UPLC-MS. L'analyseur du spectromètre de masse est programmé avec une méthode de Single Ion Recording (SIR) qui permet de détecter uniquement les masses recherchées, à une fréquence de 1Hz. Le collecteur de fractions est programmé pour chaque TM de telle sorte à collecter la masse souhaitée en fonction du temps, du signal UV ou de la masse. Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel Masslynx V4.1 de Waters.

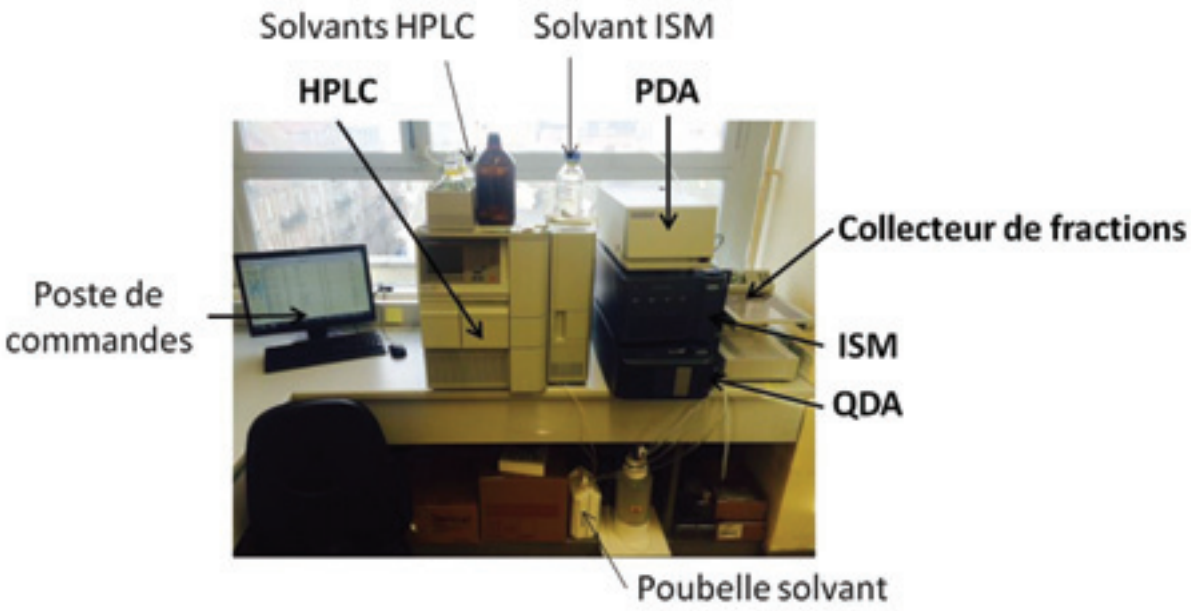


Figure 8 *: chromatographe liquide HPLC semi-préparative couplé à un détecteur à barrettes de diodes et à détecteur de masses. L'ensemble est relié à un collecteur de fractions.*

IX. Vérification par UPLC-UV-MS des fractions collectées

1. Préparation des échantillons

200µL de chaque fraction collectée sont prélevés et mis dans un tube en verre à fond conique puis fermé avec un bouchon pré-percé pour être injecté en UPLC.

2. Méthode UPLC-UV-MS

Les analyses sont effectuées sur le système précédemment décrit au paragraphe « Analyse globale du contenu métabolique des teintures-mères en UPLC-UV-MS ». La colonne utilisée est une colonne Waters Acquity HSS T3 1.8µm, 2.1 x 100mm. La température du four colonne est de 35°C. Les solvants utilisés sont eau + 0.1 % d'acide formique (A), et méthanol + 0.1 % d'acide formique (B). La méthode chromatographique utilisée consiste en un gradient de solvants de 15min. Le débit de solvants est constant, à 0.35mL.min^{-1}. Le gradient est le suivant : 5 % de MeOH pendant 2min, puis augmentation jusqu'à 100 % de MeOH en 8min, plateau à 100 % de MeOH pendant 2min, retour à 5 % de MeOH en 1min et maintien à 5 % de MeOH pendant 2min (***Tableau 4***). 3µL de chaque échantillon sont injectés. Le détecteur UV à barrettes de diodes est programmé pour scanner l'échantillon de 190 à 500nm, à 10 points/sec pendant 15min. La source du spectromètre de masse est programmée pour une ionisation positive (ESI+), avec un voltage de cône de +25V. L'analyseur du spectromètre de masse est utilisé en mode simple quadripôle afin d'effectuer un Scan de l'échantillon permettant de détecter les masses comprises entre 150 et 700 m/z, à 1scan/sec, pendant 15min. Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel Masslynx V4.1 de Waters.

Temps (min)	débit (mL.min^{-1})	% A	% B
0	0,35	95	5
2	0,35	95	5
10	0,35	0	100
12	0,35	0	100
13	0,35	95	5
15	0.35	95	5

Tableau 4 *: gradient de solvants utilisés pour la méthode chromatographique UPLC-UV-MS afin de vérifier les fractions collectées.*

X. Détermination des formules brutes des composés présents dans les fractions collectées par UPLC-QTOF

1. Préparation des échantillons

200µL de chaque fraction sont prélevés et mis dans des tubes en verre à fond conique et fermés avec des bouchons pré-percés pour être injectés en spectrométrie de masse à haute résolution. Une solution de calibration est préparée pour être injectée au début de chaque analyse : 50mL eau/isopropanol 50/50 v/v + 0.5mL 1M NaOH + 75µL acide acétique + 25µL acide formique. Cette solution permet de former un cluster d'une quarantaine de masses connues entre 90.9766 Da ($Na(HCOONa)_1$ et 948.8727 Da ($Na(NaAc)_3(NaF)_{10}$.

2. Méthode UPLC-QTOF

Les analyses sont effectuées sur le même système qu'au paragraphe «Analyse non ciblée de la TM par spectrométrie de masse haute-résolution LC-QTOF ». La colonne utilisée est une colonne Waters Acquity HSS T3 1.8µm, 2.1 x 100mm couplée à une pré-colonne Waters Acquity HSS T3

C18 1.7µm 2.1 x 5mm. La température du four colonne est de 35 °C. Les solvants utilisés sont : eau + 0.1 % d'acide formique (A), et méthanol + 0.1 % d'acide formique (B). Comme pour les vérifications des fractions en UPLC-UV-MS, la méthode chromatographique utilisée consiste en un gradient de solvants de 15min. Le débit de solvants est constant à 0.35mL.min^{-1}. Le gradient est le suivant : 5 % de MeOH pendant 2min, puis augmentation jusqu'à 100 % de MeOH en 8min, 100 % MeOH pendant 2min, retour à 5 % MeOH en 1min et maintien à 5 % MeOH pendant 2min. 2µL de chaque échantillon sont injectés. La source du spectromètre de masse est programmée pour une ionisation positive (ESI+), avec différents voltages de cône. L'analyseur du spectromètre de masse est programmé en mode bbCID de telle sorte à effectuer un Scan des ions parents de 150 à 1000 m/z, fragmenter les ions dans la cellule de collision en alternant des énergies de collision faibles et élevées et effectuer un Scan de l'ensemble des ions fils obtenus, de 150 à 1000 m/z.

3. Détermination des formules brutes et identification des composés

Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel Compass DataAnalysis V4.3 de Bruker. Les données brutes MS et MS/MS sont recalibrées à l'aide des masses mesurées du cluster du calibrant interne, que nous avons injecté à chaque début d'analyse. Une fois toutes les masses recalibrées, nous extrayons manuellement les spectres MS et les spectres MS/MS associés, puis interrogeons SmartFormulla3D™ (Bruker) afin de déterminer une formule brute. Le principe de détermination de formules brutes est décrit dans la Partie I chapitre 3.

XI. Mise en évidence de métabolites d'intérêts par UPLC-MS/MS en mode MRM (Multiple Rection Monitoring)

1. Préparation des échantillons

200µL de chaque teinture-mère sont prélevés à partir du stock filtré à 0.2µm et mis dans un tube en verre à fond conique puis fermé avec un bouchon pré-percé pour être injectés en UPLC.

2. Méthode chromatographique

Les analyses sont effectuées sur le système précédemment décrit au paragraphe « Analyse globale du contenu métabolique des teintures-mères en UPLC-UV-MS ». La colonne utilisée est une colonne Waters Acquity BEH C18 1.7µm, 2.1 x 100mm couplée à une pré-colonne Waters

Acquity BEH C18 1.7µm 2.1 x 5mm. La température du four colonne est de 28°C. Les solvants utilisés sont eau + 0.1% d'acide formique(A), et acétonitrile + 0.1% d'acide formique (B). La méthode chromatographique utilisée consiste en un gradient de solvants de 15min. Le débit des solvants est constant à 0.4mL.min^{-1}. Le gradient est le suivant : 5% d'ACN pendant 1min, puis augmentation jusqu'à 53% d'ACN en 6min, puis augmentation jusqu'à 100% d'ACN en 1min, puis un plateau à 100% d'ACN pendant 3min 30sec, et retour à 5% d'ACN en 1min et maintien à 5 % d'ACN pendant 2min 30sec (***Tableau 5***).

Temps (min)	**débit (ml.min^{-1})**	**% A**	**% B**
0	0,4	95	5
1	0,4	95	5
7	0,4	47	53
8	0,4	0	100
11.5	0,4	0	100
12.5	0,4	95	5
15	0,4	95	5

Tableau 5 *: gradient de solvants utilisé pour la chromatographie liquide UPLC-UV-MS.*

3. Méthode de détection MS/MS

Les méthodes de Multiple Reaction Monitoring (MRM) ont été mises en place individuellement pour chaque standard. Chaque standard est mis en solution dans un mélange eau/méthanol 50/50 v/v pour une concentration finale de 10µM. 200µL sont prélevés et mis dans un tube en verre à fond conique puis fermé avec un bouchon pré-percé pour être injectés en UPLC.

XII. ANNEXES

Annexe 1 : liste des métabolites présents dans la banque de données GC-MS polaire de la plateforme. Les métabolites sont classés par ordre alphabétique. Les numéros qui suivent le nom du métabolite correspondent au nombre de pics obtenus lors de l'analyse du standard (ex : nom_1, nom_2, nom_3 correspondent à 3 pics détectés du même standard).

Nom	Analyte ID (NOM - RI-m/z)	Ion caractéristique	Indice de rétention
1,3 Diaminopropane	1,3 Diaminopropane - 1656-201	201	1656
1,7-diaminoheptane	1,7-diaminoheptane - 2061-403	403	2061
1-kestose	1-kestose - 3459-451	451	3459
3-hydroxycinnamic acid	3-hydroxycinnamic acid - 1868-293	293	1868
4-Aminobutyric acid	4-Aminobutyric acid - 1537-304	304	1537
5-methylthioadenoside	5-methylthioadenoside - 2826-236	236	2826
8-carboxygeraniol_1	8-carboxygeraniol_1 - 1840-285	285	1840
8-carboxygeraniol_2	8-carboxygeraniol_2 - 1939-299	299	1939
8-hydroxygeraniol	8-hydroxygeraniol - 1702-211	211	1702
8-hydroxylinalol	8-hydroxylinalol - 1572-169	169	1572
aconitic acid_1	aconitic acid_1 - 1751-375	375	1751
aconitic acid_2	aconitic acid_2 - 1761-375	375	1761
Adenine	Adenine - 1873-264	264	1873
Agmatine	Agmatine - 1739-174	174	1739
Alanine	Alanine - 1439-248	248	1439
Allantoin_1	Allantoin_1 - 1903-331	331	1903
Allantoin_2	Allantoin_2 - 2087-259	259	2087
Alpha-ketoglutaric acid_1	Alpha-ketoglutaric acid_1 - 1561-73	73	1561
Alpha-ketoglutaric acid_2	Alpha-ketoglutaric acid_2 - 1588-73	73	1588
Apigenine	Apigenine - 3134-471	471	3134
Arabinose	Arabinose - 1681-307	307	1681
Arabitol	Arabitol - 1739-217	217	1739
Arginine	Arginine - 1828-157	157	1828
Ascorbic acid	Ascorbic acid - 1970-205	205	1970

Asparagine	Asparagine - 1639-116	116	1639
Aspartic acid_1	Aspartic acid_1 - 1431-160	160	1431
Aspartic acid_2	Aspartic acid_2 - 1529-232	232	1529
Beta-alanine	Beta-alanine - 1439-248	248	1439
Butyric acid	Butyric acid - 1313-131	131	1313
Cadaverine	Cadaverine - 1842-174	174	1842
Caffeic acid_1	Caffeic acid_1 - 1992-396	396	1992
Caffeic acid_2	Caffeic acid_2 - 2147-396	396	2147
Catechin	Catechin - 2911-368	368	2911
Cellobiose_1	Cellobiose_1 - 2778-361	361	2778
Cellobiose_2	Cellobiose_2 - 2808-361	361	2808
Chlorogenic acid_1	Chlorogenic acid_1 - 3026-345	345	3026
Chlorogenic acid_2	Chlorogenic acid_2 - 3129-345	345	3129
Cinnamic acid	Cinnamic acid - 1549-220	220	1549
Cinnamoyl glucose	Cinnamoyl glucose - 2777-331	331	2777
Citric acid	Citric acid - 1831-273	273	1831
Citrulline_1	Citrulline_1 - 1825-157	157	1825
Citrulline_2	Citrulline_2 - 2117-274	274	2117
Coumaric acid	Coumaric acid - 1941-293	293	1941
Coumaroyl glucose	Coumaroyl glucose - 1718-204	204	1718
Cysteine_1	Cysteine_1 - 1565-220	220	1565
Cysteine_2	Cysteine_2 - 2324-218	218	2324
Cytidine	Cytidine - 2729-217	217	2729
Cytosine	Cytosine - 1534-170	170	1534
Dehydroascorbic acid dimer_1	Dehydroascorbic acid dimer_1 - 1864-245	245	1864
Dehydroascorbic acid dimer_2	Dehydroascorbic acid dimer_2 - 1889-316	316	1889
Delphinidin chloride_1	Delphinidin chloride_1 - 3087-369	369	3087
Delphinidin chloride_2	Delphinidin chloride_2 - 3097-408	408	3097
Delphinidin chloride_3	Delphinidin chloride_3 - 3125-355	355	3125
Delphinidin chloride_4	Delphinidin chloride_4 - 3154-408	408	3154
Delphinidin chloride_5	Delphinidin chloride_5 - 3160-355	355	3160

Deoxyglucose	Deoxyglucose - 1809-205	205	1809
Dopamine	Dopamine - 2097-174	174	2097
Erythritol_1	Erythritol_1 - 1531-217	217	1531
Erythritol_2	Erythritol_2 - 1565-221	221	1565
Ethanolamine	Ethanolamine - 1281-174	174	1281
Ferulic acid_1	Ferulic acid_1 - 1925-338	338	1925
Ferulic acid_2	Ferulic acid_2 - 2099-338	338	2099
Flavone	Flavone - 2242-222	222	2242
Fructose_1	Fructose_1 - 1894-307	307	1894
Fructose_2	Fructose_2 - 1904-307	307	1904
Fructose-6-phosphate	Fructose-6-phosphate - 2364-315	315	2364
Fucose_1	Fucose_1 - 1747-277	277	1747
Fucose_2	Fucose_2 - 1759-277	277	1759
Fumaric acid	Fumaric acid - 1354-245	245	1354
Galactitol	Galactitol - 1972-217	217	1972
Galactose_1	Galactose_1 - 1918-319	319	1918
Galactose_2	Galactose_2 - 1941-319	319	1941
Gallic acid	Gallic acid - 1969-458	458	1969
Gelsemine_1	gelsemine_1 - 2747-394	394	2747
Gelsemine_2	gelsemine_2 - 2803-322	322	2802
Gentiobiose_1	Gentiobiose_1 - 2934-361	361	2934
Gentiobiose_2	Gentiobiose_2 - 2912-204	204	2912
Gluconic acid_1	Gluconic acid_1 - 2036-333	333	2036
Gluconic acid_2	Gluconic acid_2 - 1907-319	319	1907
Gluconic acid_3	Gluconic acid_3 - 1920-217	217	1920
Glucose	Glucose - 1925-319	319	1925
Glucose_1	Glucose_1 - 1921-319	319	1921
Glucose_2	Glucose_2 - 1942-319	319	1942
Glucose-6-phospate_1	Glucose-6-phospate_1 - 2378-387	387	2378
Glucose-6-phospate_2	Glucose-6-phospate_2 - 2398-387	387	2398
Glucuronic acid_1	Glucuronic acid_1 - 1968-333	333	1968
Glucuronic acid_2	Glucuronic acid_2 - 1984-333	333	1984
Glutamic acid	Glutamic acid - 1624-246	246	1624

Glutamic acid_1	Glutamic acid_1 - 1534-158	158	1534
Glutamine	Glutamine - 1777-156	156	1777
Glutaric acid_1	Glutaric acid_1 - 1412-261	261	1412
Glutaric acid_2	Glutaric acid_2 - 1412-261	261	1412
Glyceraldehyde-3-phosphate_1	Glyceraldehyde-3-phosphate_1 - 1720-299	299	1720
Glyceraldehyde-3-phosphate_2	Glyceraldehyde-3-phosphate_2 - 1731-299	299	1731
Glyceric acid	Glyceric acid - 1346-292	292	1346
Glycerol	Glycerol - 1299-205	205	1299
Glycine	Glycine - 1322-174	174	1322
Glycolic acid	Glycolic acid - 1079-177	177	1079
Guanine	Guanine - 2142-352	352	2142
Hesperetin	Hesperetin - 2963-503	503	2963
Hexadecanoic acid	Hexadecanoic acid - 2041-313	313	2041
Hydroquinone	Hydroquinone - 1412-239	239	1412
Hydroxyproline	Hydroxyproline - 1538-230	230	1538
Hypoxanthine	Hypoxanthine - 1812-206	206	1812
Indole-3-acetic acid_1	Indole-3-acetic acid_1 - 1919-247	247	1919
Indole-3-acetic acid_2	Indole-3-acetic acid_2 - 1973-202	202	1973
Indole-3-acetonitrile	Indole-3-acetonitrile - 1880-228	228	1880
Indole-3-butyric acid	Indole-3-butyric acid - 2206-202	202	2206
Isocitric acid_1	Isocitric acid_1 - 1833-273	273	1833
Isocitric acid_2	Isocitric acid_2 - 1840-273	273	1840
Isoleucine	Isoleucine - 1310-158	158	1310
Itaconic acid	Itaconic acid - 1356-259	259	1356
Kaempferol	Kaempferol - 3081-559	559	3081
Lactitol	Lactitol - 2843-204	204	2843
Lactose_1	Lactose_1 - 2767-204	204	2767
Lactose_2	Lactose_2 - 2783-204	204	2783
Lauric acid	Lauric acid - 1646-257	257	1646
Leucine_1	Leucine_1 - 1287-158	158	1287
Leucine_2	Leucine_2 - 1163-86	86	1163

Malic acid	Malic acid - 1382-233	233	1382
Malonic acid	Malonic acid - 1216-147	147	1216
Maltose_1	Maltose_1 - 2818-361	361	2818
Maltose_2	Maltose_2 - 2844-361	361	2844
Mannitol	Mannitol - 1959-319	319	1959
Mannose_1	Mannose_1 - 1912-319	319	1912
Mannose_2	Mannose_2 - 1929-319	319	1929
Melezitose	Melezitose - 3550-361	361	3550
Melibiose_1	Melibiose_1 - 2935-361	361	2935
Melibiose_2	Melibiose_2 - 2963-361	361	2963
Methionine	Methionine - 1527-176	176	1527
Methyl Glucopyranose	Methyl Glucopyranose - 1901-204	204	1901
Mevalonic acid	Mevalonic acid - 1566-349	349	1566
Myoinositol	Myoinositol - 2122-305	305	2122
Myricetin	Myricetin - 3228-207	207	3228
Naringenin_1	Naringenin_1 - 2879-545	545	2879
Naringenin_2	Naringenin_2 - 2896-473	473	2896
Naringenin_3	Naringenin_3 - 2977-486	486	2977
Norleucine	Norleucine - 1334-158	158	1334
O-acetyl serine	O-acetyl serine - 1408-218	218	1408
Octadecanoic acid	Octadecanoic acid - 2245-341	341	2245
Octopamine_1	Octopamine_1 - 2042-174	174	2042
Octopamine_2	Octopamine_2 - 1962-174	174	1962
Oleanolic acid	Oleanolic acid - 3594-320	320	3594
Ornithine	Ornithine - 1622-142	142	1622
Oxalic acid	Oxalic acid - 1137-147	147	1137
Oxaloacetic acid	Oxaloacetic acid - 1472-290	290	1472
Palatinose	Palatinose - 2918-361	361	2918
Palmitic acid	Palmitic acid - 2016-84	84	2016
Phenylalanine_1	Phenylalanine_1 - 1556-146	146	1556
Phenylalanine_2	Phenylalanine_2 - 1641-218	218	1641
Phosphoenol pyruvate	Phosphoenol pyruvate - 1611-369	369	1611
p-hydroxybenzoic acid	p-hydroxybenzoic acid - 1629-267	267	1629

Phytol_1	Pphytol_1 - 2136-143	143	2136
Phytol_2	Phytol_2 - 2175-143	143	2175
Pipecolic acid	Pipecolic acid - 1278-84	84	1278
Pipecolic acid	Pipecolic acid - 1636-200	200	1636
Proline	Proline - 1312-142	142	1312
Protopine	Protopine - 3038-148	148	3038
Putrescine	Putrescine - 1745-174	174	1745
Pyruvic acid	Pyruvic acid - 1051-174	174	1051
Quercetin	Quercetin - 3178-575	575	3178
Quinic acid	Quinic acid - 1891-345	345	1891
Quinine	Quinine - 2680-136	136	2680
Raffinose	Raffinose - 3451-361	361	3451
Rhamnose_1	Rhamnose_1 - 1737-277	277	1737
Rhamnose_2	Rhamnose_2 - 1745-277	277	1745
Ribitol	Ribitol - 1762-217	217	1762
Salicylic acid	Salicylic acid - 1521-267	267	1521
Secologanin_1	Secologanin_1 - 2944-361	361	2944
Secologanin_2	Secologanin_2 - 2964-361	361	2964
Serine_1	Serine_1 - 1377-218	218	1377
Serine_2	Serine_2 - 1271-132	132	1271
Serotonine_1	Serotonine_1 - 2495-174	174	2495
Serotonine_2	Serotonine_2 - 2518-174	174	2518
Shikimic acid	Shikimic acid - 1816-204	204	1816
Sorbitol	Sorbitol - 1968-319	319	1968
Sorbose_1	Sorbose_1 - 1898-307	307	1898
Sorbose_2	Sorbose_2 - 1904-307	307	1904
Spermidine_1	Spermidine_1 - 2218-174	174	2218
Spermidine_2	Spermidine_2 - 2282-174	174	2282
Spermidine_3	Spermidine_3 - 2501-174	174	2501
Spermine_1	Spermine_1 - 2790-329	329	2790
Spermine_2	Spermine_2 - 2689-174	174	2689
Stachyose	Stachyose - 3906-361	361	3906
Stearic acid	Stearic acid - 2243-356	356	2243

Succinic acid	Succinic acid - 1322-147	147	1322
Sucrose	Sucrose - 2712-361	361	2712
Syringic acid_1	Syringic acid_1 - 1902-342	342	1902
Syringic acid_2	Syringic acid_2 - 1822-284	284	1822
Tartaric acid	Tartaric acid - 1653-292	292	1653
Taurine	Taurine - 1677-326	326	1677
Threonine	Threonine - 1402-218	218	1402
Thymidine	Thymidine - 2424-171	171	2424
Trehalose	Trehalose - 2815-361	361	2815
Tryptamine	Tryptamine - 2225-289	289	2225
Tyramine	Tyramine - 1920-338	338	1920
Tyrosine	Tyrosine - 1946-218	218	1946
Umbelliferone	Umbelliferone - 1842-234	234	1842
Uracil	Uracil - 1356-241	241	1356
Urea	Urea - 1244-189	189	1244
Valerenic acid	Valerenic acid - 1971-306	306	1971
Valine	Valine - 1227-144	144	1227
Vanillic acid	Vanillic acid - 1766-312	312	1766
Xylitol	Xylitol - 1728-217	217	1728
Xylose_1	Xylose_1 - 1667-103	103	1667
Xylose_2	Xylose_2 - 1675-103	103	1675

Annexe 2 : liste des métabolites présents dans la banque de données GC-MS apolaire de la plateforme.

Nom	Analyte ID (NOM - RI-m/z)	Ion caractéristique	Indice de rétention
(+)-8(15)-Cedren-9-ol	(+)-8(15)-Cedren-9-ol - 1654-177	177	1654
1,4-cineol_1	1,4-cineol_1 - 1012-125	125	1012
1,4-cineol_2	1,4-cineol_2 - 1028-154	154	1028
1-Decanol	1-Decanol - 1272-112	112	1272
2-Phenylethanol	2-Phenylethanol - 1110-91	91	1110
a-Humulene	a-Humulene -1459-93	93	1459
Bisabolene	Bisabolene - 93-1543	93	1543

Bornyl acetate	Bornyl acetate - 1286-136	136	1286
Carene-delta	Carene-delta - 1009-93	93	1009
(-)-Carveol_1	(-)-carveol_1 - 1218-109	109	1218
(-)-Carveol_2	(-)-carveol_2 - 1230-132	132	1230
Caryophyllene	Caryophyllene - 1425-133	133	1425
(-)-trans-Caryophyllene	(-)-trans-Caryophyllene - 1426-133	133	1426
(-)-Caryophyllene oxide	(-)-Caryophyllene oxide - 1589-109	109	1589
Cedrene_1	Cedrene_1 - 1437-119	119	1437
Cedrene_2	Cedrene_2 - 1417-119	119	1417
Cedrene_3	Cedrene_3 - 1425-161	161	1425
Cineole	Cineole - 1028-154	154	1028
cis-Jasmone_1	cis-Jasmone_1 - 1401-164	164	1401
cis-Jasmone_2	cis-Jasmone_2 - 1391-164	164	1391
cis-Nerolidol	cis-Nerolidol - 1533-107	107	1533
Citral_1	Citral_1 - 1239-109	109	1239
Citral_2	Citral_2 - 1269-69	69	1269
Citronellol	Citronellol - 1226-95	95	1226
Dihydrolinalool	Dihydrolinalool - 1132-138	138	1132
y-Dodecalactone	y-Dodecalactone - 1677-85	85	1677
Eugenol	Eugenol - 1359-164	164	1359
Farnesol_1	Farnesol_1 - 1698-93	93	1698
Farnesol_2	Farnesol_2 - 1722-93	93	1722
Frambinone	Frambinone - 1557-164	164	1557
Geraniol	Geraniol - 1255-69	69	1255
Geranyl_linalool	Geranyl_linalool - 2029-93	93	2029
Humulene_1	Humulene_1 - 1459-93	93	1459
Humulene_2	Humulene_2 - 1424-133	133	1424
Isolongifolene	Isolongifolene - 1394-161	161	1394
(+/-)-Lavandulol	(+/-)-Lavandulol - 1165-111	111	1165
(-)-S-Limonene	(-)-S-Limonene - 1025-136	136	1025
(-)-Linalool	(-)-Linalool - 1096-93	93	1096
(+ \-)-Linalool	(+ \-)-Linalool - 1096-93	93	1096
Linalool_oxide_1	Linalool_oxide_1 - 1069-111	111	1069

Linalool_oxide_2	Linalool_oxide_2 - 1085-111	111	1085
L-Perillaldehyde	L-Perilla aldehyde-SP - 1274-122	122	1274
Methyl anthranilate	Methyl anthranilate - 1344-151	151	1344
Methyl Jasmonate_1	Methyl Jasmonate_1 - 1648-224	224	1648
Methyl Jasmonate_2	Methyl Jasmonate_2 - 1632-224	224	1632
Nerolidol_1	Nerolidol_1 - 1534-107	107	1534
Nerolidol_2	Nerolidol_2 - 1565-107	107	1565
Ocimene_1	Ocimene_1 - 1034-93	93	1034
Ocimene_2	Ocimene_2 - 1026-136	136	1026
Paracymene	Paracymene - 1022-119	119	1022
(-)-Perillyl alcohol	(-)-Perillyl alcohol - 1302-121	121	1302
Phellandrene_1	Phellandrene_1 - 1003-93	93	1003
Phellandrene_2	Phellandrene_2 - 1022-119	119	1022
Phellandrene_3	Phellandrene_3 - 1027-93	93	1027
Phytol_1	Phytol_1 - 2082-123	123	2082
Phytol_2	Phytol_2 - 2109-123	123	2109
(+)-Rose oxide_1	(+)-Rose oxide_1 - 1106-139	139	1106
(+)-Rose oxide_2	(+)-Rose oxide_2 - 1123-139	139	1123
Salicylaldehyde	Salicylaldehyde - 1039-122	122	1106
Squalene	Squalene - 2829-81	81	2829
trans, trans-Farnesol	trans, trans-Farnesol - 1723-69	69	1723
trans-Nerolidol	trans-Nerolidol - 1565-161	161	1565
Terpinene	Terpinene - 1056-136	136	1056
Valencene	Valencene - 1499-161	161	1499

Annexe 3 : liste des métabolites cibles dans la banque de données LC-MS/MS de la plateforme. MRM : ion précurseur > ion fils, RT : temps de rétention (min), CV : tension du cône (V), CE : énergie de collision (eV), Time range : fenêtre d'acquisition (min) ; ES : mode d'ionisation électrospray (ES+ ou ES-). Les composés entre crochets n'ont pas été confirmés par des standards commerciaux. Leurs identités ont été déduites par les résultats MS/MS et les publications.

Flavonoids - MRM_1						
	MRM	**RT**	**CV**	**CE**	**Time range**	**ES**
Fonction 1					**0 to 3.55**	**ES+**
[Sinapoylcholine dimer (isomer_1)]	309.8>251	2,79	28	16		
[Methylsulfinylheptyl glucosinolate]	480>400	2,44	14	8		
[Daidzin sulfate]	497>255.1	2,32	14	16		
Procyanidin B1	579.2>427	2,79	32	16		
Pelargonidin-3,5-diglucoside	595>271	2,72	32	32		
[Quercetin-hexosylmethylpentoside-methylpentoside]	757>449	3,13	28	24		
Fonction 2					**0 to 3.55**	**ES-**
[4-Methylthiobutyl glucosinolate (Glucoerucin)]	420>97	2,55	35	24		
[Indol-3-ylmethyl glucosinolate (Glucobrassicin)]	447>97	2,93	35	24		
[8-Methylsulfinyloctyl glucosinolate (Glucohirsutin)]	492>97	2,95	35	24		
Fonction 3					**3.55 to 4.26**	**ES-**
[3-Benzoyloxy-n-propyl glucosinolate (Glucomalcomiin)]	480>97	3,82	35	24		
[Kaempferol-dimethylpentoside (isomer-2)]	577.2>431	3,78	35	24		
Fonction 4					**3.55 to 4.26**	**ES+**
[Kaempferol-dimethylpentoside (isomer_3)]	579>433	3,96	35	16		
[Kaempferol-hexoside-methylpentoside (isomer3)]	595>287	3,68	35	32		

[Quercetin-dimethylpentoside]	595>449	3,72	35	8		
quercetin-3-O-rutinoside (-3-glucoside-rhamnoside=Rutin)	611.1>303	3,91	24	28		
[Kaempferol-dihexoside]	611.2>287	3,82	14	16		
[Isorhamnetin-hexoside-methylpentoside (isomer_2)]	625.1>463	3,74	21	16		
[Quercetin-methylpentoside dimer (isomer_2)]	895>603	3,87	28	24		
Fonction 5					**4.26 to 15**	**ES-**
[7-Methylthioheptyl glucosinolate]	462.1>97	4,47	35	24		
Fonction 6					**4.26 to 15**	**ES+**
[9-(Methylsulfinyl)nonanenitrile]	202>138	4,77	28	16		
Dihydrokaempferol	289.1>153	4,77	24	16		
Myricetin	319>153	4,7	30	35		
[Quercetin-methylpentoside (isomer_2)]	449>303	4,74	28	24		
[Isorhamnetin-methylpentoside]	463>317	4,77	21	8		
Flavonoids - MRM_2						
	MRM	**RT**	**CV**	**CE**	**Time range**	**ES**
Fonction 1					**0 to 3.65**	**ES+**
[Sinapoylcholine dimer (isomer_2)]	309.8>251	3,28	28	16		
[Coumarinic acid-glucose]	326.8>147	3,14	21	32		
[Sinapoyl glucose]	387>207	3,33	21	24		
[Kaempferol-dimethylpentoside (isomer-1)]	579>287	3,27	35	24		
Procyanidin B2	579.2>427	3,24	32	16		
[Kaempferol-hexoside-methylpentoside (isomer1)]	595.6>287	3,29	25	32		
[Quercetin-hexoside-methylpentoside (isomer_1)]	611.2>465	3,18	35	16		
[Sinapine dimer]	619.2>310	3,3	28	16		
[Guaiasylglycerol-beta-sinapoylcholine ether 4'-O-hexoside]	668.4>251.1	3,18	28	32		

Fonction 2					**3.65 to 4.59**	**ES+**
Pelargonidin	271>121	4,08	32	32		
Quercetin-3-glucoside	465>303	4,03	24	16		
[Kaempferol-dimethylpentoside (isomer_4)]	579>287	3,97	35	24		
Kaempferol-3-O-rutinoside	595>287	4,17	24	24		
[Isorhamnetin-dimethylpentoside]	609>463	4,01	21	16		
[Quercetin-methylpentoside dimer (isomer_3)]	895>603	4,01	28	24		
Fonction 3					**3.65 to 4.59**	**ES-**
[Coumaroyl-malate (or dimer) (isomer_1)]	559.2>133	4,06	21	24		
[Coumaroyl-malate (or dimer) (isomer_2)]	559.2>133	4,18	21	24		
Fonction 4					**4.59 to 15**	**ES+**
Apigenin	271.1>153	5,88	35	32		
2',4,4',6'-tetrahydrochalcone et Naringenin	273.1>153	5,93	32	24		
Naringenin	273.1>153	5,96	32	24		
Kaempferol	287>153	6,02	30	35		
[Peonidin]	301.1>286	6,01	35	24		
Quercetin	303>153	5,38	32	32		
Isorhamnetin (isomer 1)	317>302	6,04	24	24		
Isorhamnetin (isomer 2)	317>302	6,08	24	24		
Fonction 5					**4.59 to 15**	**ES-**
[Kaempférol-methylpentoside]	431>285	5,24	35	24		
[8-methylthiooctyl glucosinolate]	476.2>97	5	35	24		
[Disinapoyl-hexoside]	591>205	5,23	35	24		
Flavonoids - MRM_3						
	MRM	**RT**	**CV**	**CE**	**Time range**	**ES**
Fonction 1					**0 to 3.92**	**ES+**
[Quercetin-methylpentoside-pentoside]	581.2>303.1	3,56	35	32		

[Kaempferol-hexoside-methylpentoside (isomer2)]	595>287	3,39	28	24		
[Quercetin-hexoside-methylpentoside (isomer_2)]	611.2>303	3,47	35	24		
[Isorhamnetin-hexoside-methylpentoside (isomer_1)]	625>317.4	3,48	21	32		
[Procyanidin trimer]	867>579	3,53	35	16		
[Quercetin-methylpentoside dimer (isomer_1)]	895>603	3,63	28	24		
[Procyanidin tetramer]	1155>579	3,63	28	20		
Fonction 2					**0 to 3.92**	**ES-**
[Epicatechin]	289>245	3,45	35	16		
Fonction 3					**3.92 to 5.66**	**ES+**
Dihydroquercetin	305>259	4,25	24	14		
[Sinapoyl-malate]	340.7>207	4,21	7	7		
Kaempferol-3-glucoside	449>287	4,34	20	16		
Quercetin-3-rhamnoside	449>303	4,39	21	16		
[Isorhamnetin-hexoside]	479>317	4,4	21	24		
[Sinapoyl malate dimer]	681>207	4,21	7	16		
Fonction 4					**5.66 to 15**	**ES+**
(2S)-flavanone	225>120.8	8,12	24	21		
[8-8'-Diferulic acid]	387.3>105	7,47	28	16		
[1-palmitoylglycerophosphatidylcholine]	496.2>184	8,69	35	32		
[Cyanidin-dihexoside-pentoside]	743.1>581.2	8,69	28	24		
Phenolic precursors - MRM						
	MRM	**RT**	**CV**	**CE**	**Time range**	**ES**
Fonction 1					**0 to 4.94**	**ES+**
Coumaric acid	164.8>146.9	3,96	22	15		
Phenylalanine	166>120	1,66	16	16		
Caffeic acid	181>163	3,38	17	10		
Ferulic acid	195>177	4,15	24	8		

Tryptophane	205>188	2,69	16	8		
Sinapic acid	225>207	4,11	20	8		
Coumaroyl-shikimate	321>147	4,05	17	14		
Caffeoyl-shikimate	337>162.9	3,63	15	16		
Coumaroyl quinate	339>147	3,49	17	14		
Caffeoyl-quinate	355>163	3,02	25	30		
Fonction 2					**4.94 to 15**	**ES+**
Cinnamic acid	149>131	5,73	24	8		
Prenyl-coumarate	165>147	8,16	17	15		
Geranyl-coumarate	165>147	10,4	17	15		
Coumaroyl-anthranilate	284>147	6,48	17	14		

XIII. BIBLIOGRAPHIE

1. Roessner, U., et al., Technical advance: simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. Plant J, 2000. 23(1): p. 131-42.

2. Sumner, L.W., et al., *Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI).* Metabolomics, 2007. 3(3): p. 211-221.

PARTIE II

LES TEINTURES-MERES

Introduction

Cette partie recense toutes les recherches bibliographiques et métabolomiques effectuées sur les teintures-mère qui composent le L52 et le L72 (***Figure 1***). Chaque chapitre correspond à une TM, ce qui simplifie la recherche d'informations. Il est composé d'une description générale de la plante et de la TM, les métabolites identifiés dans la littérature pouvant être retrouvés dans la TM et leurs effets biologiques connus. Enfin, sont présentées les différentes analyses effectuées sur la TM et les molécules identifiées dans ces travaux.

Produits leaders

Etats grippaux

Trouble du sommeil

NOM	NOM COMMUN	FAMILLE
Eupatorium perfoliatum	Eupatoire perfoliée	Asteraceae
Aconitum napellus	Aconit napel	Ranunculaceae
Bryonia alba	Brionne blanche	Cucurbitaceae
Arnica montana	Arnica des montagnes	Asteraceae
Gelsemium	Gelsemium	Gelsemiaceae
China rubra	Quinquina	Rubiaceae
Belladona	Belladone	Solanaceae
Drosera	Drosera	Droseraceae
Polygala senega	Polygale de Virginie	Polygalaceae
Eucalyptus globulus	Gommier bleu	Myrtaceae
Sumbulus	(racine de musc)	Apiaceae
Cicuta virosa	Ciguë aquatique	Apiaceae
Asa foetida	Ase fétide	Apiaceae
Corydalis formosa	Corydalis formosa	Papaveraceae
Ignatia	(*Strychnos ignatii*)	Loganiaceae
Valeriana	Valériane officinale	Valerianaceae
Stasphysagria	Staphisaigre	Renonculaceae
Avena sativa	Avoine cultivée	Poaceae
Hyoscyamus	Jusquiame noire	Solanaceae

Figure 1 *: liste des 19 TMs entrants dans la composition des deux produits leaders des Laboratoires Lehning, le L52 et le L72. Sont indiqués de gauche à droite : le nom de la TM, le nom commun de la plante utilisée pour la fabrication de la TM et le nom de la famille botanique auquel appartient la plante. Nous pouvons observer la diversité botanique de ces plantes, qui nous conduira vers l'observation de nombreuses familles de molécules.*

Certaines remarques communes sont ressorties de ces recherches : les résultats LC-UV-MS ont permis d'obtenir un premier jeu de données qualitativement important, mais difficilement exploitable pour l'identification de molécules. En effet, les données UV et les mesures des masses peu précises ne nous permettent pas, à ce stade-là, l'identification de composés. Néanmoins, elles ont permis d'orienter les recherches vers d'autres techniques d'analyses, comme la GC-MS et la LC-HRMS. Nous observons dans la plupart des profils chromatographiques LC-UV-MS des TMs la présence de métabolites polaires de petites masses, ainsi que des métabolites assez apolaires. Nous avons donc décidé d'analyser toutes les TMs en GC-MS avec deux méthodes : une méthode avec dérivation pour observer majoritairement les composés polaires ; et une méthode sans dérivation pour observer les molécules apolaire et volatiles (voir Partie II Matériel et Méthodes). Ensuite, nous avons décidé, pour quelques-unes des TMs, de travailler en spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) afin d'obtenir une précision de masse

plus importante et donc une identification plus précise des métabolites majoritaires. La difficulté à ce stade fut la bonne séparation des métabolites en chromatographie, pour éviter une coélution à l'arrivée dans le spectromètre de masse et donc d'obtenir des spectres de masses se chevauchant et empêchant la génération de formules brutes. Ceci nous a conduit à passer par l'HPLC semi-préparative afin de collecter des petites fractions de TM et d'obtenir des extraits plus simples à analyser en HRMS.

Nous avons regardé la présence de phytostérols dans chaque TM. Cette famille de molécules présente un intérêt pour la santé humaine. Par exemple, des mélanges de phytostérols sont commercialisés pour améliorer les symptômes de l'hypertrophie bénigne de la prostate [1]. Aucune analyse des 19 TMs en UPLC-MS avec la source APPI en mode positif n'a permis d'observer et d'identifier des molécules type stérols, que ce soit en mode Scan 100 → 1000 m/z ou en mode SIR pour observer le stigmasterol, le cycloartenol, le campesterol, le sitosterol, le cholesterol et le 24-methylene-cycloartenol-4-carboxy-4-methyl. Ceci peut être expliqué par la méthode de fabrication des TMs, qui est une macération de la plante dans un mélange éthanol/eau. Cette technique d'extraction n'est pas la plus adaptée pour extraire les composés apolaires type stérols. La méthode de détection MS en mode Scan n'est également pas la méthode la plus sensible. Deux possibilités se présentent : soit il n'y a pas du tout de composés stéroliques dans les TMs, soit ils sont présents en très faible quantité et nous ne les détectons pas avec cette méthode. Nous verrons par la suite que nous identifions quelques composés stéroliques grâce aux analyses GC-MS.

1. Jean, Bruneton., *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e ed.)*. 2009: Lavoisier. P: 904-905.

Chapitre 1: *Eupatorium perfoliatum*

1. Description générale

Eupatorium perfoliatum L., appelée plus communément eupatoire perfoliée, herbe à fièvre ou herbe à souder, fait partie de la famille des Astéracées (***Figure 1***). Elle est principalement originaire d'Amérique du Nord et de l'est de l'Asie. Elle fut utilisée par les indiens d'Amérique pendant plusieurs siècles contre la fièvre, le rhume, la toux et les maux de tête. Elle a ensuite été utilisée au 18ème siècle pour traiter la malaria, la dengue ou la fièvre jaune. Aujourd'hui, elle est utilisée principalement pour lutter contre le syndrome grippal. Arrivée il y a plusieurs dizaines d'années en Europe, elle n'est utilisée que dans des formulations homéopathiques sur le marché européen [1]. Elle ne doit pas être confondue avec *Eupatorium cannabinum* présente en Europe.

La teinture-mère est fabriquée à partir des parties aériennes fleuries fraiches, par macération dans un mélange éthanol/eau 65/35 V/V, selon la technique générale de préparation des teintures-mères.

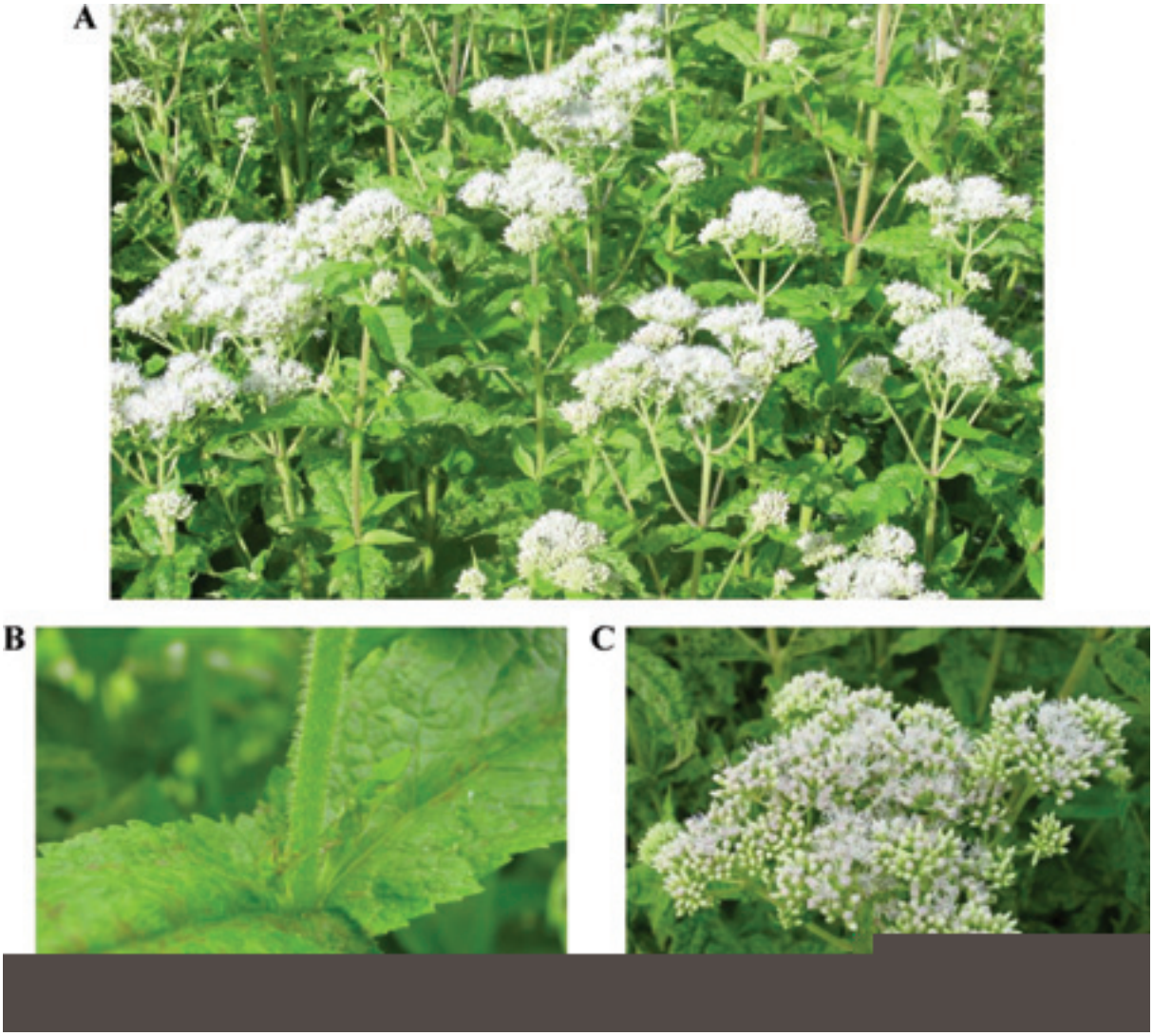


Figure 1 *: photographie des parties aériennes d'Eupatorium perfoliatum. A : parties aériennes fleuries, B : feuilles particulières enserrent la tige, C : inflorescence. C'est une plante herbacée vivace d'environ 1-1.5m de haut. D'après [2].*

2. Bibliographie et connaissances scientifiques

Dans la monographie d'*Eupatorium perfoliatum* des laboratoires Lehning, nous dosons, par spectrométrie UV-visible à 402 nm, les flavonoïdes totaux, exprimés en astragaline ($C_{21}H_{20}O_{11}$; MM : 448.4 $g.mol^{-1}$). La teneur en flavonoïdes totaux doit être au minimum de 0.08 % *m/m.*

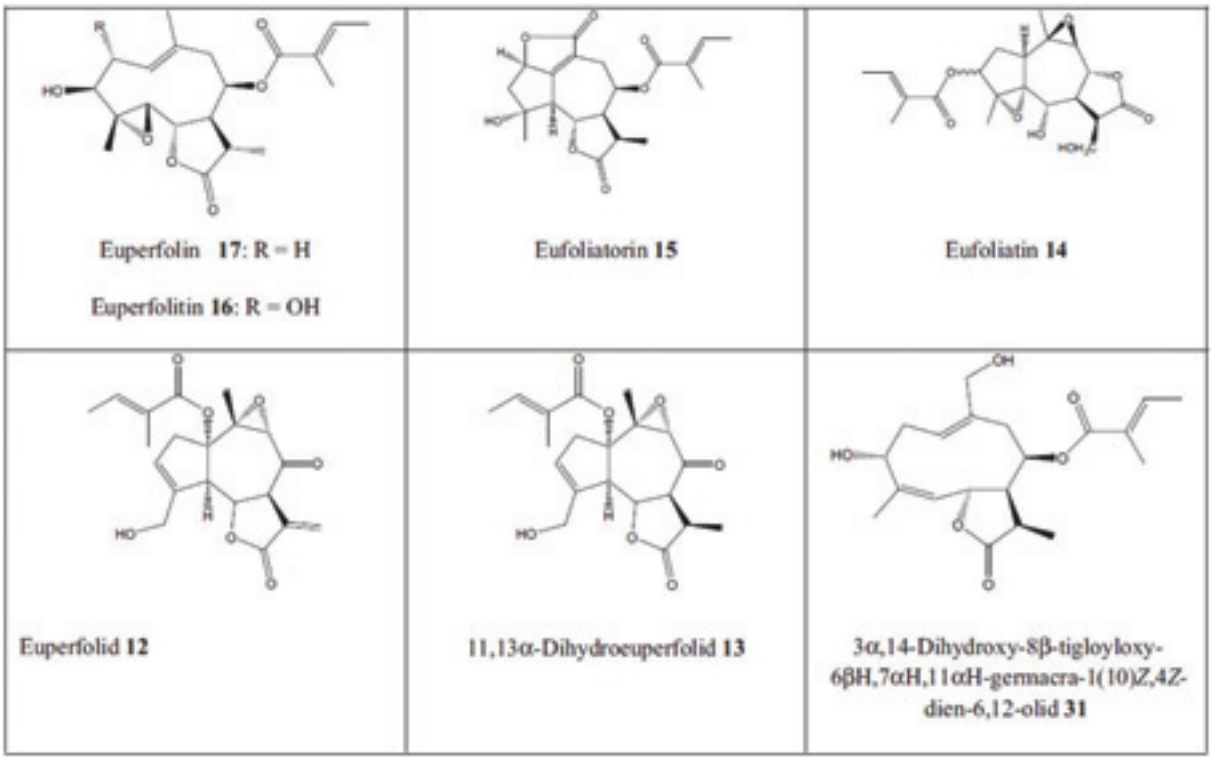


Figure 3 *: Structure des six principaux lactones sesquiterpèniques d'Eupatorium perfoliatum. 12, 13, 14, 15 font partie de la famille des guaianolides, 16 et 17 de la famille des germacranolides. D'après [2].*

Nous pouvons retrouver des dérivés d'acide caféique assez communs tels que l'acide quinique, l'acide chlorogénique (acide 5-caffeoylquinique), l'acide néochlorogénique (acide 3-caffeoylquinique) ainsi que des dérivés d'acide glucarique : acide 2,5-dicaffeoylglucarique, acide 3,4-dicaffeoylglucarique et acide 2,4- ou 3,5-dicaffeoylglucarique [4](***Figure 4***).

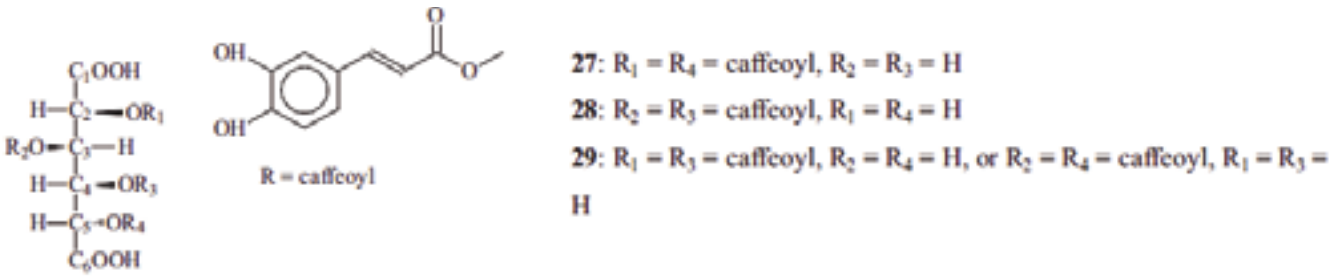


Figure 4 *: structures des principaux dérivés d'acides glutariques connus chez Eupatorium perfoliatum. 27 : acide 2,5-dicaffeoylglucarique ; 28 : acide 3,4-dicaffeoylglucarique ; 29 : acide 2,4 ou 3,5-dicaffeoylglucarique. D'après [2].*

La composition de l'huile essentielle d'*E. perfoliatum* a été peu explorée, probablement à cause de sa faible abondance (0.05% v/m ou 1.8 mL d'huile essentielle par kg de matière sèche [5]). Ces analyses en GC-MS ont permis d'identifier les molécules suivantes: β-gurjunen, β-caryophyllenoxid, limonen, linalool, borneol, bornylacetat, (iso)-eugenol, α-copaen, β-elemen, ar-curcumen, β-caryophyllen, humulen, δ-cadinen, E-anethol, carvon, camphor et selin-11-en-4-α-ol [2].

Des polysaccharides communs, les glucuronoxylanes, composants de l'hémicellulose, ont été identifiées. Parmi eux nous retrouvons les 4-O-methylglucuronoxylanes (ou MGX) [6].

Pour les triterpènes et les stérols, les premiers travaux sur *E. perfoliatum* datent de 1973 [7]. Ils ont été complétés par la suite par différents groupes de recherche principalement par des méthodes de GC-MS avec dérivation, pour au final identifier les molécules suivantes : α-amyrin, β-amyrin, lupeol, taraxasterol, β-sitosterol, stigmasterol, campesterol, 3β-hydroxyurs-20-ene, 3β-acetoxyurs-20-ene, urs-20-en-3-one, 3β-hydroxyursane. Par la suite, d'autres triterpènes ont été retrouvés tels que l'α- et β-amyrinacetate (***Figure** 5*).

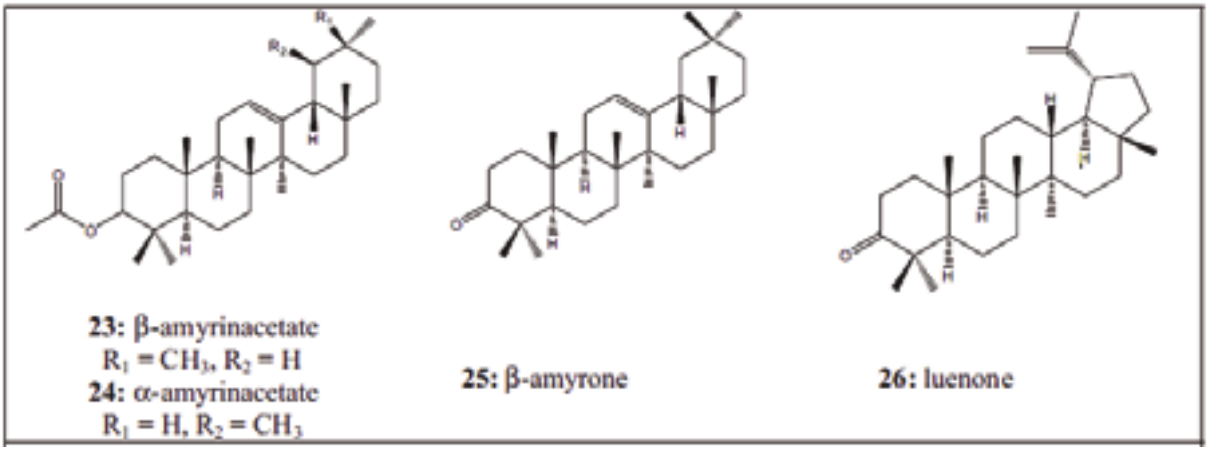


***Figure 5** : structure de certains triterpènes, phytostérols retrouvés chez E. perfoliatum. D'après [2].*

Le genre *Eupatorium* est également connu pour posséder de nombreuses espèces contenant des alcaloïdes pyrrolizidiniques. La plupart des alcaloïdes de ce groupe sont toxiques, comme mutagène ou inducteur de tumeurs hépatiques [6]. Néanmoins, aucun alcaloïde pyrrolizidinique n'a été trouvé pour le moment dans l'espèce *Eupatorium perfoliatum*. Cette caractéristique en fait un critère d'identification pour l'espèce, et permet aux commissions pharmaceutiques de classer son utilisation comme non risquée.

D'un point de vue biologique, des tests d'activités anti-inflammatoire et immunostimulante ont été effectués à partir de différents extraits d'*E. perfoliatum*. L'extrait hydro-alcoolique correspondant à la TM présenterait une activité anti-inflammatoire [5]. La cytotoxicité d'un extrait éthanolique d'*E. perfoliatum* a également été observée sur des lignées cellulaires, avec une IC_{50} d'environ 12 $\mu g.mL^{-1}$. Cet extrait n'a pas montré d'effets anti-bactériens significatifs sur les deux bactéries à Gram positif testées [8].

3. Résultats et Discussion

a. Analyse de la TM en UPLC-UV-MS

Cette première analyse non ciblée a pour but de nous montrer quelle est la composition globale de la teinture-mère, c'est-à-dire si elle contient beaucoup de métabolites, si ces derniers absorbent en UV, dans quelle gamme de masse se trouvent-ils, s'ils sont plutôt de natures très polaires, peu polaires ou moyennement apolaires ou bien apolaires ?

Les chromatogrammes UV et MS ESI+ (Scan de 100 à 1000 m/z) nous montrent que la teinture-mère est très riche en métabolites (***Figure 6***). Nous observons des métabolites sortant dans le volume mort, avant les 2 min de l'analyse. Cela signifie que ces métabolites sont très polaires et par conséquent ne sont pas retenus par la colonne chromatographique. Les pics sortants entre 4 et 10 min correspondent à des molécules peu polaires. Enfin, les molécules éluées à la fin de l'analyse sont apolaires. Nous pouvons observer une différence entre les deux profils chromatographiques UV et MS. Nous voyons qu'un pic majoritaire en UV n'est pas forcement majoritaire en MS, et inversement. Cela nous montre bien la complexité de la définition d'une « molécule majoritaire ». Une molécule qui absorbe très bien en UV, c'est le cas des molécules possédant un ou plusieurs cycles aromatiques, peut très mal s'ioniser, voir ne pas s'ioniser du tout. Elle sera donc minoritaire en analyse MS. A l'inverse, certaines molécules s'ionisent très bien mais n'absorbent pas en UV.

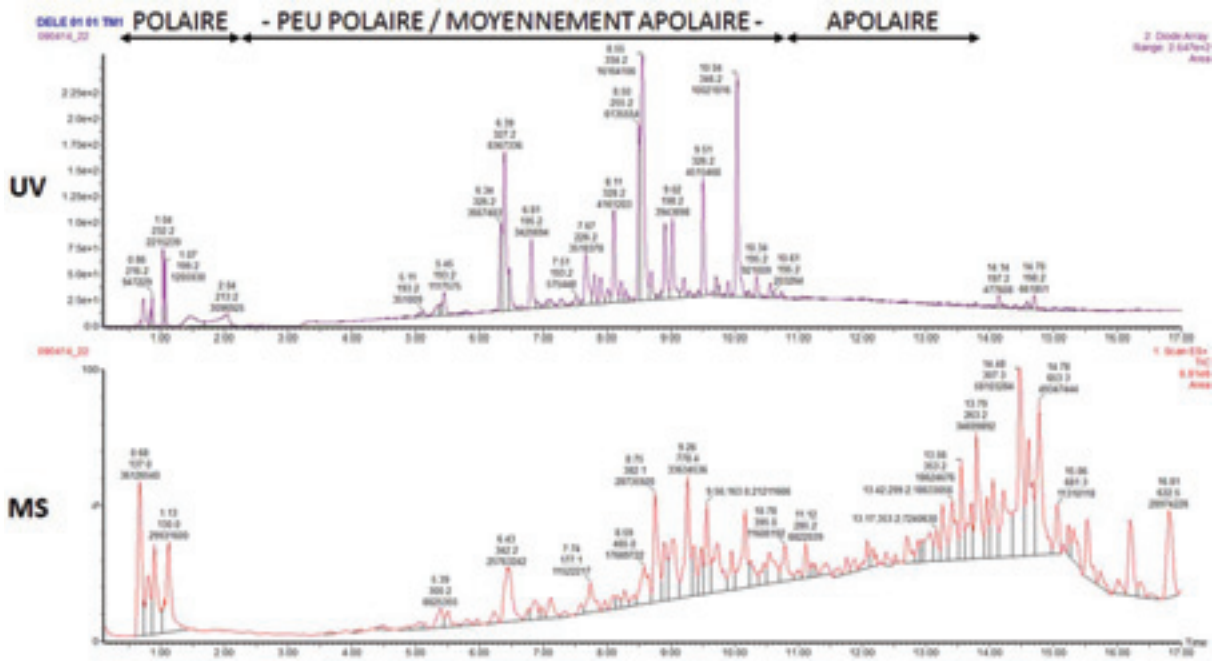


Figure 6 *: chromatogrammes UV Scan 190-500 nm complet (0 – 17 min) (haut) et MS Scan 100-1000 m/z complet (0 – 17 min) (bas).*

A partir de ces chromatogrammes, nous pouvons recenser les principaux pics majoritaires en fonction de leurs aires sous courbe, ces dernières étant proportionnelles aux concentrations des métabolites dans la TM. Ainsi pour chaque pic majoritaire, nous aurons un temps de rétention caractéristique et une absorbance maximale ou un ion majoritaire, caractéristique de la molécule présente sous le pic.

Pic majoritaire	Aire sous pic	Temps de rétention (s)	λmax (nm)	λmax secondaire (nm)
1	16164106	8,55	334,2	330>223>198
2	10021816	10,04	346,2	346>224>254>198
3	8367336	6,39	327,2	327>220>195
4	6135554	8,50	255,2	255>221>356>199>196
5	4515468	9,51	326,2	327>221>196
6	4161203	8,11	328,2	328>194>220
7	3943898	9,02	198,2	196>265>342
8	3667483	6,34	326,2	326>194>219
9	3518378	7,67	226,2	226>197
10	3503112	8,91	197,2	198>219>265>346
11	3420694	6,81	195,2	195>324>218
12	3096925	2,04	213,2	211>207>202>205
13	2736512	1,47	210,2	211>197
14	2215239	1,04	232,2	231>198

15	2065602	6,47	194,2	194>219>326
16	1537774	0,72	195,2	198>208
17	1470625	7,80	194,2	194>254>352
18	1432228	8,69	220,2	220>195
19	1205930	1,07	199,2	198>260
20	1010442	9,20	198,2	196>221
21	971134	8,22	195,2	195>226
22	921009	10,34	195,2	195>219
23	841608	8,01	194,2	194>216>326
24	788456	5,35	193,2	193>215>326
25	784402	9,71	195,2	195>368
26	645812	7,11	194,2	194>311
27	618011	7,28	193,2	194>216>326
28	575448	7,51	193,2	194>301
29	571358	9,90	195,2	195>219
30	537930	10,56	195,2	195>217>334

Tableau 1 *: liste des 30 pics chromatographiques majoritaires observés en UPLC-UV Scan 190-500 nm. Ils sont classés par ordre d'abondance (aires décroissantes) après intégration automatique.*

Pic majoritaire	Aire sous pic	Temps de rétention (s)	m/z majoritaire (Da)	m/z secondaire (Da)
1	36126540	0,68	137,0	137>119>151>105>123>133
2	33634536	9,26	778,4	778>398>779>442>426>263>399>780
3	29931600	1,13	130,0	156>130>170>139>118>136>146>163
4	28735920	8,75	382,1	382>247>229>155>183>383>265>347
5	25763242	6,43	342,2	163>342>355>129>115>372>343>356
6	25371370	10,16	382,1	317>382>247>746>318>702>365>747
7	24570256	9,05	440,1	440>449>287>398>424>382>211>441
8	23948894	9,72	382,1	382>702>247>233>636>703>265>303
9	23480614	0,9	138,0	138>116>146>170>193>104>147>157
10	21211666	9,56	163,0	163>209>164>210>592>620>181>233
11	18033254	0,81	104,1	104>219>145>127>163>105>113>115
12	17689722	8,59	465,0	465>303>382>398>289>466>517>163
13	15250696	8,91	384,1	440>384>400>424>165>441>449>344
14	11600192	10,78	395,0	664>395>245>137>295>498>301>665
15	11522217	7,74	177,1	177>117>193>611>356>757>303>101
16	11041147	9,35	442,2	442>263>380>443>245>233>217>381
17	10110489	9,47	361,1	361>379>620>782>396>722>261>621
18	9411506	9,95	361,1	361>261>362>595>343>243>363>262
19	8437430	12,69	313,1	313>258>376>149>205>277>279>314
20	8090651	10,25	380,1	382>147>193>317>247>380>165>245

21	7136315	6,87	163,0	358>163>420>359>153>181>133>171
22	6961728	7,12	227,2	227>225>207>147>153>209>163>389
23	6822039	11,12	285,2	285>267>303>361>147>149>119>159
24	6625355	5,39	300,2	300>133>163>301>119>355>101>165
25	6594808	10,46	159,0	287>787>249>159>263>382>380>788
26	6486434	12,07	283,2	283>265>301>694>284>382>119>329
27	5146203	5,49	300,2	300>163>301>355>165>133>302>356
28	4562120	12,16	313,1	313>295>331>394>135>285>301>149
29	4170986	11,44	245,1	285>245>203>147>149>349>217>249
30	4153721	8,27	149,0	149>163>595>135>503>449>538>287

Tableau 2 *: liste des 30 pics majoritaires observés en UPLC-MS ESI+ scan 100 – 1000 Da. Ils sont classés par ordre d'abondance (aires décroissantes) après intégration automatique.*

Sous chaque pic sont également recensés les autres ions moins intenses (ou ions secondaires). Ces derniers peuvent correspondre à la même molécule avec un adduit ou à des fragments de cette molécule (fragmentation en source). Ils peuvent également correspondre à d'autres molécules coéluées.

b. Analyse des composés polaires de la TM en GC EI MS après dérivation

Les techniques d'analyses en GC-MS présentent l'avantage d'avoir des banques de données nécessaires à l'identification des molécules. L'analyse GC-MS avec la méthode de dérivation est pertinente car nous avons observé préalablement en LC-MS la présence de molécules polaires, de faibles poids moléculaires.

MOLECULES IDENTIFIEES
glycolic acid - 1074-147
alanine - 1106-116
ethanolamine - 1282-174
glycerol - 1291-205
phosphoric acid - 1291-127
succinic acid - 1325-147
glyceric acid - 1349-292
fumaric acid - 1356-245
pyroglutamic acid - 1534-156
xylose - 1684-307
shikimic acid - 1820-204
citric acid - 1836-273
1-O-methyl-alpha-D-galactoside - 1849-204
quinic acid - 1887-345

fructose/sorbose - 1902-307
fructose/sorbose - 1912-307
galactose - 1923-319
glucose - 1930-319
galactose - 1949-319
n-hexadecanoic acid - 2045-313
myoinositol - 2132-318
caffeic acid - 2153-396
stearic acid - 2251-341
sucrose - 2725-361
kaempferol - 3106-559
chlorogenic acid - 3156-345
4-trans-Caffeoylquinic acid - 3204-307
1-kestose - 3497-361
MOLECULES PUTATIVES
[7-nitroindole [2,3-a]cyclodec-1-ene] - 1072-272

Tableau 3 *: liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode polaire dans la TM Eupatorium perfoliatum. Nomenclature : NOM – Indice de rétention – Ion caractéristique.*

Les molécules identifiées sont principalement des acides organiques, des sucres et des dérivés phénoliques.

c. Analyse des composés volatiles de la TM en GC EI MS sans dérivation

La seconde analyse en GC-MS, des métabolites extraits à l'hexane, nous a permis d'identifier les molécules suivantes :

MOLECULES IDENTIFIEES
camphene - 959-121
β-Pinene - 982-93
(-)-S-limonene - 1029-136
thymol methyl ether - 1234-149
bornyl acetate - 1288-136
eugenol - 1360-164
geraniol acetate - 1366-93
(+)-cyclosativene - 1373-204
copaene - 1381-161
(-)-α-bourbonene - 1391-161
trans-caryophyllene - 1427-133
(-)-aristolene - 1449-161
humulene - 1461-93

ç-muurolene - 1483-161
α-farnesene - 1512-123
butylated hydroxytoluene - 1518-205
ç-cadinene - 1521-161
ë-cadinene - 1530-161
nerolidol - 1567-107
caryophyllene oxide - 1591-91
tau-muurolol - 1648-204
tetradecanoic acid, ethyl ester - 1795-101
pentadecanoic acid, ethyl ester - 1894-101
n-hexadecanoic acid - 1968-256
hexadecanoic acid, ethyl ester - 1998-101
phytol - 2118-123
linoleic acid ethyl ester - 2165-109
linolenic acid, ethyl ester - 2175-108
octadecanoic acid, ethyl ester - 2195-101
eicosanoic acid, ethyl ester - 2396-340
squalene - 2834-81
α-tocospiro A - 2862-419
α-tocospiro B - 2883-419
α-tocopherol - 3060-416
vitamin E - 3144-430
δ-sitosterol - 3334-414
α-amyrin - 3373-218
MOLECULES PUTATIVES
[Butane, 1,1-diethoxy-3-methyl-] - 960-115
[α-Myrcene] - 993-93
[Nonane, 1,1-diethoxy-] - 1386-103
[β-elemene] - 1397-189
[α-eudesmene] - 1495-105
[α-muurolene] - 1507-161
[humulene-1,2-epoxide] - 1618-138
[phytol, acetate] - 1840-123
[heptadecanoic acid, ethyl ester] - 2094-101
[ethyl 3-hydroxyoctadecanoate] - 2348-117
[phenol, 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-] - 2423-177
[bis(2-ethylhexyl) phthalate] - 2551-149
[(3methyl,24R)-ergost-5-en-3-ol] - 3240-400
[5à-stigmast-7-en-3á-ol, (24S)-] - 3391-414
[phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-, phosphite (3:1)] - 3443-441
[α-amyrin acetate] - 3476-218

***Tableau 4** : liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode apolaire dans la TM Eupatorium perfoliatum. Nomenclature : NOM – Indice de rétention – Ion caractéristique.*

Nous avons identifié de nombreux métabolites parmi lesquels nous retrouvons des molécules volatiles appartenant à la famille des dérivés terpéniques (camphène, β-pinène, eugénol, humulène). Nous détectons également des acides gras (acide linoléïque, acide octadécanoïque et acide eicosanoïque par exemple). Enfin, nous identifions des composés stéroliques comme le la vitamine E (α-tocophérol), sitostérol ou α-amyrine.

d. Analyse de la TM en UPLC-MS/MS mode MRM

Ont été identifiées, à l'aide de la méthode décrite dans la Partie II : M&M, les molécules suivantes :

MOLECULES IDENTIFIEES
rutin (quercetin-3-O-rutinoside)
quercetin-3-glucoside
kaempferol-3-O-rutinoside
naringenin
kaempferol
quercetin
dihydroquercetin
kaempferol-3-glucoside
coumaric acid
phenylalanine
caffeic acid
ferulic acid
tryptophan
coumaroyl-quinic acid
caffeoyl-quinic acid
MOLECULES PUTATIVES
kaempferol-dihexoside
peonidin

Tableau 5 *: liste des molécules identifiées en UPLC-MS/MS dans la TM Eupatorium perfoliatum.*

Nous identifions principalement des dérivés d'acides caféiques et les flavonoïdes majoritaires présents également dans la littérature.

e. Focus : étude des sesquiterpènes lactones et des alcaloïdes pyrrolizidiniques

- Sesquiterpènes lactones

Les formules brutes correspondantes à l'euperfolin ($C_{20}H_{28}O_6$) et l'euperfolitin ($C_{20}H_{28}O_7$) ont été déterminées grâce à la spectrométrie de masse haute-résolution dans la TM d'*E. perfoliatum* (***Figure 7***). Malheureusement, la confirmation des identifications à l'aide des fragments MS/MS n'a pas aboutie.

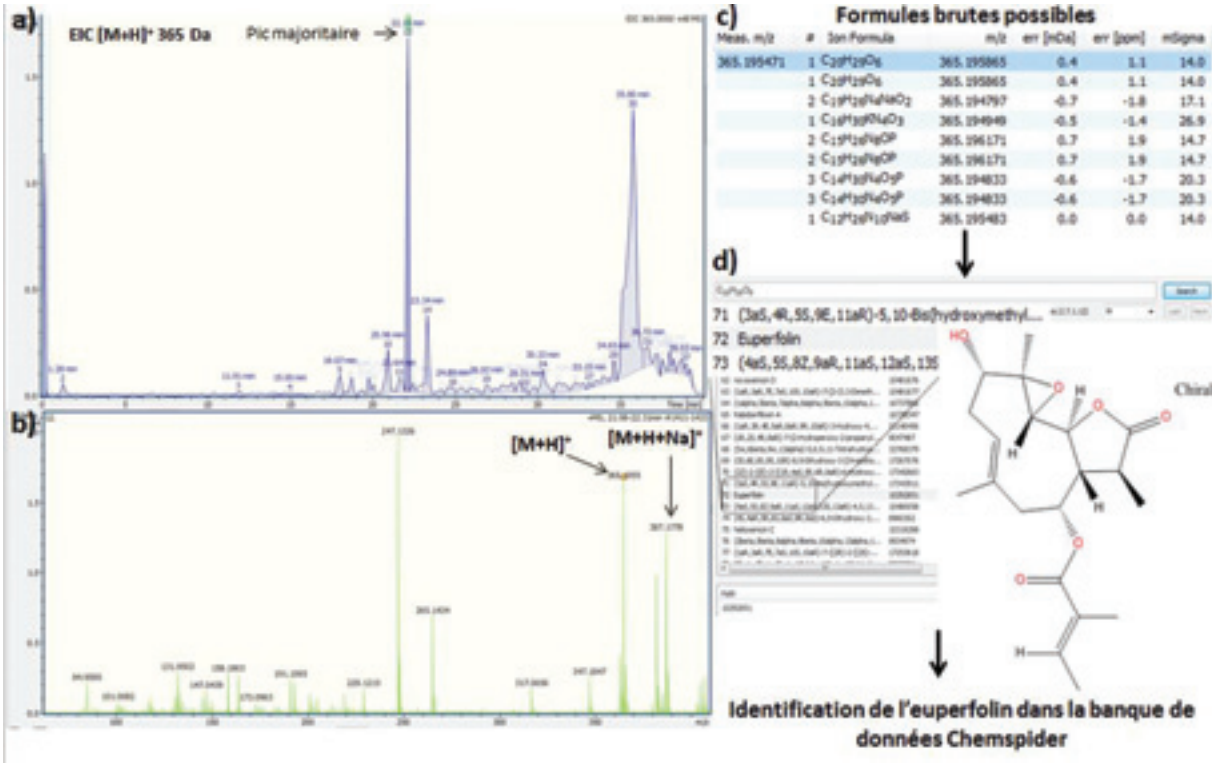


Figure 7 *: stratégie d'identification de l'euperfolin en HRMS dans la TM d'E. perfoliatum. a) EIC complet (0 - 40 min) du m/z 365 ; b) moyenne des spectres de masse 21,98-22,31min correspondant au pic majoritaire de l'EIC ; c) formules brutes proposées par le logiciel classées par score décroissant. Ici le meilleur score correspond à la formule brute de l'euperfolin ; d) interrogation des banques de données dont Chemspiderde formules brutes. L'euperfolin sort dans une liste de 374 molécules avec de nombreuses redondances. La même stratégie est adoptée pour les autres molécules identifiées en HRMS dont l'euperfolitin.*

- Alcaloïdes pyrrolizidiniques (ou PAs)

Une méthode HPLC-DAD a été développée afin d'observer et quantifier 4 alcaloïdes pyrrolizidiniques : la sénécionine, la sénécionine-N-oxide, l'échimidine et la lycopsamine (***Figure 8***), à partir des standards commerciaux.

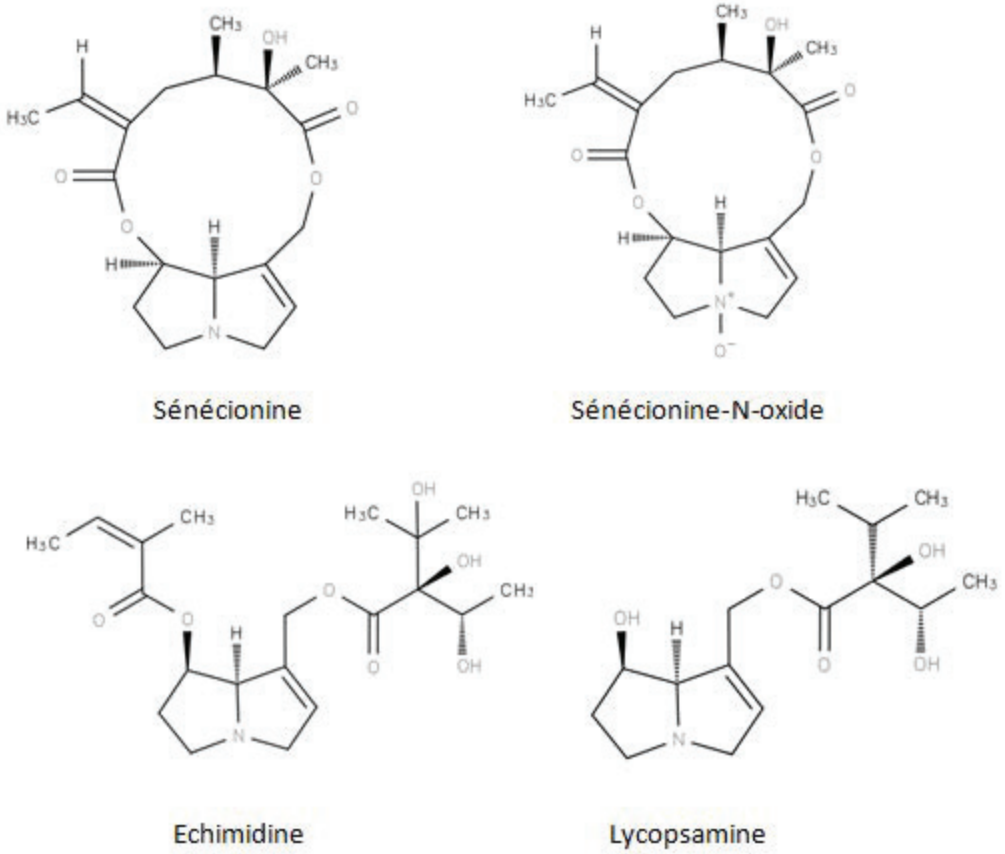


Figure 8 *: structures des 4 alcaloïdes pyrrolizidiniques recherchés par HPLC-DAD et UPLC-MS/MS dans la TM d'E. perfoliatum. Sénécionine, $C_{18}H_{25}NO_5$, MM = 335,4 g.mol^{-1}; sénécionine-N-oxide, $C_{18}H_{25}NO_6$, MM = 351.4 g.mol^{-1} ; echimidine, $C_{20}H_{31}NO_7$, MM = 397.5 g.mol^{-1}; lycopsamine, $C_{15}H_{25}NO_5$, MM = 299.4 g.mol^{-1}*

Préparation des échantillons pour la méthode HPLC-DAD

Les standards ont été commandés chez PhytoLab (PhytoLab GmbH & Co. KG, Allemagne). Des solutions stocks à 1mg.ml^{-1} ont été préparées dans de l'acétonitrile + 0.1% d'acide formique pour la sénécionine, la sénécionine-N-oxide et la lycopsamine et dans un mélange eau/acétonitrile (80/20 v/v) + 0.1% acide formique pour l'échimidine. Une courbe de calibration pour chaque composé a été faite à partir des concentrations suivantes : 1.25 / 2.5 / 12.5 / 25 / 125 / 250 µg.ml^{-1} (sauf pour la lycopsamine car elle n'a pas été détectée en UV). 1mL de TM d'*E. perfoliatum* lot BO06 stockée à 4°C a été filtré à 0.22µm puis dilué au 1/10ème dans de l'acétonitrile + 0.1% d'acide formique, préparé en triplica. Un échantillon de TM diluée au 1/10ème avec ajout du mix des 3 alcaloïdes a également été préparé à une concentration de 250µg.ml^{-1}.

Méthode HPLC-DAD

L'analyse a été faite sur une colonne HPLC Phenomenex Kinetex C18 10nm, 100 x 4.6mm couplée à une pré-colonne Phenomenex Kinetex C18 10nm, 10 x 4.6mm. La température du four était de 40°C. Les solvants utilisés étaient : eau + 6.5µM acétate d'ammonium acétate + ammoniac, pH = 9 (A) et acétonitrile/eau (90/10 v/v) + 6.5µM acétate d'ammonium acétate + ammoniac, pH = 9 (B). Le gradient de solvant était, à un débit constant de 1 $ml.min^{-1}$: 10% de B pendant 2min, puis augmentation jusqu'à 25% de B en 2min, suivi d'une augmentation jusqu'à 70% de B en 8min. Plateau à 70% de B pendant 1min30 puis retour à 10% de B en 1min et maintient à 10% de B pendant 2min30. La durée totale de l'analyse était de 17 min (***Tableau 6***). Le volume d'injection était de 10 µL. Le détecteur à barrette de diodes était en mode balayage de 200 à 400nm.

Temps (min)	débit (ml/min)	% A	% B
0	1	90	10
2	1	90	10
4	1	75	25
12	1	30	70
13.5	1	30	70
14.5	1	90	10
17	1	90	10

***Tableau 6** : gradient de solvants utilisé pour la méthode de détection des alcaloïdes pyrrolizidiniques par HPLC-DAD.*

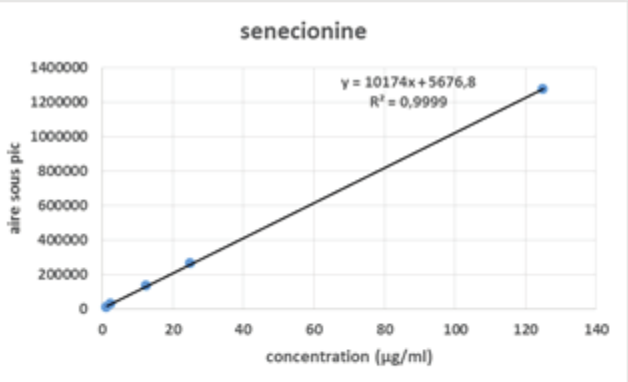
Résultats des analyses HPLC-DAD des 3 PAs et de la TM

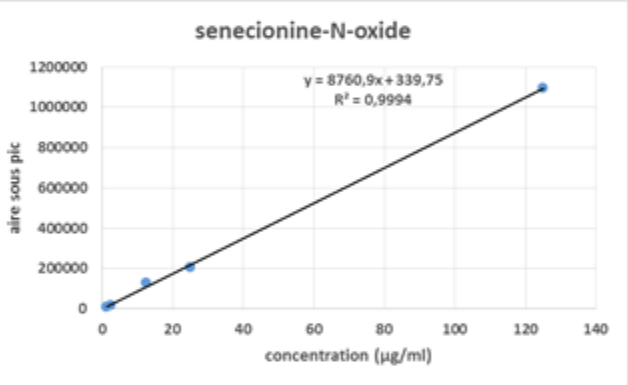
Nous avons observé les chromatogrammes à 215nm correspondant à la λ_{max} des trois composés (***Figure 10***). Au bout de 7 injections des différents standards, nous avons pu déduire les temps de rétention suivants :

- sénécionine-N-oxide : 5.804 min (± 0.016 min)
- sénécionine : 8.641 min (± 0.013 min)
- echimidine : 8.971 min (± 0.029 min)

Nous avons mis en place les trois gammes étalons afin de quantifier les composés dans la TM (***Figure 9***).

Sénécionine	[C] µg/ml	aire
	1.25	12273
	2.5	30738
	12.5	136798
	25	263631
	125	1276412
sénécionine-N-oxide	[C] µg/ml	aire
	1.25	10384
	2.5	18531
	12.5	127214
	25	205497
	125	1096572
échimidine	[C] µg/ml	aire
	1.25	25443
	2.5	41400
	12.5	191100
	25	376795
	125	2123242





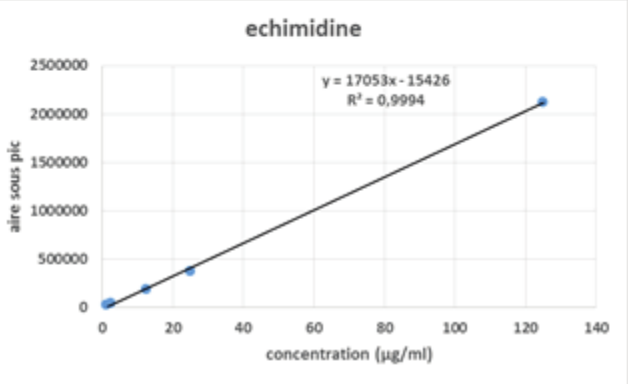


Figure 9 *: courbes de calibration des 3 PAs en HPLC-UV.*

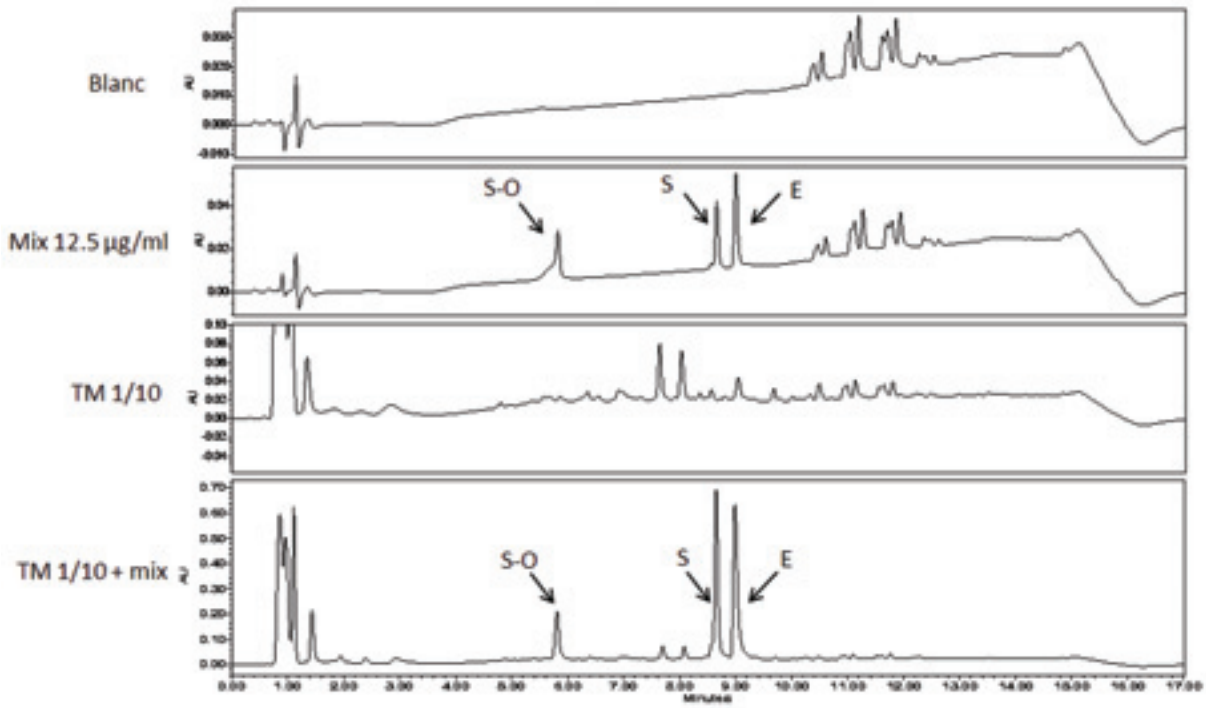


Figure 10 *: chromatogrammes complets (0 – 17 min) à 215 nm des analyses en HPLC-DAD des trois PAs (S : sénécionine, S-O : sénécionine-N-oxide, E : échimidine) et de la TM E. perfoliatum.*

Aucune des trois molécules n'a été détectée dans la TM *d'Eupatorium perfoliatum* avec cette méthode. A la suite de cette analyse, nous avons décidé de développer une méthode de quantification en spectrométrie de masse UPLC-MS/MS afin d'essayer d'augmenter la sensibilité, de baisser le seuil de détection et d'observer la lycopsamine.

Préparation des échantillons pour la méthode UPLC-MS/MS

A partir des mêmes solutions stocks préparées pour l'analyse HPLC-DAD, des dilutions ont été préparées pour les courbes de calibration afin d'obtenir les concentrations de 0.1 / 1 / 10 / 100 / 1000 $ng.ml^{-1}$.

Méthode UPLC-MS/MS

L'analyse a été faite sur une colonne UPLC Waters BEH C18 1.7µm, 2.1 x 100mm couplée à une pré-colonne Waters BEH C18 1.7µm, 2.1 x 10mm. La température du four était de 45°C. Les solvants utilisés étaient : eau + 6.5µM acéta*te* d'ammonium acétate + ammoniac, pH = 9 (A) et acétonitrile/eau (90/10 v/v) + 6.5µM acétate d'ammonium acétate + ammoniac, pH = 9 (B). Le gradient de solvant était, à un débit constant de 0.3 $ml.min^{-1}$: 10% de B pendant 2min, puis augmentation jusqu'à 25% de B en 2min, suivi d'une augmentation jusqu'à 70% de B en 8min. Plateau à 70% de B pendant 1min30 puis retour à 10% de B en 1min et maintient à 10% de B pendant 2min 30sec. La durée totale de l'analyse était de 17min. Le volume d'injection était de 5

µL. Les paramètres MS/MS mode MRM des 4 PAs ont été optimisés sur le système UPLC-MS Waters décrit dans la partie II M&M.

	temps de rétention	**m/z**	**ion fils**	**tension cone (CV)**	**Energie Collision (EC)**	**Ionisation ESI**
sénécionine	11.56	336.2	120.1	34	28	pos
sénécionine N-oxide	8.97	352.4	118.2	34	29	pos
échimidine	12.38	398.4	120.1	30	22	pos
lycopsamine	8.66	300.3	94	34	26	pos

Tableau 7 *: paramètres MS/MS mode MRM obtenus pour les 4 PAs.*

Résultats des analyses UPLC-MS/MS des 4 PAs et de la TM

A l'aide de cette méthode, nous pouvons détecter les 4 molécules avec un seuil de détection de 1 ng.ml^{-1}. Nous avons gagné un facteur 1000 par rapport à la méthode de détection HPLC-DAD. Nous avons réalisé les gammes étalons permettant de doser les composés dans la TM (***Figure 11***).

[C](ng/ml)	0.1	1	10	100	1000
sénécionine	n.d.	4467	40504	367349	2607738
Sénécionine-N-oxide	n.d.	1205	12291	110798	831465
échimidine	n.d.	7293	63581	593623	4780874
lycopsamine	n.d.	8200	76072	707597	5525326

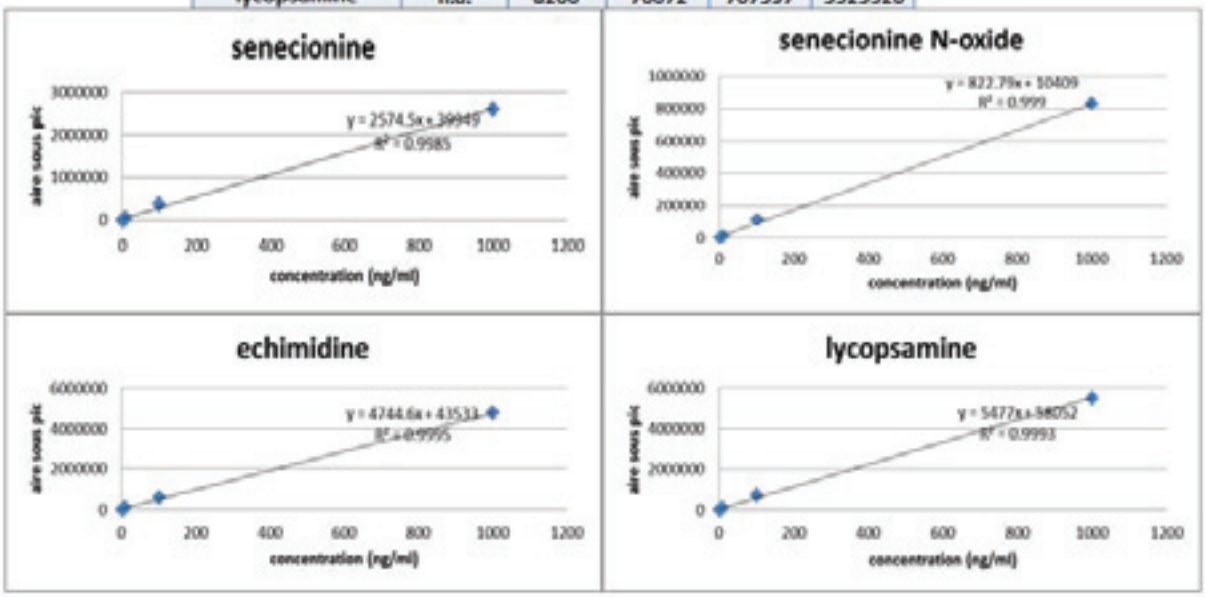


Figure 11 *: courbes de calibration des 4 PAs en UPLC-MS/MS. n.d. : non détecté.*

Après analyse de la TM *E. perfoliatum* en triplica, nous détectons de l'échimidine et de la lycopsamine à des concentrations de 151 $ng.ml^{-1}$ ± 5 $ng.ml^{-1}$ et 3674 $ng.ml^{-1}$ ± 124 $ng.ml^{-1}$ respectivement.

4. Conclusion

Grace à l'utilisation de plusieurs techniques analytiques, de nombreuses molécules ont pu être identifiées. Seules quelques molécules sont détectées par plusieurs méthodes. C'est le cas par exemple de l'acide caféique ou du kaempférol, détectés à la fois en GC-MS avec dérivation et en UPLC-MS/MS. Cela nous montre bien la nécessité d'utiliser plusieurs techniques analytiques différentes car elles sont complémentaires.

C'est la première fois que nous détectons des alcaloïdes pyrrolizidiniques, l'échimidine et la lycopsamine, dans une teinture-mère d'*Eupatorium perfoliatum*. En effet, dans la littérature, cette famille de métabolites est décrite comme absente de l'espèce *E. perfoliatum*, probablement parce que les techniques de détection utilisées n'étaient pas assez sensible. Mais les techniques analytiques ont évolué et les analyses UPLC-MS/MS permettent de détecter des molécules à des concentrations toujours plus faibles, même dans des extraits complexes. Différentes approches et méthodologies se développent afin de détecter les PAs dans divers extraits [9] et de nouvelles réglementations se mettent en place utilisant ces nouvelles approches (Public statement on contamination of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products with pyrrolizidine alkaloids EMA/HMPC/328782/2016).

5. Bibliographie

1. Jean, Bruneton., *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e ed.)*. 2009: Lavoisier.

2. Hensel, A., et al., *Eupatorium perfoliatum L.: phytochemistry, traditional use and current applications.* J Ethnopharmacol, 2011. **138**(3): p. 641-51.

3. Herz, W., P.S. Kalyanaraman, and G. Ramakrishnan, *Sesquiterpene lactones of Eupatorium perfoliatum.* J Org Chem, 1977. **42**(13): p. 2264-71.

4. Maas, M., F. Petereit, and A. Hensel, *Caffeic acid derivatives from Eupatorium perfoliatum L.* Molecules, 2008. **14**(1): p. 36-45.

5. Maas, M., A.M. Deters, and A. Hensel, *Anti-inflammatory activity of Eupatorium perfoliatum L. extracts, eupafolin, and dimeric guaianolide via iNOS inhibitory activity and modulation of inflammation-related cytokines and chemokines.* J Ethnopharmacol, 2011. **137**(1): p. 371-81.

6. Vollmar, A., W. Schäfer, and H. Wagner, *Immunologically active polysaccharides of eupatorium cannabinum and eupatorium perfoliatum.* Phytochemistry, 1986. **25**(2): p. 377-381.

7. Domínguez, X.A., J.G. Quintanilla, and M.P. Rojas, *Sterols and triterpenes from Eupatorium perfoliatum.* Phytochemistry, 1974. **13**(3): p. 673-674.

8. Habtemariam, S. and A.M. Macpherson, *Cytotoxicity and antibacterial activity of ethanol extract from leaves of a herbal drug, boneset (Eupatorium perfoliatum).* Phytother Res, 2000. **14**(7): p. 575-7.

9. Crews, C., F. Berthiller, and R. Krska, *Update on analytical methods for toxic pyrrolizidine alkaloids.* Anal Bioanal Chem, 2010. **396**(1): p. 327-38.

Chapitre 2 : *Aconitum napellus*

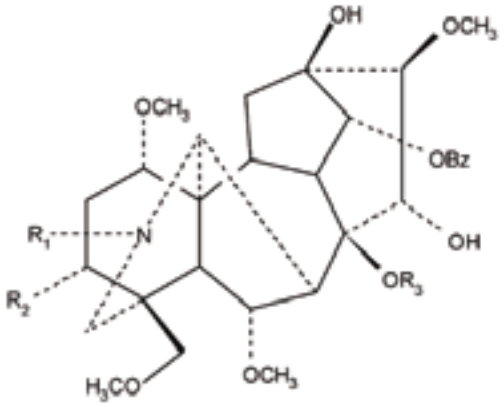
1. Description générale

L'Aconit napel fait partie de la famille des Renonculacées. Nous la trouvons essentiellement dans les zones montagneuses de l'ouest de l'Europe jusqu'à l'Himalaya. C'est une plante herbacée possédant une inflorescence bleue-violacée, et vivace par sa racine tubérisée (***Figure 1***). Cette dernière possède 0.5 à 1.5% d'alcaloïdes toxiques dont le principal est l'aconitine, lui conférant la notoriété de la plante la plus toxique de France, et l'une des plus toxiques de la flore d'Europe tempérée [1]. L'aconitine à un effet neurotoxique, elle excite et paralyse les terminaisons nerveuses, les centres bulbaires et induit un ralentissement respiratoire et une dissociation auriculo-ventriculaire. La dose moyenne mortelle d'aconitine chez l'Homme serait de 3mg, soit l'équivalent de 2 à 4g de racines. Autrefois, les extraits d'Aconit étaient utilisés pour fabriquer des flèches empoisonnées pour la chasse. De nos jours, elle reste principalement utilisée en médecine traditionnelle chinoise pour ses propriétés antirhumatismales et analgésiques, anesthésiques et antinévralgiques.

La teinture-mère est fabriquée à partir de la plante entière fleurie, fraiche, dans un mélange éthanol/eau (45/55 V/V), suivant la technique générale de fabrication des TM de la pharmacopée.

Figure 1 *: photographie de parties aériennes de l'aconit napel [2].*

2. Bibliographie et connaissances scientifiques



Name	R_1	R_2	R_3
Benzoylaconine	C_2H_5	OH	H
Aconitine	C_2H_5	OH	acetyl
Benzoylmesaconine	CH_3	OH	H
Mesaconitine	CH_3	OH	acetyl
Benzoylhypaconine	CH_3	H	H
Hypaconitine	CH_3	H	acetyl

Figure 2 *: structures des principaux alcaloïdes retrouvés chez A.napellus [3]. D'autres structures d'alcaloïdes sont présentées en annexe 1.*

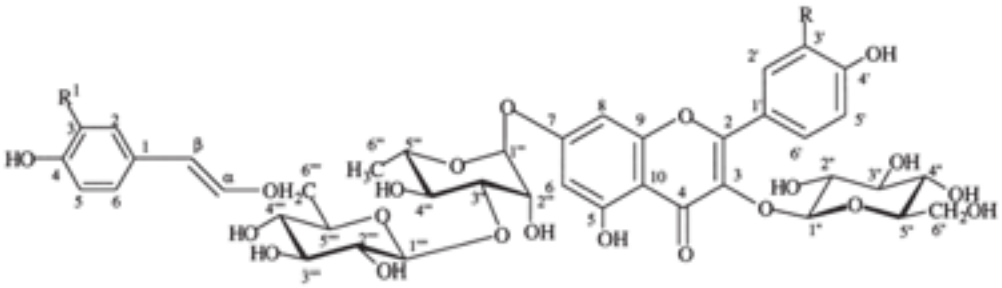
Pour contrôler la bonne fabrication de la TM, nous effectuons un dosage des alcaloïdes totaux, exprimé en aconitine ($C_{34}H_{47}NO_{11}$, MM : 645.7371g.mol^{-1}).

L'aconit napel est particulièrement étudiée pour ses alcaloïdes car ils sont responsables de la toxicité de la plante (***Figure 2***). Il est intéressant de rappeler ici que la composition en métabolites secondaires d'une plante dépend de son origine géographique [4]. L'étude de la composition en alcaloïdes de la même sous-espèce d'*A. napellus* subsp. f*irmum* montre que suivant l'origine de la plante (Ukraine, République Tchèque ou Roumaine), nous observons des profils phytochimiques différents (***Figure 3***).

	River Luzhanki (Ukraine) [12]	Moravskoslezské Beskydy Mount. (Czech Rep.) [13]	Retezat Mountains (Romania)
Neoline (**1**)	x		x
Napelline (**2**)			x
Isotalatizidine (**3**)			x
Karakoline (**4**)			x
Senbusine A (**5**)	x		x
Senbusine C (**6**)			x
Aconitine (**7**)		x	x
Taurenine (**8**)	x		x
Songorine (**17**)	x		
Hypaconitine	x	x	
Mesaconitine	x	x	
3-Deoxyaconitine	x	x	
Tadzhaconine	x		
15-Acetylsongorine	x		

Figure 3 *: composition en alcaloïdes de trois sous-espèces d'A. napellus subsp. firmum de lieux de récolte différents [4] .*

Bien qu'il existe de nombreuses publications concernant l'étude phytochimique d'*A. napellus*, très peu d'autres familles de molécules ont été explorées, notamment chez la sous-espèce *napellus*. Nous pouvons néanmoins indiquer la présence de flavonols glycosylés chez *A. napellus* subsp. *lusitanicum* [5] et subsp. *neomontanum* [6]*(**Figure 4**).*



1 R = R¹ = OH

2 R = H R¹ = OH

3 R = R¹ = H

Figure 4 *: structure de trois flavonols glycosylés présents chez A. napellus subsp. neomontanum [6] : quercetin-7-O-(6-trans-caffeoyl)-b-glucopyranosyl-(1!3)-a-rhamnopyranoside-3-O-b-glucopyranoside (1) ; kaempferol-7-O-(6-trans-caffeoyl)-b-glucopyranosyl-(1!3)-a-rhamnopyranoside-3-O-b-glucopyranoside (2) et kaempferol-7-O-(6-trans-p-coumaroyl)-b-glucopyranosyl-(1!3)-a-rhamnopyranoside-3-O-b-glucopyranoside (3)*

3. Résultats et Discussion

a. Analyse de la TM en UPLC-UV-MS

Comme pour les autres TMs, nous observons des profils très différents entre le signal UV et le signal MS. Ce dernier étant particulièrement riche en nombre de pics détectés (***Figure 5***).

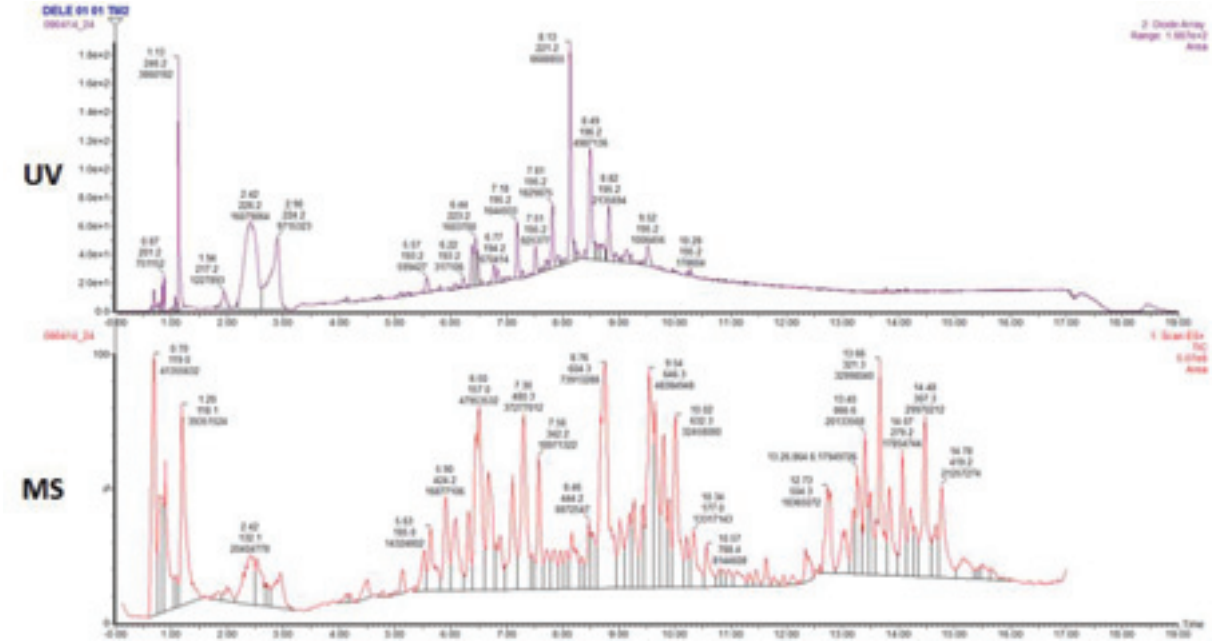


Figure 5 *: chromatogrammes UV Scan 190-500nm complet (0-17min) (haut) et MS Scan 100-100 m/z complet (0-17 min) (bas).*

Les principaux pics majoritaires de ces deux chromatogrammes ont été recensés dans le ***Tableau 1*** et le ***Tableau 2***.

Pic majoritaire	Aire sous pic	Temps de rétention (s)	λmax (nm)	λmax secondaire (nm)
1	16078932	2,42	226,2	224>201>205
2	9715323	2,9	224,2	221>205>202
3	6688855	8,13	221,2	195>220>254>339
4	4987136	8,49	196,2	195>216>256>329
5	3860182	1,13	246,2	227>198
6	2135694	8,82	195,2	195>216>323>266
7	1829875	7,81	195,2	195>255>352
8	1644933	7,18	195,2	195>216>270>330
9	1603700	6,44	223,2	195>222
10	1541578	6,38	220,2	195>220
11	1227893	1,94	217,2	217
12	1006456	9,52	195,2	195>221
13	956598	8,71	195,2	195>220

14	925377	7,51	195,2	195>219
15	886141	0,69	195,2	194
16	808358	6,47	222,2	194>221>267>300
17	789969	0,76	192,2	192
18	751152	0,87	201,2	202>199>210
19	700569	0,84	195,2	194>264
20	687732	9,14	195,2	195>216
21	670414	6,77	194,2	194>219
22	599427	5,57	193,2	193>217
23	516582	8,2	195,2	195
24	505622	8,64	195,2	195>219
25	497199	8,58	196,2	195>216
26	442986	7,92	194,2	195>215
27	433798	0,81	195,2	195>193>274
28	417609	6,83	194,2	194>217
29	370628	1,01	196,2	195>192
30	356518	7,7	195,2	195>216>282

Tableau 1 *: liste des 30 pics chromatographiques majoritaires observés en UPLC-UV Scan 190-500nm. Ils sont classés par ordre d'abondance (aires décroissantes) après intégration automatique.*

Pic majoritaire	Aire sous pic	Temps de rétention (s)	m/z majoritaire (Da)	m/z secondaire (Da)
1	73913288	8,76	604,3	604>760>605>761>646>647>606>762
2	48384948	9,54	646,3	648>646>648>760>788>789>761>630
3	47953532	6,50	157,0	157>342>139>171>189>203>185>343
4	41355632	0,70	119,0	119>137>103>121>151>105>149>135
5	39351524	1,20	118,1	145>163>118>136>130>127>180>226
6	37277012	7,30	480,3	480>481>446>595>185>482>496>528
7	32458080	10,02	632,3	632>633>634>646>600>647>635>601
8	27082324	6,66	466,2	466>450>438>467>451>404>439>482
9	25282052	9,65	646,3	646>647>648>649>246
10	24538956	9,81	630,3	630>631>646>647>632>568>788
11	24152486	0,90	138,0	138>116>104>145>127>163>219>193
12	22646356	7,10	496,2	496>402>497>542>403>656>328>464
13	21089992	0,79	104,1	104>219>148>145>163>127>130>105
14	20404778	2,42	132,1	132>157>139>145>163>127>133>175
15	19149092	6,09	500,2	500>360>501>153>361>354>436>157
16	18971322	7,56	342,2	185>342>343>139>157>171>203>480
17	18365072	12,73	504,3	258>337>325>319>504>149>201>205
18	16877106	5,90	424,2	424>408>425>454>409>426>157>185
19	14394746	9,28	760,3	760>761>762>556>616>961>945>946

20	14324802	5,63	185,0	185>358>229>157>139>454>203>440
21	14150708	8,16	935,4	935>936>131>117>937>757>815>209
22	13711110	6,89	468,2	468>466>402>211>656>390>438>450
23	13639882	9,19	556,2	556>720>588>557>704>802>632>721
24	13487815	9,01	586,2	586>632>587>588>633>604>702>760
25	13317143	10,34	177,0	177>223>646>147>788>193>165>632
26	11503657	6,31	466,2	466>467>468>454>181>241>422>496
27	11373256	9,44	688,3	688>689>618>619>802>690>803>760
28	11314333	2,52	157,0	132>157>139>121>175>180>133>145
29	11070396	13,04	248,3	248>277>279>328>289>384>149>295
30	10933469	9,90	674,4	674>675>646>630>676>647>631>726

Tableau 2 *: liste des 30 pics chromatographiques majoritaires observés en UPLC-MS Scan 100-1000nm. Ils sont classés par ordre d'abondance (aires décroissantes) après intégration automatique.*

b. Analyse des composés polaires de la TM en GC-MS après dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
glycolic acid - 1077-147
alanine - 1108-116
ethanolamine - 1282-174
glycerol - 1290-147
phosphoric acid - 1291-299
proline - 1313-142
succinic acid - 1325-147
glyceric acid - 1348-292
malic acid - 1502-233
pyroglutamic acid - 1534-156
4-aminobutyric acid - 1541-304
threonic acid - 1563-292*
threonic acid - 1579-292*
xylose - 1671-307*
xylose - 1679-307*
arabinose - 1684-307*
arabinose - 1699-307*
trans-aconitic acid - 1755-375
citric acid - 1837-273
fructose - 1904-307
sorbose - 1914-307
glucose - 1924-319*
glucose - 1933-319*
galactose - 1951-319
gluconic acid - 2043-333

myoinositol - 2134-318
stearic acid - 2255-341
maltose - 2840-361

Tableau 3 *: liste des molécules identifiées en GC-MS la méthode polaire dans la TM Aconitum napellus. Nomenclature : NOM - Indice de rétention – Ion caractéristique. (*) : Formes ou nombres de groupements TMS différents.*

c. Analyse des composés volatiles de la TM en GC- MS sans dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
benzaldehyde - 966-106
benzoic acid, ethyl ester - 1169-105
hexadecanoic acid, ethyl ester - 1994-101
linoleic acid ethyl ester - 2162-95
linolenic acid ethyl ester - 2169-108
MOLECULES PUTATIVES
[butane, 1,1-diethoxy-3-methyl-] - 960-115
[bis(2-ethylhexyl) phthalate] - 2551-149
[phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-, phosphite (3:1)] - 3444-441

Tableau 4 *: liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode apolaire dans la TM Aconitum napellus. Nomenclature : NOM – Indice de rétention – Ion caractéristique.*

d. Analyse de la TM en UPLC-MS/MS mode MRM

MOLECULES IDENTIFIEES
Rutin (quercetin-3-O-glucoside)
Coumaric acid
Phenylalanine
Ferulic acid
MOLECULES PUTATIVES
Kaempferol-dihexoside

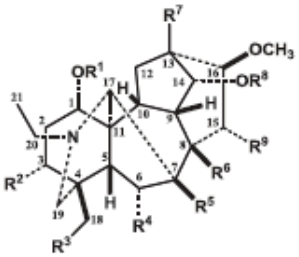
Tableau 5 *: liste des molécules identifiées et putatives en UPLC-MS/MS dans la TM A. napellus.*

4. Conclusion

L'exploration du métabolome de la TM d'*Aconitum napellus* nous a permis d'identifier une trentaine de molécules. De nombreux acides organiques et sucres ont pu être identifiés avec la méthode GC-MS polaire. Les métabolites identifiés à l'aide de la méthode GC-MS apolaire sont en majorité des acides gras. Des composés phénoliques tels que la rutine, l'acide férulique et le kaempférol-dihexoside ont pu être identifiés en UPLC-MS/MS. Nous devons utiliser une méthode plus spécifique pour identifier les alcaloïdes présents dans la TM.

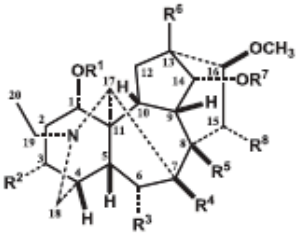
5. Annexes

Annexe 1 : structure d'alcaloïdes présents dans l'Aconit [4].



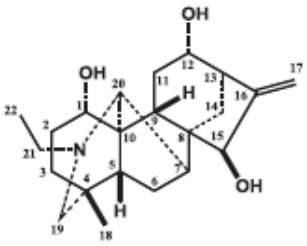
	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5	R^6	R^7	R^8	R^9
neoline (**1**)	H	H	OCH_3	OCH_3	H	OH	H	H	H
isotalatizidine (**3**)	H	H	OCH_3	H	H	H	H	H	OH
karakoline (**4**)	H	H	H	H	H	OH	H	H	H
senbusine A (**5**)	H	H	OCH_3	OH	H	OH	H	H	H
senbusine C (**6**)	H	H	OCH_3	OCH_3	H	OH	H	H	OH
aconitine (**7**)	CH_3	OH	OCH3	OCH_3	H	OAc	OH	Bz	OH
taurenine (**8**)	H	H	OCH_3	OCH_3	H	OAc	H	H	OH
acotoxinine (**13**)	H	H	OCH_3	OCH_3	H	OVr	H	H	H
14-deacetyl-18-demethyl-pubescenine (**14**)	H	H	OH	OH	OH	OCH_3	H	H	H
delectinine (**15**)	CH_3	H	OH	OCH_3	OH	OH	H	H	H
neolinine (**16**)	H	H	OH	OCH_3	H	OH	H	H	H

Ac = acetyl; Vr= veratroyl; Bz = benzoyl group

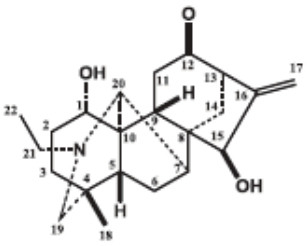


	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5	R^6	R^7	R^8
aconosine (**9**)	CH_3	H	H	H	OH	H	H	H
acotoxicine (**10**)	CH_3	OH	H	H	OH	H	H	H
delavaconitine (**11**)	CH_3	H	H	H	OH	OH	Bz	H
dolaconine (**12**)	CH_3	H	H	H	OH	H	Ac	H

Ac = acetyl group



napelline (**2**)



songorine (**17**)

6. Bibliographie

1. Jean, Bruneton., . 2009: Lavoisier. p. 1198-1200.

2.

3. Xie, Y., et al., J Chromatogr A, 2005. **1093**(1-2): p. 195-203.

4. Kiss, T., et al., Fitoterapia, 2013. **90**: p. 85-93.

5. Díaz, J.G., et al., Biochemical systematics and ecology, 2005. **33**(2): p. 201-205.

6. Fico, G., et al., Phytochemistry, 2001. **57**(4): p. 543-6.

Chapitre 3 : *Bryonia alba*

1. Description générale

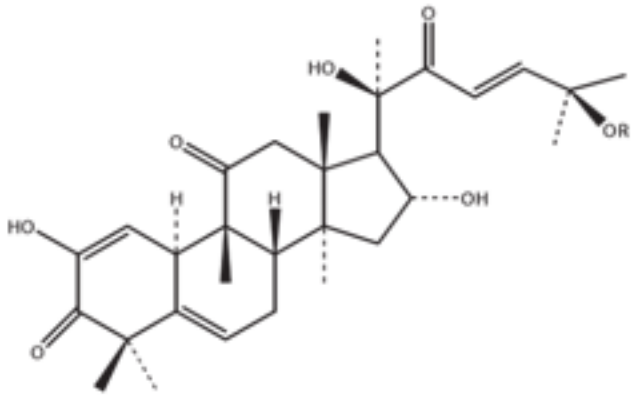
, Á ÂÒÙÏ Î Å ÂÌÁÎ ÃÈÅ ÆÉÊÐÁÒÕÉÅ ÄÅ ÌÁ ÆÉÍ ÊÌÅ ÄÅÓÃÕÃÕÒÂÉÓÁÃï ÅÓ8. Ï ÕÓÌÁ ÒÅÕÕï ÕÕÏ Î ÓÅÓÓÁÎ ÕÉÅÌÌÁÍ ÅÎ Ô ÅÎ %ÕÕï ÐÅhÅÎ ! ÆÉÑÕÅ ÄÕ. Ï ÒÄ ÅÔÅÎ ! ÓÉÅ ÃÅÎ ÕÒÁÌÅ8#ÕÅÓÕÕÎ Å ÐÌÁÎ ÕÅ ÇÒÉ ÐÁÎ ÕÅ ÅÔÕÉÓÁÃÅ ÇÒÝÃÅ Û ÕÏ Î ÕÕÂÅÒÃÕÌÅ ¡ ***Figure 1***Ø8, ÅÓÃÕÃÕÒÂÉÓÁÃÊ ÅÕhÃÁÒÁÃÔ ÒÉÓÕÑÕÅÓ ÄÅ ÐÌÕÓÉÅÕÒÓ ÇÅÎ ÒÅÓ ÄÅ ÌÁ ÆÉÍ ÊÌÅ ÄÅÓ ÃÕÃÕÒÂÉÓÁÃï ÅÓhÕï Î ÔÒÅÓÐÏ Î ÓÁÂÌÅÓ ÄÅ ÌÁ ÕÏ ØÉÃÊÕ ÄÅ ÌÁ ÐÌÁÎ ÕÅhÅÎ ÐÁÒÕÉÃÕÌÉÅÒ ÄÁÎ Ó ÓÁ ÒÁÃÊ Å ÕÕÂï ÒÉÓï Å8

, Á ÒÁÃÊ Å ÄÅ ÂÒÙÏ Î ÅhÃï Í Í Å ÌÅÓ ÇÒÁÊ ÅÓ ÄÅ ÃÏ ÌÏ ÑÕÊ ÕÅ ÅÔÌÅ ÓÕÃ ÄÕ ÆÕÉÔÄÕ ÃÏ Î ÃÏ Í ÂÒÅ ÄÕÎ Åh ï ÕÁÉÅÎ ÔÕÕÊÉÓï ÓÁÕÕÅÄÉÓÃÏ Í Í Å ÐÕÒÇÁÕÉÓr ϟ ϒ8$ Å Î Ï ÓÊ ÕÒÕhÌÁ ÂÒÙÏ Î Å ÅÓÔÅÍ ÐÌÏ Ù Å ÃÏ ÕÒÁÍ Í ÅÎ Ô ÅÎ ÈÏ Í ï Ï ÐÁÕÉÅ ÐÏ ÕÒ ÌÅÓ ÊÌ ÆÁÍ Í ÁÕÊ Î Ó ÁÉÇÕÅÓ ÄÅÓ ÕÏ ÉÅÓ ÒÅÓÐÉÒÁÕÏ ÉÒÅÓ ÅÔ ÌÅÓ ÓÙÍ ÐÕÊÍ ÅÓ ÇÒÉÐÁÕØ8, Á ÕÅÊ ÕÕÒÅÇ ï ÒÅ ÅÓÔ ÆÂÒÉÑÕï Å Û ÐÁÒÕÉÒ ÄÅÓ ÕÕÂÅÒÃÕÌÅÓ ÆÉÁÉÕh ÄÁÎ Ó ÕÎ Í ï ÌÁÎ ÇÅ ï ÕÉÁÎ Ï ÌÇÅÁÕ ϣϣϒϣϣ ÖϒÖ8 $ ÅÕØ ÅÓÐ ÃÅÓ ÐÅÕÖÅÎ Ô ðÒÅ ÕÕÊÉÓï ÅÓ ÐÏ ÕÒ ÌÁ ÆÉÂÒÉÃÁÕÊ Î ÄÅ ÌÁ 4- ⁄ *Bryonia cretica* , 8ÓÕÂÓÐ8 *dioica* ¡ *ÁÃÑ8Ø4ÕÕÊ Ï Õ *Bryonia alba* , 8

Figure 1 *: photographie des parties aériennes d'une bryone blanche [2].*

2. Bibliographie et connaissances scientifiques

[illegible]



R=H Cucurbitacin I
R=Ac Cucurbitacin E

***Figure 2** : structure chimique de la cucurbitacine E ($C_{32}H_{44}O_8$, MM : 556.68696g.mol^{-1})et de la cucurbitacine I [3].*

[illegible]

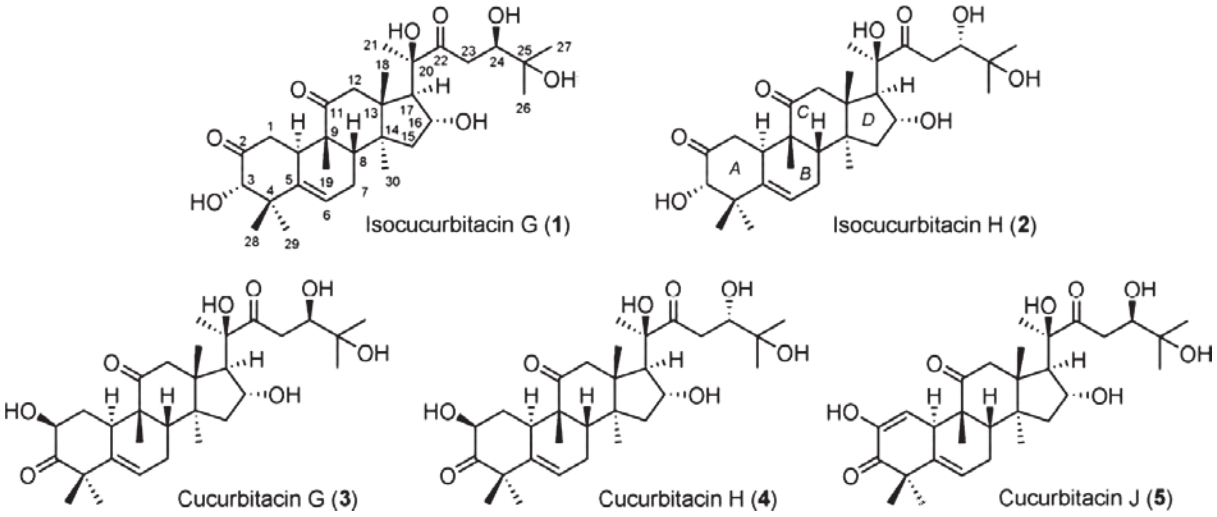


Figure 3 *: structures chimiques de l'isocucurbitacine G (1) et H (2), et des cucurbitacines G (3), H (4) et J(5) [5].*

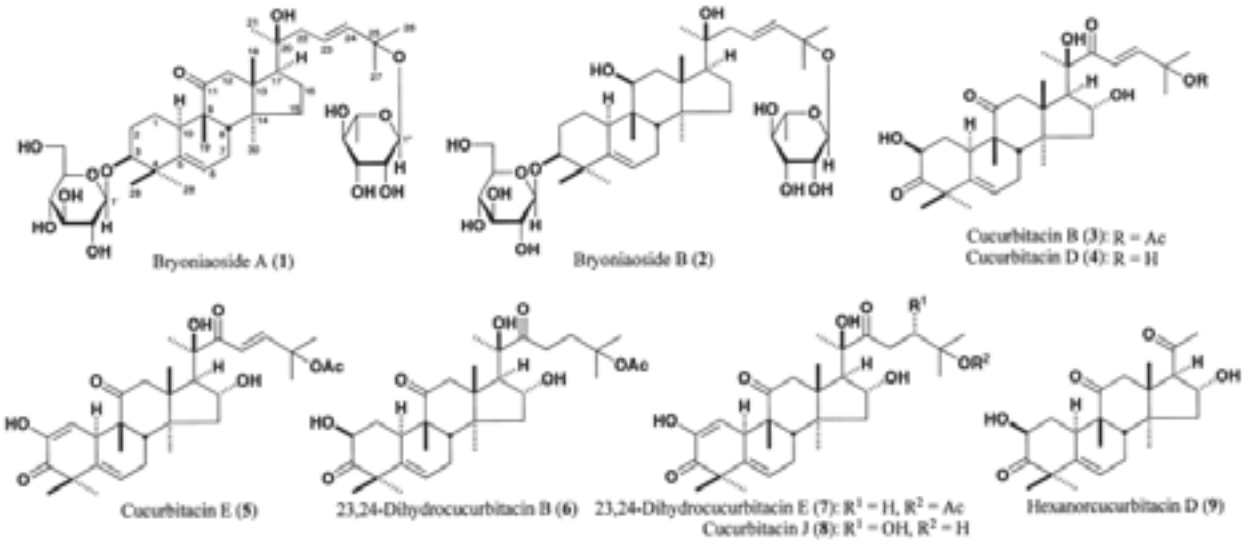


Figure 4 *: structures chimiques de triterpenes type-cucurbitane observés chez B. cretica [6].*

3. Résultats et Discussions

a. Analyse de la TM en UPLC-UV-MS

#ï Í Í ÅÐÏ ÕÒÌÅÓÁÕÕÒÅÓ4- ÕñÎ Ï ÕÓÏ ÂÓÅÒÒÏ Î ÓÄÅÓÐÒÏ ÆÊÓ56 ÅÔ- 3 ÒÒÏ ÓÒÒÈÃÈÅÓÅÔÄÈÆÆÈÒÅÎ ÔÒÅÎ ÔÒÅ ÌÅÓÄÅÕØÓÒÉÇÎ ÁÕØ8 ***Figure 5***Ò8

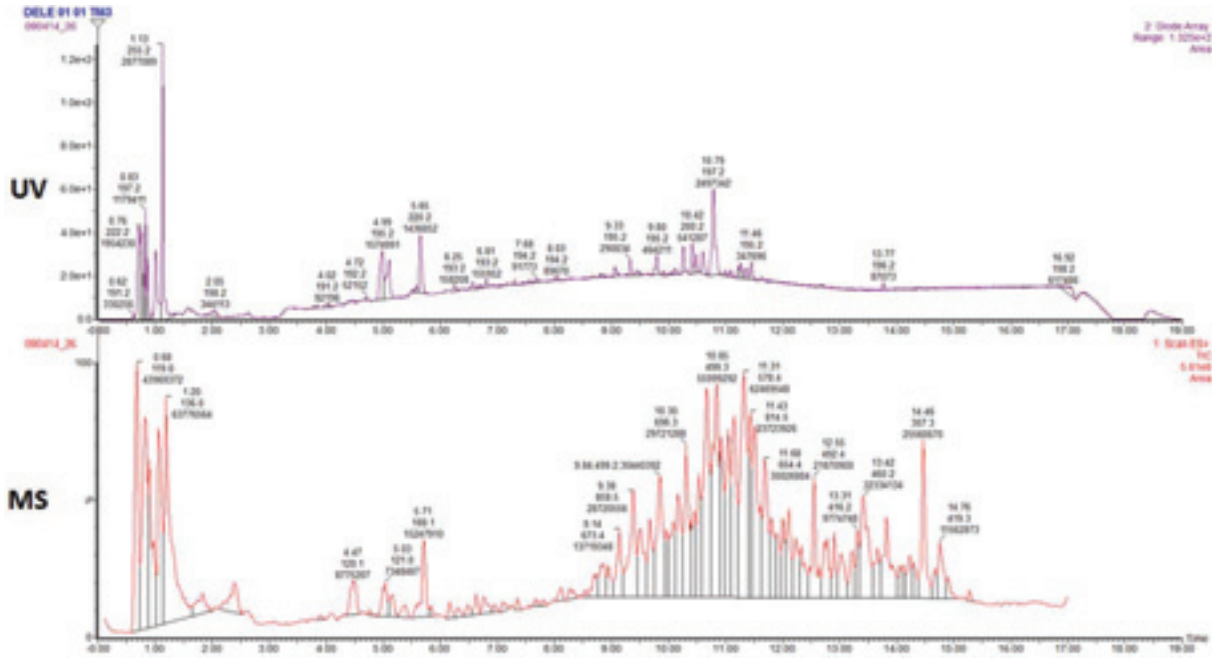


Figure 5 *: chromatogrammes UV Scan 190-500nm complet (0-17min) (haut) et MS Scan 100-100 m/z complet (0-17 min) (bas).*

, ÅÓÐÒÎÊ ÃÉÐÁÕØÐÐÆÓÍ ÁÊ ÒÈÁÉÐÓÁÅÃÅÓÁÅØÃÈÒÍ ÁÕÇÒÁÍ Í ÅÓÏ Î Ò Ò ÒÅÃÅÎ Ó Ó ÁÁÎ ÓÌÅ ***Tableau 1***ÅÒÌÅ ***Tableau 2***8

Pic majoritaire	Aire sous pic	Temps de rétention (s)	λmax (nm)	λ secondaires (nm)
1	2877086	1,13	255,2	198>264
2	2583672	0,72	222,2	220>198
3	2459531	10,79	197,2	196>268
4	2326195	1,01	201,2	198
5	1954230	0,76	222,2	220>198
6	1574991	4,99	195,2	195>250
7	1436052	5,65	220,2	219>194>278
8	1356538	5,1	195,2	194>250
9	1179411	0,83	197,2	195>264
10	747928	0,87	197,2	196
11	541287	10,42	200,2	196>268

12	518638	10,61	196,2	195>216
13	497194	10,26	195,2	195>216>268
14	464211	9,8	195,2	195>218
15	370415	10,49	196,2	195
16	347696	11,46	195,2	195>219>268
17	330256	0,62	191,2	191
18	290834	9,33	195,2	195>216
19	261530	11,26	196,2	196>216
20	202250	9,06	194,2	195>216
21	185399	11,38	195,2	195>219
22	163496	11,31	195,2	196
23	159507	11,23	195,2	195>220
24	158208	6,25	193,2	193>216
25	155952	6,81	193,2	193>216
26	148134	6,57	193,2	193>216
27	125528	5,58	193,2	193
28	122411	9,44	195,2	195>216
29	113704	10,12	195,2	195>216
30	89670	8,03	194,2	194>216

Tableau 1 *: liste des 30 pics chromatographiques majoritaires observés en UPLC-UV Scan 190-500nm. Ils sont classés par ordre d'abondance (aires décroissantes) après intégration automatique.*

Pic majoritaire	Aire sous pic	Temps de rétention (s)	m/z majoritaire (Da)	m/z secondaire (Da)
1	63776564	1,20	136,0	145>163>161>130>136>127>226>115
2	62469548	11,31	578,4	578>501>579>801>576>499>502>802
3	55999292	10,85	499,3	499>500>963>534>501>535>784>977
4	52504628	10,67	501,2	501>979>536>502>980>483>537>499
5	45365016	0,82	159,0	159>176>104>175>113>148>177>130
6	43969372	0,68	119,0	119>137>105>151>133>123>121>219
7	41578556	11,52	576,3	576>499>577>500>578>501>817>654
8	37059408	11,15	816,5	817>818>594>637>595>819>475>499
9	34933244	1,05	161,1	161>115>162>321>143>116>159>144
10	30704498	11,05	960,7	961>962>963>499>817>473>505>782
11	30440392	9,84	499,2	499>861>696>500>862>679>501>515
12	30233078	0,90	138,0	138>159>176>116>175>147>104>129
13	30026804	11,68	654,4	654>655>799>475>636>637>800>457
14	29721288	10,30	696,3	696>499>697>500>552>501>517>698
15	28720556	9,38	858,5	859>979>860>499>980>781>833>782
16	25237760	10,92	499,3	499>500>963>534>964>501>535>784
17	23723926	11,43	814,5	815>816>494>574>575>498>817>578

18	22964898	10,53	497,2	497>653>473>498>491>515>550>654
19	21870900	12,55	492,4	492>475>457>342>493>489>476>458
20	21427060	10,16	698,4	698>699>501>674>843>817>502>675
21	17859702	9,51	515,2	515>861>712>497>862>713>673>516
22	17519988	10,09	815,5	499>816>517>675>832>863>712>501
23	16556097	9,67	978,7	979>980>833>690>673>800>834>635
24	15258337	11,81	499,2	499>622>500>965>545>623>799>948
25	15247910	5,71	188,1	188>205>212>189>151>206>159>178
26	15007672	12,78	258,3	258>277>149>205>279>259>163>181
27	14556888	10,46	497,2	659>497>660>784>515>550>946>499
28	13719348	9,14	673,4	673>979>674>980>534>499>981>800
29	12288820	12,23	652,4	652>473>505>803>653>316>804>657
30	12087828	12,00	475,2	475>654>655>637>476>457>497>638

Tableau 2 *: liste des 30 pics chromatographiques majoritaires observés en UPLC-MS Scan 100-1000nm. Ils sont classés par ordre d'abondance (aires décroissantes) après intégration automatique.*

b. Analyse des composés polaires de la TM en GC-MS après dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
ÇÌÙÃÏ ÌÊÃ ÁÃÊÄ Ž´²¹¹hŽ´¹¹
ÁÌÁÎ ÊÅŽ´¹¹²hŽ´¹¹
ÅÈÊÁÏ ÏÌÁÍ ÊÅŽ´¹³³ŽŽ´¹¹
ÐÈÏ ÓÐÈÏ ÒÊÃ ÁÃÊÄ Ž´¹³²ŽŽ³³
ÓÒÃÃÊ ÉÃ ÁÃÊÄ Ž´¹¹³³Ž´¹¹
ÇÌÙÃÅÒÉÃ ÁÃÊÄ Ž´¹¹³³hŽ³³
ÆÉÍ ÁÒÉÃ ÁÃÊÄ Ž´¹¹³³ŽŽ³³
ÁÓÐÁÒÒÉÃ ÁÃÊÄ Ž´¹³³³Ž´¹²
Í ÁÌÉÃ ÁÃÊÄ Ž´¹³²¹Ž´¹¹
ÐÙÒÏ ÇÌÕÒÁÍ ÉÃ ÁÃÊÄ Ž´¹³³³Ž´¹¹
³ŽÁÍ ÊÏ ÂÕÒÙÒÉÃ ÁÃÊÄ Ž´¹³³²Ž³²³
ÁÒÁÂÊÏ ÓÅŽ´¹hŽŽ³²¹
ØÙÏ ÓÅŽ´¹³hŽ³²¹
ÒÈÁÍ ÎÏ ÓÅŽ´¹³hŽ´¹¹
ÃÉÒÉÃ ÁÃÊÄ Ž´hŽ³³Ž³
ÓÏ ÒÂÏ ÓÅŽ´¹³²¹Ž³²¹
ÆÈÕÃÒ ÓÅŽ´¹³¹²Ž³²¹
ÇÁÌÁÃÒ ÓÅŽ´¹³ŽŽ³¹³
ÇÌÕÃÏ ÓÅŽ´¹³ŽŽ³¹³
ÇÁÌÁÃÒ ÓÅŽ´¹³³²Ž³¹³
ÇÌÕÃÏ ÎÉÃ ÁÃÊÄ ŽŽ³³³Ž³³³
ÇÌÕÃÏ ÎÉÃ ÁÃÊÄ ŽŽ³³³Ž³³³
ÃÉÒÒÌÊÅŽŽŽŽŽŽ³³

[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]

Tableau 3 *: liste des molécules identifiées en GC-MS méthode polaire dans la TM Bryonia alba. Nomenclature : NOM - Indice de rétention – Ion caractéristique. (*) : Formes ou nombres de groupements TMS différents.*

c. Analyse des composés volatiles de la TM en GC- MS sans dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]
MOLECULES PUTATIVES
[illegible]
[illegible]
[illegible]

Tableau 4 *: liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode apolaire dans la TM Bryonia alba. Nomenclature : NOM – Indice de rétention – Ion caractéristique.*

d. Analyse de la TM en UPLC-MS/MS mode MRM

MOLECULES IDENTIFIEES
[illegible]
[illegible]

Tableau 5 *: liste des molécules identifiées en UPLC-MS/MS dans la TM B. alba.*

e. Focus : la cucurbitacine E

, Á ÃÕÃÕÒÀÉÓÁÃÊÅ %ÅÓÒÌÁÍ ÏÌïÃÕÌÅ ÄÏÓÏÅ ÐÏÕÒÌÅ ÃÏÎÒÒÈÌÅ ÄÅÌÁ 4- ÁÕØ, ÁÃÏ ÒÁÕÐÉÒÅÓ, ÅÈÎÊÍÇ ¡*Figure 2*Ç8, Á Í ïÒÈÏ ÄÅ ÄÅ ÄïÒÅÃÒÈÎ 56 Ù ⁊⁊ÍÍ ïÒÃÎ ÔÍ ÏÊÍ ÓÉÐÏ ÃÉÃÉÑÕÅ ÅÔÍ ÏÊÍ ÓÓÃÎ ÓÉÃÌÅ ÑÕÕÕÎ ÅÄïÒÃÒÈÎ ÐÁÒÓÉÐÅÃÒÐÍ ïÒÐÉÅ ÄÅÍ ÁÓÓÅ ÃÎ Í ÏÄÅ- 2- ˇhÎ ÏÕÓÁÓÎ ÓÁÄï ÃÉÃï ÄÅ ÄïÖÅÌÏ ÐÐÅÒÕÎ Í ïÒÈÏ ÄÅ 50, #Ž; 37- 3 ÐÏÕÒ ÄïÒÃÒÅÒ ÅÔ ÑÕÃÎ ÒÉÃÉÅÒ ÌÁ ÃÕÃÕÒÀÉÓÁÃÊÅ % ¡ÌÅ ÓÒÃÎ ÄÁÓÄ ÃÏÍ Í ÅÒÃÉÃÌïÒÃÎ ÔÄÉÉÐÏÎÉÃÌÅÇ8

- 0ÒÏÐÁÓÁÒÈÎ ÄÅÓïÃÈÃÍ ÒÈÌÏÎÓ

5ÎÅÓÏÌÕÒÈÎ ÓÒÐÃËÄÅÃÕÃÕÒÀÉÓÁÃÊÅ %ÅÓÔÐÒÏÐÁÒÏÅÙ⁊Í Ç8 , ⁊ÄÃÎ ÓÄÕ$- 3/ 8⁊Ə, ÅÓÔÐÒÏÌÅÓÏ ÅÔ ÁÈÊÕÔ Ù ⁊⁊⁊Ə, ÄÕÕÎ Í ïÌÃÍ ÇÅ ÅÁÕ⁊Í ïÒÈÃÍ ÏÌ ⁊⁊⁊⁊ ÐÏÕÒÏ ÂÔÎ ÉÒÕÎ Å ÃÏÎ ÃÎ ÒÃÁÒÈÎ ÆÊÃÌÅ ÄÅ ⁊ƏÇ8 , ⁊8, Á 4- ÅÓÔÄÊÕÏ ÅÁÕ⁊⁊⁊⁊⁊ ÄÃÎ ÓÕÎ Í ïÌÃÍ ÇÅ ÅÁÕ⁊Í ïÒÈÃÍ ÏÌ ⁊⁊⁊⁊8

- - ïÒÈÏ ÄÅ 50, #Ž; 37- 3

, ÅÓÃÍ ÃÌÙÓÅÓÕÎ ÔÅÆÆÃÕÏ ÅÓÓÕÒÌÅÍ ðÍ Å ÓÙÓÔÍ Å ÄïÃÕÉÔÃÕ ÐÁÒÁÇÒÁÐÈÅÅ ! ÎÃÌÙÓÅ ÇÏ ÂÃÌÅ ÄÕ ÃÏÎ ÔÃÍ ÕÍ ïÔÃÃÏ ÌÉÑÕÅ ÄÅÓÔÅÊ ÕÕÒÅÓÇ; ÎÒÅÓÃ 50, #Ž; 6Ž; 3 ÇÄÅ ÌÁ ÐÁÒÒÅ))8, Á ÃÏ ÌÏ ÎÎ Å ÕÔÈÉÓÏ Å ÅÓÔÕÎ Å ÃÏ ÌÏ ÎÎ Å 7 ÁÔÅÒÓÓ! ÃÑÕÉÓÙ (33 4⁊ ⁊⁊8Ə Í ˇ⁊⁊⁊ Ø⁊⁊⁊ Í ÃÏ ÕÐÏ Å ÛÕÎ Å ÐÒÏ ZÃÏ ÌÏ ÎÎ Å 7 ÁÔÅÒÓÓ! ÃÑÕÉÓÙ(33 4⁊ #⁊⁊⁊⁊⁊8Ə Í ⁊⁊⁊ Ø⁊ Í 8, Á ÔÅÍ ÐÏÒÁÕÕÒÅ ÄÕ ÆÉÕÒÃÏ ÌÏ ÎÎ Å ÅÓÔÄÅ⁊⁊ X#8, ÅÓÕÎ ÌÒÁÍ ÕÓ ÕÕÈÉÓÏ ÓÕÎ Î ÔÅÁÕ ⁊⁊⁊8 Д ÄÕÃÃÉÃÉÅ ÆÉÕÏ ÉÑÕÅ ¡! ÕÅÅÍ ïÒÈÃÍ ÏÌ ⁊⁊⁊8Д ÄÕÃÃÉÃÉÅ ÆÉÕÏ ÉÑÕÅ ¡" Ç8, Á Í ïÒÈÏ ÄÅ ÄÈÕÏ Í ÁÕÏ ÇÒÁÐÈÉÑÕÅ ÕÕÈÉÓÏ Å ÃÏ ÎÓÉÓÅ ÃÎ ÕÎ ÇÒÁÄÉÃÎ ÔÄÅ ÕÎ ÌÒÁÎ ÕÓÅÓÃÏ ÎÓÃÎ ÔÙ⁊⁊8⁊⁊ , ⁊Í ÉÊ 8, Å ÇÒÁÄÉÃÎ ÔÅÓÕÎ Å ÓÕÉÒÁÎ ÔÅ⁊⁊Д ÄÅ- Å/ (ÐÅÎ ÄÅÎ Ô⁊Í ÉÊ ˇÐÕÉÓ ÁÕÇÍ ÅÎ ÔÅÈÎ ÉÕÑÕÕÙ⁊⁊⁊Д ÄÅ- Å/ (ÅÎ ⁊⁊⁊Í ÉÊ ˇhÓÕÉÒÉÄÃÕÎ ÐÌÁÔÅÅÕ Û⁊⁊⁊Д ÄÅ- Å/ (ÐÅÎ ÄÅÎ Ô ⁊Í ÉÊ ÑÒÅÕÕÒÛ⁊⁊Д ÄÅ- Å/ (ÅÎ ⁊Í ÉÊ ÅÔÍ ÁÉÊ ÔÉÅÎ Û⁊⁊Д ÄÅ- Å/ (ÐÅÎ ÄÅÎ Ô⁊Í ÉÊ ¡*Tableau 6*Ç8, Á ÄïÒÅÃÒÈÎ - 37- 3 ÅÎ Í ïÄÅ- 2- ÓÃÁÓÔÁÉÉÅ ÅÎ %3)ˇKÁÓÅÃÕÎ Å ÔÅÎ ÓÉÈÎ ÄÅÍ 7Ú⁊⁊⁊⁊⁊8⁊⁊⁊8, Á ÔÅÎ ÓÈÎ ÄÕÃÉÎ ÅÓÔÄÅ⁊⁊⁊Å6 ÅÒÌõÎ ÅÒÇÉÅ ÄÅ ÄÃÌÉÈÎ ÄÅ⁊⁊⁊Å68

Temps (min)	débit (mL/min)	% A	% B
⁊	⁊ˇ⁊⁊	⁊⁊	⁊
⁊⁊	⁊ˇ⁊⁊	⁊⁊	⁊
⁊⁊⁊	⁊ˇ⁊⁊	⁊	⁊⁊⁊
⁊⁊	⁊ˇ⁊⁊	⁊	⁊⁊⁊
⁊⁊	⁊ˇ⁊⁊	⁊⁊	⁊
⁊⁊	⁊ˇ⁊⁊	⁊⁊	⁊

***Tableau 6** : gradient de solvants utilisés pour la méthode chromatographique UPLC-MS/MS de dosage de la cucurbitacine E.*

- 2ïÓÕÌÕÁÕÕ

. ïÕÓÄïÕÅÃÕÎÎÓÌÁÃÕÃÕÕÀÉÕÁÃÉÅ%ÄÁÎÓÌÁ4- ÛÕÎÅÄÃÎÎÃÅÎÕÀÁÕÎÎÉÎÉÆÉÕÀÕÕÅÛ4ƏÇ8 ,ƶ8$ÕÁÉÕÎÓ ÌõÎÂÓÅÕÕÁÕÎÎÉÎ ÄÅ ÌõÎÉÕÁÎÓÕÕÎ ÄÅÓÉÉÁÓ ÅÔÄÅ ÌÅÃÕÕÓÉÉÔÎÇÕÁÕÎÎÉÕhÎÎÕÓÉÉÕÕÎÎÓÉÉÅÎÕÕÎÅ ÄÎÎÃÅÎÕÀÁÕÎÎÉÎ ÄõÅÎÕÕÉÉÎ 4ƶ ÛƶÇ8 ,ƶ ÄÅÎÓÌõÃÈÁÎÕÎÎÉÎÎ ÄÅ4- ÄÉÉÕÎÅhÕÎÉÉÔÄÅÎÓÌÁ4- ÕÎÅ ÄÎÎÃÅÎÕÀÁÕÎÎÉÎ ÄÅ 4ƶ ÛƶƏÇ8 ,ƶ8ÕÎÕÕÔÄÌÉÄÅÀÕÌÅÀÕÎÓÕÁÕhÎÎÕÓÄÅÄÕÎÎÓÕÔÄÁÌÉÕÕÎÅÄÎÕÕÎÅÄÄ ÃÁÌÉÄÀÁÕÎÎÉÎ ÄÅÎÓÌõÕÀÕÅÄÅÇÕÁÎ ÄÅÃÕÀÄÅÓÄÎÎÃÅÎÕÀÁÕÎÎÉÎÓÅÕÎÎÉÎ ïÅÓ8

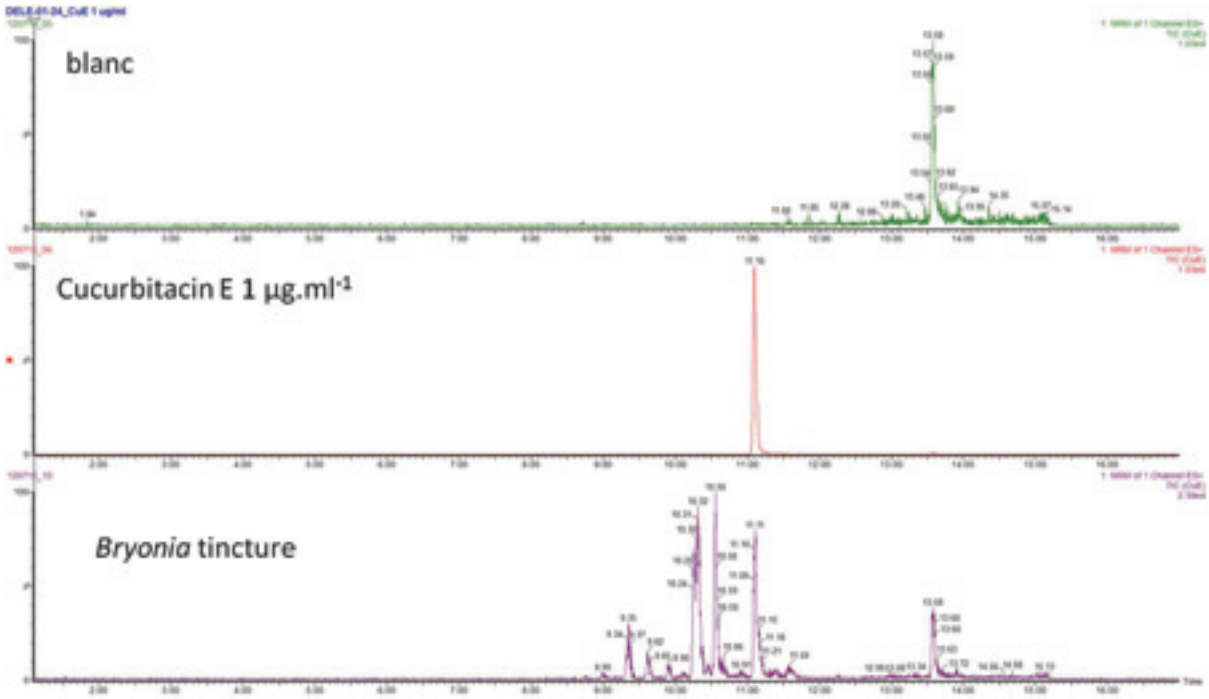


Figure 6*: identification par UPLC-MS de la cucurbitacine E dans la TM de Bryonia alba. La molécule élue à 11.09min. L'aire moyenne des trois pics correspondant à la cucurbitacine E dans le triplicat d'échantillons de TM 1/1000 est de 1041, après intégration automatique. Celui du pic correspondant au standard 1µg.mL-1 est de 78628.*

4. Conclusion

! ÌõÄÉÄÅ ÄÅÓÄÉÄÅÉÅÄÎÕÅÓÅÍ ïÕÉÏ ÄÅÓÁÎ ÁÌÙÕÎÕÅÓhÎÏÕÓÁÕÎÓÓÉÎÕÅÓÁÎÕÅÅÄÅ ÕÎÅ ÑÕÁÕÎÕÅÉÅ ÄÅ Í ÏÌïÃÕÌÅÓÄÁÎÓÌÁ4- "ÙÏÎÉÁ8ÁÕÎ ÉÌÅÓÎÏÍ ÂÕÅÕØÕÕÃÅÓÅÓÅÂÁÉÄÅÓÏÕÕÁÎ ÉÑÕÅÓÄïÕÅÕhÎÏÕÓ ÕÅÕÎÕÕÎÓÕÎÓ ÌÁ ÃÉÕÕÌÉÉÅÅhÕÎ ÁÃÉÄÅ ÁÍ ÉÉï ÁÁÎÎÄÁÎÕÅÌÚ ÌÅÓ ÅÉÉÎ ÄÅÓ ÌÁ ÆÁÍ ÉÌÅ ÄÅÓ ÃÕÃÕÕÀÉÉÁÃïÅÓ8#ÅÕÅÍ ÏÌïÃÕÌÅÐÕÎÓÅÅÅÓÐÕÎÐÕÉÉÎÕÁÎÕÉÉØÕÄÁÎÕÅÓr9Ÿ8. ïÕÓÁÕÎÓïÇÁÌÅÍ ÅÎÕ ÄïÕÅÌÏÐÉÎ ÕÎÅÍ ïÕÉÏ ÄÅÓÁÐÉÄÅÄÅÄïÕÅÃÉÉÎ ÅÕÄÅÑÕÁÎÕÅÉÉÎ ÄÅÌÁÃÕÃÕÕÀÉÉÁÃÉÅ%ÅÎ 50, #Z, - 37- 38

5. Bibliographie

1. Jean, B., *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e ed.)*. 2009: Lavoisier. p. 909-910.

2. *http://homeopathyforathletes.com/byronia_alba/*.

3. Kaya, G.I. and M.F. Melzig, *Quantitative determination of cucurbitacin E and cucurbitacin I in homoeopathic mother tincture of Gratiola officinalis L. by HPLC.* Pharmazie, 2008. **63**(12): p. 851-3.

4. Pohlmann, J., *Die Cucurbitacine in Bryonia alba und Bryonia dioica.* Phytochemistry, 1975. **14**(7): p. 1587-1589.

5. Sallam, A.A., et al., *Cucurbitacins from Bryonia cretica.* Phytochemistry Letters, 2010. **3**(3): p. 117-121.

6. Matsuda, H., et al., *Cucurbitane-type triterpenes with anti-proliferative effects on U937 cells from an egyptian natural medicine, Bryonia cretica: structures of new triterpene glycosides, bryoniaosides A and B.* Chem Pharm Bull (Tokyo), 2010. **58**(5): p. 747-51.

7. Sturm, S. and H. Stuppner, *Analysis of cucurbitacins in medicinal plants by high-pressure liquid chromatography–mass spectrometry.* Phytochemical Analysis, 2000. **11**(2): p. 121-127.

8. Krauze-Baranowska, M. and W. Cisowski, *Flavone C-glycosides from Bryonia alba and B. dioica.* Phytochemistry, 1995. **39**(3): p. 727-729.

9. Akashi, K., C. Miyake, and A. Yokota, *Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger.* Febs Letters, 2001. **508**(3): p. 438-442.

Chapitre 4 : *Arnica montana*

1. Description générale

L'arnica des montagnes fait partie de la famille des Astéracées (***Figure 1***). Nous la retrouvons essentiellement dans les montagnes d'Europe (celle utilisée par les Laboratoires Lehning provient des Vosges). Sa principale utilisation est en application externe, sous la forme de crème ou de gel, pour soulager les hématomes et les ecchymoses. Elle présente des propriétés anti-inflammatoire et analgésique. La teinture-mère est fabriquée à partir de la plante entière fraiche, macérée dans un mélange éthanol/eau 45/55 v/v.

Figure 1 *: photographie des parties aériennes fleuries d'Arnica montana [1].*

2. Bibliographie et connaissances scientifiques

Dans la monographie de la TM d'*Arnica montana*, nous dosons les sesquitèrpenes lactones (STLs) totaux, exprimés en tiglate de dihydrohélénaline ($C_{20}H_{26}O_5$, MM 346.4 g.mol-1). La teneur doit être au minimum de 0.01% m/m. Ces STLs sont détectés et quantifiés par DAD-UV. Rappelons-nous également que ces STLs sont considérés comme des « composés signatures »

dans la famille des Astéracées. Les deux STLs majoritaires chez *A. montana* sont l'hélénaline et le dihydrohélénaline (***Figure 2***).

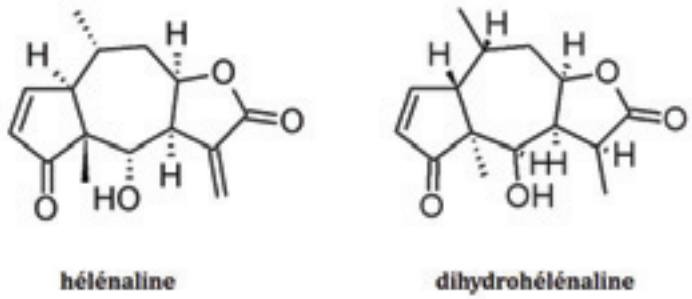


Figure 2 *: structure chimique des deux principaux STLs retrouvés chez A. montana : hélénaline ((*$C_{15}H_{18}O_4$*, MW : 262.31 g.mol*$^{-1}$*) et 2-3-dihydrohélénaline (*$C_{15}H_{20}O_4$*, MW : 264.32 g.mol*$^{-1}$*).*

Leurs concentrations dépendent de l'origine géographique de la plante. Cela peut avoir une importance car l'hélénaline aurait une activité anti-inflammatoire plus grande que la dihydrohélénaline [2]. D'autres STLs, dérivés de ces deux composés, ont également été identifiés (***Figure 3***).

Compound name	Formula	Molecular mass (g mol^{-1})
DH-methacrylate	$C_{19}H_{24}O_5$	332.16
H-methacrylate	$C_{19}H_{22}O_5$	330.15
H-isobutyrate	$C_{19}H_{24}O_5$	332.16
DH-tiglate	$C_{20}H_{26}O_5$	346.18
H-tiglate	$C_{20}H_{24}O_5$	344.16
H-2-methyl butyryl	$C_{20}H_{26}O_5$	346.18
H-isovalerate	$C_{20}H_{26}O_5$	346.18

Figure 3 *: liste des STLs identifiés chez A. montana. DH : dihydrohélénaline, H : hélénaline. D'après [2].*

Certains composés phénoliques ont également été observés tels que : l'acide chlorogénique ; la quercetine-3-O-glucoside, l'acide 3,5-dicaffeoylquinique et le kaempferol-3-O-glucoside [2].

3. Résultats et Discussion

a. Analyse de la TM en UPLC-UV-MS

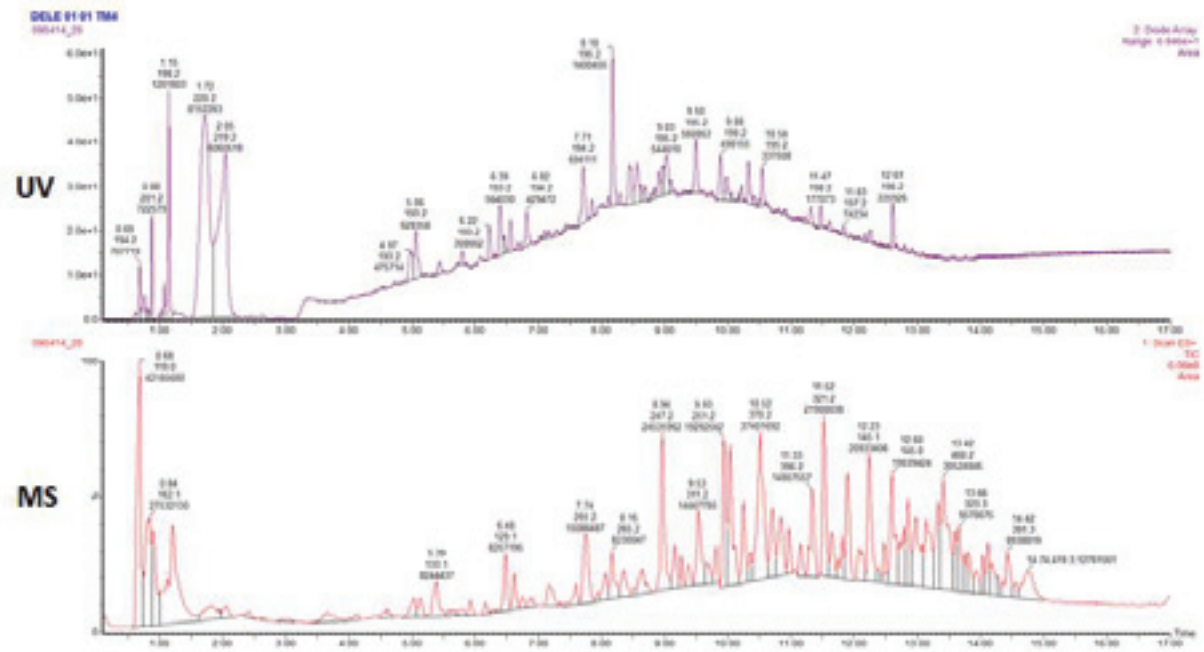


Figure 4 *: chromatogrammes UV Scan 190-500nm complet (0-17min) (haut) et MS Scan 100-100 m/z complet (0-17 min) (bas).*

Les principaux pics majoritaires de ces deux chromatogrammes ont été recensés dans le *Tableau 1*et le *Tableau 2*.

Pic majoritaire	Aire sous pic	Temps de rétention (s)	λmax (nm)	λ secondaires (nm)
1	8152263	1,72	220,2	219>201
2	6060518	2,05	219,2	216>205>202
3	1400455	8,18	195,2	194>218>329
4	1201803	1,15	198,2	195>262
5	834844	0,76	193,2	193
6	722579	0,88	201,2	202>198>205>210
7	707719	0,69	194,2	193
8	694111	7,71	194,2	194>216
9	628358	5,06	193,2	196>216>327
10	585578	8,44	195,2	194>216
11	581758	8,56	194,2	194>216
12	564030	6,39	193,2	193>216>323

13	560863	9,50	195,2	195>217
14	544610	9,03	195,2	195>216
15	498155	9,88	198,2	195>218
16	475714	4,97	193,2	193>216>327
17	429472	6,82	194,2	194>216
18	410171	10,33	195,2	195>219
19	370978	1,08	214,2	194>198>202>212
20	337508	10,54	195,2	195>217
21	335926	12,61	196,2	198>220>287
22	319283	6,56	195,2	194>217
23	308662	6,22	193,2	193>212>254
24	283001	9,98	195,2	195>218
25	278200	8,97	194,2	195>216
26	250064	8,91	195,2	195>220
27	228502	1,03	194,2	193>198>202>212
28	188966	6,46	193,2	193>216>323
29	177073	11,47	198,2	196>219
30	169240	11,32	198,2	196>219

Tableau 1 *: liste des 30 pics chromatographiques majoritaires observés en UPLC-UV Scan 190-500nm. Ils sont classés par ordre d'abondance (aires décroissantes) après intégration automatique.*

Pic majoritaire	Aire sous pic	Temps de rétention (s)	m/z majoritaire (Da)	m/z secondaire (Da)
1	44569384	1,21	130,1	130>145>163>127>136>112>236>144
2	42185680	0,68	119,0	119>137>151>105>133>123>121>120
3	37401692	10,52	370,2	293>370>247>347>137>364>265>145
4	27532130	0,84	162,1	104>219>145>163>127>162>118>148
5	25304350	10,04	247,1	247>350>333>293>248>351>334>251
6	24535962	8,96	247,2	247>324>307>248>325>308>279>392
7	21900038	11,52	321,2	321>145>322>339>146>356>361>293
8	20933406	12,23	145,1	145>321>322>149>146>343>323>163
9	19724348	12,97	279,3	279>239>248>277>295>324>217>219
10	19292542	9,93	251,2	251>163>145>252>291>164>146>133
11	19039424	12,6	145,0	145>335>321>336>219>146>149>163
12	16882718	11,89	335,2	335>145>149>336>293>353>412>375
13	16356755	0,9	116,1	116>127>104>145>163>147>381>193
14	15086487	7,74	265,2	265>342>266>247>444>117>153>375
15	14957557	11,3	396,2	293>396>145>251>163>397>247>379
16	14667785	9,53	311,2	311>163>628>133>209>490>247>249
17	12525692	10,71	137,2	137>245>345>291>362>368>334>163
18	12368495	10,25	247,2	247>352>335>245>331>353>348>248

19	12275884	10,83	247,1	247>193>349>366>195>163>367>248
20	11992350	12,8	217,1	258>217>277>149>279>205>259>305
21	11098931	12,85	219,1	219>221>151>179>324>251>163>217
22	8257195	6,48	129,1	129>115>101>163>147>165>355>250
23	8244437	5,39	133,1	133>119>101>105>115>155>147>163
24	8230047	8,16	265,2	265>131>247>163>517>117>229>201
25	7656146	11,63	410,2	293>410>393>247>291>315>396>321
26	7219047	12,07	291,2	219>291>241>410>323>393>147>149
27	7019963	8,64	209,2	209>143>371>289>175>191>263>193
28	6537750	9,15	245,1	245>305>322>163>133>227>246>247
29	6105602	11,81	291,2	147>291>391>408>239>219>145>293
30	5782584	8,36	147,0	147>163>165>135>161>145>127>141

Tableau 2 *: liste des 30 pics chromatographiques majoritaires observés en UPLC-MS Scan 100-1000nm. Ils sont classés par ordre d'abondance (aires décroissantes) après intégration automatique.*

b. Analyse des composés polaires de la TM en GC-MS après dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
glycolic acid - 1075-147
alanine - 1107-116
malonic acid - 1215-147
glycerol - 1290-205
phosphoric acid - 1291-299
succinic acid - 1325-147
glyceric acid - 1348-292
fumaric acid - 1357-245
malic acid - 1502-233
pyroglutamic acid - 1534-156
xylose - 1679-307*
arabinose - 1685-307
xylose - 1700-307*
citric acid - 1837-273
quinic acid - 1889-345
fructose - 1904-307
sorbose - 1916-307
mannose - 1925-319
glucose - 1932-319
galactose - 1951-319
gluconic acid - 2043-333
myoinositol - 2134-318
stearic acid - 2253-341
sucrose - 2730-361

trehalose - 2836-361
1-kestose - 3511-361

Tableau 3 *: liste des molécules identifiées en GC-MS méthode polaire dans la TM Arnica montana. Nomenclature : NOM - Indice de rétention – Ion caractéristique. (*) : Formes ou nombres de groupements TMS différents.*

c. Analyse des composés volatiles de la TM en GC- MS sans dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
p-cymene - 1024-119
anisole, 2-isopropyl-5-methyl- - 1235-149
thymol - 1291-135
eugenol - 1360-164
hexadecanoic acid, ethyl ester - 1994-101
phytol - 2113-123
linoleic acid ethyl ester - 2162-109
linolenic acid ethyl ester - 2170-108
MOLECULES PUTATIVES
[butane, 1,1-diethoxy-3-methyl-] - 960-115
[borneol] - 1164-95
[2-allyl-4-methylphenol] - 1215-148
[ethanone, 1-(2,4,6-trimethylphenyl)-] - 1249-147
[benzene, 2-(1,1-dimethylethyl)-1,4-dimethoxy-] - 1427-179
[bornyl isovalerate] - 1514-136
[ethyl 9-hexadecenoate] - 1973-194
[phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-, phosphite (3:1)] - 3444-441

Tableau 4 *: liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode apolaire dans la TM Arnica montana. Nomenclature : NOM – Indice de rétention – Ion caractéristique.*

d. Analyse de la TM en UPLC-MS/MS mode MRM

MOLECULES IDENTIFIEES
rutin (quercetine-3-O-rutinoside)
quercetin-3-O-glucoside
apigenin
naringenin
kaempferol-3-glucoside
coumaric acid

phenylalanine
caffeic acid
ferulic acid
tryptophane
caffeoyl-quinate
MOLECULES PUTATIVES
[sinapoyl glucose]
[peonidin]
[isorhamnetin-hexoside]

Tableau 5 *: liste des molécules identifiées en UPLC-MS/MS dans la TM Arnica montana.*

e. Dosage d'alcaloïdes pyrrolyzidiniques

Cette famille de molécules étant toxique et largement présente dans les plantes de la famille des Astéracées, nous avons utilisé la méthode UPLC-MS/MS développée lors de l'étude de la TM d'*Eupatorium perfoliatum* pour rechercher la sénécionine, la sénécionine-N-oxide, l'échimidine et la lycopsamine (voir « Partie III Chapitre 1 *Eupatorium perfoliatum* »). Aucune de ses quatre molécules n'a été détectée dans la TM d'*A. montana*.

f. Collecte de fractions par HPLC semi-préparative et identification de métabolites d'intérêts par HRMS.

- Méthode HPLC-semi-préparative

Nous avons décidé d'identifier finement certaines molécules, potentiellement présentes dans la TM d'arnica, d'intérêts pour la santé humaine. Dans cette TM, les molécules actives font partie de la famille des sesquiterpènes lactones. Ce sont principalement l'hélénaline, la dihydrohélénaline (***Figure 2***) et leurs dérivées. Malheureusement, il n'existe pas de standards commerciaux de ces molécules, rendant leurs indentifications plus difficiles. Nous avons donc entrepris de purifier ces molécules et de les identifier en spéctrométrie de masse haute-résolution. Dans un premier temps, nous avons recherché dans les analyses UPLC-MS Scan les masses pouvant correspondre aux molécules recherchées. Puis nous avons collecté des fractions contenants nos molécules d'intérêts par HPLC semi-préparative. Enfin, les fractions ont été analysées en UPLC-HRMS afin de déterminer une formule brute pour chacun des composés.

Tous les systèmes analytiques et les préparations d'échantillons sont décrits dans la « Partie II Matériel et Méthodes ».

Pour mettre en place la méthode de collecte des fractions, 11 masses ont été retenues suite à l'analyse de la TM en UPLC-MS et aux recherches bibliographiques (***Tableau 6***).

m/z	molécules potentielles
347.4	dihydrohelenalin-tiglate
265.3	2,3-dihydrohelenalin
355.3	chlorogenic acid
181.6	6,7-dihydroxycoumarin
517.5	3,5-dicaffeoylquinic acid
333.2	DH-methacrylate / H-isobutyrate
331.2	H-methacrylate
347.2	DH-tiglate / H-2-methyl butyryl / H-isovalerate
345.2	helenalin-tiglate
145.1	inconnu 1
353.5	inconnu 2

Tableau 6 : *m/z sélectionnés pour la collecte des fractions à partir des données UPLC-MS. H : hélenaline ; DH : dihydrohélénaline.*

Le premier gradient de solvant testé pour la collecte des fractions de la TM d'arnica était un gradient de solvant linéaire, avec une augmentation de 5 à 100% de méthanol en 45min, pour une durée totale de l'analyse de 60min. Il a permis de mettre en place les paramètres de détection MS et de séparer efficacement nos métabolites d'intérêts. Nous avons donc gardé cette méthode (*Tableau 7*).

Temps (min)	débit (ml/min)	% A	% B
0	3.0	95	5
2	3.0	95	5
47	3.0	0	100
50	3.0	0	100
53	3.0	95	5
60	3.0	95	5

Tableau 7 *: gradient de solvants utilisé pour la méthode HPLC semi-préparative (A : eau + 0.1% acide formique ; B : méthanol + 0.1% acide formique).*

La collecte des différentes fractions est basée sur la spectrométrie de masse. Le détecteur de masse (QDA) possède une source Electrospray différente de celle des analyses UPLC-MS. Nous devons, dans un premier temps, optimiser les tensions de cône, afin d'obtenir la meilleure ionisation possible et donc le signal le plus intense pour la collecte des différentes molécules. Deux tensions de cône ont été testées, 5 et 10V, pour chacune des masses choisies.

Malgré toutes ces optimisations, certaines molécules choisies pour la collecte ne sont pas détectées et ne peuvent pas être collectées. Ceci peut s'expliquer par la différence de sensibilité et d'ionisation entre le spectromètre de masse couplé à l'UPLC et le détecteur de masse couplé à l'HPLC semi-préparative.

Au final, nous avons collecté 6 fractions. Le collecteur de fraction était programmé pour collecter sur la base des temps de rétention. 8 injections de 100µL de TM d'arnica ont été réalisées pour la collecte (*Tableau 8*).

fractions	**m/z**	**molécules potentielles**	**tensions de cône (V)**	**plages de collecte (min)**
1	265.3	2,3-dihydrohelenalin	5	23.06 – 23.23
2	333.2	DH-methacrylate / H-isobutyrate	10	25.86 – 26.00
3	347.2	DH-tiglate / H-2-methyl butyryl / H-isovalerate	5	26.18 – 26.36
4	345.2	helenalin-tiglate	10	28.26 – 28.49
5	145.1	inconnue	10	42.54 – 42.77
6	353.5	inconnue	5	50.84 – 51.02

Tableau 8 *: liste des 6 fractions collectées à partir de la TM d'arnica.*

- Identification par HRMS

Avant d'être analysées en HRMS, les fractions ont été vérifiées en UPLC-MS. La fraction 1 contient bien le m/z 265. La fraction 2 contient le m/z 333, mais également un autre : le m/z à 495. La fraction 3 contient le m/z 347, mais aussi un m/z majoritaire de 385. Dans la fraction 4,

nous retrouvons les m/z 345 et 247. Nous ne retrouvons pas le m/z 145 de la fraction 5, mais un m/z de 321. Enfin, nous n'avons pas obtenu une bonne collecte pour la fraction 6.

Fractions	m/z mesurés en UPLC-MS	m/z exacts mesurés en HRMS	formules brutes	Molécules identifiées en HRMS/MS
1	265	265.1437	$C_{15}H_{20}O_4$	2,3-dihydrohelenalin (mais pas MS/MS)
2	333 495	333,0605 495.1128	$C_{16}H_{12}O_8$ $C_{22}H_{22}O_{13}$	/ /
3	347 385	/ /	/ /	/ /
4	345 247	/ 247.1329	/ $C_{15}H_{18}O_3$	/ 7-α-hydroxydehydrocostus lactone
5	321	321.1693	/	/

Tableau 9 *: résultats des analyses HRMS de la TM Arnica montana. Deux molécules ont pu être identifiées finement à l'aide des spectres MS, dont une confirmée à l'aide des spectres MS/MS.*

Dans la fraction 1, nous déterminons une formule correspondant à la 2,3-dihydrohélénaline. En interrogeant les banques de données de formules brutes (KEGG, PubChem,…), plusieurs choix s'offrent à nous :

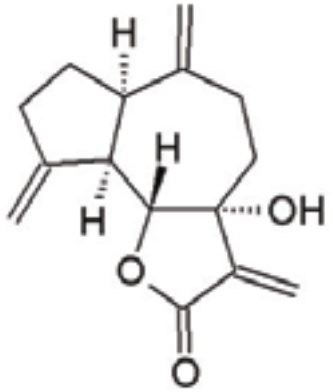
- la 2,3-dihydrohélénaline, sous le nom de (3S,3aS,4S,4aR,7aR,8R,9aR)-4-Hydroxy-3,4a,8-trimethyl-3,3a,4,4a,7a,8,9,9a-octahydroazuleno[6,5-b]furan-2,5-dione.
- l'acide abscissique (ABA)
- l'acide hirsutique C

L'analyse des fragments en HRMS ne nous a pas permis de discriminer ces 3 molécules, bien que le choix de la 2,3-dihydrohélénaline soit le plus pertinent. En effet, l'acide abscissique est une hormone végétale, relativement peu présente sous forme libre dans les tissus et l'acide hirsutique C n'a été identifié que dans des champignons à l'heure actuelle [3].

Dans la fraction 2, deux formules brutes ont été identifiées : $C_{16}H_{12}O_8$ et $C_{22}H_{22}O_{13}$. Aucune ne correspond à un métabolite présent dans les banques de données. La formule brute du DH-methacrylate ($C_{19}H_{24}O_5$) n'a pas été proposée par le logiciel.

Les masses présentes dans la fraction 3 sont très faiblement détectées avec l'analyse HRMS, rendant impossible toute identification. Nous pouvons nous demander si le problème provient de la stabilité de l'échantillon ou d'une mauvaise ionisation.

Dans la fraction 4, seul le m/z 247 a été retrouvé. Après interrogation des banques de données des formules brutes MS et MS/MS, la molécule a pu être identifiée. Elle correspond au 7-α-hydroxydehydrocostus lactone, de formule brute $C_{15}H_{18}O_3$. Cette molécule a été isolée à partir de la plante *Podachenium eminens* et a été testée *in vitro* contre *Mycobacterium tuberculosis*, l'agent responsable de la tuberculose [4]. Elle présente une activité antituberculeuse assez faible comparée à d'autres sesquiterpènes lactones naturels et aux produits de synthèse existants [5].



7-α- hydroxydehydrocostus lactone

Figure 5 *: structure chimique du 7-alpha-hydroxydehydrocostus lactone, nouveau sesquiterpène lactone identifié dans la TM d'Arnica montana.*

Enfin, dans la fraction 5, aucune formule brute n'a été déterminée pour le m/z 321.1693 car le massif isotopique était trop mauvais, empêchant toute identification.

4. Conclusion

Les différentes approches métabolomiques nous ont permis d'identifier une soixantaine de molécules différentes : des sucres ; des acides organiques ; des dérivés terpéniques (mono-, sesqui-terpènes) ; des acides gras et de nombreux composés phénoliques et flavonoïdes. Nous n'avons pas détectés d'alcaloïdes pyrrolyzidiniques dans la TM. Grace à la purification par HPLC semi-préparative et la HRMS, nous avons pu identifier deux sesquiterpènes lactones : la 2,3-dihydrohelenalin et la 7-α-hydroxydehydrocostus lactone, qui est décrite pour la première fois dans la TM d'*Arnica montana*.

5. Bibliographie

1. *http://jardin-secrets.com/arnica-des-montagnes-article-2196,135,fr.html*.

2. Pljevljakušić, D., et al., *Morphological and chemical characterization of Arnica montana L. under different cultivation models.* Industrial Crops and Products, 2014. **52**: p. 233-244.

3. Mellows, G., et al., *Sesquiterpenoid metabolites from Stereum complicatum.* Phytochemistry, 1973. **12**(11): p. 2717-2720.

4. Cantrell, C.L., et al., *Antimycobacterial activities of dehydrocostus lactone and its oxidation products.* Journal of natural products, 1998. **61**(10): p. 1181-1186.

5. Cantrell, C.L., S.G. Franzblau, and N.H. Fischer, *Antimycobacterial plant terpenoids.* Planta Med, 2001. **67**(8): p. 685-94.

Chapitre 5 : *Gelsemium sempervirens*

1. Description générale

Gelsemium sempervirens, ou Jasmin de la Caroline, fait partie de la famille des Gelsemiacées. Nous la retrouvons essentiellement en Amérique du Nord, particulièrement au sud-est des Etats-Unis, de la Virginie à la Floride. Aux Etats-Unis, elle possède le nom de « Yellow Jasmin » à cause de ses fleurs jaunes. La teinture-mère est fabriquée à partir des organes souterrains séchés, macérés dans un mélange éthanol/eau 65/35 v/v (***Figure 1***).

Figure 1 *: photographie des parties souterraines de Gelsemium sempervirens. Elles sont constituées d'un rhizome et de racines [1].*

C'est une plante très utilisée en médecine homéopathique pour le traitement des migraines, névralgies, sciatiques, douleurs utérines, nausées et inflammations [2]. Elle est également utilisée comme sédatif léger pour les symptômes d'anxiété.

2. Bibliographie et connaissances scientifiques

Dans la monographie de la TM de *Gelsemium sempervirens*, nous dosons la gelsémine, un alcaloïde monoterpénique (***Figure 2***). Sa teneur dans la TM doit être au minimum de 0.010% m/m.

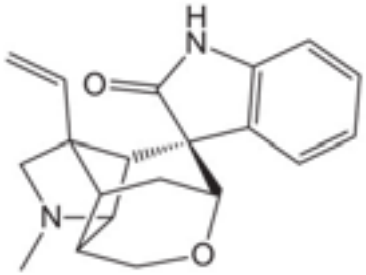


Figure 2 *: structure chimique de la gelsémine ($C_{20}H_{22}N_20_2$, MM : 322,4 g.mol-^{1}).*

Les métabolites secondaires les plus étudiés dans le genre *Gelsemium* sont les alcaloïdes indolo-monoterpéniques. Environ 190 composés, comprenant des alcaloïdes, des irodoïdes et des stéroïdes, ont été identifiés dans ce genre. Parmi eux correspondent 121 alcaloïdes. Toutes ces molécules sont référencées dans la revue de Jin 2014 [2]. Seules les molécules retrouvées uniquement dans les racines de *Gelsemium sempervirens*, parties utilisées pour la fabrication de la TM, ont été reportées dans le ***Tableau 1*** et quelques-unes de leurs structures dans les ***Figure 3*** et ***Figure 4*.**

NOM	MM (g.mol^{-1})	Formule	Famille	Références
14-hydroxygelsemicine	374.43	$C_{20}H_{26}N_2O_5$	Gelsemine-type alkaloid	[3]
Gelsemine	322.4	$C_{20}H_{22}N_20_2$	Gelsemine-type alkaloid	[3]
Gelsevirine	352.43	$C_{21}H_{24}N_2O_3$	Gelsemine-type alkaloid	[3]
19R-hydroxydihydrogelsevirine	370.44	$C_{21}H_{26}N_2O_4$	Gelsemine-type alkaloid	[3]
11-methoxyhumantenine	384.47	$C_{22}H_{28}N_2O_4$	Humantenine-type alkaloid	[3]
Gelsempervine A	382.45	$C_{22}H_{26}N_2O_4$	Sarpagine-type alkaloid	[4]
Gelsempervine B	424.49	$C_{24}H_{28}N_2O_5$	Sarpagine-type alkaloid	[4]
Gelsempervine C	382.45	$C_{22}H_{26}N_2O_4$	Sarpagine-type alkaloid	[4]
Gelsempervine D	424.49	$C_{24}H_{28}N_2O_5$	Sarpagine-type alkaloid	[4]
19Z-16-epi-voacarpine	368.43	$C_{21}H_{24}N_2O_4$	Sarpagine-type alkaloid	[4]
19E-16-epi-voacarpine	368.43	$C_{21}H_{24}N_2O_4$	Sarpagine-type alkaloid	[4]
Sempervilam	288.34	$C_{19}H_{16}N_2O$	Yohimbane-type Alkaloid	[4]

ourouparine	329.37	$C_{21}H_{17}N_2O_2^+$	Yohimbane-type Alkaloid	[3]
GSIR-1	182.22	$C_{10}H_{14}O_3$	Iridoid	[3]
Scopolin	354.31	$C_{16}H_{18}O_9$	Coumarin	[3]

Tableau 1 *: liste des molécules identifiées dans les racines de G. sempervirens d'après la littérature [2]*

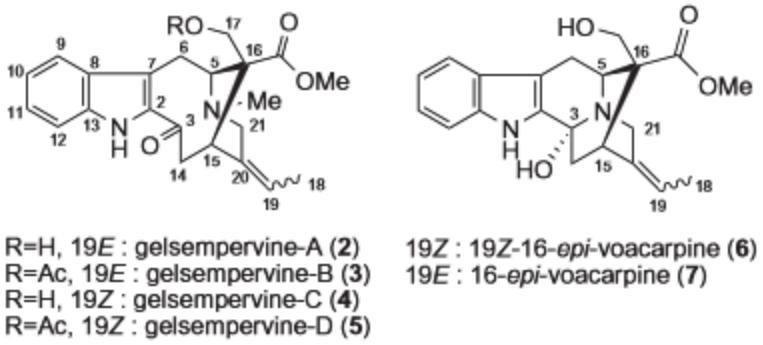


Figure 3 *: structures chimiques d'alcaloïdes identifiés dans les racines de G. sempervirens [4]*

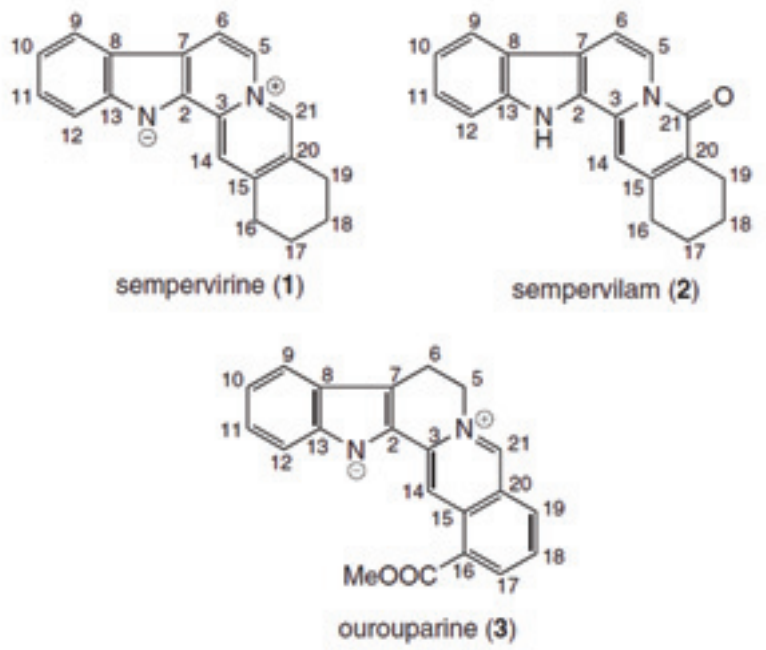


Figure 4 *: structures chimiques d'alcaloïdes identifiés dans les racines de G. sempervirens [3]*

3. Résultats et Discussion

a. Analyse de la TM en UPLC-UV-MS

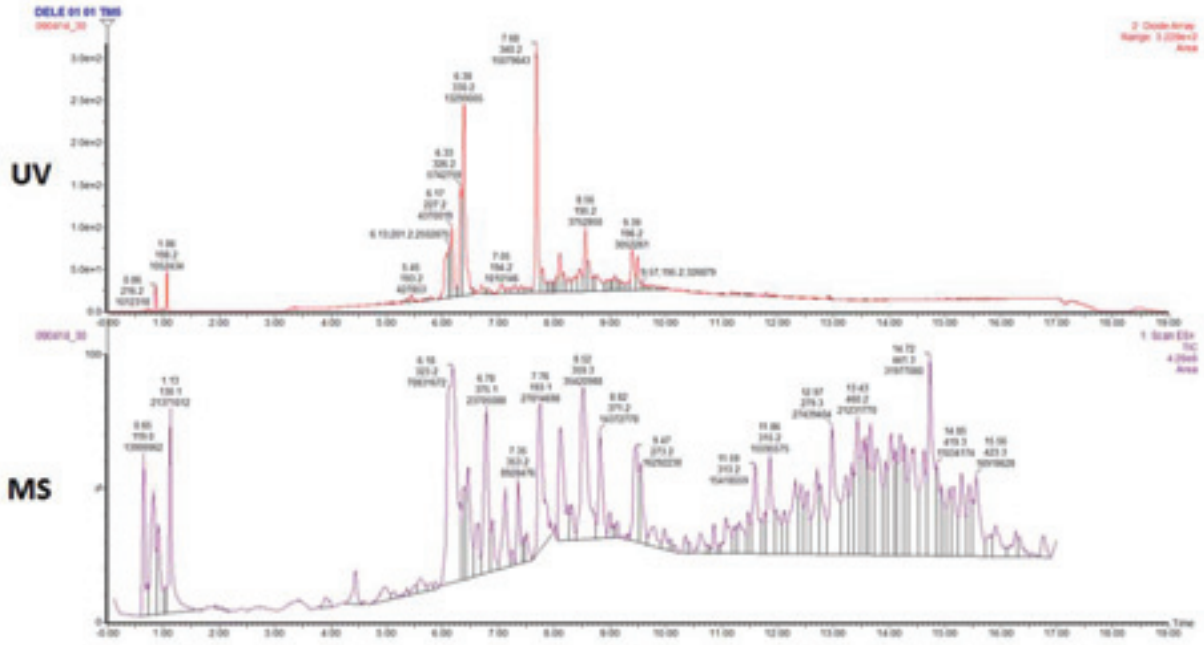


Figure 5 *: chromatogrammes UV Scan 190-500nm complet (0-17min) (haut) et MS Scan 100-100 m/z complet (0-17 min) (bas).*

b. Analyse des composés polaires de la TM en GC-MS après dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
glycolic acid - 1077-147
ethanolamine - 1283-174
phosphoric acid - 1290-299
succinic acid - 1325-147
glyceric acid - 1348-292
fumaric acid - 1356-253
erythritol - 1527-217
pyroglutamic acid - 1534-156
xylose - 1679-307
xylitol - 1743-217
citric acid - 1837-273
quinic acid - 1889-345
fructose - 1903-307
sorbose - 1914-307
mannose - 1924-319

glucose - 1930-319
galactose - 1951-319
gluconic acid - 2042-333
hexadecanoic acid, n- - 2047-313
scopoletin - 2057-264
myoinositol - 2133-318
stearic acid - 2253-341
sucrose - 2729-361
gelsemine - 2786-394
chlorogenic acid - 3056-345*
chlorogenic acid - 3164-345*
MOLECULES PUTATIVES
[isomaltose] - 2914-361

Tableau 2 *: liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode polaire dans la TM Gelsemium. Nomenclature : NOM - Indice de rétention – Ion caractéristique. (*) : Formes ou nombres de groupements TMS différents.*

Il est intéressant ici d'observer l'identification de la gelsémine par cette méthode. Cette dernière pourrait servir de contrôle à la fois de la quantité de gelsémine présent dans la TM, obligatoire pour la bonne fabrication de la TM, et de l'ensemble de la plante grâce aux 25 autres molécules identifiées. La scopoletine est la version non-glycosylée de la scopoline, coumarine également retrouvé dans la littérature [4].

c. Analyse des composés volatiles de la TM en GC- MS sans dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
cineole - 1032-154
salicylic acid, ethyl ester - 1271-120
anethole - 1287-148
thymol - 1301-135
α-curcumene - 1488-132
pentadecanoic acid, ethyl ester - 1894-101
hexadecanoic acid, ethyl ester - 1995-101
phytol - 2113-123
linoleic acid ethyl ester - 2162-109
octadecanoic acid, ethyl ester - 2194-101
MOLECULES PUTATIVES
[butane, 1,1-diethoxy-3-methyl-] - 960-115
[camphor] - 1144-95
[acetophenone, 4'-hydroxy-] - 1161-136
[salicylic acid, methyl ester] - 1194-120
[benzaldehyde, 4-methoxy-] - 1254-135

[heptadecanoic acid, ethyl ester] - 2093-101
[(E)-9-Octadecenoic acid ethyl ester] - 2168-264
[eicosanoic acid, ethyl ester] - 2395-101
[δ-sitosterol] - 3333-414
[α-amyrin] - 3368-218*
[α-amyrin] - 3416-218*
[phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-, phosphite (3:1)] - 3444-441

Tableau 3 *: liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode apolaire dans la TM Gelsemium. Nomenclature : NOM – Indice de rétention – Ion caractéristique. (*) : Les deux molécules sont identifiées comme étant l'α-amyrin. Il n'existe pas de formes différentes de l'α-amyrin, l'une des deux molécules doit être la β-amyrin ou le lupéol. Les trois molécules ont la même formule brute* $C_{30}H_{50}O$*.*

d. Analyse de la TM en UPLC-MS/MS mode MRM

MOLECULES IDENTIFIEES
apigenin
caffeic acid
coumaroyl quinate
caffeoyl-quinate
MOLECULES PUTATIVES
[peonidin]

Tableau 4 *: liste des molécules identifiées en UPLC-MS/MS dans la TM Gelsemium.*

4. Conclusion

Une cinquantaine de molécules ont pu être identifiées par l'ensemble des analyses, dont plus de la moitié par la méthode GC-MS polaire. Cette dernière permet également de détecter la gelsémine, l'alcaloïde dosé pour le contrôle-qualité de la TM. Des dérivés terpéniques, quelques acides gras et des stérols ont été retrouvés.

5. Bibliographie

1. *http://7song.com/blog/2013/02/gelsemium-sempervirens-wildcrafting-and-medicine-making/.*

2. Jin, G.L., et al., *Medicinal plants of the genus Gelsemium (Gelsemiaceae, Gentianales)--a review of their phytochemistry, pharmacology, toxicology and traditional use.* J Ethnopharmacol, 2014. **152**(1): p. 33-52.

3. Kogure, N., et al., *Total synthesis and full NMR assignment of ourouparine, a yohimbane-type indole alkaloid isolated from Gelsemiumsempervirens.* Journal of Natural Medicines, 2007. **61**(2): p. 208-212.

4. Kogure, N., et al., *Six new indole alkaloids from Gelsemium sempervirens Ait. f.* Tetrahedron letters, 2005. **46**(35): p. 5857-5861.

Chapitre 6 : *China rubra*

1. Description générale

China rubra ou quinquina rouge, correspond à l'écorce séchée de *Cinchona pubescens* Vahl (*Cinchona succirubra* Pavon) (***Figure 1***). Le genre *Cinchona* comporte une quarantaine d'espèces et appartient à la famille des Rubiacées. L'espèce *C. pubescens* est originaire d'Amérique du sud. La teinture-mère est préparée à partir de l'écorce séchée dans un mélange éthanol/eau 65/35 v/v.

Figure 1 *: photographie d'écorces séchées de quinquina [1].*

Les extraits de quinquina sont utilisés comme antipaludique (grâce de la quinine) et comme relaxant musculaire et antiarythmique (grâce a à la quinidine) (***Figure 2***). Le quinquina est la première source de quinine, isolée pour la première fois en 1820 par Pelletier et Caventou [2]. La quinine a été l'unique substance active contre la malaria pendant 200 ans. Elle est active sur les stades jeunes des parasites *Plasmodium vivax, falciparum, malariae* et *ovale*. De nos jours, elle est synthétisée et reste toujours un modèle pour le développement de molécules antipaludiques de synthèse.

2. Bibliographie et connaissances scientifiques

Dans la monographie de la TM de *China rubra*, nous dosons les alcaloïdes totaux, exprimés en quinine (***Figure 2***). La teneur doit être comprise entre 0.3 et 0.65% m/m.

Bien entendu, la composition en alcaloïdes type quinine dans le quinquina est largement documentée [3, 4]. L'HPLC-UV est la méthode la plus couramment utilisée pour détecter les alcaloïdes.

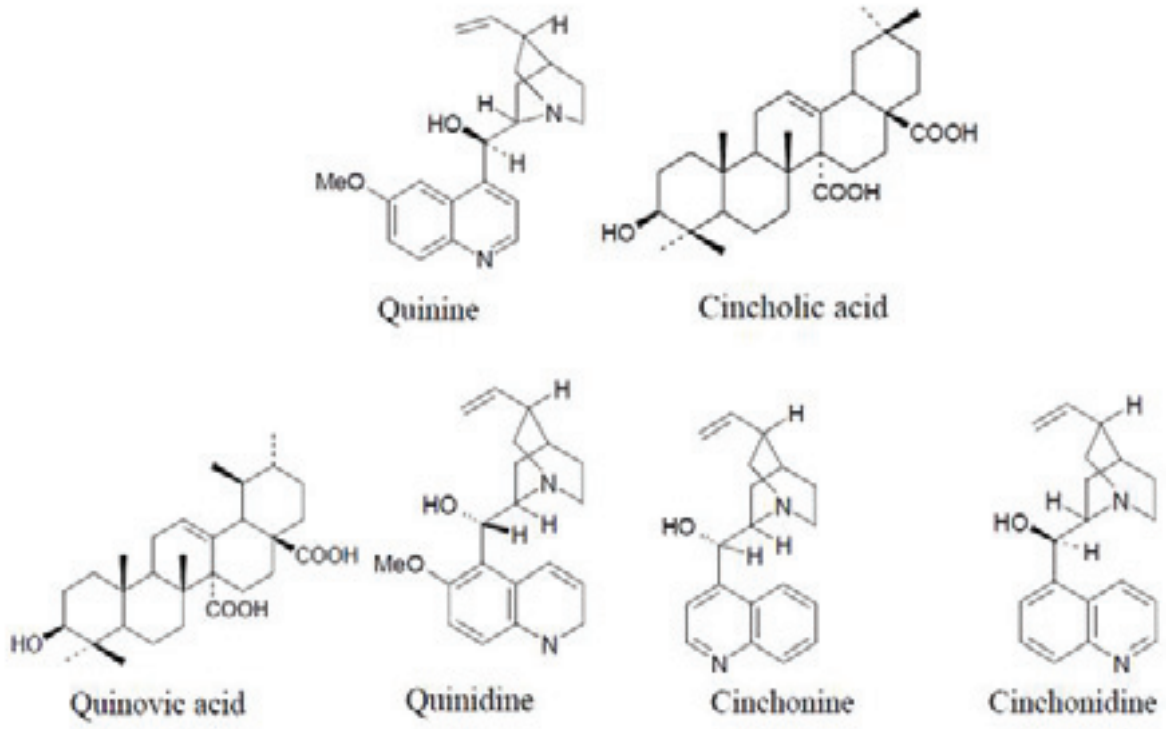


Figure 2 *: structures chimiques des alcaloïdes : quinine ($C_{20}H_{24}N_2O_2$, MM : 324.417 g.mol^{-1}), quinidine ($C_{20}H_{24}N_2O_2$, MM : 324.417 g.mol^{-1}), cinchonine ($C_{19}H_{22}N_2O$, MM : 294.173218 g.mol^{-1}), cinchonidine ($C_{19}H_{22}N_2O$, MM : 294.173218 g.mol^{-1}) et des triterpènes : acide cincholique ($C_{30}H_{46}O_5$, MM : 486.683g.mol^{-1}) et acide quinovique ($C_{30}H_{46}O_5$, MM : 486.683g.mol^{-1}).*

Nous retrouvons également dans l'écorce des triterpènes (***Figure 2***), certains composés phénoliques et acides organiques comme l'acide quinique [2].

3. Résultats et discussion

a. Analyse des composés polaires de la TM en GC-MS après dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
glycolic acid - 1077-147
ethanolamine - 1282-174
glycerol - 1290-299
phosphoric acid - 1291-127
succinic acid - 1324-147
fumaric acid - 1356-245
malic acid - 1501-233
xylitol - 1741-217
1-O-methyl-α-D-galactoside - 1846-204
quinic acid - 1887-345
sorbose - 1899-307
gluconic acid - 1906-319
fructose - 1910-307
gluconic acid - 1919-217
glucose - 1927-319
galactose - 1947-319
gluconic acid - 2037-333
myoinositol - 2127-318
stearic acid - 2246-341
quinine - 2698-136
sucrose - 2714-361
catechin - 2897-368*
catechin - 2918-368*
chlorogenic acid - 3139-345
MOLECULES PUTATIVES
[cinchonane, 9-trimethylsilyloxy-] - 2535-136

Tableau 1 *: liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode polaire dans la TM China rubra. Nomenclature : NOM - Indice de rétention – Ion caractéristique. (*) : Formes ou nombres de groupements TMS différents. La molécule putative, [cinchonane, 9-trimethylsilyloxy], correspond à la cinchonidine comportant 9 groupments TMS.*

Nous retrouvons à l'aide de cette méthode de nombreux acides organiques tels que l'acide quinique. Nous détectons également des composés phénoliques d'intérêts tels que l'acide chlorogénique et le catéchine. Il est intéressant d'observer la détection de la quinine et de la cinchonidine, qui apparait comme composé putatif lors de notre analyse. La quinidine et la cinchonine sont probablement détectables avec cette méthode. Nous pourrions les ajouter à la

banque de données et les identifier, si elles sont présentes en concentrations suffisantes dans la TM.

b. *Analyse des composés volatiles de la TM en GC- MS sans dérivation*

MOLECULES IDENTIFIEES
benzoic acid, ethyl ester - 1169-105
α-curcumene - 1488-132
butylated hydroxytoluene - 1518-205
hexadecanoic acid, ethyl ester - 1994-101
linoleic acid ethyl ester - 2162-95
octadecanoic acid, ethyl ester - 2194-101
MOLECULES PUTATIVES
[heptadecanoic acid, ethyl ester] - 2094-101
[ethyl 9,12,15-octadecatrienoate] - 2168-95
[eicosanoic acid, ethyl ester] - 2394-101
[bis(2-ethylhexyl) phthalate] - 2550-167
[squalene] - 2833-81
[vitamin E] - 3145-430
[campesterol] - 3240-400
[sitosterol] - 3334-414
[phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-, phosphite (3:1)] - 3443-441

Tableau 2 *: liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode apolaire dans la TM China rubra. Nomenclature : NOM – Indice de rétention – Ion caractéristique.*

c. *Analyse de la TM en UPLC-MS/MS mode MRM*

MOLECULES IDENTIFIEES
rutin (quercetin-3-O-rutinoside)
procyanidin B2
kaempferol-3-O-rutinoside
caffeic acid
coumaroyl-quinate
caffeoyl-quinate
MOLECULES PUTATIVES
kaempferol-dimethylpentoside(isomer-1)
kaempferol-dimethylpentoside(isomer-4)

procyanidin trimer
procyanidin tetramer
epicatechin
1-palmitoylglycerophosphatidylcholine

Tableau 3 *: liste des molécules identifiées en UPLC-MS/MS dans la TM China rubra.*

4. Conclusion

Nous avons identifié une cinquantaine de molécules dans la TM *China rubra*, parmi lesquelles nous retrouvons de nombreux acides organiques, des acides phénoliques et des flavonoïdes. Avec la méthode GC-MS polaire, nous pouvons détecter, en plus des nombreuses autres molécules, les alcaloïdes d'intérêts pour le contrôle de la TM.

.

5. Bibliographie

1. *http://www.herboristerie.com/produits/quinquina-rouge-en-vrac/*.

2. Jean, Bruneton., *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e ed.)*. 2009: Lavoisier. p. 1178-1184.

3. Martins, D. and C.V. Nunez, *Secondary metabolites from Rubiaceae species.* Molecules, 2015. **20**(7): p. 13422-13495.

4. McCalley, D.V., *Analysis of the Cinchona alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques.* Journal of chromatography A, 2002. **967**(1): p. 1-19.

Chapitre 7 : *Belladonna*

1. Description générale

La belladonne (*Atropa belladonna* L.) fait partie de la famille des solanacées (***Figure 1***). Elle pousse en Europe, Afrique du Nord et Asie de l'Ouest principalement. Historiquement, elle est utilisée comme antidouleur, relaxant musculaire et anti-inflammatoire. Actuellement, elle n'est utilisée quasiment que pour des préparations à caractère homéopathique. C'est une plante toxique, principalement due à sa composition en alcaloïdes tropaniques tels que l'atropine, l'hyoscyamine et la scopolamine. Ce sont des molécules parasympatholytiques, bloquant le système nerveux parasympathique, ce dernier contrôlant les activités involontaires des organes. La teinture-mère d'*Atropa belladonna* est fabriquée à partir de la plante entière fleurie fraiche. La plante est macérée dans un mélange d'éthanol/eau 45/55 v/v.

Figure 1 *: photographie des parties aériennes fleuries de la belladone [1].*

2. Bibliographie et connaissances scientifiques

Pour le contrôle de la bonne fabrication de la teinture-mère, nous dosons les alcaloïdes totaux, exprimés en hyoscyamine ($C_{17}H_{23}NO_3$, MM : 289.4 g.mol^{-1}). La teneur doit être comprise entre 0.02 et 0.05% m/m. Parmi ces alcaloïdes, l'hyoscyamine, nettement prépondérante, est accompagnée de faibles quantités de scopolamine (également appelée hyoscine).

La belladone est très étudiée pour ses alcaloïdes tropaniques toxiques tels que l'atropine, la scopolamine et l'hyoscyamine (***Figure 2***).[2]

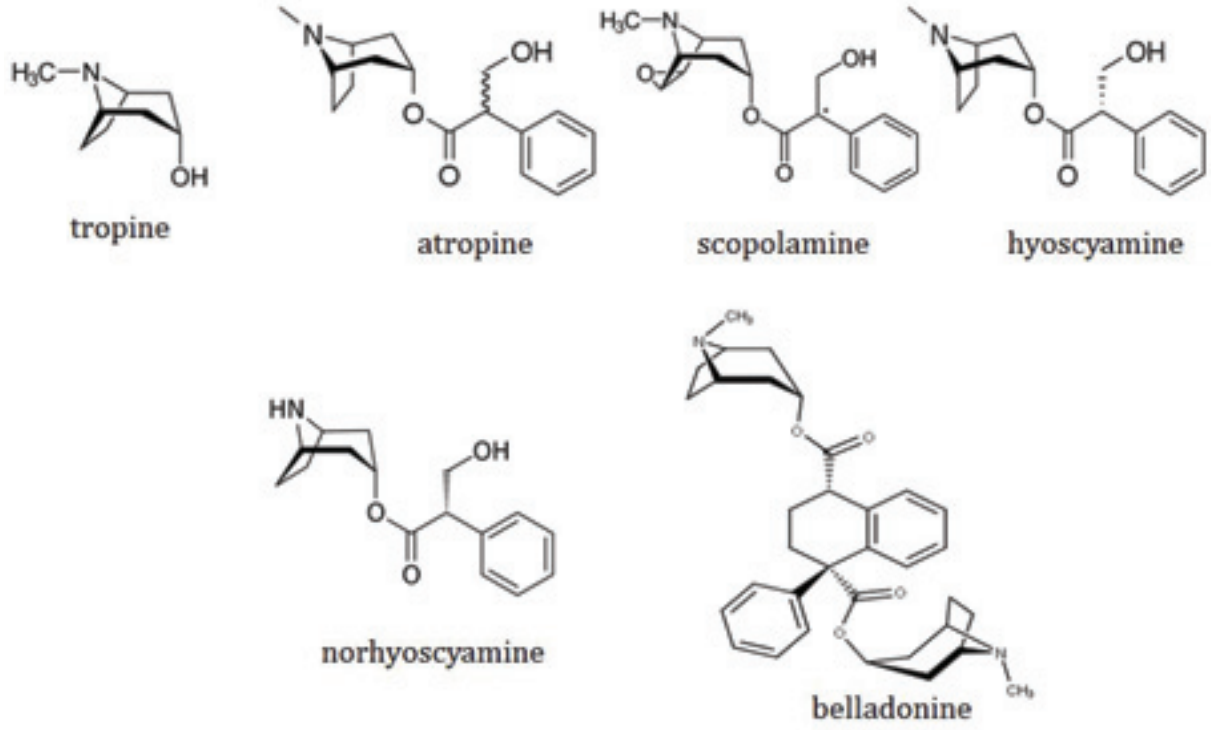


Figure 2 *: structures chimiques des principaux alcaloïdes identifiés dans la belladone. Tropine ($C_8H_{15}NO$, MM : 141.21 g.mol^{-1}), Atropine (ou dl-hyoscyamine, $C_{17}H_{23}NO_3$, MM : 289.369 g.mol^{-1}), Scopolamine (ou hyoscine, $C_{17}H_{21}NO_4$, MM : 303.3529 g.mol^{-1}), l-Hyoscyamine ($C_{17}H_{23}NO_3$, MM : 289.375 g.mol^{-1}), Norhyoscyamine ($C_{16}H_{21}NO_3$, MM 275.34 g.mol^{-1}) Belladonine ($C_{34}H_{42}N_2O_4$, MM 542.72 g.mol^{-1}).N'ont pas été représentées les molécules suivantes : Apoatropine ($C_{17}H_{21}NO_2$, MM : 271.35 g.mol^{-1}) et 6-β-hydroxyhyoscyamine ($C_{17}H_{24}NO_3$,MM : 289.38 g.mol^{-1}).*

Des composés phénoliques et d'autres alcaloïdes ont également été identifiés dans des travaux portants directement sur la teinture-mère de belladone : la scopoline, l'acide chlorogénique, le kaempferol-3-O-b-D (6-O-a-L-rhamnogalactoside)-7-O-b-D-glucoside, la scopoletine et la rutine [3].

Nous pouvons également retrouver le scopolétol, une coumarine présente en petite quantité dans les feuilles de belladone [4].

3. Résultats et discussion

a. Analyse des composés polaires de la TM en GC-MS après dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
pyruvic acid - 1049-174
glycolic acid - 1077-147
alanine - 1108-116
butylamine - 1111-174
ethanolamine - 1283-174
phosphoric acid - 1291-299
proline - 1314-142
succinic acid - 1325-147
glyceric acid - 1349-292
fumaric acid - 1356-245
malic acid - 1504-147
pyroglutamic acid - 1535-156
4-Aminobutyric acid - 1542-304
p-hydroxybenzoic acid - 1634-267
xylose - 1686-307
citric acid - 1840-273
quinic acid - 1892-345
fructose - 1908-307
sorbose - 1918-307
glucose - 1928-319*
glucose - 1936-319*
galactose - 1955-319
gluconic acid - 2042-292*
gluconic acid - 2048-333*
myoinositol - 2140-318
guanine - 2158-352
stearic acid - 2260-341
hyoscyamine - 2311-124
MOLECULES PUTATIVES
[ethyl phosphoric acid] - 1239-211

Tableau 1 *: liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode polaire dans la TM Belladonna. Nomenclature : NOM - Indice de rétention – Ion caractéristique. (*) : Formes ou nombre de groupements TMS différents.*

Une vingtaine de molécules ont pu être identifiées à l'aide de cette méthode. Nous retrouvons principalement des sucres (fructose, glucose), des acides organiques (acide pyruvique, acide malique, acide quinique) et des acides aminés (alanine, proline). Nous identifions également l'hyoscyamine. Il peut donc être intéressant d'essayer d'incrémenter la banque de données avec

les alcaloïdes pouvant être présents dans la TM, tels que l'atropine ou la scopolamine par exemple. Nous pourrions alors avoir un aperçu global à la fois sur la composition en alcaloïdes et sur le profil global en métabolites pour le contrôle qualité de la TM.

b. *Analyse des composés volatiles de la TM en GC- MS sans dérivation*

MOLECULES IDENTIFIEES
benzoic acid, ethyl ester - 1169-105
n-decanoic acid - 1369-129
decanoic acid, ethyl ester - 1397-155
phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)- - 1514-191
dodecanoic acid, ethyl ester - 1596-101
1,2-benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester - 1870-149
hexadecanoic acid, ethyl ester - 1994-101
phytol - 2113-123
linoleic acid ethyl ester - 2162-95
linolenic acid ethyl ester - 2169-95
MOLECULES PUTATIVES
[nonanoic acid, 9,9-diethoxy-, ethyl ester] - 1771-856
[bis(2-ethylhexyl) phthalate] - 2551-149
[phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-, phosphite (3:1)] - 3444-441

Tableau 2 *: liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode apolaire dans la TM Belladonna. Nomenclature : NOM – Indice de rétention – Ion caractéristique.*

c. *Analyse de la TM en UPLC-MS/MS mode MRM*

MOLECULES IDENTIFIEES
rutin (= quercetin-3-O-rutinoside)
kaempferol-3-O-rutinoside
coumaric acid
phenylalanine
tryptophane
MOLECULES PUTATIVES
quercetin-hexosylmethylpentoside-methylpentoside

Tableau 3 *: liste des molécules identifiées en UPLC-MS/MS dans la TM Belladonna.*

Nous avons identifié cinq nouveaux flavonoïdes et précurseurs phénoliques dans la TM de belladone grâce à cette méthode. La rutine est également retrouvée dans la littérature [3].

4. Conclusion

Les analyses effectuées sur la TM *Belladonna* nous a permis d'identifier une cinquantaine de molécules. La majorité des identifications a été faite par la méthode GC-MS polaire, où nous avons également pu détecter l'alcaloïde dosé pour le contrôle de la TM, la hyoscyamine.

5. Bibliographie

1. *http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2013/siebold_alic/.*

2. Arraez-Roman, D., et al., *Characterization of Atropa belladonna L. compounds by capillary electrophoresis-electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry and capillary electrophoresis-electrospray ionization-ion trap-mass spectrometry.* Electrophoresis, 2008. **29**(10): p. 2112-6.

3. Gao, J., et al., *Simultaneous HPLC Determination of Five Active Ingredients in Belladonna tincture.* Asian Journal of Chemistry, 2014. **26**(8): p. 2315.

4. Jean, Bruneton., *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e ed.)*. 2009: Lavoisier. p. 965-972.

Chapitre 8 : *Drosera rotundifolia*

1. Description générale

Le drosera est principalement connu pour son appartenance à une catégorie de plantes un peu particulières : les plantes carnivores. Il fait partie de la famille des Droséracées (***Figure 1***). En Europe, l'espèce est devenue très rare et est donc aujourd'hui protégée. La plus répandue est *Drosera rotundifolia*, mais il existe également les espèces *D. anglica* et *D. intermedia*. D'un point de vue médical, il peut être utilisé pour traiter les verrues, les convulsions et même la coqueluche [1]. La teinture-mère est fabriquée à partir de la plante entière séchée de diverses espèces de drosera (*D. rotundifolia* L. ou *D. anglica* Huds. (*D. longifolia* L.), macérée dans un mélange éthanol/eau 45/55 v/v.

Figure 1 *: photographie des parties aériennes du drosera [2].*

2. Bibliographie et connaissances scientifiques

Aux Laboratoires Lehning, nous dosons deux classes de molécules pour le contrôle de la teinture-mère. Les polyphénols totaux, exprimés en pyrogallol, sont dosés par CCM. La teneur doit être au minimum de 0.050% m/m. La plumbagine, une naphtoquinone, est également dosée par HPLC-UV à 267nm. Sa teneur dans la TM doit être au maximum de 0.010%. Pour l'étude de stabilité de la TM, une CCM sur la plumbagine, un dosage des tanins totaux et un dosage des flavonoïdes totaux sont effectués.

Plusieurs flavonoïdes ont été identifiés dans des extraits de Drosera : kaempférol, quercétine, isoquercétine, astragaline, gossypin et gossypytrin (***Figure 2***) [3].

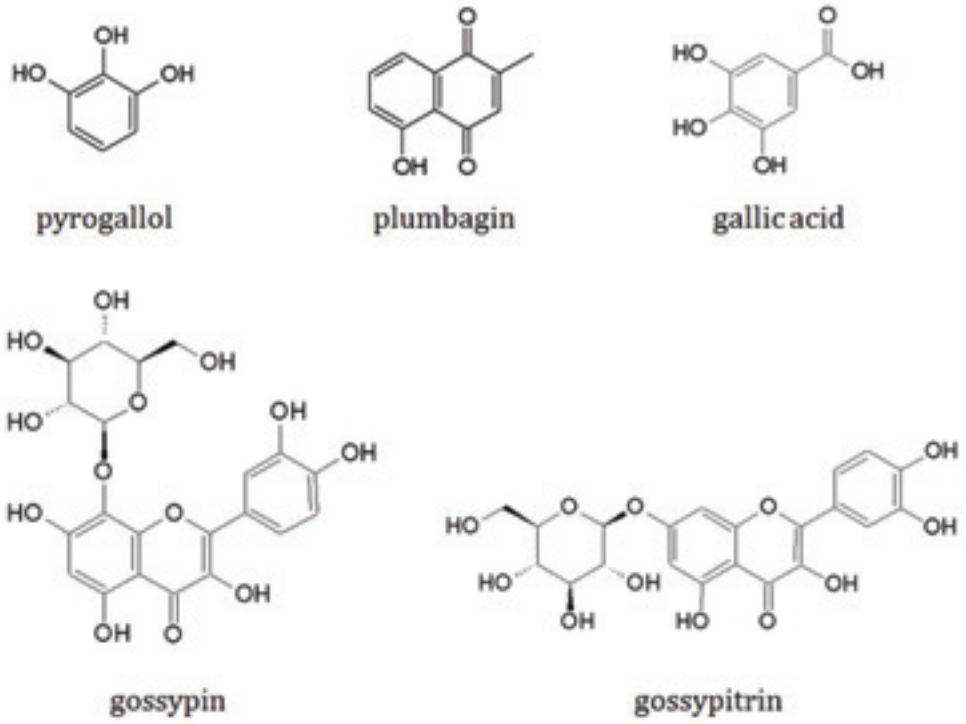


Figure 2 *: structures chimiques du pyrogallol ($C_6H_6O_3$, MM : 480.090393 g.mol^{-1}), de la plumbagine ($C_{11}H_8O_3$, MM : 188.179 g.mol^{-1}), de l'acide gallique ($C_7H_6O_5$, MM : 170.120 g.mol^{-1}) de la gossypin ($C_{21}H_{20}O_{13}$, MM : 480.090393 g.mol^{-1}) et de la gossypitrin ($C_{21}H_{20}O_{12}$, MM : 464,376 g.mol^{-1}).*

3. Résultats et discussion

a. Analyse des composés polaires de la TM en GC-MS après dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
glyceric acid - 1348-292
fumaric acid - 1357-245
erythritol - 1528-217
pyroglutamic acid - 1535-156
threonic acid - 1580-292
ribose - 1685-307
arabitol - 1744-217
citric acid - 1838-273
sorbose - 1904-307*
sorbose - 1915-307*
glucose - 1931-319
galactose - 1952-319
gallic acid - 1977-458
gluconic acid - 2044-333
n-hexadecanoic acid - 2049-313
myoinositol - 2135-305
stearic acid - 2255-341
kaempferol - 3118-559

Tableau 1 *: liste des molécules identifiées en GC-MS méthode polaire dans la TM de drosera. Nomenclature : NOM - Indice de rétention – Ion caractéristique. (*) : Formes ou nombres de groupements TMS différents.*

b. Analyse des composés volatiles de la TM en GC- MS sans dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
hexadecanoic acid, ethyl ester - 1994-101
phytol - 2113-123
linoleic acid ethyl ester - 2161-95
linolenic acid ethyl ester - 2168-95
MOLECULES PUTATIVES
[plumbagin] - 1615-188
[bis(2-ethylhexyl) phthalate] - 2551-149
[phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-, phosphite (3:1)] - 3444-441

Tableau 2 *: liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode apolaire dans la TM drosera. Nomenclature : NOM – Indice de rétention – Ion caractéristique.*

Nous pouvons observer à l'aide de cette méthode la présence de plumbagine. Nous pourrions incrémenter la banque de données avec cette molécule et ainsi utiliser la GC-MS pour le dosage de celle-ci.

c. *Analyse de la TM en UPLC-MS/MS mode MRM*

MOLECULES IDENTIFIEES
quercetin-3-O-glucoside
kaempferol
naringenin
quercetin
isorhamnetin (isomer 1)
isorhamnetin (isomer 2)
dihydroquercetin
kaempferol-3-glucoside
coumaric acid
ferulic acid

Tableau 3 *: liste des molécules identifiées en UPLC-MS/MS dans la TM drosera.*

Comme nous l'avons vu dans la littérature, le drosera est riche en composés phénoliques et flavonoïdes. Cela est confirmé par cette analyse ou nous identifions une dizaine de ces composés aux propriétés intéressantes majoritairement antioxydantes.

d. *Focus : dosage de la plumbagine et de l'acide gallique par UPLC-MS/MS.*

Nous avons développé une méthode UPLC-MS/MS en mode MRM afin d'identifier et doser la plumbagine et l'acide gallique dans la TM de drosera.

- Préparation des échantillons

Les standards plumbagine (Extrasynthese, France) et acide gallique (Sigma-Aldrich, USA) ont été mis en solution dans un mélange eau/méthanol 50/50 v/v afin d'obtenir une concentration stock d'1mg.mL^{-1}. Une gamme étalon a été faite en triplica dans le but de quantifier la plumbagine dans la TM de drosera aux concentrations suivantes : 0.05 / 0.1/ 0.25 / 0.5 / 1 / 2.5 / 5 / 10 / 50 µg.mL^{-1}. L'acide gallique a été dilué à 10µg.mL^{-1} pour le développement de la méthode MRM. 200µL de TM de drosera, filtrée à 0.2µm, ont été dilués dans 200µL d'un mélange eau/méthanol 50/50 v/v, en triplica.

- Méthode UPLC-MS/MS

L'analyse a été faite sur une colonne UPLC Waters HSS T3 C18 1.8µm, 2.1 x 100mm couplée à une pré-colonne Waters HSS T3 C18 1.8µm, 2.1 x 10mm. La température du four était de 35°C. Les solvants utilisés étaient : eau + 0.1% acide formique (A) et méthanol + 0.1% acide formique (B). Le gradient de solvant était: 1% de B pendant 2min, puis augmentation jusqu'à 100% de B en 10min, suivi d'un plateau à 100% de B pendant 2min. Retour à 1% de B en 1min puis 1% de B pendant 2min. Le débit était constant à 0.35 $ml.min^{-1}$. La durée totale de l'analyse était de 17min. Le volume d'injection était de 5 µL. Les paramètres MS/MS mode MRM de la plumbagine et de l'acide gallique ont été optimisés sur le système UPLC-MS Waters décrit dans la «Partie II Matériel et Méthodes ». Ils sont référencés dans le ***Tableau 4***.

	temps de rétention	**m/z**	**ion fils**	**tension cone (CV)**	**Energie Collision (EC)**	**Ionisation ESI**
plumbagine	8.82	191.3	176.1	26	22	pos
acide gallique	3.92	169.2	125.2	24	15	neg

Tableau 4 *: paramètres MS/MS mode MRM optimisés de la plumbagine et de l'acide gallique*.

- Résultats des analyses UPLC-MS/MS de la plumbagine et de l'acide gallique

La plumbagine est détectée en mode ESI positif à un m/z 191.3. Or, sa masse moléculaire est de 188.2 $g.mol^{-1}$. La molécule possède dans sa structure un nombre important d'insaturations. Il est probable qu'en solution, le standard se soit hydrogéné, qu'il ait perdu une double-liaison et qu'il ait récupéré deux atomes d'hydrogène. Nous obtenons alors une masse de 190 qui, après ionisation, correspond à l'ion m/z $(M+H)^+$ 191.3. L'acide gallique est quant à lui, bien détecté en mode ESI négatif.

[c] µg/ml	Aire sous pic REP1	Aire sous pic REP2	Aire sous pic REP3	Moyenne	SD
0.05	48	25	51	41	14
0.1	72	52	71	65	11
0.25	963	397	612	657	285
0.5	3861	2585	3177	3207	638
1	8271	3999	5443	5904	2173
2.5	43807	26413	33982	34734	8721
5	68143	67323	72904	69456	3013
10	157687	167814	164264	163255	5138
50	569706	524011	551373	548363	22996

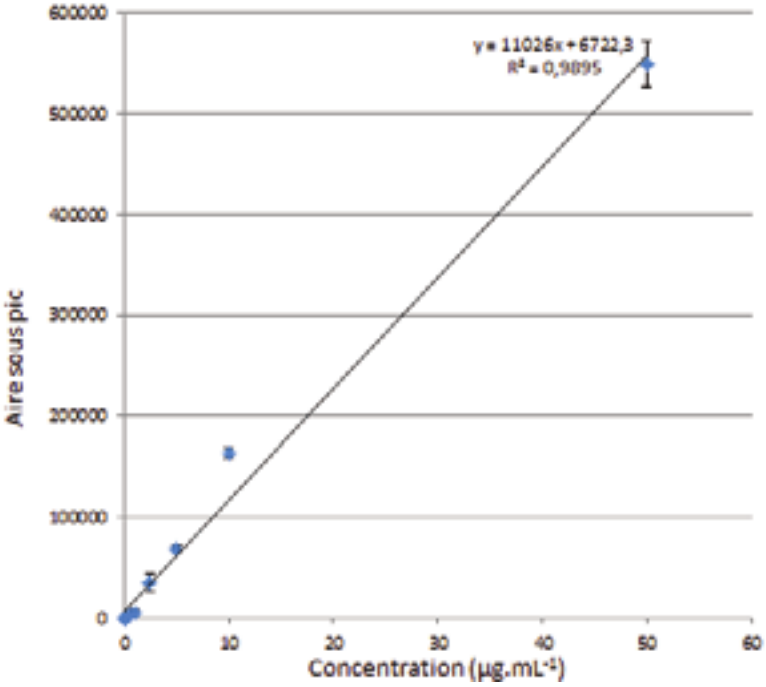


Figure 3 *: gamme étalon de la plumbagine par UPLC-MS/MS mode MRM.*

Nous pouvons détecter la plumbagine à une concentration de 50 ng.mL-1 à l'aide de cette méthode. La réponse est linéaire entre les différents points de gammes, de 50 ng.mL^{-1} à 50 µg.mL^{-1}, permettant ainsi une quantification précise de la plumbagine dans ces gammes de concentrations. Nous retrouvons la plumbagine à une concentration de 28.49µg.mL^{-1} dans l'échantillon dilué au ½, correspondant à une concentration finale dans la TM de 56.98µg.mL-1 ± 0.5.

	aires sous pics					concentrations ($\mu g.mL^{-1}$)	
	réplica 1	**réplica 2**	**réplica 3**	**moyenne**	**écart-type**	**[C]**	**écart-type**
TM Drosera	335383	313558	313558	320833	12600	28.49	0.53

Tableau 5 *: données brutes et concentration calculée dans l'échantillon dilué de la TM de drosera.*

A l'aide de cette méthode, nous pouvons rapidement et facilement doser la plumbagine et l'acide gallique dans la TM de drosera et entendre cette méthode à d'autres TM.

4. Conclusion

Nous retrouvons peu de données bibliographiques sur l'espèce *Drosera rotundifolia* dans la littérature. Dans ces travaux, nous avons identifié une trentaine de molécules dont de nombreux composés phénoliques. Nous avons également mis en place une méthode de dosage rapide de la plumbagine et de l'acide gallique par UPLC-MS/MS.

5. Bibliographie

1. Zehl, M., et al., *Identification and quantification of flavonoids and ellagic acid derivatives in therapeutically important Drosera species by LC-DAD, LC-NMR, NMR, and LC-MS.* Anal Bioanal Chem, 2011. **400**(8): p. 2565-76.

2. *https://fr.wikipedia.org/wiki/Dros%C3%A9ra_%C3%A0_feuilles_rondes*.

3. Schölly, T. and I. Kapetanidis, *Flavonoids from Drosera rotundifolia L.(Droseraceae).* SCIENTIA PHARMACEUTICA, 1993. **61**: p. 277-277.

Chapitre 9 : *Polygala senega*

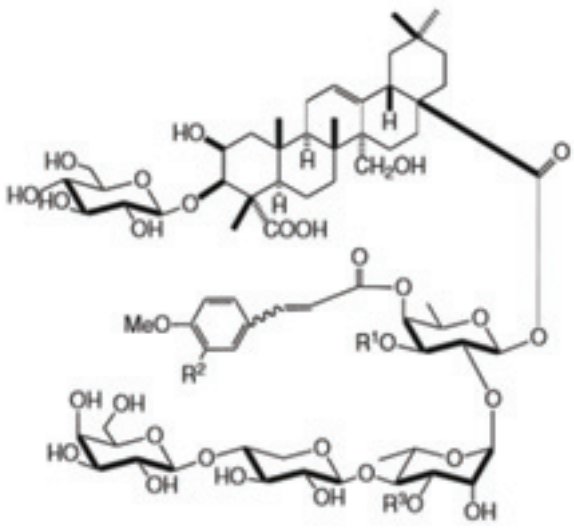
1. Description générale

La polygale de Virginie *(Polygala senega* L.) fait partie de la famille des Polygacées (ordre des Fabales). Nous la retrouvons en Amérique du Nord, du Sud du Canada jusqu'au centre et à l'est des Etats-Unis. Cette plante est connue dans le domaine pharmaceutique car elle contient des saponosides, utilisés pour le traitement de la toux [1]. D'ailleurs, nous avons recouru à la polygale en Europe dès les années 1800 pour traiter la pneumonie. La teinture-mère est préparée à partir des racines et des souches séchées dans un mélange d'éthanol/eau 65/35 v/v (***Figure 1***).

Figure 1 *: photographie des parties souterraines de Polygala senega [2].*

2. Bibliographie et connaissances scientifiques

D'après la monographie de référence de *Polygala senega*, nous contrôlons la TM en ajoutant 1mL de celle-ci dans 9mL d'eau. Après agitation, il doit se former une mousse abondante causée par les saponosides. Ces derniers apportent également une coloration jaune au mélange. Les saponosides sont des hétérosides assez fréquents chez les végétaux. Ils sont caractérisés par des propriétés tensio-actives, d'où la formation d'une solution moussante lorsque nous les mélangeons à l'eau. La racine de polygale renferme environ 10% de saponosides.



	R¹	R²	R³
Senegin II	-H	-OMe	-H
Senegin III	Rha	-H	-H
Senegin IV	Rha	-H	Api
Senegasaponin a	-H	-H	Api
Senegasaponin b	-H	-H	-H

***Figure 2** : structures chimiques des principaux senegasaponines identifiés dans la racine de polygala : Senegin II ($C_{70}H_{104}O_{32}$ MM 1457.56 g.mol^{-1}), senegin III ($C_{75}H_{112}O_{35}$ MM 1572.67 g.mol^{-1}, Senegin IV $C_{81}H_{122}O_{39}$ MM 1719.83 g.mol^{-1}, Senegasaponin a ($C_{74}H_{110}O_{35}$ MM : 1559.64420g.mol^{-1}), Senegasaponin b ($C_{69}H_{102}O_{31}$ MM : 1427.5296g.mol^{-1}).*

Une étude *in-vitro* sur des cultures de cellules a montré que ces saponines ont un effet anti-prolifique et anti-angiogénique, intéressant pour le traitement contre les cancers [3]. Ce potentiel anti-cancéreux a également été étudié avec la mise en nanoparticules directement un extrait hydroalcoolique de racine de polygala. Ces nanoparticules ont montré une activité cytotoxique contre des cellules cancéreuses de foie de souris, mais pas contre les cellules saines [4]. Des essais d'activités biologiques *in-vitro* sur différentes lignées cellulaires ont également montré que certains extraits de polygala présentaient une activité anti-inflammatoire [5].

Une classe d'oligosaccharides a également été identifiée dans polygala. Ces molécules sont appellés senegoses A à I [6, 7].

3. Résultats et discussion

a. Analyse des composés polaires de la TM en GC-MS après dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
glycolic acid - 1077-147
alanine - 1108-116
butylamine - 1111-174
ethanolamine - 1283-174
glycerol - 1291-205
glyceric acid - 1349-292
fumaric acid - 1356-245
salicylic acid - 1524-267
erythritol - 1528-217
pyroglutamic acid - 1535-156
4-aminobutyric acid - 1542-304
xylose - 1685-307
xylitol - 1744-319
citric acid - 1839-273
sorbose - 1905-307
fructose - 1915-307
glucose - 1934-319
galactose - 1953-319
gluconic acid - 2045-333
myoinositol - 2136-318
stearic acid - 2257-341
sucrose - 2736-361
trehalose - 2844-361
MOLECULES PUTATIVES
[phosphoric acid (3TMS)] - 1291-299

Tableau 1 *: liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode polaire dans la TM Polygala. Nomenclature : NOM - Indice de rétention – Ion caractéristique.*

b. Analyse des composés volatiles de la TM en GC- MS sans dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
o-cresol - 1048-108
heptanoic acid, ethyl ester - 1094-88
benzoic acid, ethyl ester - 1169-105
methyl salicylic acid - 1193-120
benzoic acid, 2-hydroxy-, ethyl ester - 1272-166
α-curcumene - 1488-132

2,4-di-tert-butylphenol - 1514-191
tetradecanoic acid, ethyl ester - 1795-101
pentadecanoic acid, ethyl ester - 1894-101
hexadecanoic acid, ethyl ester - 1995-101
linoleic acid ethyl ester - 2162-263
octadecanoic acid, ethyl ester - 2194-101
MOLECULES PUTATIVES
[hexane, 1,1-diethoxy-] - 1089-103
[nonanoic acid, ethyl ester] - 1296-101
[2-octenal, 2-butyl-] - 1376-182
[ethyl 9-hexadecenoate] - 1974-237
[ethyl 9-hexadecenoate] - 1983-237
[heptadecanoic acid, ethyl ester] - 2094-101
[(E)-9-octadecenoic acid ethyl ester] - 2178-264
[cis-11-eicosenoic acid, methyl ester] - 2372-292
[eicosanoic acid, ethyl ester] - 2395-101
[ethyl 13-docosenoate] - 2572-320
[docosanoic acid, ethyl ester] - 2597-368
[chondrillasterol] - 3330-271
[phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-, phosphite (3:1)] - 3443-441

Tableau 2 *: liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode apolaire dans la TM Polygala. Nomenclature : NOM – Indice de rétention – Ion caractéristique.*

c. Analyse de la TM en UPLC-MS/MS mode MRM

MOLECULES IDENTIFIEES
rutin
quercetin-3-O-glucoside
kaempferol-3-O-rutinoside
kaempferol
quercetin
isorhamnetin (isomer 1)
isorhamnetin (isomer 2)
kaempferol-3-O-glucoside
coumaric acid
phenylalanine
ferulic acid
tryptophane
sinapic acid

MOLECULES PUTATIVES
[isorhamnetin-hexoside]

Tableau 3 *: liste des molécules identifiées et putatives en UPLC-MS/MS dans la TM polygala.*

4. Conclusion

A l'aide de ces trois méthodes d'analyses, nous identifions une soixantaine de molécules. Nous retrouvons de nombreux métabolites issus de la famille des sucres. Beaucoup de molécules type saponine et phénolique sont conjugués avec des oses. Certains acides, comme l'acide benzoïque et l'acide férulique forment souvent des liaisons ester avec les oligosaccharides type senegoses [6].

5. Bibliographie

1. Jean, Bruneton., *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e ed.)*. 2009: Lavoisier. p841-842.

2. *http://old.tcmwiki.com/wiki/radix-polygalae*.

3. Arai, M., et al., *Anti-angiogenic effect of triterpenoidal saponins from Polygala senega.* J Nat Med, 2011. **65**(1): p. 149-56.

4. Paul, S., et al., *Anticancer Potentials of Root Extract of Polygala senega and Its PLGA Nanoparticles-Encapsulated Form.* Evid Based Complement Alternat Med, 2011. **2011**.

5. Van, Q., et al., *Anti-inflammatory effect of Inonotus obliquus, Polygala senega L., and Viburnum trilobum in a cell screening assay.* J Ethnopharmacol, 2009. **125**(3): p. 487-93.

6. Saitoh, H., T. Miyase, and A. Ueno, *Senegoses A--E, oligosaccharide multi-esters from Polygala senega var. latifolia Torr. et Gray.* Chem Pharm Bull (Tokyo), 1993. **41**(6): p. 1127-31.

7. Saitoh, H., T. Miyase, and A. Ueno, *Senegoses F--I, oligosaccharide multi-esters from the roots of Polygala senega var. latifolia Torr. et Gray.* Chem Pharm Bull (Tokyo), 1993. **41**(12): p. 2125-8.

Chapitre 10 : *Eucalyptus globulus*

1. Description générale

Le gommier bleu *Eucalyptus globulus* est un très grand arbre (jusqu'à 50m de haut) originaire d'Australie (***Figure 1***). Il est de nos jours présent dans d'autres régions du monde, comme l'Europe où il est largement planté au Portugal, en Espagne et en Italie [1]. L'intérêt du genre *Eucalyptus* sont ses feuilles riches en huiles essentielles (entre 5 et 35mL par kg) utilisées traditionnellement contre les affections bronchiques aigues bénignes. L'huile essentielle est fabriquée par entrainement à la vapeur d'eau suivi d'une rectification (2ème distillation) à partir des feuilles fraiches. Le profil phytochimique de l'huile essentielle est bien connu, mais peut beaucoup varier d'un chémotype à l'autre. C'est une toute autre méthode d'extraction que nous utilisons pour fabriquer la teinture-mère d'*Eucalytpus globulus* : nous faisons macérer les feuilles séchées dans un mélange éthanol/eau 65/35 v/v. Nous allons donc extraire des molécules plus polaires et moins volatiles que dans l'huile essentielle, bien que nous puissions y retrouver les molécules majoritaires de l'huile essentielle.

Figure 1 *: photographie de feuilles de gommier bleu [2].*

2. Bibliographie et connaissances scientifiques

Pour contrôler la bonne fabrication de la TM, nous dosons les flavonoïdes totaux, exprimés en rutine. Deux molécules d'intérêts sont également contrôlées par les Laboratoires Lehning dans la TM : l'eucalyptol (1,8 cinéol) et le terpinéol.

Les molécules majoritaires de l'huile essentielle peuvent être retrouvées dans la TM. Il s'agit de l'eucalyptol, l'α-pinène, le β-pinène, l'α-phellandrène, le limonène et le camphre (***Figure 2***).

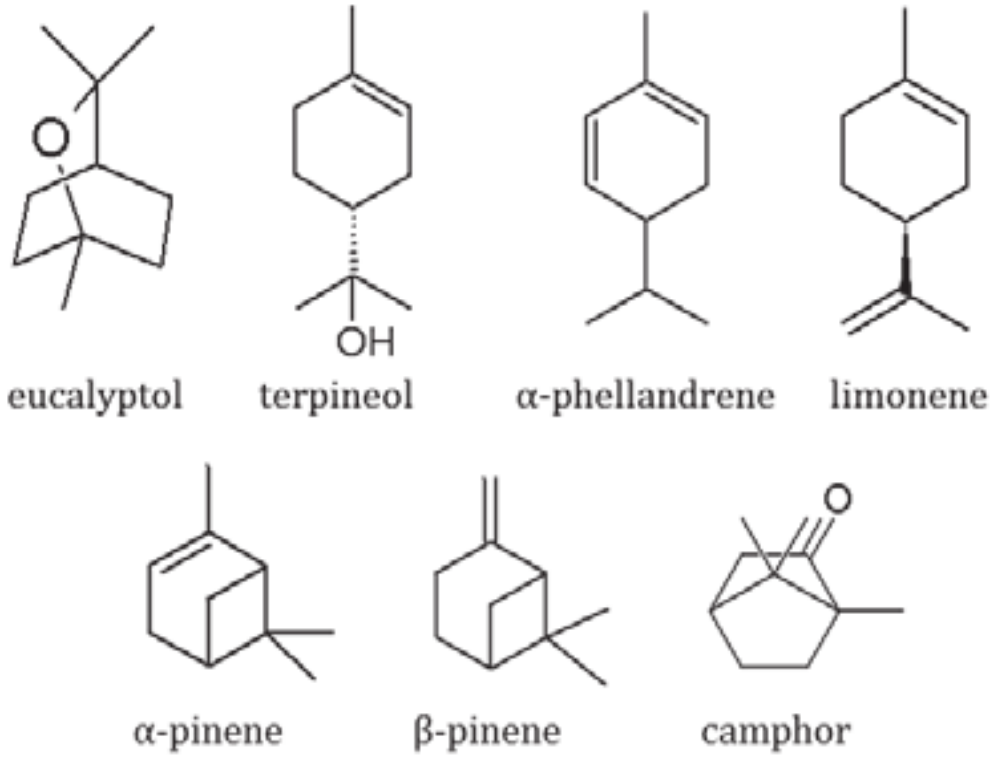


Figure 2 *: structures chimiques des principaux constituants de l'huile essentielle d'eucalyptus. Ils font partie de la famille des monoterpènes (molécules à 10 atomes de carbones). Eucalyptol ($C_{10}H_{18}O$, MM : 154.2493g.mol^{-1}), terpineol ($C_{10}H_{18}O$, MM : 154.2493g. mol^{-1}), α-phellandrene ($C_{10}H_{16}$, 136.234g.mol^{-1}), limonène ($C_{10}H_{16}$, 136.234g.mol^{-1}), α- et β-pinène ($C_{10}H_{16}$, 136.234g.mol^{-1}), camphre ($C_{10}H_{18}O$, MM : 154.2493g.mol^{-1}).*

En plus de l'huile essentielle, les poches sécrétrices de la feuille d'Eucalyptus peuvent contenir des esters monoterpéniques glycosylés, telles que la cuniloside B et la froggattiside A [3]. Des tests de bioactivités *in vitro* des monoterpènes glycosylés conjugués à l'acide gallique, ont montré que la globulosin A et B, la cypellocarpin A et eucaglobulin ont une activité antioxydante. Certaines d'entre-elles ont également une activité anti-inflammatoire et anti-cancéreuse [4].

Nous pouvons également retrouver des tanins tels que le tellimagrandin I, l'eucalbanin C, le 2-O-digalloyl-1,3,4-tri-O-galloyl-beta-D-glucose et le 6-O-digalloyl-1,2,3-tri-O-galloyl-beta-D-glucose [5]. Enfin, l'eucalyptone montre des effets cariostatique[6].

3. Résultats et discussion

a. Analyse des composés polaires de la TM en GC-MS après dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
ethanolamine - 1282-174
succinic acid - 1325-147
glyceric acid - 1348-292
fumaric acid - 1356-245
α-terpinyl acetate - 1363-136
malic acid - 1502-233
erythritol - 1526-217
xylitol - 1742-319
quinic acid - 1886-345
sorbose - 1901-307*
sorbose - 1912-307*
glucose - 1929-319*
galactose - 1949-319
dibutyl phthalate - 1965-149
gallic acid - 1973-458
glucose - 2007-204*
gluconic acid - 2040-333
myoinositol - 2132-318
sucrose - 2724-361
gentiobiose - 2906-361
catechin - 2929-368
chlorogenic acid - 3155-345
MOLECULES PUTATIVES
[malic acid, 4-ethyl ester] - 1459-233
[3,4,5-Trihydroxybenzoic acid, ethyl ester] - 1954-414

Tableau 1 *: liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode polaire dans la TM Eucalyptus globulus. Nomenclature : NOM - Indice de rétention – Ion caractéristique. (*) : Formes ou nombre de TMS différents.*

b. Analyse des composés volatiles de la TM en GC- MS sans dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
α-pinene - 948-93
β-pinene - 982-93
cineole - 1035-154
terpinene - 1058-93
butanoic acid, 3-methyl-, 3-methylbutyl ester - 1102-85
fenchol - 1111-81
isopinocarveol - 1138-92
cis-carveol - 1218-109
exo-2-hydroxycineole acetate - 1345-108
α-terpinyl acetate - 1354-136
copaene - 1382-161
geraniol acetate - 1385-69
calarene - 1440-161
aromadendrene - 1451-204
alloaromadendrene - 1471-204
δ-Guaijene - 1480-161
ç-Muurolene - 1483-161
γ-Cadinene - 1521-161
viridiflorol - 1569-204
spathulenol - 1587-205
globulol - 1596-161
rosifoliol - 1632-164
2-pentadecanone, 6,10,14-trimethyl- - 1846-109
n-hexadecanoic acid - 1965-256
hexadecanoic acid, ethyl ester - 1994-101
phytol - 2115-123
linoleic acid ethyl ester - 2162-95
squalene - 2834-81
vitamin E - 3146-430
MOLECULES PUTATIVES
[pinocarvone] - 1162-135
[borneol] - 1165-95
[p-menth-1-en-4-ol] - 1177-111
[α-terpineol] - 1190-136
[isoledene] - 1379-161
[α-gurjunene] - 1417-204
[ç-gurjunene] - 1421-189
[1H-cyclopropa[a]naphthalene, decahydro-1,1,3a-trimethyl-7-methylene-] - 1435-189
[α-selinene] - 1494-91
[aristol-1(10)-en-9-yl isovalerate] - 1527-202
[α-eudesmol] - 1660-149
[benzeneacetic acid, 2-phenylethyl ester] - 1917-104

[9,12,15-octadecatrienoic acid, ethyl ester, (Z,Z,Z)-] - 2169-79
[4,8,12,16-tetramethylheptadecan-4-olide] - 2354-99
[α-tocospiro A] - 2884-419
[ç-sitosterol] - 3334-414
[ursolic aldehyde] - 3670-203

***Tableau 2** : liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode apolaire dans la TM Eucalyptus globulus. Nomenclature : NOM – Indice de rétention – Ion caractéristique.*

Nous identifions un très grand nombre de molécules volatiles caractéristiques des huiles essentielles d'eucalyptus. Toutes les molécules identifiées à l'aide de ces méthodes GC-MS ont pu être extraites des feuilles d'eucalyptus grâce à la technique de fabrication des TM, à savoir une macération dans un mélange hydro-alcoolique pendant plusieurs semaines. Cette méthode extraction permet à la fois d'obtenir un très grand nombre de molécules volatiles caractéristiques de l'huile essentielle d'eucalyptus, mais aussi des molécules plus polaires telles que l'acide chlorogénique ou le catéchine. Cela en fait un extrait enrichi en molécules intéressantes pour la santé humaine.

c. Analyse de la TM en UPLC-MS/MS mode MRM

MOLECULES IDENTIFIEES
rutin
quercetin-3-O-glucoside
kaempferol-3-O-rutinoside
kaempferol
quercetin
isorhamnetin (isomer 1)
isorhamnetin (isomer 2)
kaempferol-3-O-glucoside
coumaric acid
phenylalanine
ferulic acid
tryptophane
sinapic acid
MOLECULES PUTATIVES
[isorhamnetin-hexoside]

***Tableau 3** : liste des molécules identifiées et putatives en UPLC-MS/MS dans la TM d'Eucalyptus globulus.*

4. Conclusion

Les trois approches métabolomiques ont contribué de manière complémentaire à l'identification d'un grand nombre de molécules dans la TM d'*Eucalyptus*. En plus des composés volatils retrouvés dans les huiles essentielles d'Eucalyptus, nous avons pu identifier des acides phénoliques, des flavonoïdes, des sucres et des acides organiques.

5. Bibliographie

1. Jean, Bruneton., *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e ed.)*. 2009: Lavoisier. p. 661-664.

2. *https://aromaticstudies.com/about-eucalyptus-globulus-and-18-cineole*.

3. Goodger, J.Q., et al., *Non-volatile components of the essential oil secretory cavities of Eucalyptus leaves: discovery of two glucose monoterpene esters, cuniloside B and froggattiside A.* Phytochemistry, 2009. **70**(9): p. 1187-94.

4. Hasegawa, T., et al., *Bioactive monoterpene glycosides conjugated with gallic acid from the leaves of Eucalyptus globulus.* Phytochemistry, 2008. **69**(3): p. 747-53.

5. Hou, A.J., et al., *Hydrolyzable tannins and related polyphenols from Eucalyptus globulus.* J Asian Nat Prod Res, 2000. **2**(3): p. 205-12.

6. Osawa, K., et al., *Eucalyptone from Eucalyptus globulus.* Phytochemistry, 1995. **40**(1): p. 183-184.

Chapitre 11 : *Sumbulus moschatus*

1. Description générale

La teinture-mère *Sumbulus moschatus,* parfois appelée racines de musc, est fabriquée à partir des parties souterraines séchées de *Ferula sumbul*. C'est une espèce appartenant à la famille des Apiacées (***Figure 1***). Elle est originaire de Russie, d'Inde et d'Ouzbékistan. C'est l'une des rares plantes, avec certaines angéliques, à produire dans ses racines une odeur de musc caractéristique. La plante est utilisée principalement en homéopathie en tant qu'anxiolytique et antispasmodique. Les racines sont macérées dans un mélange d'éthanol/eau 65/35 v/v pendant plusieurs semaines.

Figure 1 *: photographie de la plante entière de Sumbulus moschatus [1].*

2. Bibliographie et connaissances scientifiques

La plante n'est pas très bien caractérisée du point de vue phytochimique. Elle possède des huiles essentielles et des tanins que nous dosons pour contrôler la TM. Cette dernière doit avoir au minimum une teneur en huiles essentielles de 0.40% (V/m) et une teneur en tanins de 0.03% (m/m), exprimée en pyrogallol ($C_6H_6O_3$, MM : 126.1g.mol^{-1}).

Les racines de musc produisent également des coumarines, classe de composés phénoliques dérivés de la coumarine (***Figure 2***). De nombreuses molécules de cette famille ont été caractérisées par RMN, comme des esters de furanocoumarines (fesumtuorine A et B), bicoumarine, (fesumtuorine C), cinq spirobicoumarines (fesumtuorine D, E, F, G et H) et des coumarines ubiquitaires, tel que l'ombelliférone [2]. Leurs structures chimiques sont présentées en ***Annexe 1***. Le moschatol et la sumferin ont également été identifiés [3].

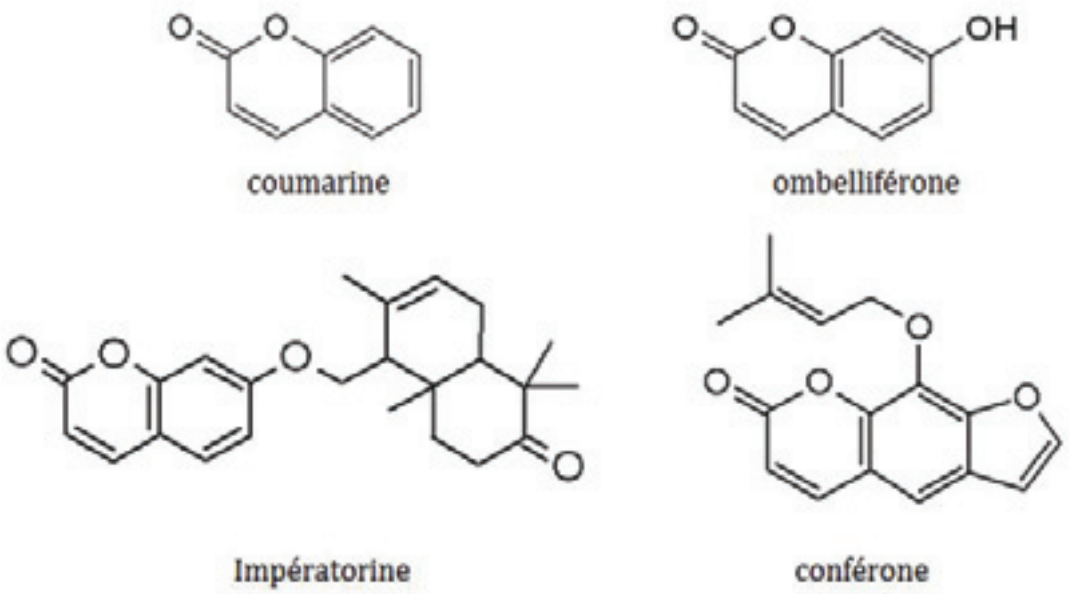


Figure 2 *: structures chimiques de la coumarine (ou 2H-1-benzopyrane-2-one ; $C_9H_6O_2$, MM : 146.143g.mol^{-1}), Ombelliféronne ($C^9H^6O^3$, MM : 162.142g.mol^{-1}), Imperatorine ($C_{16}H_{14}O_4$, MM : 270.280g.mol^{-1}), conférone ($C_{24}H_{28}O_4$, MM: 380.477g.mol^{-1}).*

3. Résultats et discussion

a. Analyse des composés polaires de la TM en GC-MS après dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
glycolic acid - 1076-147
pyruvic acid - 1090-147
alanine - 1099-116*
alanine - 1103-116*
alanine - 1105-116*
malonic acid - 1210-147
valine - 1225-144
ethanolamine - 1278-174
succinic acid - 1322-247
glyceric acid - 1346-292
fumaric acid - 1355-245
nonanoic acid - 1365-215
serine - 1375-204
threonine - 1404-219
aspartic acid - 1434-160*
β-alanine - 1440-248
malic acid - 1505-147
pyroglutamic acid - 1535-156
aspartic acid - 1538-232*
4-aminobutyric acid - 1542-175
p-hydroxybenzoic acid - 1636-267
asparagine - 1686-231
xylitol - 1747-217
vanillic acid - 1772-312
DL-glycerol-3-phosphate - 1784-357
ribonic acid - 1808-292
citric acid - 1840-273
quinic acid - 1890-345
sorbose - 1899-307*
sorbose - 1906-307*
fructose - 1911-307
sorbose - 1916-307*
glucose - 1925-319*
glucose - 1932-205*
galactose - 1948-319
glucuronic acid - 1977-333
gluconic acid - 2030-333*
gluconic acid - 2035-292*
ferulic acid - 2096-338

myoinositol - 2116-318*
myoinositol - 2123-318*
octadecadienoic acid - 2210-337
2-O-glycerol-β-D-galactopyranoside - 2216-204
tryptophan - 2237-202
3-trans-caffeoylquinic acid - 3137-345
MOLECULES PUTATIVES
[benzoic acid, 3,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester] - 1829-370
[caffeic acid-TMS_ether] - 2144-396

Tableau 1 *: liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode polaire dans la TM Sumbulus moschatus. Nomenclature : NOM - Indice de rétention – Ion caractéristique. (*) : Formes ou nombre de groupements TMS différents. Nous observons beaucoup de molécules identifiées plusieurs fois dans cette analyse. C'est un symptôme d'une dérivation incomplète de l'échantillon, conduisant, pour chaque molécule, à l'identification de plusieurs formes avec un nombre différents de groupements TMS greffés dessus.*

b. Analyse des composés volatiles de la TM en GC- MS sans dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
α-pinene - 948-93
δ-carene - 1012-93
paracymene - 1025-119
terpinene - 1057-136
α-campholenal - 1124-108
sabinol - 1137-92
cis-verbenol - 1143-109
benzoic acid, ethyl ester - 1168-105
fenchyl acetate - 1220-136
anisole, 2-isopropyl-5-methyl- - 1244-149
bornyl acetate - 1288-95
longipinene - 1356-119
cyclosativene - 1373-204
longicyclene - 1377-204
copaene - 1381-161
calarene - 1439-161
aromadendrene - 1446-204
curcumene - 1488-132
myristicin - 1527-192
δ-Cadinene - 1530-204
α-calacorene - 1550-157
elemicin - 1560-208
γ-eudesmol - 1629-204
agarospirol - 1644-161
β-eudesmol - 1660-149

pentadecanoic acid, ethyl ester - 1895-101
hexadecanoic acid - 1972-256
hexadecanoic acid, ethyl ester - 1997-101
9,12-octadecadienoic acid (Z,Z)- - 2145-95
linoleic acid, ethyl ester - 2167-263
octadecanoic acid, ethyl ester - 2195-101
MOLECULES PUTATIVES
[hexanal, diethyl acetal] - 1090-129
[(3E)-6-methyl-3,5-heptadiene-2-one] - 1101-109
[pinocarvone] - 1162-108
[myrtenal] - 1196-79
[l-verbenone] - 1209-135
[myrtenyl acetate] - 1328-119
[2-bornene] - 1337-121
[(-)-aristolene] - 1426-105
[lanceol, cis] - 1867-134
[heptadecanoic acid, ethyl ester] - 2094-101
[(E)-9-octadecenoic acid ethyl ester] - 2172-264
[ç-sitosterol] - 3331-414
[phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-, phosphite (3:1)] - 3443-441
[ç-sitostenone] - 3472-412

Tableau 2 *: liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode apolaire dans la TM Sumbulus moschatus. Nomenclature : NOM – Indice de rétention – Ion caractéristique.*

c. Analyse de la TM en UPLC-MS/MS mode MRM

MOLECULES IDENTIFIEES
coumaric acid
phenylalanine
caffeic acid
ferulic acid
coumaroyl quinate
caffeoyl quinate
MOLECULE PUTATIVE
[1-palmitoylglycerophosphatidylcholine]

Tableau 3 *: liste des molécules identifiées et putatives en UPLC-MS/MS dans la TM Sumbulus moschatus.*

d. *Collecte de fractions par HPLC semi-préparative et identification de métabolites d'intérêts par HRMS.*

- Méthode HPLC semi-préparative

Tous les systèmes analytiques et les préparations d'échantillons sont décrits dans la « Partie II Matériel et Méthodes, VIII ».

La méthode chromatographique utilisée pour la collecte des fractions de la TM *Sumbulus moschatus* est décrite dans le ***Tableau 4***.

Temps (min)	débit (mL.min-1)	% A	% B
0	3	95	5
2	3	95	5
47	3	0	100
55	3	0	100
58	3	95	5
65	3	95	5

Tableau 4 *: gradient de solvant utilisé pour la séparation et la collecte des fractions issues de la TM Sumbulus moschatus. Solvant A : eau + 0.1% acide formique ; solvant B : méthanol + 0.1% acide formique.*

Nous avons collecté 5 fractions correspondant à des molécules inconnues (***Tableau 5***). Au total, nous avons effectué 8 injections de 100µL de TM. Les 8 réplicats de chaque fraction ont été regroupés et séchés au concentrateur pour être stockés à 4°C en attendant les analyses HRMS.

Fractions	molécules potentielles	m/z	tensions de cône QDA (V)	plages de collecte (min)
1	inconnue	172	5	38.31 – 38.56
2	inconnue	218	5	40.00 – 40.26
3	inconnue	455	5	45.50 – 45.73
4	inconnue	341	5	46.51 – 46.75
5	inconnue	339	5	46.92 – 47.20

Tableau 5 *: liste des fractions collectées à partir de la TM Sumbulus moschatus.*

- Identification par HRMS

Nous avons vérifié les différentes fractions par UPLC-MS juste après la collecte. Nous observons dans chaque fraction les masses attendues sauf pour la fraction 5. Nous retrouvons dans les fractions plusieurs m/z pouvant correspondre à des molécules différentes. Nous avons décidé de les identifier en HRMS.

Fractions	**m/z mesurés en UPLC-MS**	**m/z exacts mesurés en HRMS**	**Formules brutes**	**Molécules identifiées en HRMS/MS**
1	172	173.0960	$C_{12}H_{12}O$	/
		247.1326	$C_{15}H_{18}O_3$	zaluzanin **C**
		145.1012	$C_{11}H_{12}$	/
		387.2163	$C_{23}H_{30}O_5$	11-deoxyprednisone acetate
2	218	219.1746	$C_{15}H_{22}O$	germacrone
		357.2064	$C_{22}H_{28}O_4$	/
3	455	455.2435	/	/
4	341	341.2110	/	/
		371.2212	$C_{23}H_{30}O_4$	/
5	339	341.2115	/	/
		439.2484	$C_{27}H_{34}O_5$	/
		469.2587	$C_{28}H_{36}O_6$	/

Tableau 6 *: résultats des analyses HRMS de la TM Sumbulus moschatus.*

Neuf formules brutes ont pu être déterminées par HRMS, conduisant à l'identification de trois molécules à l'aide des spectres MS/MS. Le zaluzanine **C** est un sesquiterpène lactone, caractérisé pour la première fois dans le genre *Zaluzania* de la famille des Astéracées. D'autres sesquiterpènes lactones ont été identifiés dans le genre *Ferula* [4], mais c'est la première fois que le zaluzanine **C** est décrit chez *Ferula sumbul*, et tout particulièrement dans la TM *Sumbulus moschatus*. La molécule présente des propriétés antinéoplasiques [5]. La germacrone est une cétone sesquiterpénique découverte dans certaines huiles essentielles telles que les huiles essentielles de curcuma et du thé « du Labrador ». Au sein de la plante, elle intervient comme molécule de défense contre les herbivores [6]. Elle est également étudiée pour ses propriétés anticancéreuses [7].

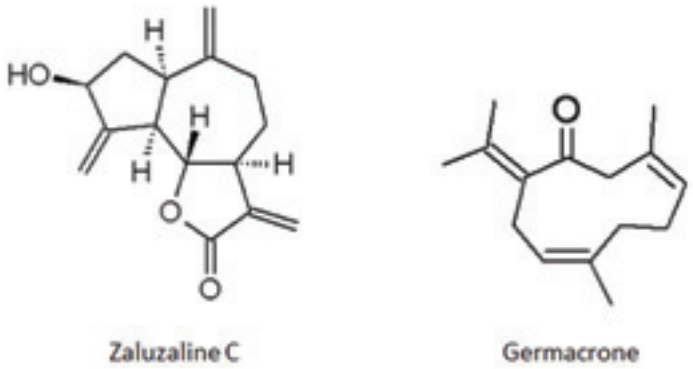


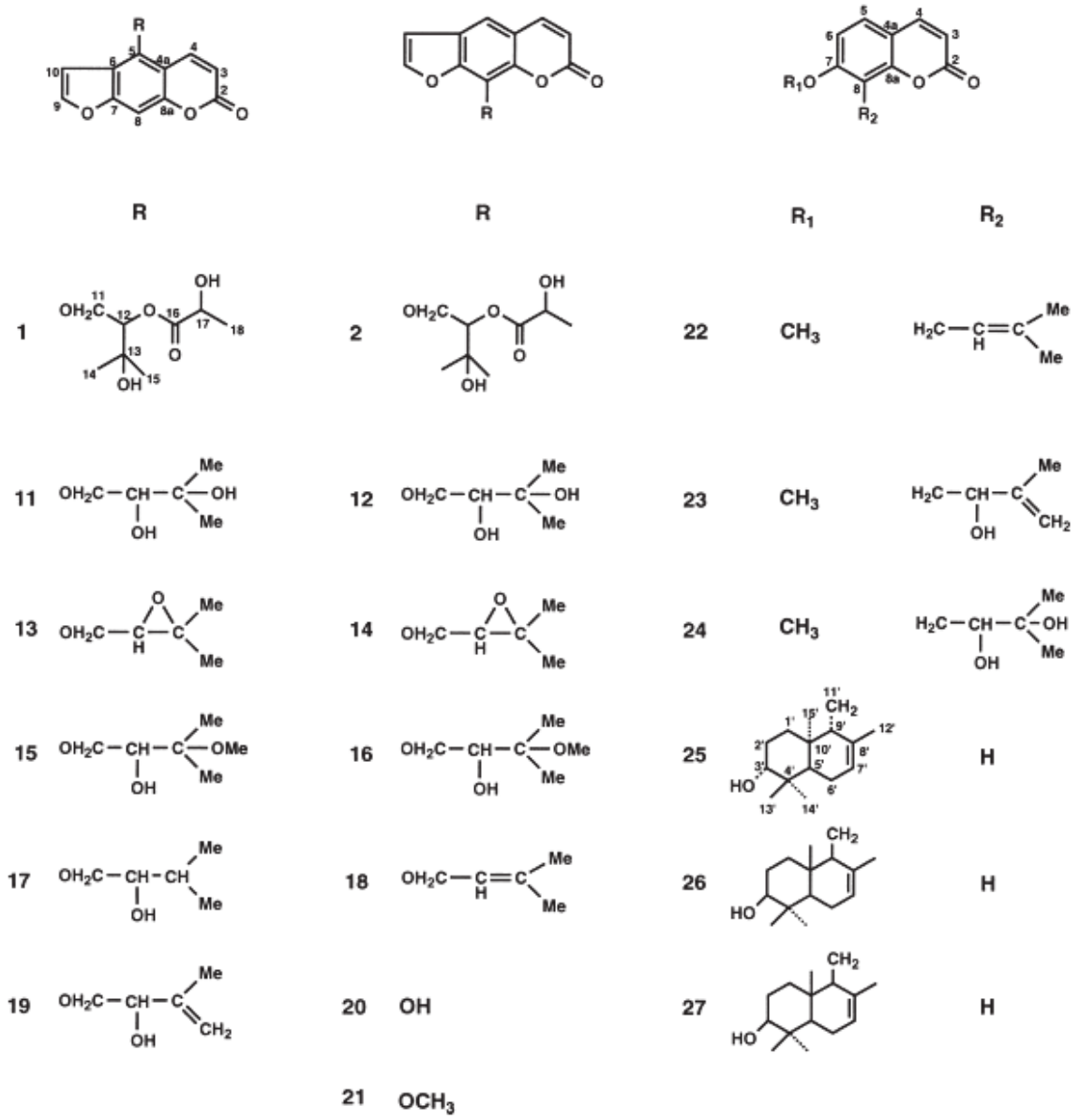
Figure 3 *: structures chimiques du zaluzaline* ***C*** *et du germacrone, identifiés en HRMS.*

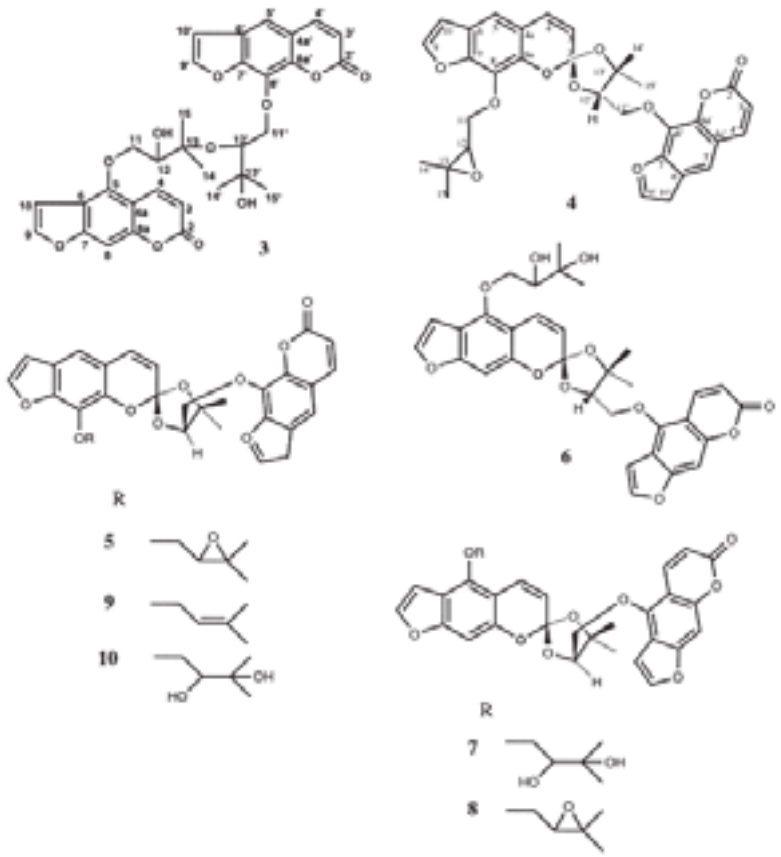
4. Conclusion

Nous avons identifié environ 80 molécules dans la TM *Sumbulus* à l'aide de nos deux méthodes GC-MS, appartenant aux familles des acides aminés, aux sucres, aux acides organiques et aux dérivés terpéniques principalement. Nous avons également décrit pour la première fois la présence de la zaluzanine **C** et de la germacrone dans Sumbulus, enrichissant ainsi les connaissances phytochimiques de cette espèce.

5. Annexes

Annexe 1 : structures chimiques des coumarines identifiées dans les racines de *Ferula sumbul.* D'après [2]. Fesumtuorin A (**1**), Fesumtuorin B (**2**), Fesumtuorin C (**3**), Fesumtuorin D (**4**), Fesumtuorin E (**5**), Fesumtuorin F (**6**), Fesumtuorin G (**7**), Fesumtuorin H (**8**), rivulobin D (**10**), oxypeucedanin hydrate (**11**), helaclenol (**12**), oxypeucedanin (**13**), helaclenin (**14**), oxypeucedanin methnolate (**15**), heraclenol 3'-methyl ester (**16**), pranferol (**17**), imperatorin (**18**), pabulenol (**19**), wanthoxol (**20**), xanthotoxin (**21**), osthol (**22**), auraptenol (**23**), meranzin hydrate (**24**), feselol (**25**), conferol (**26**), conferone (**27**).





6. Bibliographie

1. *http://www.homeopathyworldcommunity.com/group/clinicaltips/forum/topics/sumbul-in-arteriosclerosis*.

2. Zhou, P., et al., *Coumarins and bicoumarin from Ferula sumbul: anti-HIV activity and inhibition of cytokine release.* Phytochemistry, 2000. **53**(6): p. 689-697.

3. Khalilova, É.K. and A. Saidkhodzhaev, *Terpenoid coumarins ofFerula sumbul.* Chemistry of natural compounds, 1998. **34**(4): p. 506-507.

4. Kasaian, J., et al., *Sesquiterpene lactones from Ferula oopoda and their cytotoxic properties.* Journal of Asian natural products research, 2014. **16**(3): p. 248-253.

5. Santamaría, F., et al., *The mode of action of Zaluzanin C, an inhibitor of translation in eukaryotes.* Biochemical and biophysical research communications, 1984. **123**(1): p. 59-63.

6. Reichardt, P., et al., *Germacrone defends Labrador tea from browsing by snowshoe hares.* Journal of Chemical Ecology, 1990. **16**(6): p. 1961-1970.

7. Aggarwal, B.B., et al., *Curcumin-free turmeric exhibits anti-inflammatory and anticancer activities: Identification of novel components of turmeric.* Molecular nutrition & food research, 2013. **57**(9): p. 1529-1542.

Chapitre 12 : *Cicuta virosa*

1. Description générale

La ciguë aquatique (*Cicuta virosa*) fait partie de la famille des Apiacées (***Figure 1***). Elle est originaire essentiellement du nord et du centre de l'Europe. C'est une plante toxique, particulièrement au niveau de ses racines. La teinture-mère est fabriquée à partir des parties souterraines fraiches, macérées dans un mélange éthanol/eau 45/55 v/v.

Figure 1*: photographie des parties aériennes de Cicuta virosa [1].*

2. Bibliographie et connaissances scientifiques

Dans les Laboratoires Lehning, nous dosons les polyines totales, exprimées en cicutoxine ($C_{17}H_{22}O_2$, MM : 258.4g.mol^{-1}). La teneur doit être comprise entre 0.010 et 0.05% m/m.

Les polyines, ou alcools polyacétylèniques, appartiennent à la famille de molécules qui apportent la toxicité à la plante.

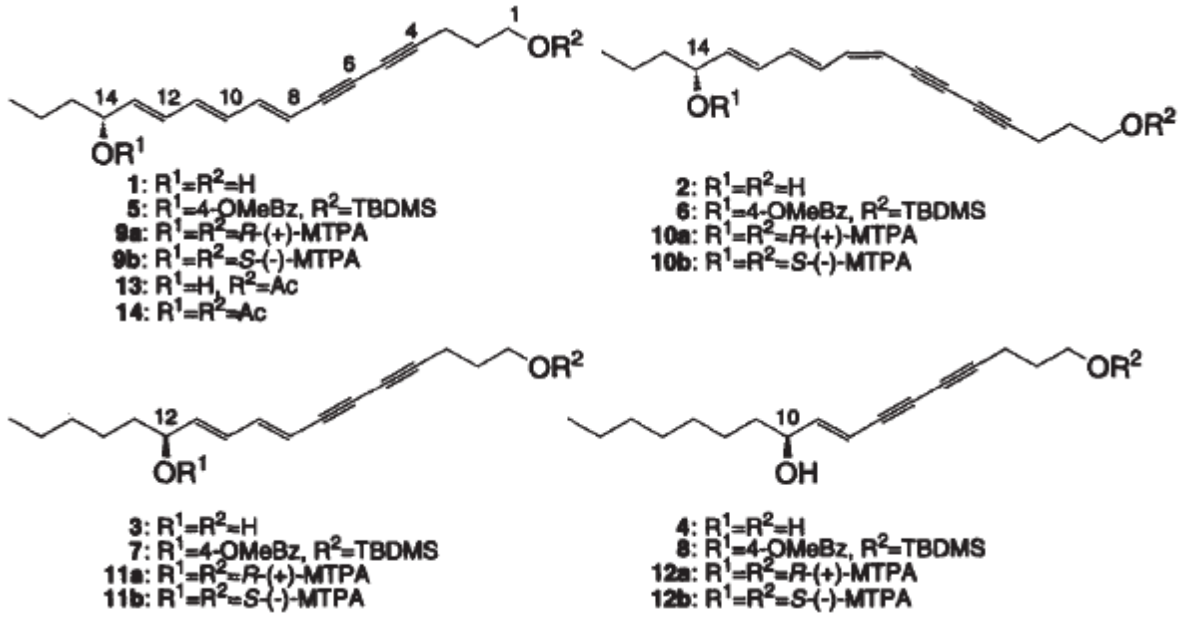


Figure 2 *: structure de la cicutoxine (1), l'isocicutoxine (2), virols A (3) et virols C (4), ainsi que leurs dérivés [2].*

Comme dans la plante *Ferula sumbul*, utilisée pour fabriquer la TM *Sumbulus moschatus*, nous retrouvons également des coumarines, assez courants dans la famille des Apiacées. L'umbelliprenine, l'imperatorine et l'isoimperatorine ont été identifiées dans les racines [3]. D'autres coumarines, dont une dimérique, la diarchangelicin A, ont également été caractérisées dans la ciguë, mais dans les parties aériennes de la ciguë [4]. Parmi elles se trouvent : l'archangelicine ; la libanorine ; la columbianedine ; l'isoedultine ; la zosimine, l'acide 2-methylbut-(2Z)-enoic-(9R,10R)-10-hydroxy-8,8-dimethyl-9,10-dihydro-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b0]dipyran-2- one-9-yl ester ; la daucoidine; l'ammijine ; la columbianetin-β-D-glucoside et l'apterine. Les structures sont présentées en ***Annexe 1***.

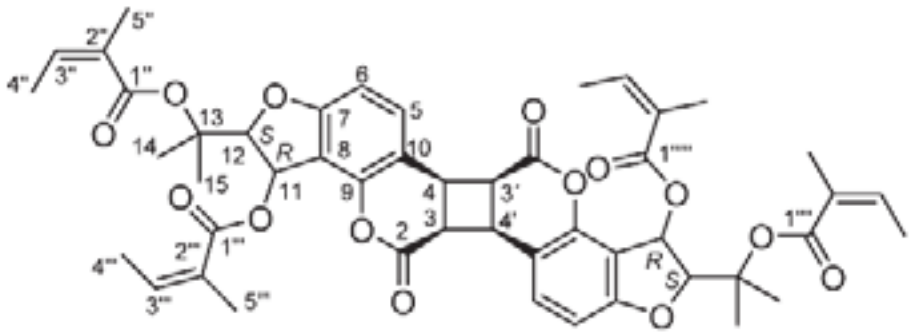


Figure 3 *: structure de la diarchangelicin A ($C_{48}H_{52}O_{14}$, MM : 852.335g.mol^{-1}).*

3. Résultats et discussion

a. Analyse de la TM en UPLC-UV-MS

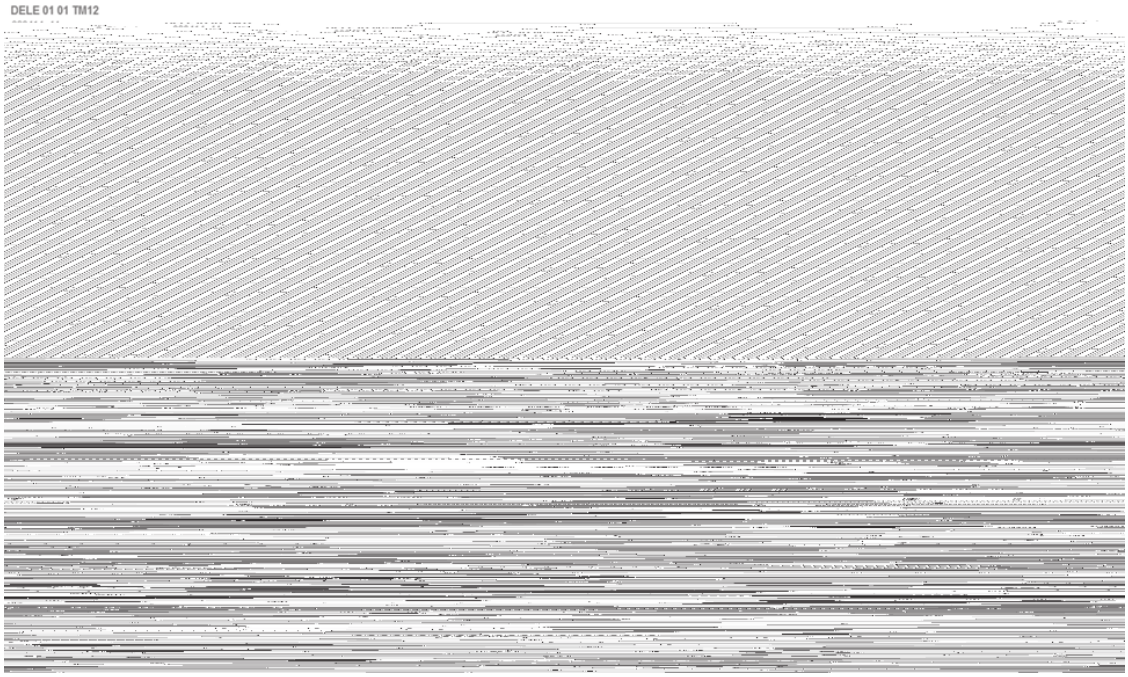


Figure 4 *: chromatogramme UV Scan 150-500nm complet (0-17min) de la TM Cicuta virosa.*

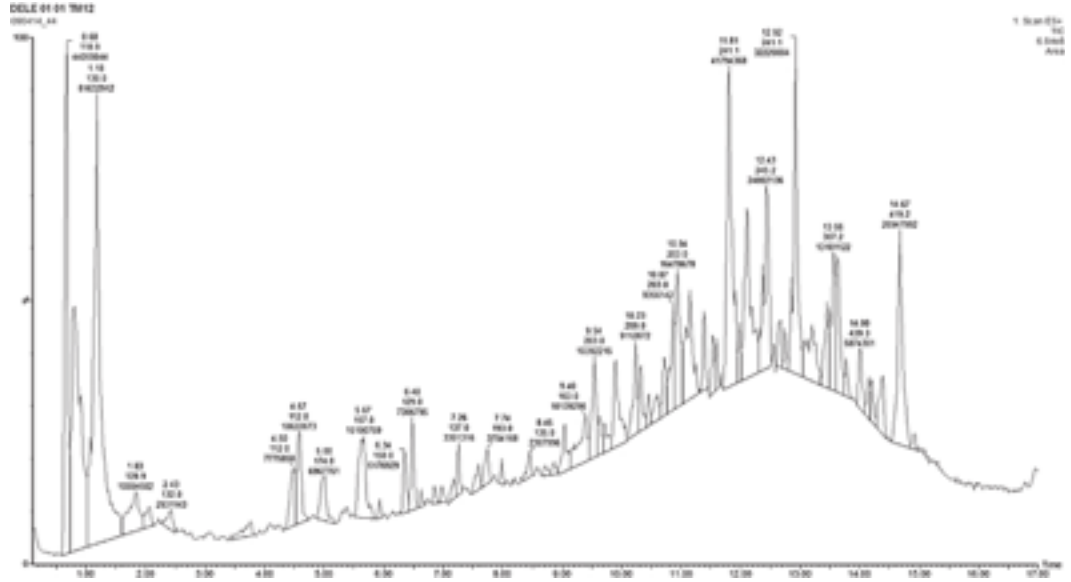


Figure 5 *: chromatogramme MS Scan 150-1000 m/z complet (0-17min) de la TM Cicuta virosa.*

Pic majoritaire	Aire sous pic	Temps de rétention (s)	λmax (nm)	λmax secondaire (nm)
1	10727457	11,74	306,2	318>331>250>241>195
2	4185762	12,86	316,2	316>333>197>250>222
3	2618442	12,05	235,2	235>293>225>195>310
4	2133683	1,13	248,2	195>253
5	1506347	11,79	196,2	196>317>333>254
6	1353706	9,83	194,2	195>235>225>293>311
7	1312660	9,83	194,2	195>224>235>293>311
8	1300781	9,48	195,2	195>216>285
9	1051872	0,87	198,2	195>198>263
10	1051748	10,87	195,2	195>216>285>269
11	1002552	0,69	196,2	195
12	801770	11,85	195,2	195>216>317>335
13	732796	11,09	195,2	195>220>293
14	728465	11,02	194,2	195>219>293
15	705680	0,99	234,2	234>193
16	619780	7,93	194,2	194>216>322
17	613603	0,76	194,2	194
18	608276	10,18	195,2	195>216>298
19	514860	11,32	196,2	195>216>293
20	497421	12,79	196,2	196>219>316>254
21	487119	12,41	198,2	196>213>266>282>252
22	485584	12,41	198,2	196>213>266>282>252
23	479883	1,07	195,2	195
24	433649	7,19	194,2	194>278
25	426785	1,09	195,2	195
26	409543	7,19	194,2	194>278
27	405382	0,81	193,2	193>272
28	402102	1,03	194,2	193>231
29	378885	12,13	195,2	195>221>293
30	375255	10,25	195,2	195>217>319

Tableau 1 *: liste des 30 pics chromatographiques majoritaires observés en UPLC-UV Scan 190-500nm. Ils sont classés par ordre d'abondance (aires décroissantes) après intégration automatique.*

Pic majoritaire	Aire sous pic	Temps de rétention (s)	m/z majoritaire (Da)	m/z secondaire (Da)
1	81632912	1,18	130,0	130>112>146>163>145>136>118>158
2	56233760	0,81	104,1	104>175>159>145>127>219>148>163
3	44059844	0,68	118,9	119>137>151>105>133>123>121
4	41794368	11,81	241,1	241>155>257>242>129>199>169>181

5	32220004	12,92	241,1	241>155>242>279>199>129>277>201
6	27955088	12,11	243,1	243>241>261>259>201>323>278>173
7	24802136	12,43	245,2	245>277>323>161>219>246>149>147
8	18554304	11,15	275,1	203>275>175>157>185>173>129>257
9	16478678	10,94	203,0	203>175>185>209>275>259>157>129
10	15190759	5,67	157,0	157>175>221>185>203>244>147>129
11	11903550	9,90	203,0	203>153>175>185>275>315>135>157
12	10884582	1,83	128,9	132>163>129>130>147>145>157>127
13	10622673	4,57	112,0	112>158>144>113>120>159>166
14	10392215	9,54	203,0	203>275>175>185>135>129>257>157
15	10139296	9,40	163,0	163>310>203>129>257>359>275>139
16	9356142	10,87	203,0	203>175>185>275>257>231>338>343
17	9112872	10,23	209,0	209>210>203>275>211>257
18	7775850	4,50	112,0	112>158>120>166
19	7306795	6,48	129,0	129>115>101>147>136>133>157>169
20	6967761	5,00	174,0	174>117>158>145>163>127>112>185
21	5587594	9,05	128,9	129>195>115>135>175>130>153>151
22	5465729	10,32	176,9	177>223>209>203>178>225>143>133
23	5449818	11,38	203,0	203>261>175>243>185>275>257>157
24	5230871	10,71	239,0	239>203>175>185>141>121>338>257
25	5176929	6,34	158,0	112>158>204>144>337>217>178>205
26	4709842	11,52	137,0	137>261>243>113>111>322>255>193
27	4408549	12,67	148,9	149>205>299>279>155>317>945>277
28	3759268	11,98	257,1	257>259>241>303>205>175>157>135
29	3704168	7,74	193,0	193>135>117>211>167>145>153>256
30	3463394	3,76	163,0	163>145>226>144>127>231>133>216

Tableau 2 : *liste des 30 pics majoritaires observés en UPLC-MS ESI+ scan 100 – 1000 Da. Ils sont classés par ordre d'abondance (aires décroissantes) après intégration automatique.*

b. Analyse des composés polaires de la TM en GC-MS après dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
ethanolamine - 1282-174
succinic acid - 1325-147
fumaric acid - 1356-245
malic acid - 1502-233
4-aminobutyric acid - 1541-174
threonic acid - 1563-292
xylose - 1678-307*
xylose - 1685-307*
citric acid - 1838-273
sorbose - 1904-307*
sorbose - 1914-307*

glucose - 1925-319*
glucose - 1932-319*
galactose - 1951-319
ferulic acid - 2106-338
myoinositol - 2134-305
sucrose - 2729-361
maltose - 2838-361
raffinose - 3540-361
MOLECULES PUTATIVES
[alanine, DL- (2TMS)] - 1109-116
[phosphoric acid] - 1290-299
[pyroglutamic acid] - 1534-156
[fructofuranose,D-] - 1831-437
[quinic acid] - 1888-345
[glucopyranose] - 1921-204*
[glucopyranose] - 2009-204*
[gluconic acid] - 2043-333

Tableau 3 *: liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode polaire dans la TM Cicuta virosa. Nomenclature : NOM - Indice de rétention – Ion caractéristique. (*) : Formes ou nombre de groupements TMS différents.*

c. Analyse des composés volatiles de la TM en GC- MS sans dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
heptanal - 918-70
α-pinene - 946-93
1-heptanol - 971-70
β-pinene - 982-93
1-octanol - 1066-84
2-nonanone - 1088-71
heptanoic acid, ethyl ester - 1094-88
fenchol - 1111-81
benzoic acid, ethyl ester - 1168-105
octanoic acid, ethyl ester - 1195-88
citronellol - 1226-123
butanoic acid, 3-methyl-, hexyl ester - 1241-103
geraniol - 1253-69
1-decanol - 1271-97
citronellol acetate - 1354-138
butanoic acid, 3-methyl-, phenylmethyl ester - 1397-108
benzene, 1,2-dimethoxy-4-(2-propenyl)- - 1406-178
myristicin - 1526-192
benzene, 1,2,3-trimethoxy-5-(2-propenyl)- - 1560-208

nerolidol - 1567-161
spathulenol - 1585-205
(-)-guaiol - 1604-161
δ-eudesmol - 1628-189
α-eudesmol - 1639-204
isovaleric acid, cinnamyl ester - 1686-115
farnesol - 1725-69
benzoic acid, 2-hydroxy-, phenylmethyl ester - 1872-91
MOLECULES PUTATIVES
[butanoic acid, 3-methyl-, ethyl ester] - 886-88
[propane, 1,1-diethoxy-2-methyl-] - 891-103
[butane, 1,1-diethoxy-] - 920-103
[butane, 1,1-diethoxy-3-methyl-] - 960-115
[pentane, 1,1-diethoxy-] - 997-115
[hexane, 1,1-diethoxy-] - 1090-129
[pinocarvone] - 1162-135
[-(-)borneol] - 1165-95
[p-menth-1-en-4-ol] - 1177-111
[butanedioic acid, diethyl ester] - 1178-129
[α-terpineol] - 1190-136
[cyclodecene, (Z)-] - 1266-95
[cyclodecene] - 1462-95
[phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-] - 1515-191
[palustrol] - 1576-204
[pregnenolone] - 2724-316
[phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-, phosphite (3:1)] - 3443-441

Tableau 4 *: liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode apolaire dans la TM Cicuta virosa. Nomenclature : NOM – Indice de rétention – Ion caractéristique.*

d. Analyse de la TM en UPLC-MS/MS mode MRM

MOLECULES IDENTIFIEES
dihydroquercetin
coumaric acid
phenylalanine
ferulic acid
tryptophane
MOLECULE PUTATIVE
[Isorhamnetin-hexoside]

Tableau 5 *: liste des molécules identifiées et putatives en UPLC-MS/MS dans la TM Cicuta virosa.*

e. *Collecte de fractions par HPLC semi-préparative et identification de métabolites d'intérêts par HRMS*

L'analyse de la TM en UPLC-MS scan 100-1000 m/z a permis de sélectionner les masses correspondant soit à des métabolites d'intérêts soit à des métabolites majoritaires inconnus. Les Extracted Ion Chromatograms (EIC) effectués pour les métabolites d'intérêts ont permis de mettre en évidence certaines masses pouvant correspondre au Virol A ; au falcarindiol ; au cicudiol ; à l'umbelliprenine ; à la cicutoxine ou l'isocicutoxine ; à l'imperatorine ou l'isoimperatorine et au virol C. Au total, nous avons sélectionné dix masses à collecter.

- Collecte des fractions

Le système de collecte HPLC semi-préparative est décrit dans la « Partie II Matériel et Méthodes, VIII ». Le gradient chromatographique utilisé est le suivant : 5% de MeOH pendant 2min, puis augmentation jusqu'à 100% de MeOH en 45min, plateau à 100% de MeOH pendant 8min, retour à 5% de MeOH en 3min et maintien à 5% de MeOH pendant 7min. La durée totale du run est de 65min, à un débit constant de 3mL.min^{-1}. Le volume d'injection est de 100µL. Le détecteur de masse QDA est programmé en mode ESI positif, avec une tension de cône de +5V pour tous les SIR.

fractions	m/z	molécules potentielles	tensions de cône (V)	plages de collecte (min)
1	175.5	inconnue	5	3.85 – 4.22
2	209.7	inconnue	5	33.56 – 33.75
4	228.8	inconnue	5	40.02 – 40.25
5	257.8	inconnue	5	40.26 – 40.52
6	261.9	inconnue	5	41.73 – 41.95
7	241.8	inconnue	5	42.00 – 42.22
fraction A	243.8	virol A	5	43.05 – 43.25
8	245.9	inconnue	5	43.88 – 44.12
10	181.6	inconnue	5	45.50 – 45.80
fraction B	241.8	umbelliprenine	5	50.62 – 50.90

Tableau 6*: liste des 10 fractions collectées à partir de la TM de Cicuta virosa.*

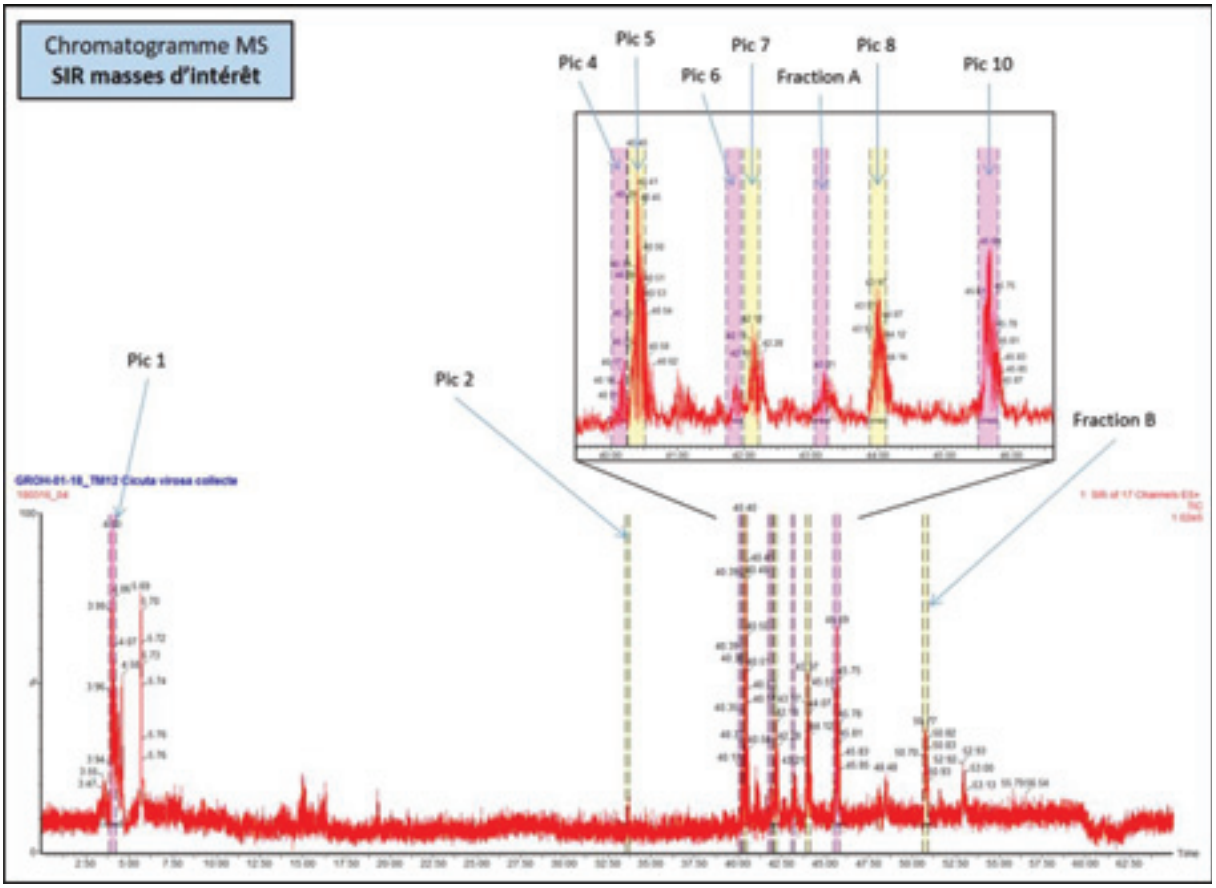


Figure 6 *: chromatogramme HPLC-MS complet (0 - 65min) de la collecte des fractions de la TM Cicuta virosa. Le chromatogramme correspond à la somme des SIR enregistrés pour chaque m/z décrit dans le* ***Tableau 6****. Les plages de collecte sont représentées en jaune et violet.*

- Vérification par UPLC-MS des fractions collectées

Nous avons vérifié les différentes fractions collectées en UPLC-MS mode Scan avant de les analyser en HRMS. Dans trois des dix fractions (Pic 1, Pic 10 et Fraction B), nous ne retrouvons pas les m/z recherchés. Pour les fractions Pic 4, Pic 5 et Fraction A, nous retrouvons en plus des m/z attendus un autre m/z (257.5, 241.5 et 277.3 respectivement). Ceci veut dire que certaines fractions ne sont pas pures. Enfin, pour les fractions Pic 2, Pic 6, Pic 7 et Pic 8, les m/z sont bien retrouvés en majorité. Au final, 7 fractions sont analysées en HRMS.

- Identification des métabolites par UPLC-HRMS

Fraction	Masse m/z mesurée en UPLC-UV-MS (Da)	Masse m/z exacte mesurée en haute résolution (Da)	Formule brute de la molécule	Molécules proposées	Identification de la molécule la plus probable
Pic 2	209,3	209,0809	$C_{11}H_{12}O_4$	• Sinapoyl aldehyde • 9-methoxymellein • Benzylsuccinate	**Sinapoyl aldehyde** (Score : 1)
Pic 4	257,5	257,1518	$C_{17}H_{20}O_2$	mSigma trop élevé	/
Pic 5	241,5	241,1587	$C_{17}H_{20}O$	Dehydrofalcarinone	**Dehydrofalcarinone** (Score : 1)
Pic 6	261,5	261,1843	$C_{17}H_{24}O_2$	• Virol A • Flacarindiol	**Virol A** (Score : 1)
Pic 7	243,5	243,1740	$C_{17}H_{22}O$	• Falcarinone • Dehydrofalcarinol	**Falcarinone** (Score : 1)
Fraction A	277,3	277,2157	$C_{18}H_{28}O_2$	• Stearidonic acid • Kinoprene	**Stearidonic acid** (Score : 1)
Pic 8	245,5	245,1899	$C_{17}H_{24}O$	Falcarinol	**Falcarinol** (Score : 1)

Tableau 7 *: résumé des identifications fines des molécules présentes dans les fractions collectées à partir de la TM de Cicuta virosa. Les masses exactes et les profils isotopiques obtenus des spectres MS et MS/MS permettent de comparer les fragmentations expérimentales aux fragmentations in silico, effectuées à l'aide du logiciel MetFrag. L'identification la plus probable donne un score de 1. Pour la fraction Pic 4, nous avons mesuré un profil isotopique mauvais, conduisant à un mSigma élevé. Nous ne pouvons donc pas identifier la molécule de manière précise.*

Nous avons pu identifier, grâce à la spectrométrie de masse haute-résolution, six molécules présentes dans la TM de *Cicuta virosa*. Nous retrouvons l'acide stéaridonique, un acide gras insaturé. La voie de biosynthèse des polyines et des molécules du type falcarinone est issue des acides gras [5]. Ces molécules ont en commun l'acide linoléique, un acide gras insaturé. Nous identifions donc principalement des molécules issues de la biosynthèse des acides gras. Le virol **A** présente la même activité que la cicutoxine mais il est trois fois moins toxique [6].

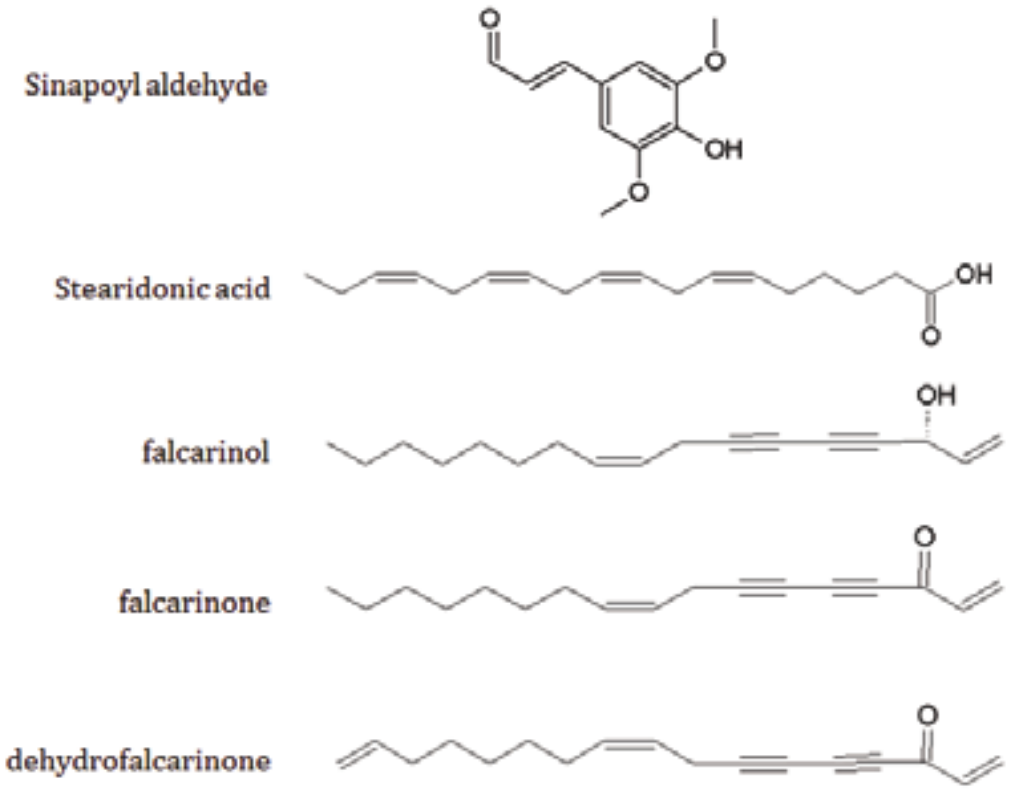


Figure 7 *: structures chimiques des molécules identifiées en HRMS dans la TM de Cicuta virosa. La strucutre du Virol A est présentée dans la* ***Figure 2****.*

4. Focus : la cicutoxine

La polyine majoritaire présente dans la racine de *Cicuta virosa* est la cicutoxine $C_{17}H_{22}O_2$ [5]. Il s'agit d'un antagoniste de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA), le principal neurotransmetteur inhibiteur dans le système nerveux central. Ainsi, la cicutoxine lie les récepteurs du GABA et induit une dépolarisation constante, empêchant la formation de nouveaux potentiels d'action. La toxicité du métabolite se traduit par des convulsions et une paralysie respiratoire [6]. Pour cette raison, il est indispensable de doser ce métabolite afin de s'assurer qu'il ne soit pas présent en trop forte quantité. Il n'existe aucun standard disponible sur le marché. Le dosage est donc approximatif à l'heure actuelle car nous effectuons uniquement un dosage global des polyines présentes dans la TM. Nous nous sommes donc penchés plus longuement sur la purification de la cicutoxine à partir de la TM, afin d'obtenir la molécule pure et de doser finement la cicutoxine dans la TM.

Dans un premier temps, nous avons recherché la présence de la cicutoxine à l'aide de son absorbance maximale (λmax = 335nm) et de sa masse moléculaire (MM = 258.355g.mol^{-1}) dans

les données UPLC-UV-MS (***Figure 8***). Nous avons détecté plusieurs molécules à une absorbance de 335nm et trois molécules présentant un m/z de 259. En combinant les deux analyses, une seule molécule présente les deux propriétés recherchées.

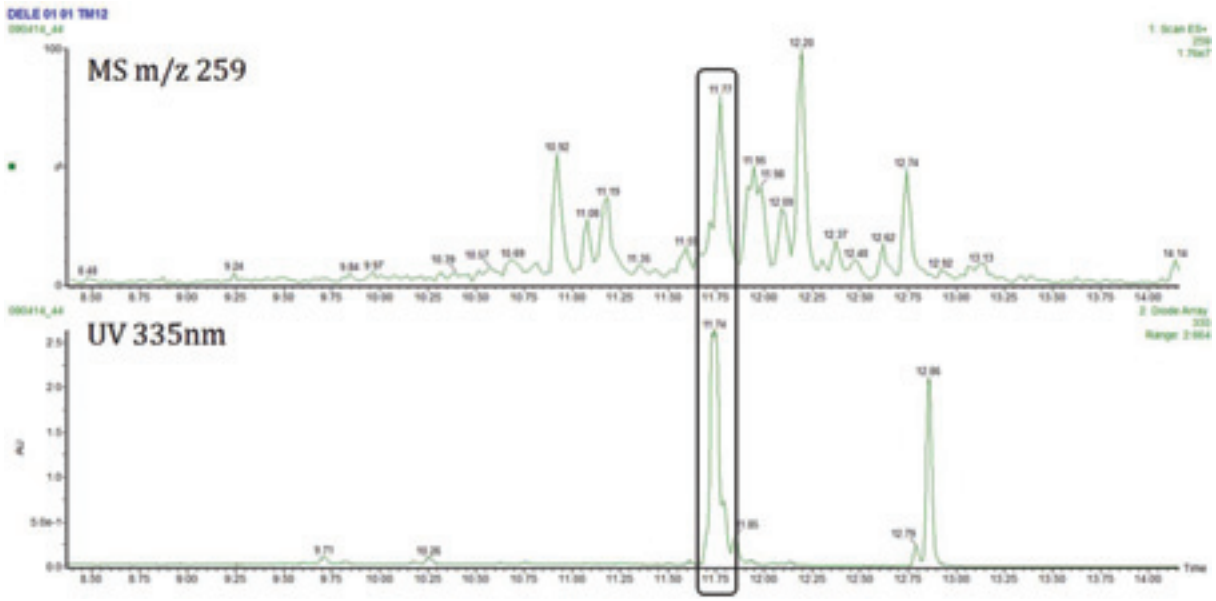


Figure 8 *: EIC (Extracted Ion Chromatogram) UV à 335nm (en bas) et EIC (Extracted Ion Chromatogram) MS m/z 259 issus de l'analyse UPLC-UV-MS de la TM Cicuta virosa. Le signal correspondant potentiellement à la cicutoxine est entouré.*

Nous avons purifié la cicutoxine en HPLC semi-préparative à l'aide d'un gradient de solvant de 60 min: 5% de MeOH pendant 2min, puis augmentation jusqu'à 70% de MeOH en 15min, suivie d'une augmentation jusqu'à 100% de MeOH en 30min, puis plateau à 100% de MeOH pendant 3 min, retour à 5% de MeOH en 3 min et maintien à 5% de MeOH pendant 7min. Le détecteur UV balayait les longueurs d'ondes de 200 à 400nm et le détecteur de masse était en mode SIR sur le m/z 259, avec une tension de cône de +5V. Les pics obtenus par les deux moyens de détection renforcent la bonne collecte de la cicutoxine. La plage de collecte de la fraction commence à 26.35min et termine à 26.70min (*Figure 9*).

Avant de procéder à l'identification fine de la molécule en HRMS, nous avons vérifié la présence de l'ion m/z 259 dans la fraction par UPLC-MS. De manière surprenante, l'ion majoritaire présent dans la fraction à un m/z de 241, le m/z 259 est retrouvé très faiblement. Il se peut qu'entre la collecte et l'analyse UPLC-MS, la molécule se soit dégradée. L'ion m/z 241 pourrait correspondre à la cicutoxine déshydratée (-18 Da.) Nous avons quand même décidé d'identifier cette molécule par HRMS.

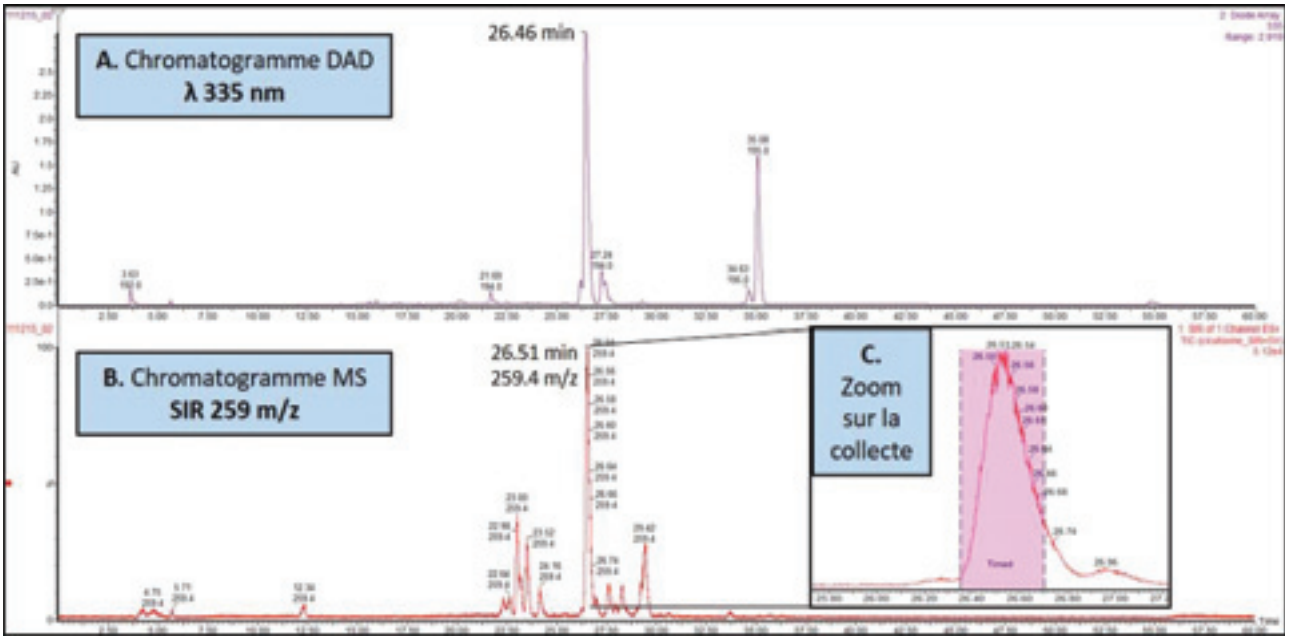


Figure 9 *: Purification de la cicutoxine dans la TM de Cicuta virosa par HPLC semi-préparative. (A) Le détecteur à barrettes de diodes (DAD) permet de détecter un pic à 335 nm, qui correspond à l'absorbance de la cicutoxine, avec un temps de rétention de 26.46 min. (B) Le détecteur de masse, en mode SIR, permet l'obtention d'un pic majoritaire m/z 259 correspondant à l'ion moléculaire de la cicutoxin. (C) La collecte de la cicutoxine est réalisée en fonction du temps, sur un intervalle de 26.35 min à 26.70 min.*

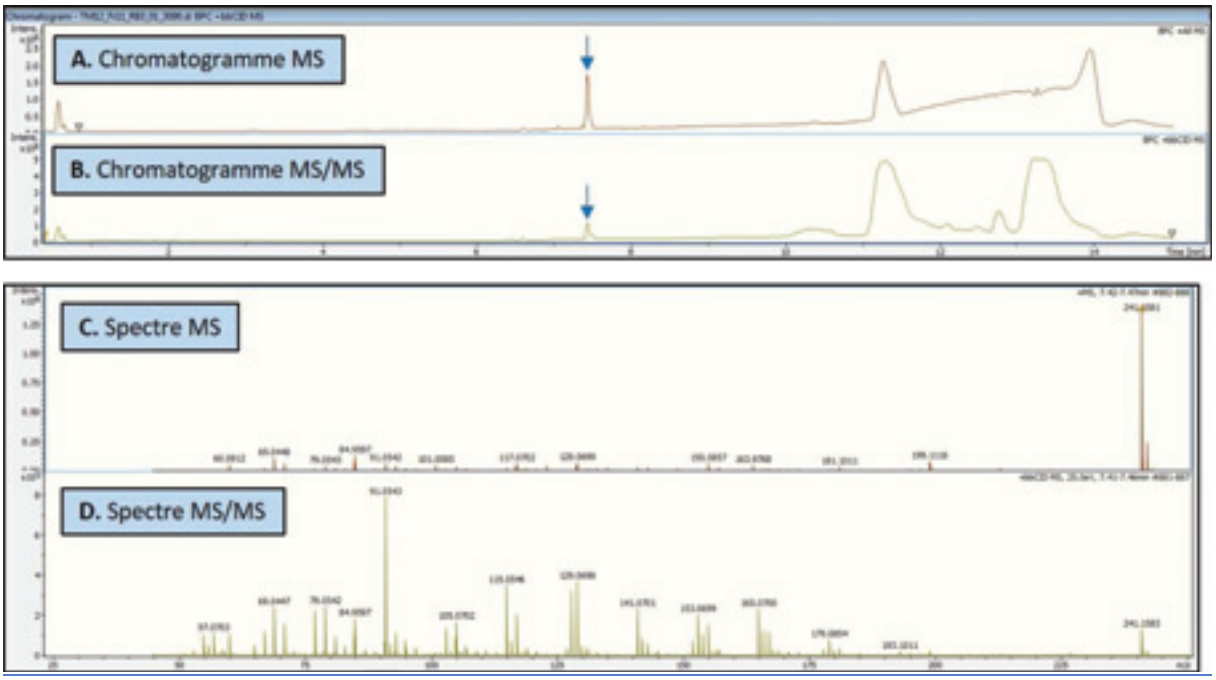


Figure 10 *: analyses HRMS de la fraction de Cicuta virosa comportant probablement la cicutoxine déshydratée. A et B : chromatogramme UPLC-MS et UPLC-MS/MS complet (0 – 15min). Nous observons le pic majoritaire correspondant à la molécule collectée. C et D : spectres MS et MS/MS du pic majoritaire. La masse calculée est de 241.1581. Nous observons bien la diminution de l'ion parent et l'apparition des fragments sur le spectre MS/MS.*

A partir du logiciel DataAnalysis et SmartFormula3D® (Bruker), nous avons interrogé les banques de données KEGG, PubChem et ChemSpider à l'aide du logiciel de fragmentation *In Silico* MetFrag. La meilleure identification obtenue correspond à la déhydrofalcarinone ($C_{17}H_{20}O$), avec un score de 1.

La collecte de la molécule étant initialement basée sur la masse de la cicutoxine, il était surprenant d'identifier la déhydrofalcarinone en HRMS. Même si la molécule s'était dégradée entre le moment de la collecte et l'analyse de la fraction, il est peu probable que la cicutoxine ait donné la dehydrofalcarinone, d'un point de vue biochimique. Nous avons donc effectué des analyses RMN sur la molécule (^{1}H, ^{13}C, COSY, HSQC) afin de déterminer sa structure. Les données RMN ont été traitées avec le logiciel NoteBook (version 2.8). Les spectres théoriques ont pu être construits à l'aide du logiciel en ligne www.nmrdb.org.

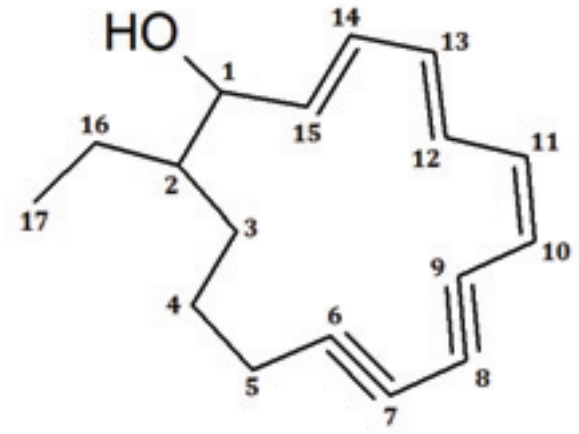


Figure 11 *: structure chimique de la « cicutoxine déshydratée » déduit à l'aide des analyses RMN. Les données brutes RMN sont présentées en* ***Annexe 2****.*

Les résultats de la RMN nous ont permis de déduire la structure de la molécule. L'enchainement des trois double-liaisons et des deux triple-liaisons correspondent à celui de la cicutoxine. La dehydrofalcarinone possède également deux triple-liaisons et trois double-liaisons, mais elles ne s'enchainent pas dans le même ordre (*Figure 7*). A l'aide des données RMN, nous avons également pu déduire la cyclisation de la molécule, lui faisant perdre une molécule d'eau H_2O. Il n'est pas rare de retrouver des polyines sous des formes cyclisées ou partiellement cyclisées [5]. Nous pouvons nous demander si, sous cette forme cyclisée, elle possède toujours son activité biologique.

Lors de ces travaux, nous avons voulu identifier et purifier la cicutoxine. Cette molécule est importante car elle est dosée dans la TM. Sa concentration nous renseigne sur la qualité de la TM. Elle doit être à une concentration minimale pour apporter son activité biologique, mais pas

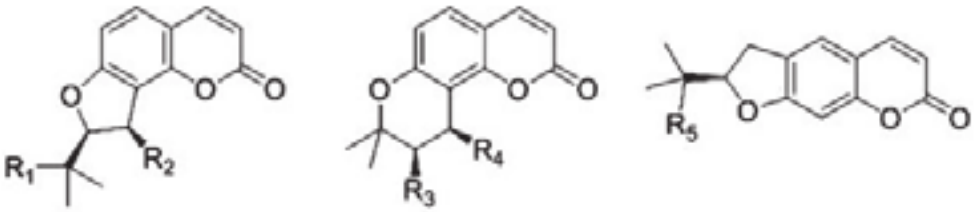
en trop forte concentration pour ne pas être toxique. Le dosage de cette molécule est difficile car cette dernière est instable. Nous avons vu qu'après purification de la molécule, celle-ci s'est cyclisée. Nous pouvons nous demander si la molécule se serait cyclisée spontanément dans la TM. Ceci expliquerait son instabilité et la difficulté de la doser dans la TM. Ou alors, ce serait la purification, le passage dans les solvants chromatographiques ou le stockage qui en seraient à l'origine.

5. Conclusion

En combinant plusieurs techniques analytiques, nous avons identifié environ soixante-dix molécules dans la TM *Cicuta virosa*, dont de nombreuses molécules apolaires et volatiles. Les identifications en HRMS nous ont permis de mettre en évidence des molécules du type falcarinol et falcarinone. La purification de la cicutoxine et les analyses RMN ont montré qu'il peut se produire des réarrangements chimiques des molécules dans la TM où bien lors de nos analyses métabolomiques. Nous avons également pu apercevoir les limites de l'identification par HRMS et sa complémentarité avec la technique RMN.

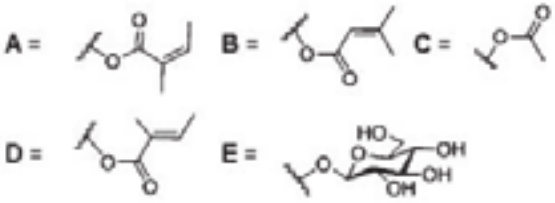
6. Annexes

Annexe 1 : structures des coumarines identifiées dans Cicuta virosa [4] : Archangelicin (**2**) ; Libanorin (**3**) ; Columbianedin (**4**) ; Isoedultin (**5**) ; Zosimin (**6**) ; 2-methylbut(2Z)-enoic acid(9R,10R)-10-hydroxy-8,8-dimethyl-9,10-dihydro-2H,8H-benzol[1,2-b:3,4b']dipyran-2-one-9-yl ester (**7**) ; Daucoidin A (**8**) ; Ammijin (**9**) ; Columbianetin-β-D-glucoside (**10**) ; Apterin (**11**).



	R_1	R_2
2	A	A
3	B	H
4	A	H
5	A	C
6	D	H
8	A	OH
10	E	H
11	E	OH

	R_3	R_4	R_5
7	A	OH	-
9	-	-	E



Annexe 2 : D'après le spectre HSQC (^{1}H-^{13}C), nous obtenons les corrélations entre les protons et les carbones reliés par des liaisons covalentes. Pour déduire les carbones quaternaires, nous avons comparé le spectre HSQC à celui du ^{13}C 1D. Les valeurs des déplacements chimiques étant dépendantes de l'environnement de l'atome (spin), nous avons pu attribuer chaque signal à son carbone, puis vérifié l'attribution avec le spectre COSY (^{1}H-^{1}H). Pour les carbones 11 ; 12 ; 13 ; 14 et 15, les valeurs des déplacements chimiques ^{1}H et ^{13}C sont trop proches pour pouvoir être attribué aux carbones correspondants.

Numéro du Carbone	**^{1}H**	**^{13}C**
1	4.06	71.6
2	1.43	40.3
3	3.53	60.6
4	1.66	31.8
5	2.43	16.8
6	C quaternaire	65.8
7	C quaternaire	75.8
8	C quaternaire	78.0
9	C quaternaire	87.2
10	5.67	10.99
11	5.88 ; 6.78 ; 6.25 ; 6.33 ; 6.40	142.1 ; 145.8 ; 129.2 ; 131.4 ; 136.5
12		
13		
14		
15		
16	1.32	18.8
17	0.88	14.0

7. Bibliographie

1. Lehn, J., *Cryptates: inclusion complexes of macropolycyclic receptor molecules.* Pure and applied Chemistry, 1978. **50**(9-10): p. 871-892.

2. Ohta, T., et al., *Absolute stereochemistry of cicutoxin and related toxic polyacetylenic alcohols from Cicuta virosa.* Tetrahedron, 1999. **55**(41): p. 12087-12098.

3. Tian, Y.-Q., Z.-X. Zhang, and H.-H. Xu, *Laboratory and field evaluations on insecticidal activity of Cicuta virosa L. var. latisecta Celak.* Industrial Crops and Products, 2013. **41**: p. 90-93.

4. Wang, S.-Q., et al., *Coumarins from Cicuta virosa and their modulating effects on multidrug-resistant (MDR) tumors.* Phytochemistry Letters, 2011. **4**(2): p. 97-100.

5. Jean, Bruneton., *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)*. 2009: Lavoisier.

6. Uwai, K., et al., *Exploring the structural basis of neurotoxicity in C17-polyacetylenes isolated from water hemlock.* Journal of medicinal chemistry, 2000. **43**(23): p. 4508-4515.

Chapitre 13 : *Asa foetida*

1. Description générale

Tout comme *Ferula sumbul* et *Cicuta virosa*, *Ferula asafoetida* L. fait partie de la famille des Apiacées (***Figure 1***). Nous la retrouvons essentiellement en Iran, en Afghanistan et en Asie. L'ase fétide est en fait une gomme-oléorésine obtenue en incisant à de nombreuses reprises la partie supérieure des racines, au niveau du collet. Ces entailles se font quand la plante a ses feuilles fanées, et la production de la résine dure entre 2 et 3 mois [1]. Il n'y a pas de cultures de cette plante, seules les plantes sauvages sont exploitées. En pharmacologie, la plante est principalement employée pour ses propriétés carminative, digestive et antispasmodique. Nous lui reconnaissons également des propriétés sédative, analgésique et antiseptique [2]. Parfois même, elle est utilisée pour traiter des symptômes liés à l'asthme et à l'épilepsie [3]. Pour préparer la teinture-mère, la gomme de résine est macérée dans un mélange éthanol/eau 90/10 v/v.

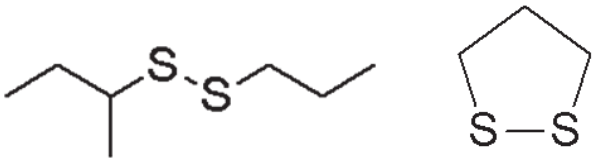
Figure 1 *: photographie des parties aériennes de Ferula asafoetida [4].*

2. Bibliographie et connaissances scientifiques

La teinture-mère doit posséder une teneur minimum d'acide ferulique de 0.15% m/m. La résine est riche en acide férulique et en dérivés coumariniques [1].

Plusieurs coumarines sesquiterpèniques ont été identifiées : conférone ; badrakemin ; feslol ; isoamarcandin et samarcandin [5].

Nous retrouvons également un grand nombre de composés volatils : des monoterpènes α- et β-pinène par exemple, aux propriétés antioxydantes [3], mais aussi des composés soufrés, apportant l'odeur caractéristique de la TM d'*Asa foetida*. Tous les composés identifiés dans les huiles essentielles de *Ferula asafoetida* sont indiqués dans l'***Annexe* 1** et l'***Annexe* 2**.



n-propyl sec-butyl disulfide dithiolane

Figure 2 *: structures chimiques des deux composés soufrés majoritairement retrouvées dans l'huile essentielle de Ferula asafoetida : n-propyl sec-butyl disulfide (ou 2-(propyldisulfanyl)butane, $C_7H_{16}S_2$, MM : 164.332g.mol^{-1}) et dithiolane (ou 1,2-dithiolane, $C^3H^6S^2$, MM : 106.210g.mol^{-1}).*

3. Résultats et discussion

a. Analyse des composés polaires de la TM en GC-MS après dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
ethanolamine - 1282-174
fumaric acid - 1357-245
vanillic acid - 1768-297
fructose - 1901-307
sorbose - 1912-307
glucose - 1928-319
galactose - 1948-319
mannitol - 1970-319
ferulic acid - 2105-338
sucrose - 2725-361

1-kestose - 3496-361
MOLECULES PUTATIVES
[oleamide] - 2432-338

Tableau 1 *: liste des molécules identifiées en GC-MS méthode polaire dans la TM Asa foetida. Nomenclature : NOM – Indice de rétention – Ion caractéristique.*

Nous identifions relativement peu de métabolites avec cette méthode sur cette TM, contrairement à la plupart des autres TM étudiées. Ceci est probablement dû à la méthode de fabrication de la TM utilisant une solution à 90% d'éthanol. Les molécules polaires sont moins extraites dans ces conditions. Nous identifions l'acide ferulique, reporté comme molécule majoritaire d'après la littérature et utilisé comme standard de contrôle qualité de la TM.

b. Analyse des composés volatiles de la TM en GC- MS sans dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
α-pinene - 944-93
o-cimene - 1038-93
β-cis-ocimene - 1048-93
disulfide, dipropyl - 1107-150
5-hydroxymethylfurfural - 1231-126
n-decanoic acid - 1375-129
vanillin - 1405-152
methyl-eugenol - 1410-178
α-humulene - 1462-93
γ-Selinene - 1495-107
dihydro-β-agarofuran - 1511-207
o-menth-8-ene-4-methanol - 1556-161
guaiol - 1609-161
γ-eudesmol - 1635-204
agarospirol - 1647-161
farnesol - 1676-81
ferulic acid - 1905-194
hexadecanoic acid, ethyl ester - 1997-101
MOLECULES PUTATIVES
[α-pyronene] - 1128-121
[n-propyl sec-butyl disulfide] - 1163-164
[4-hydroxy-3-methylacetophenone] - 1319-150
[α-gurjunene] - 1656-204
[isoledene] - 1731-161
[α-selinene] - 1754-204
[diisooctyl phthalate] - 2550-167
[lanosterol] - 3334-411

Tableau 2 *: liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode apolaire dans la TM Asa foetida. Nomenclature : NOM – Indice de rétention – Ion caractéristique.*

Nous retrouvons de nombreux composés volatils comme décrit dans la littérature. Nous identifions des composés soufrés, tels que le dipropyl disulfide et le n-propyl sce-butyl disulfide. L'identification de ce dernier doit néanmoins être confirmée par injection du standard dans le système chromatographique. Nous retrouvons également l'acide ferulique. Il n'est pas rare qu'une molécule présente en forte concentration dans un extrait soit retrouvée dans les deux phases de l'extraction, polaire et apolaire, l'une étant saturée.

Avec cette méthode, nous identifions autant de métabolites qu'avec une méthode d'extraction au CO_2 supercritique [2]. L'hydrodistillation, méthode d'extraction plus spécifique pour les huiles essentielles, permet néanmoins d'identifier un plus grand nombre de molécules apolaires [6].

c. *Analyse de la TM en UPLC-MS/MS mode MRM*

MOLECULES IDENTIFIEES
coumaric acid
caffeic acid
ferulic acid

Tableau 3 *: liste des molécules identifiées en UPLC-MS/MS dans la TM Asa foetida.*

Très peu de molécules ont été identifiées à l'aide de cette méthode. Comme pour la méthode GC-MS polaire, ceci est principalement dû à la méthode de fabrication de la TM. Néanmoins, nous pouvons retrouver l'acide ferulique. Cette méthode permettrait en 15min de doser précisément ce métabolite.

d. *Collecte de fractions par HPLC semi-préparative et identification de métabolites d'intérêts par HRMS.*

- Méthode HPLC-semi-préparative

Tous les systèmes analytiques et les préparations d'échantillons sont décrits dans la « Partie II Matériel et Méthodes, VIII ».

La méthode chromatographique utilisée pour la collecte des fractions de la TM *Asa foetida* est décrite dans le ***Tableau*** *4*.

Temps (min)	débit (ml.min-1)	% A	% B
0	3	95	5
2	3	95	5
47	3	0	100
55	3	0	100
58	3	95	5
65	3	95	5

Tableau 4 *: gradient de solvant utilisé pour la séparation et la collecte des fractions issues de la TM Asa foetida. Solvant A : eau + 0.1% acide formique ; solvant B : méthanol + 0.1% acide formique.*

Nous avons collecté neuf fractions correspondant majoritairement à des molécules inconnues (***Tableau 5***). Au total, nous avons effectué dix injections de 100µL de TM. Les 10 réplicats de chaque fraction ont été regroupés et séchés au concentrateur pour être stockés à 4°C en attendant les analyses HRMS.

Fractions	molécules potentielles	m/z	tensions de cône (V)	plages de collecte (min)
1	dithiolane	107	5	28.15 – 28.70
2	inconnue	131	5	37.99 – 38-35
3	α- β-pinène	137	5	39.05 – 39.35
4	inconnue	221	5	39.99 – 40.56
5	inconnue	397	5	43.57 – 43.88
6	inconnue	383	5	44.55 – 44.92
7	inconnue	177	5	46.38 – 46.73
8	inconnue	383	5	47.22 – 47.50
9	inconnue	205	5	51.91 – 52.42

Tableau 5 *: liste des fractions collectées à partir de la TM Asa foetida.*

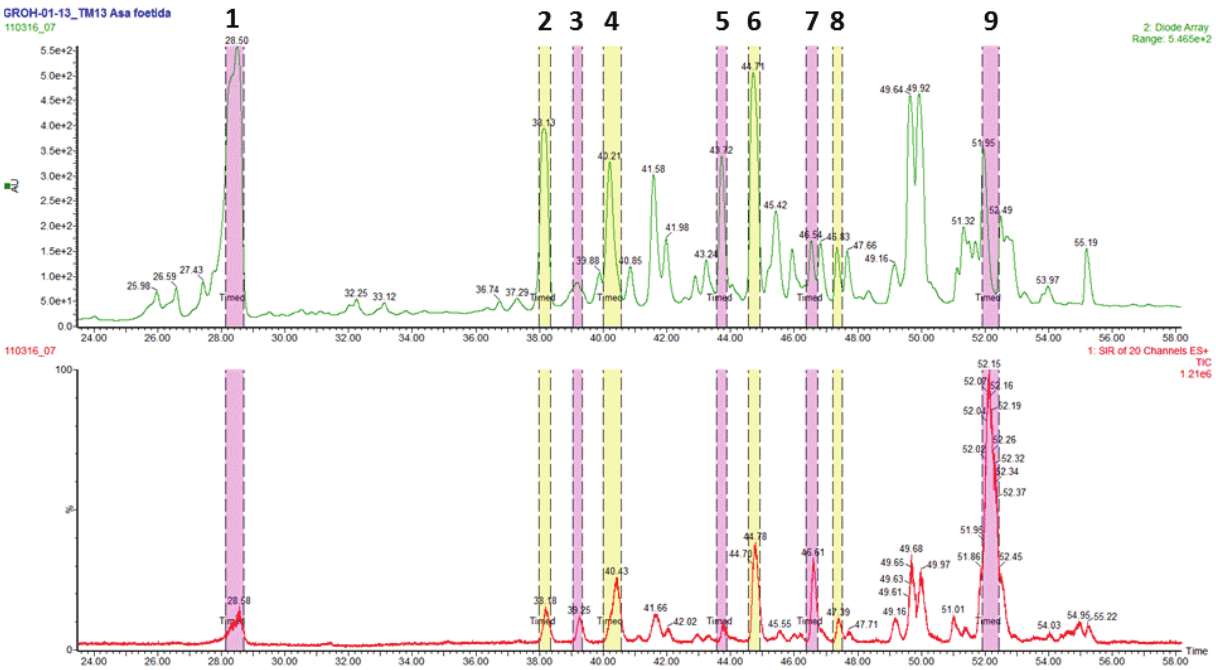


***Figure 3** : chromatogramme HPLC-UV Scan 190-500nm (en haut) et HPLC-MS (en bas) de la collecte des fractions de la TM Asa foetida. Le chromatogramme HPLC-MS correspond à la somme des SIR enregistrés pour chaque m/z listé dans le **Tableau 5**. Les plages de collecte sont représentées en jaune et violet.*

- Identification par HRMS

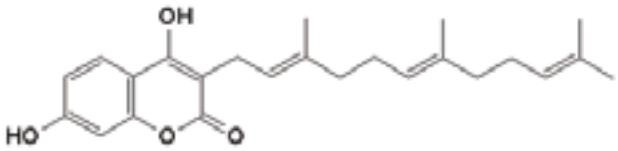
Avant d'analyser chaque fraction en HRMS, chaque fraction a été vérifiée en UPLC-MS Scan. Toutes les masses collectées ont été retrouvées dans les fractions, excepté pour la fraction 1. La masse attendue m/z 107 n'est pas présente. Nous retrouvons deux autres masses, m/z 195 et 177. Dans certaines autres fractions, nous avons aussi des masses supplémentaires. Nous avons essayé d'identifier ces molécules en plus de nos molécules recherchées initialement. L'ensemble des identifications est résumé dans le ***Tableau 6***.

Fractions	m/z mesurés en UPLC-MS	m/z exacts mesurés en HRMS	Formules brutes	Molécules identifiées en HRMS/MS
1	195 177	195.0650 177.0543	$C_{10}H_{10}O_4$ $C_{10}H_8O_3$	/ 1,3,8-naphtalenertriol
2	131 163 165	131.0494 163.0755 165.0911	C9H6O $C_{10}H_{10}O_2$ $C_{10}H_{12}O_2$	/ methyl cinnamate eugenol ou isoeugenol
3	137	137.0091	$C_4H_8OS_2$	/

	211 421	211.0278 421,0488	$C_7H_{14}OS_3$ /	[2-(1-methylsulfanyl ethyl)-1,3-dithiole-4-yl]methanol /
4	221	221.1899	$C_{15}H_{24}O$	cyperol
5	397	397.2003	$C_{24}H_{28}O_5$	/
6	383	383.2220	$C_{24}H_{31}O_4$	ammoresinol
7	177 383	177.0908 383.2208	$C_{11}H_{12}O_2$ $C_{24}H_{31}O_4$	cis-1,2-Dihydroxy-1,2-dihydro-8-methylnaphthalene ammoresinol
8	383 163	383.2217 163.0390	$C_{24}H_{31}O_4$ $C_9H_6O_3$	ammoresinol 4- ou 7-hydroxycoumarin
9	205	205.1585	$C_{14}H_{20}O$	/

Tableau 6 *: résultats des identifications par HRMS de molécules inconnues dans la TM Asa foetida.*

Nous identifions des dérivés terpéniques tels que le 1,3,8-naphtalenertriol, l'eugenol et le cyperol. Nous retrouvons dans plusieurs fractions l'ammoresinol, un sesquiterpène décrit dans l'espèce *Dorema ammoniacum*, également de la famille des Apiacées (***Figure 4***) [7]. Le 4- ou 7-hydroxycoumarine est une molécule précurseur dans la famille des coumarines, famille très présente dans *Ferula asafoetida* [1]. Enfin, le methyl cinnamate est une molécule volatile possédant une odeur caractéristique de fruits rouges [8].



ammorésinol

Figure 4 *: structure chimique de l'ammorésinol ($C_{24}H_{31}O_4$, MM : 382.494g.mol^{-1}).*

4. Conclusion

Nous avons identifié une quarantaine de molécules dans la TM *Asa foeatida*, dont des nombreux dérivés terpéniques. Nous détectons l'acide férulique par les deux méthodes GC-MS et la méthode UPLC-MS/MS. Cette dernière est la méthode de choix pour doser la molécule dans la TM. Grâce à la HRMS, nous avons identifié des molécules non caractérisées chez *Ferula asafoetida* jusqu'à présent.

5. Annexes

Annexe 1 : liste des composés identifiés dans l'huile de *Ferula asafoetida* après une extraction au CO_2 supercritique et après une hydrodistillation. RI : indice de rétention de Kovats sur une colonne DB-1. D'après [2].

No.	Compound	R.I.[a]
1	α-Pinene	938
2	β -Pinene	979
3	Myrcene	990
4	α-Phellandrene	1004
5	1,4-Cineole	1016
6	*p*-Cymene	1025
7	Limonene + β-phellandrene	1030
8	(*Z*)-β-ocimene	1038
9	(*E*)-β-ocimene	1049
10	1-Propyl sec-butyl disulfide	1172
11	(*Z*)-1-propenyl sec-butyl disulfide	1177
12	(*E*)-1-propenyl sec-butyl disulfide	1181
13	Bis(1-methyl propyl) disulfide	1220
14	Bis(1-methyl propenyl) disulfide	1263
15	*trans* Anethole	1281
16	β-Coryophyllene	1418
17	Bis(1-methyl thio)propyl disulfide	1426
18	α-Humulene	1452
19	γ-Gurjunene	1472
20	Germacrene D	1479
21	Virdiflorene	1492
22	Cuparene	1501
23	γ-Cadinene	1512
24	*cis*-γ-Bisabolene	1514
25	δ-Cadinene	1522
26	*trans*-γ-Bisabolene	1532
27	Germacrene B	1554
28	Eudesmol (10-epi-γ)	1619
29	γ-Eudesmol	1629
30	Hinesol	1636

Annexe 2 : liste des composés identifiés dans l'huile essentielle de *Ferula asafoetida* RI : indice de rétention de Kovats. D'après [6].

Compound	RI[b]
α-Pinene	932.2
Camphene	945.8
β-Pinene	975.9
Myrcene	988.1
α-Phellandrene	1004.2
p-Cymene	1021.9
Limonene	1026.8
β-Phellandrene	1030.7
(Z)-β-ocimene	1035.8
(E)-β-ocimene	1045.1
allo-Ocimene	1125.9
neo-allo-Ocimene	1137.9
1-Propyl sec-butyl disulfide	1159.6
(Z)-1-Propenyl sec-butyl disulfide	1166.5
(E)-1-Propenyl sec-butyl disulfide	1177.9
1,2-Dithiolane	1196.5
Thionol	1196.9
Bis(1-methyl propyl)disulfide	1209.5
Bornyl acetate	1282.3
trans-Pinocarvyl acetate	1296.2
p-Vinyl guaiacol	1309.6
β-Cedrene	1409.1
(E)-Caryophyllene	1415.1
β-Ylangene	1418.6
Bis(1-methyl thio) propyl disulfide	1422.7
β-Gurjunene	1434.8
α-Guaiene	1439.3
α-Humulene	1449.5
β-Selinene	1482.2
α-Selinene	1491.8
Propyl nitrite	1494.2
β-Dihydroagarofuran	1496.8
β-Bisabolene	1504.5
γ-Cadinene	1509.8
δ-Cadinene	1519.5
β-Himachalene	1527.2
Elemol	1545.1
Longipinene epoxide	1593.5
Guaiol	1596.1
5-Epi-7-epi-a-Eudesmol	1604.2
10-Epi-g-Eudesmol	1620.5
γ-Eudesmol	1633.5
Agarospirol	1642.1
β-Eudesmol	1647.1
α-Eudesmol	1651.1

6. Bibliographie

1. Jean, Bruneton., *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e ed.)*. 2009: Lavoisier. p. 697.

2. Khajeh, M., et al., *Comparison of essential oils compositions of Ferula assa-foetida obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods.* Food Chemistry, 2005. **91**(4): p. 639-644.

3. Kavoosi, G., et al., *Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oils from Carum copticum seed and Ferula assafoetida latex.* Journal of food science, 2013. **78**(2): p. T356-T361.

4. *http://thepoisondiaries.tumblr.com/post/42771270639/aphrodisiac-asafoetida-ferula-asa-foetida*.

5. Asghari, J., et al., *Identification of sesquiterpene coumarins of oleo-gum resin of Ferula assa-foetida L. from the Yasuj region.* Natural product research, 2016. **30**(3): p. 350-353.

6. Kavoosi, G. and V. Rowshan, *Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil obtained from Ferula assa-foetida oleo-gum-resin: effect of collection time.* Food chemistry, 2013. **138**(4): p. 2180-2187.

7. Adhami, H.-R., et al., *Compounds from gum ammoniacum with acetylcholinesterase inhibitory activity.* Scientia pharmaceutica, 2013. **81**(3): p. 793-806.

8. *http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1417571.html*.

Chapitre 14 : *Corydalis*

1. Description générale

La teinture-mère Corydalis est fabriquée à partir des espèces *Dicentra canadensis* ou *Corydalis cava*. Ces deux plantes font parties de la famille des Papaveracées (***Figure 1***). Nous les retrouvons principalement en Amérique du Nord, et sont utilisées pour traiter les symptômes liés aux douleurs abdominales et aux spasmes [1]. Les tubercules séchés sont macérés dans un mélange éthanol/eau 65/35 v/v pour fabriquer la TM.

Figure 1 *: A gauche : photographie des parties aériennes de Dicentra canadensis [2]. A droite : photographie des parties aériennes de Corydalis cava [3].*

2. Bibliographie et connaissances scientifiques

Pour contrôler la qualité de la TM, nous dosons les alcaloïdes totaux, exprimés en protropine ($C_{20}H_{19}NO_5$ MM : 353.37g.mol^{-1}). La teneur doit être comprise entre 0.10 et 0.20% (m/m).

La plante est essentiellement utilisée en phytothérapie pour sa teneur en alcaloïdes (***Figure 2***). Plusieurs autres structures d'alcaloïdes retrouvés dans Corydalis sont présentées en ***Annexe 1*** [4].

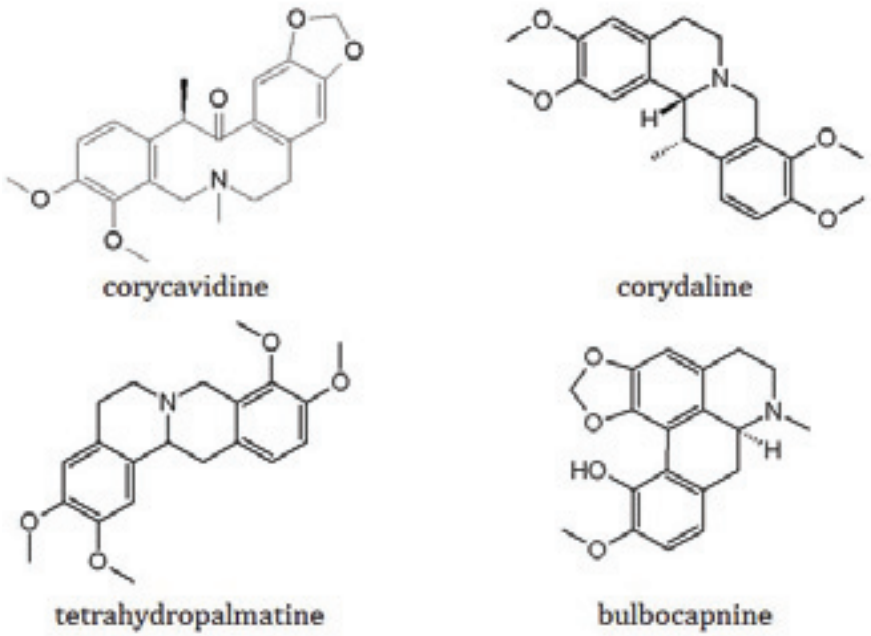


Figure 2 *: structures chimiques des principaux alcaloïdes retrouvés dans Corydalis cava : corycavidine ($C_{22}H_{25}NO_5$, MM = 383.44 g.mol-1), corydaline ($C_{22}H_{27}NO_4$ MM = 369.45 g.mol^{-1}), tetrahydropalmatine ($C_{21}H_{25}NO_4$ MM = 355.43 g.mol^{-1}), bulbocapnine ($C_{19}H_{19}NO_4$ MM = 325.36 g.mol^{-1}).*

3. Résultats et discussion

a. Analyse des composés polaires de la TM en GC-MS après dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
ethanolamine - 1282-174
glycerol - 1291-205
glycine - 1324-248
glyceric acid - 1348-292
fumaric acid - 1356-245
serine - 1377-909
threonine - 1405-291
pyroglutamic acid - 1534-156
4-aminobutyric acid - 1541-304
ribitol - 1742-319
citric acid - 1836-273
quinic acid - 1886-345
fructose - 1901-307
sorbose - 1911-307

glucose - 1928-319
galactose - 1949-319
mannitol - 1970-319
gluconic acid - 2039-333
myoinositol - 2129-318
9,12-octadecadienoic acid - 2219-337
sucrose - 2722-361
maltose - 2831-361*
maltose - 2860-361*
4-trans-caffeoylquinic acid - 3201-307
MOLECULES PUTATIVES
[hydrastine] - 2945-190
[3-O-coumaroyl-D-quinic acid] - 3099-345

Tableau 1 : *liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode polaire dans la TM Corydalis. Nomenclature : NOM - Indice de rétention – Ion caractéristique. (*) : Formes ou nombre de groupements TMS différents. Parmi les nombreuses molécules identifiées, nous retrouvons un alcaloïde, l'hydrastine. Nous devons néanmoins confirmer son identification par injection du standard ou à l'aide d'une autre méthode.*

b. Analyse des composés volatiles de la TM en GC- MS sans dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
1,2-benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester - 1870-149
hexadecanoic acid, ethyl ester - 1994-101
linoleic acid ethyl ester - 2162-963
MOLECULES PUTATIVES
[ethanone, 1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-] - 1316-150
[phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-] - 1515-191
[hydrastinine] - 1631-190
[ethyl 9,12,15-octadecatrienoate] - 1997-897
[diisooctylphthalate] - 2550-149
[tetrahydropalmatine] - 3062-903
[phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-, phosphite (3:1)] - 3443-441

Tableau 2 *: liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode apolaire dans la TM Corydalis. Nomenclature : NOM - Indice de rétention – Ion caractéristique. Parmi les molécules identifiées, nous retrouvons l'hydrastinine, issue de l'hydrolyse de l'hydrastine. Nous retrouvons également le tetrahydropalmatine. Nous devons néanmoins confirmer leurs identifications par injection des standards ou à l'aide d'une autre méthode.*

c. *Analyse de la TM en UPLC-MS/MS mode MRM*

MOLECULES IDENTIFIEES
coumaric acid
MOLECULES PUTATIVES
[1-palmitoylglycerophosphatidylcholine]

Tableau 3 *: liste des molécules identifiées en UPLC-MS/MS dans la TM Corydalis.*

d. *Collecte de fractions par HPLC semi-préparative et identification de métabolites d'intérêts par HRMS.*

- Méthode HPLC-semi-préparative

Tous les systèmes analytiques et les préparations d'échantillons sont décrits dans la « Partie II Matériel et Méthodes, VIII ».

La méthode chromatographique utilisée pour la collecte des fractions de la TM *Corydalis* est décrite dans le ***Tableau 4.***

Temps (min)	débit (ml.min-1)	% A	% B
0	3	95	5
2	3	95	5
10	3	70	30
37	3	45	55
47	3	0	100
55	3	0	100
58	3	95	5
65	3	95	5

Tableau 4 *: gradient de solvant utilisé pour la séparation et la collecte des fractions issues de la TM Corydalis. Solvant A : eau + 0.1% acide formique ; solvant B : méthanol + 0.1% acide formique.*

Nous avons collecté sept fractions pouvant contenir la corydaline, la corycavidine et la tetrahydropalmatine. Les autres fractions contiennent des molécules inconnues (***Tableau 5***). Au total, nous avons effectué sept injections de 100µL de TM. Les sept réplicas de chaque fraction ont été réunis entre eux et séchés au concentrateur pour être stockés à 4°C en attendant les analyses HRMS.

Fractions	molécules potentielles	m/z	tensions de cône (V)	plages de collecte (min)
1	inconnue	328	5	14.12 – 14.30
2	corydaline	368	5	15.40 – 15.70
3	corycavidine	342	5	16.32 – 16.80
4	tetrahydropalmatine	356	5	19.40 – 20.20
5	inconnue	370	5	22.05 – 22.50
6	inconnue	352	5	23.45 – 23.85
7	inconnue	366	5	25.45 – 26.00

Tableau 5 *: liste des fractions collectées à partir de la TM Corydalis. Les fractions 4 et 5 étaient légèrement jaunes. Les fractions 6 et 7 étaient jaunes.*

- Identification par HRMS

Avant d'analyser chaque fraction en HRMS, chaque fraction a été vérifiée en UPLC-MS Scan. Toutes les masses collectées ont été retrouvées dans les fractions, excepté pour la fraction 1. La masse attendue m/z 107 n'est pas présente. Nous retrouvons deux autres masses, m/z 195 et 177. Dans certaines autres fractions, nous avons aussi des masses supplémentaires. Nous avons essayé d'identifier ces molécules en plus de nos molécules recherchées initialement. L'ensemble des identifications est résumé dans le ***Tableau 6***.

Fractions	m/z mesurés en UPLC-MS	m/z exacts mesurés en HRMS	Formules brutes	Molécules identifiées en HRMS/MS
1	328	328.1539	/	/
2	368	368.1129	$C_{20}H_{17}NO_6$	bicuculline
3	342 384	342.1696 384.1078	$C_{20}H_{23}NO_4$ /	naltrexone /
4	356	356.1854	$C_{21}H_{25}NO_4$	tetrahydropalmatine
5	370	370.2010	$C_{22}H_{27}NO_4$	possible corydaline mais pas MS/MS
6	352	352.1543	$C_{21}H_{21}NO_4$	ochotensine
7	367	366.1699	$C_{22}H_{23}NO_4$	/

Tableau 6 *: liste des formules brutes et des molécules identifiées en HRMS dans la TM Corydalys.*

Au total, six formules brutes ont pu être déterminées. La bicuculline est un alcaloïde antagoniste du neurotransmetteur GABA. Il a été découvert en 1932, isolé à partir d'extraits de *Dicentra cucullaria* et plusieurs espèces de *Corydalis* [5]. Depuis, il est très étudié pour ses propriétés antagoniste du GABA [6]. Il peut provoquer des convulsions. Nous identifions le tetrahydropalmatine, un alcaloïde que nous avions choisi pour la purification. Sa structure est présentée dans la ***Figure 2***. Nous obtenons une formule brute pouvant correspondre à la corydaline, mais nous n'avons pas pu confirmer l'identification avec le spectre MS/MS. L'ochotensine est également un alcaloïde, isolé pour la première fois à partir de l'espèce *Corydalis ochotensis* [7]. C'est la première fois que cet alcaloïde est identifié dans l'espèce *Corydalis cava*. Aucune activité biologique n'est reliée à cette molécule.

Nous observons, dans la fraction 7, une différence de masse de 16 Da par rapport à la masse présente dans la fraction 6. D'après la structure chimique de l'ochotensine, nous pouvons supposer qu'il y ait eu une réaction d'oxydation sur l'une des doubles-liaisons de la molécule.

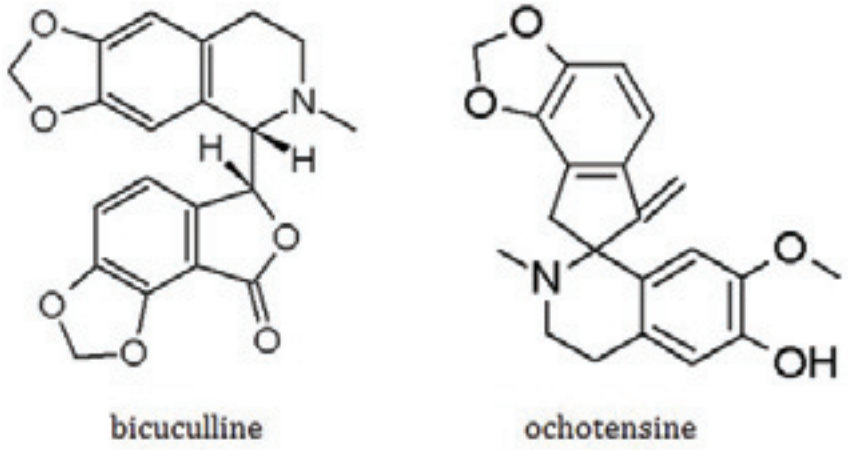


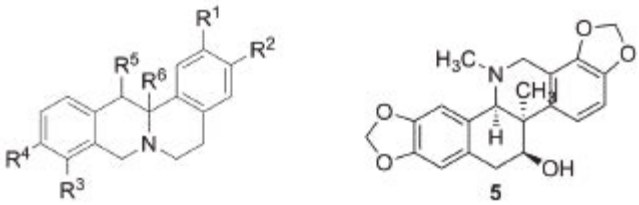
Figure 3*: structures chimiques d'alcaloïdes identifiés par HRMS dans la TM Corydalis : bicuculline ($C_{20}H_{17}NO_6$, MM : 367.352g.mol^{-1}) et ochotensine ($C_{21}H_{21}NO_4$, MM : 351.396g.mol-1).*

4. Conclusion

Nous avons identifié une quarantaine de molécule dans la TM Corydalis. La majorité d'entre elle a été identifié par la méthode GC-MS polaire. La HRMS nous a permis de caractériser des alcaloïdes pour la première fois chez l'espèce *Corydalis cava.*

5. Annexes

Annexe 1 : structures chimiques d'alcaloïdes retrouvées dans Corydalis [4]. (+)-canadine (**1**); (+)-corydaline (**2**) ; (–)-Corycavamine (**3**) ; (+)-tetrahydropalmatine (**4**) ; (+)-corynoline (**5**) ; (±)-corycavidine (**6**) ; (+)-canadaline (**7**) ; Allocryptopine (**8**) ; (+)-corydine (**9**) ; (+)-bulbocapnine (**10**) ; (–)-isocorypalmine (**11**) ; (+)-corypalmine (**12**) ; (–)-scoulerine (**13**) ; (–)-sinoacutine (**14**) et (+)-N-methyllaurotetanine (**15**).



1 $R^1 = R^2 = -O-CH_2-O-$, $R^3 = R^4 = -OCH_3$, $R^5 = -H$, $R^6 = \text{—}H$

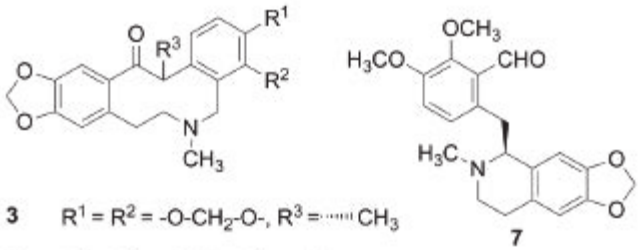
2 $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = -OCH_3$, $R^5 = \cdots CH_3$, $R^6 = \text{—}H$

4 $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = -OCH_3$, $R^5 = -H$, $R^6 = \text{—}H$

11 $R^1 = OH$, $R^2 = R^3 = R^4 = -OCH_3$, $R^5 = -H$, $R^6 = \cdots H$

12 $R^1 = R^3 = R^4 = -OCH_3$, $R^2 = OH$, $R^5 = -H$, $R^6 = \text{—}H$

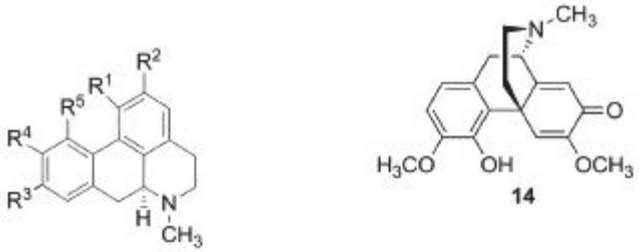
13 $R^1 = R^3 = OH$, $R^2 = R^4 = -OCH_3$, , $R^5 = -H$, $R^6 = \cdots H$



3 $R^1 = R^2 = -O-CH_2-O-$, $R^3 = \cdots CH_3$

6 $R^1 = R^2 = -OCH_3$, $R^3 = -CH_3$

8 $R^1 = R^2 = -OCH_3$, $R^3 = -H$



9 $R^1 = OH$, $R^2 = -OCH_3$, $R^3 = -H$, $R^4 = R^5 = -OCH_3$

10 $R^1 = R^2 = -O-CH_2-O-$, $R^3 = H$, $R^4 = -OCH_3$, $R^5 = OH$

15 $R^1 = R^2 = -OCH_3$, $R^3 = -OH$, $R^4 = -OCH_3$, $R^5 = -H$

6. Bibliographie

1. Sturm, S., C. Seger, and H. Stuppner, *Analysis of Central European Corydalis species by nonaqueous capillary electrophoresis–electrospray ion trap mass spectrometry.* Journal of Chromatography A, 2007. **1159**(1): p. 42-50.

2. *https://en.wikipedia.org/wiki/Dicentra_canadensis#/media/File:Dicentra_canadensis_-_Canadian_Heart_Flower.jpg*.

3. *http://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-75067-synthese*.

4. Chlebek, J., et al., *Application of BACE1 immobilized enzyme reactor for the characterization of multifunctional alkaloids from Corydalis cava (Fumariaceae) as Alzheimer's disease targets.* Fitoterapia, 2016. **109**: p. 241-247.

5. Manske, R.H., *THE ALKALOIDS OF FUMARACEOUS PLANTS: II. DICENTRA CUCULLARIA (L.) BERNH.* Canadian Journal of Research, 1932. **7**(3): p. 265-269.

6. Johnston, G.A., *Advantages of an antagonist: bicuculline and other GABA antagonists.* British journal of pharmacology, 2013. **169**(2): p. 328-336.

7. McLean, S., et al., *The structure of ochotensine and ochotensimine.* Tetrahedron Letters, 1966. **7**(2): p. 185-187.

Chapitre 15 : *Ignatia amara*

1. Description générale

Strychnos ignatii est une plante originaire des Philippines et de Chine. Elle fait partie de la famille des loganiacées (***Figure 1***). En médecine homéopathique, elle est utilisée pour traiter les troubles du sommeil, de l'anxiété et les syndromes dépressifs [1]. Dans certaines régions d'Afrique, la plante est utilisée contre les douleurs abdominales et intestinales, contre la fièvre et pour soigner certaines morsures [2]. C'est une espèce qui a aussi été utilisée pour élaborer des poisons curarisants [3]. Pour la fabrication de la TM, nous faisons macérer les graines séchées dans un mélange éthanol/eau 65/35 v/v.

Figure 1 *: photographie des fruits et des feuilles de Strychnos ignatii [4].*

2. Bibliographie et connaissances scientifiques

Pour contrôler la TM après fabrication, nous dosons la strychnine. La teneur de cette molécule doit être comprise entre 0.12 et 0.17% m/m.

La famille phytochimique principale dans la plante *Strychnos ignatii* sont les alcaloïdes, dont font partie la strychnine et la brucine (***Figure 2***).

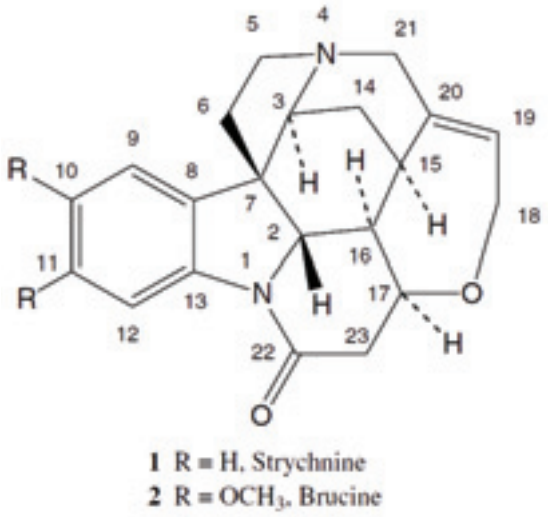


Figure 2 *: structures chimiques de la strychnine ($C_{21}H_{22}N_2O_2$, MM = 334.41 g.mol^{-1}) et de brucine ($C_{23}H_{26}N_2O_4$, MM = 394.46 g.mol^{-1}) D'après [5].*

Une étude métabolomique en RMN, d'extraits brutes issus de différentes parties de la plante, a permi d'identifier dans les graines séchées de *S. ignatii* la présence de : brucine ; ester d'acide caféique ; d'acides gras saturés et insaturés ; de loganine ; de strychnine et de sucrose [5]. Le tableau comparatif des différents extraits de Strychnos est présenté en ***Annexe 1***.

3. Résultats et discussion

a. Analyse des composés polaires de la TM en GC-MS après dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
ethanolamine - 1282-174
glycerol - 1288-205
glyceric acid - 1348-292
fumaric acid - 1356-245
pyroglutamic acid - 1534-156

threonic acid - 1562-292
citric acid - 1836-273
quinic acid - 1886-345
fructose - 1901-307
sorbose - 1912-307
glucose - 1928-319
mannose - 1948-319
myoinositol - 2130-305
sucrose - 2725-361
chlorogenic acid - 3155-345
4-trans-Caffeoylquinic acid - 3201-307
1-kestose - 3496-361
MOLECULES PUTATIVES
[Acetic acid, bis[(trimethylsilyl)oxyl]-, trimethylsilyl ester] - 1267-191
[brucine] - 3281-334

***Tableau 1**: liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode polaire dans la TM Ignatia amara. Nom - Indice de rétention - Ion caractéristique. A l'aide de cette méthode, nous pouvons identifier la brucine. Nous devons cependant confirmer l'identification avec un standard pur.*

b. Analyse des composés volatiles de la TM en GC- MS sans dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
nonane, 3-methyl- - 975-71
anisole - 1287-148
naphthalene, 1,2-dihydro-1,1,6-trimethyl- - 1357-157
phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)- - 1515-191
n-hexadecanoic acid - 1967-256
hexadecanoic acid, ethyl ester - 1994-101
linoleic acid - 2151-95
linoleic acid ethyl ester - 2163-95
9-octadecenoic acid - 2169-264
bis(2-ethylhexyl) phthalate - 2550-149
α-amyrone - 3345-218
α-amyrone - 3390-218
MOLECULES PUTATIVES
[butane, 1,1-diethoxy-3-methyl-] - 960-103
[urs-12-en-3-ol] - 3415-218
[phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-, phosphite (3:1)] - 3443-441

***Tableau 2** : liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode apolaire dans la TM Ignatia amara. Nomenclature : NOM – Indice de rétention – Ion caractéristique.*

c. *Analyse de la TM en UPLC-MS/MS mode MRM*

MOLECULES IDENTIFIEES
kaempferol-3-O-rutinoside
coumaric acid
coumaroyl quinate
caffeoyl quinate
MOLECULES PUTATIVES
[8-8'-diferulic acid]
[1-palmitoylglycerophosphatidylcholine]

Tableau 3*: liste des molécules identifiées en UPLC-MS/MS dans la TM Ignatia amara.*

d. *Collecte de fractions par HPLC semi-préparative et identification de métabolites d'intérêts par HRMS.*

- Méthode HPLC-semi-préparative

Tous les systèmes analytiques et les préparations d'échantillons sont décrits dans la « Partie II Matériel et Méthodes, VIII ».

La méthode chromatographique utilisée pour la collecte des fractions de la TM *Ignatia amara* est décrite dans le ***Tableau 4***.

Temps (min)	débit (ml.min-1)	% A	% B
0	3	95	5
2	3	95	5
47	3	0	100
55	3	0	100
58	3	95	5
65	3	95	5

Tableau 4 *: gradient de solvant utilisé pour la séparation et la collecte des fractions issues de la TM Ignatia amara. Solvant A : eau + 0.1% acide formique ; solvant B : méthanol + 0.1% acide formique.*

Nous avons collecté trois fractions dans lesquelles pourraient être potentiellement présentes la strychnine, la brucine et une molécule inconnue majoritairement présente dans la TM (***Tableau 5***). Au total, nous avons effectué dix injections de 100µL de TM. Les 10 réplicats de chaque fraction ont été regroupés et séchés au concentrateur pour être stockés à 4°C en attendant les analyses HRMS.

Fractions	molécules potentielles	m/z	tensions de cône (V)	plages de collecte (min)
1	strychnine	107	5	24.20 – 25.90
2	inconnue	131	5	27.30 – 28.25
3	brucine	137	5	28.45 – 29.10

Tableau 5 *: liste des fractions collectées à partir de la TM Ignatia amara.*

- Identification par HRMS

Avant d'analyser chaque fraction en HRMS, chaque fraction a été vérifiée en UPLC-MS Scan. Toutes les masses collectées ont été retrouvées dans les fractions, excepté pour la fraction 1. La masse attendue m/z 107 n'est pas présente. Nous retrouvons deux autres masses, m/z 195 et 177. Dans certaines autres fractions, nous avons aussi des masses supplémentaires. Nous avons essayé d'identifier ces molécules en plus de nos molécules recherchées initialement. L'ensemble des identifications est résumé dans le ***Tableau 6***.

Fractions	m/z mesurés en UPLC-MS	m/z exacts mesurés en HRMS	Formules brutes	Molécules identifiées en HRMS/MS
1	335	335.1750	$C_{21}H_{22}N_2O_2$	strychnine mais pas MS/MS
2	351	351.1699	$C_{21}H_{22}N_2O_3$	strychnine N-oxide mais pas de MS/MS
3	395	395.1697	$C_{23}H_{26}N_2O_4$	brucine mais pas MS/MS

Tableau 6*: résultats des identifications par HRMS de molécules extraites de la TM Ignatia amara.*

Nous avons pu déterminer trois formules brutes correspondant à la strychine, la strychnine N-oxide et à la brucine. Néanmoins, nous n'avons pas pu confirmer les identifications avec les spectres MS/MS. Nous pourrions refaire l'analyse en optimisant la fragmentation de chaque molécule pour confirmer les identifications.

4. Conclusion

Peu d'études métabolomiques ont été faites sur *Strychnos ignatii* en dehors des alcaloïdes. Nous avons identifié une quarantaine de molécules dont des sucres, des acides organiques et des composés phénoliques. Des alcaloïdes ont été retrouvés par HRMS mais également par GC-MS méthode polaire, qui pourrait être une méthode intéressante pour le dosage de la strychnine.

5. Annexes

Annexe 1 : métabolites détectés et identifiés par RMN 1H dans différents extraits brutes d'espèces du genre *Strychnos*. D'après [5].

Compounds	*S. nux-vomica* seeds	*S. nux-vomica* stem bark	*S. nux-vomica* "false angostura"	*S. nux-vomica* root bark	*S. ignatii* seeds	*S. icaja* stem bark	*S. icaja* root bark	*S. icaja* collar bark	*S. icaja* leaves
α-Colubrine		+							
β-Colubrine	+	+	+	+					
Brucine	+	+	+	+	+				
Caffeic acid ester	+	+	+	+	+	+	+	+	
Epoxy-novacine						+	+	+	+
Fatty acids	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fatty acids (unsaturated)	+				+				
Hydroxy-epoxy-novacine						+	+	+	+
Icajine						+	+	+	
Isovangucine							+	+	
Loganin	+				+				
Novacine	+					+			+
Strycheine	+	+	+	+	+	+	+	+	
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+		
Sungucine							+	+	
Vomicine	+					+	+	+	

6. Bibliographie

1. Marzotto, M., et al., *Effects of Ignatia amara in mouse behavioural models.* Homeopathy, 2012. **101**(1): p. 57-67.

2. Philippe, G., et al., *About the toxicity of some Strychnos species and their alkaloids.* Toxicon, 2004. **44**(4): p. 405-416.

3. Jean, Bruneton., *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)*. 2009: Lavoisier.

4. *https://nutrawiki.org/ignatia-amara/*.

5. Frédérich, M., et al., *Metabolomic analysis of Strychnos nux-vomica, Strychnos icaja and Strychnos ignatii extracts by 1 H nuclear magnetic resonance spectrometry and multivariate analysis techniques.* Phytochemistry, 2004. **65**(13): p. 1993-2001.

Chapitre 16 : *Valeriana officinalis*

1. Description générale

La valériane (*Valeriana officinalis*) fait partie de la famille des Valérianacées (***Figure 1***). Nous la retrouvons principalement dans les pays occidentaux. Elle présente des activités sédatives et anxiolytiques [1]. La teinture-mère est fabriquée à partir des parties souterraines de la plante, dans un mélange éthanol/eau, 55/45 v/v.

Figure 1 *: photographie des parties aériennes fleuries de Valeriana officinalis [2].*

2. Bibliographie et connaissances scientifiques

Nous dosons dans la TM la teneur en acides sesquiterpéniques, exprimés en acide valérinique. Cette dernière doit être au minimum de 0.004% (m/m). La teneur ne doit pas descendre en dessous de 0.002% (m/m) lors des tests de stabilité.

Dans la même famille des acides sesquiterpéniques, nous pouvons également retrouver l'acide acétoxyvalérinique, l'hydroxyvalérinique et la valéranone.

Des métabolites de la famille des iridoïdes, les valépotriates, ont également été identifiés : valtrate, isovaltrate et acévaltrate. Ce sont des composés assez présents au sein des racines (entre 0.8 et 1.7% m/m) mais ils sont instables [3]. Ces molécules seraient également responsables, comme les acides sesquiterpéniques, de l'activité sédative et anxiolytique de la plante.

Des flavonoïdes, souvent glycosylés, ont également été identifiés dans la valériane, telles que la linarine et l'hespéridine [4].

L'huile essentielle issue des racines de valériane a également été étudiée. La liste de métabolites identifiés se trouve en ***Annexe 1***.

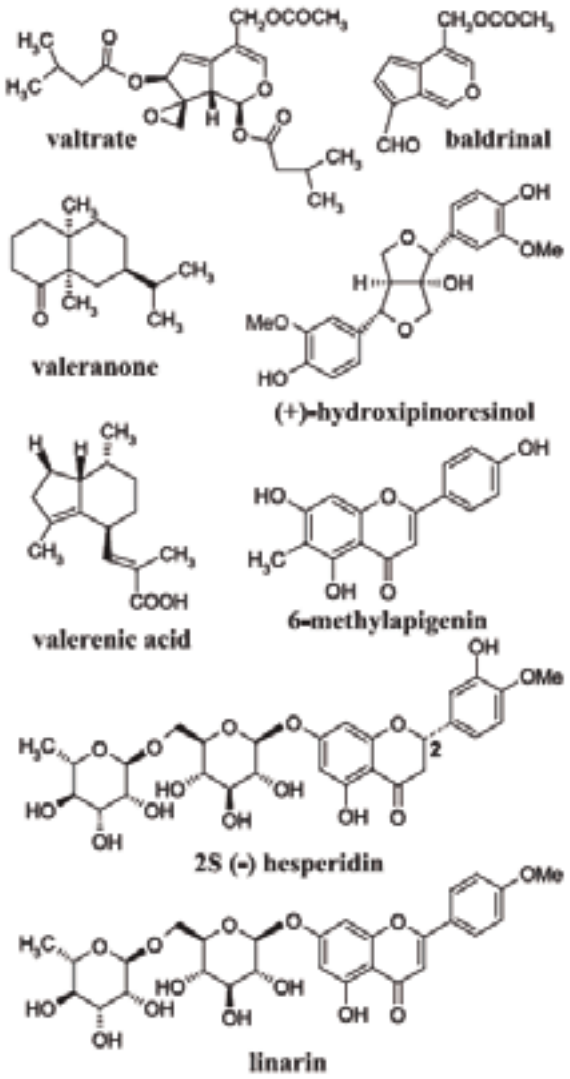


Figure 2 *: Structures chimiques du valtrate (C22H30O8, MM : 422.469g.mol-1), de l'acide valérénique ($C_{15}H_{22}O_2$ MM = 234.33 g.mol^{-1}), la valéranone ($C_{15}H_{26}O$, MM : 222.366g.mol^{-1}) et la badrinal ($C_{12}H_{10}O_4$, MM : 218.205g.mol^{-1}), l'hydroxypinorésinol ($C_{20}H_{22}O_7$, MM : 375.144g.mol^{-1}), le 6-methylapigénine ($C_{16}H_{12}O_5$, MM : 284.263g.mol^{-1}), l'hespéridine (C28H34O15, MM : 610.561g.mol^{-1}) et la linarine ($C_{28}H_{32}O_{14}$, MM : 592.545g.mol^{-1}). D'après [4].*

3. Résultats

a. Analyse des composés polaires de la TM en GC-MS après dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
glycolic acid - 1067-147
pyruvate - 1081-147
alanine - 1097-116
ethanolamine - 1275-174
leucine - 1281-158
phosphoric acid - 1286-299
isoleucine - 1304-158
succinic acid - 1320-247
glyceric acid - 1346-292
fumaric acid - 1353-245
serine - 1375-218
malic acid - 1508-147
pyroglutamic acid - 1536-156
ornithine - 1629-142
glutamic acid - 1635-246
xylose - 1684-307
ribose - 1699-307
citric acid - 1833-273*
citric acid - 1841-273*
quinic acid - 1894-345
fructose - 1916-307
sorbose - 1931-307
glucose - 1950-319
galactose - 1961-319
ethylglucopyranoside - 1969-204
caffeic acid - 1996-396
hexadecanoic acid - 2040-313
myoinositol - 2122-318
caffeic acid - 2142-396
ethyl linoleate - 2154-81
octadecatrienoic acid - 2206-337
sucrose - 2695-361*
sucrose - 2713-361*
cellobiose - 2775-361
maltose - 2812-361
gentiobiose - 2890-361*
gentiobiose - 2913-361*
melibiose - 2937-361
chlorogenic acid - 3035-345*

chlorogenic acid - 3146-345*
raffinose - 3459-361
1-kestose - 3474-361
MOLECULES PUTATIVES
[butanoic acid, 3-methyl-3-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester] - 1211-131
[ethyl phosphoric acid, di-TMS] - 1230-211
[galactosylglycerol] - 2351-204

***Tableau 1** : liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode polaire dans la TM Valeriana officinalis. Nomenclature : NOM - Indice de rétention – Ion caractéristique. (*) : Formes ou nombre de groupements TMS différents.*

b. Analyse des composés volatiles de la TM en GC- MS sans dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
camphene - 959-121
β-pinene - 982-93
borneol - 1164-95
p-menth-1-en-4-ol - 1176-111
2-pinen-10-ol - 1196-108
Anisole, 2-isopropyl-5-methyl- - 1234-149
bornyl acetate - 1288-136
myrtenyl acetate - 1328-119
α-terpinyl acetate - 1352-136
γ-elemene - 1439-121
β-ionone - 1443-121
alloaromadendrene - 1468-161
phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)- - 1515-191
elemol - 1555-161
spatulenol - 1585-205
caryophyllene oxide - 1592-187
γ-eudesmol - 1628-204
agarospirol - 1652-161
ç-eudesmol - 1662-161
a-bisabolol - 1691-119
hexadecanoic acid, ethyl ester - 1993-101
linoleic acid ethyl ester - 2163-263
linolenic acid, ethyl ester - 2171-79
di-(2-ethylhexyl)phthalate - 2550-149
MOLECULES PUTATIVES
[p-menth-2-ene] - 1029-93
[α-gurjunene] - 1416-204*
[α-selinene] - 1461-93
[α-gurjunene] - 1465-204*

[citronellyl propionate] - 1579-138
[rosifoliol] - 1603-164
[eudesm-7(11)-en-4-ol] - 1668-204
[(E)-valerenyl isovalerate] - 1704-187*
[(E)-valerenyl isovalerate] - 1814-187*
[(E)-valerenyl isovalerate] - 1836-187*
[trans-isoeugenol] - 1861-164
[(E)-valerenyl isovalerate] - 2060-187*
[ç-sitosterol] - 3335-414
[phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-, phosphite (3:1)] - 3443-441

Tableau 2 *: liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode apolaire dans la TM Valeriana officinalis. Nomenclature : NOM – Indice de rétention – Ion caractéristique. (*) : Formes différentes ou isomères non présents dans les banques de données.*

De nombreuses molécules ont pu être identifiées à l'aide cette méthode. La racine de valériane est riche en huiles essentielles, de 2 à 20mL par Kg de racine sèche [3]. Plusieurs molécules sont identifiées sous le nom de valerenyl isovalerate ($C_{20}H_{32}O_2$, MM : 304.4669g.mol^{-1}). Beaucoup de composés ont des structures proches de cette molécule dans la TM mais ils ne sont pas présents dans la banque de données. Ces composés proches du valerenyl isovalerate possèdent des spectres de masses similaires. L'identification dans les banques de données se faisant par comparaison des spectres de masses, la meilleure identification obtenue pour ces composés est celle du valerenyl isovalerate.

c. Analyse de la TM en UPLC-MS/MS mode MRM

MOLECULES IDENTIFIEES
apigenin
coumaric acid
phenylalanine
caffeic acid
ferulic acid
tryptophane
caffeoyl-quinate
MOLECULES PUTATIVES
[sinapoylcholine dimer (isomer_2)]
[peonidin]

Tableau 3 *: liste des molécules identifiées et putatives en UPLC-MS/MS dans la TM Valeriana officinalis.*

4. Conclusion

Près d'une centaine de molécules ont pu être identifié à l'aide des trois méthodes complémentaires GC-MS et LC-MS/MS. toutes ces molécules proviennent des parties souterraines de *Valeriana officinalis*. De nombreuses familles phytochimiques sont représentées : des mono- et sesqui-terpènes ; des acides gras ; des stérols ; des sucres ; des acides organiques ; des acides aminés et des composés phénoliques.

5. Annexes

Annexe 1 : liste des métabolites identifiés en GC-MS de l'huile essentielle de racines de valériane. I : indice de rétention, colonne DB-5, alcanes (alcanes C9-C22). D'après [1].

	Compound	I		Compound	I
1	Isovaleric acid	833	31	β-Bisabolene	1504
2	α-Thujene	927	32	γ-Cadinene	1514
3	α-Pinene	936	33	δ-Cadinene	1523
4	Camphene	954	34	Kessane	1537
5	β-Pinene	979	35	Elemol	1550
6	p-Cymene	1025	36	Germacrene B	1558
7	Limonene	1028	37	Spathulenol	1576
8	1,8-Cineole	1031	38	Globulol	1585
9	Borneol	1169	39	Guaiol	1601
10	Citronellol	1226	40	10-*epi*-γ-Eudesmol	1623
11	Bornyl acetate	1286	41	Acetoxyvaleranone	1627
12	Myrtenyl acetate	1325	42	*epi*-α-Cadinol	1638
13	δ-Elemene	1335	43	Hinesol	1641
14	α-Terpinyl acetate	1346	44	β-Eudesmol	1650
15	Citronellyl acetate	1335	45	Valerenol	1653
16	β-Elemene	1391	46	Valerenal	1666
17	α-Gurjunene	1407	47	Valeranone	1673
18	*E*-Caryophyllene	1416	48	Elemol acetate	1680
19	β-Gurjunene	1431	49	*epi*-α-Bisabolol	1681
20	α-Humulene	1452	50	Valerenic acid	1684
21	*allo*-Aromadendrene	1458	51	14-Hydroxy-α-muurolene	1777

6. Bibliographie

1. Safaralie, A., S. Fatemi, and F. Sefidkon, *Essential oil composition of Valeriana officinalis L. roots cultivated in Iran: Comparative analysis between supercritical CO2 extraction and hydrodistillation.* Journal of chromatography A, 2008. **1180**(1): p. 159-164.

2. *https://gobotany.newenglandwild.org/species/valeriana/officinalis/.*

3. Jean, Bruneton., *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)*. 2009: Lavoisier. P. 740-746.

4. Fernández, S., et al., *Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from Valeriana officinalis.* Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2004. **77**(2): p. 399-404.

Chapitre 17 : *Staphysagria*

1. Description générale

La teinture-mère de *Staphysagria* est fabriquée à partir de l'espèce *Delphinium staphysagria*, une renonculacée principalement présente dans la région méditerranéenne. Les graines de la staphysaigre étaient utilisées pour préparer des décoctions afin d'obtenir un parasiticide en application externe, d'où son nom commun d'herbe aux poux [1]. Elle est utilisée pour ses propriétés anti-inflammatoire et analgésique.

Figure 1 *: photographie des parties aériennes fleuries aériennes de la Delphinium staphysagria [2]*

2. Bibliographie et connaissances scientifiques

La méthyllycaconitine est l'un des alcaloïdes retrouvés fréquemment chez le genre *Delphinium*. C'est un curarisant qui bloque la conduction cholinergique au niveau post-synaptique [1].

Des alcaloïdes diterpéniques ont été identifiés dans la staphysaigre tels que la delphinine, la chasmanine et la delphisine [3, 4]. Ces molécules sont responsables de l'activité anti-inflammatoire, mais induisent une toxicité si elles sont présentes en trop forte concentration.

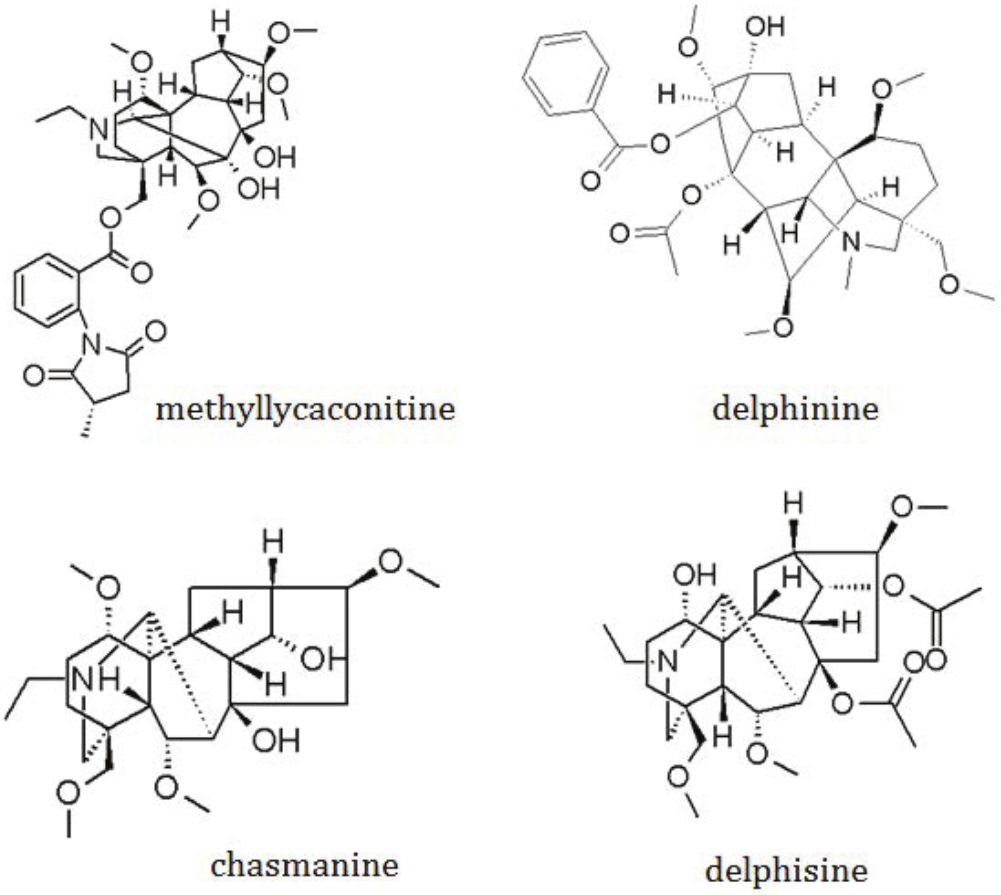


***Figure 2**: structures chimiques de la méthyllycaconitine ($C_{37}H_{50}N_2O_{10}$, MM : 682.800g.mol^{-1}), la delphinine ($C_{33}H_{45}NO_9$ MM = 599.71 g.mol^{-1}), la chasmanine ($C_{25}H_{41}NO_6$ MM = 451.60 g.mol^{-1}) et la delphisine ($C_{28}H_{43}NO_8$ MM = 521.64 g/mol^{-1}).*

3. Résultats et discussion

a. Analyse des composés polaires de la TM en GC-MS après dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
ethanolamine - 1282-174
glycerol - 1288-205
glyceric acid - 1348-292
fumaric acid - 1356-245
erythritol - 1526-217
4-aminobutyric acid - 1541-304
xylitol - 1741-319
fructose - 1901-307
sorbose - 1912-307
mannose - 1922-319*
glucose - 1928-319
mannose - 1948-319*
mannitol - 1970-319
myoinositol - 2130-318
oleic acid - 2225-339
sucrose - 2724-361
MOLECULES PUTATIVES
[oleamide] - 2432-338

Tableau 1 *: liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode polaire dans la TM Staphysagria. Nomenclature : NOM - Indice de rétention – Ion caractéristique. (*) : Formes ou nombres de TMS différents.*

b. Analyse des composés volatiles de la TM en GC- MS sans dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
benzoic acid ethyl ester - 1168-105
bornyl acetate - 1288-136
phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)- - 1514-191
agarospirol - 1651-161
hexadecanoic acid ethyl ester - 1994-101
linoleic acid ethyl ester - 2162-95
(E)-9-Octadecenoic acid ethyl ester - 2169-264
bis(2-ethylhexyl) phthalate - 2550-149
MOLECULES PUTATIVES
[eudesm-7(11)-en-4-ol] - 1667-204
[phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-, phosphite (3:1)] - 3443-441

Tableau 2 *: liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode apolaire dans la TM Staphysagria. Nomenclature : NOM – Indice de rétention – Ion caractéristique.*

c. *Analyse de la TM en UPLC-MS/MS mode MRM*

MOLECULES IDENTIFIEES
rutin (quercetin-3-O-rutinoside)
kaempferol-3-O-rutinoside
phenylalanine
tryptophane
MOLECULES PUTATIVES
[Quercetin-hexoside-methylpentoside (isomer_2)]
[1-palmitoylglycerophosphatidylcholine]

Tableau 3 *: liste des molécules identifiées et putatives en UPLC-MS/MS dans la TM Staphysagria.*

4. Conclusion

Une trentaine de molécules ont été identifiées dans la TM *Staphysagria*. Nous n'avons pas retrouvé d'alcaloïdes à l'aide de nos méthodes. Il est nécessaire d'utiliser une méthode plus ciblée, soit d'extraction, soit d'analyse tel que la HRMS, pour les identifier.

5. Bibliographie

1. Jean, B., *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)*. 2009: Lavoisier. p. 1200-1201.

2. *https://www.preservons-la-nature.fr/blog/?p=2053*.

3. Faridi, B., et al., *Toxicité aiguë et activité anti-inflammatoire des graines de Delphinium staphysagria.* Phytothérapie, 2014. **12**(3): p. 175-180.

4. Anser, H. and R. Najam, *Anti Nociceptive Activity of ARGENTUM NITRICUM, STAPHYSAGRIA, IGNATIA AMARA in Mice in Comparison with Acetyl Salicylic Acid (Aspirin).* International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2015. **6**(1): p. 147.

Chapitre 18 : *Avena sativa*

1. Description générale

L'avoine cultivée fait partie de la famille des poacées (***Figure 1***). La teinture-mère est fabriquée par macération des parties aériennes fleuries dans un mélange éthanol/eau 45/55 v/v.

Figure 1 *: photographie des parties aériennes fleuries de l'avoine [1].*

2. Bibliographie et connaissances scientifiques

Pour le contrôle de la bonne fabrication de la TM, nous dosons l'acide trans-aconitique ($C_6H_6O_6$, MM : 174.1g.mol^{-1}). La teneur doit être au minimum de 0.015% m/m.

De nombreux composés phénoliques ont été identifiés dans l'avoine, tels que l'acide cinnamique, l'acide caféique, l'acide p-coumarique, l'acide férulique [2] ; l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide vanillique et la vanilline [3] (***Figure 2***). Tous ces composés ont des propriétés antioxydantes.

Le peptide lunasine a été identifié dans l'avoine. Ce peptide, également identifié dans d'autres céréales tels que l'orge, le seigle et le blé, est étudié car il présente des propriétés anti-inflammatoires. Il intervient dans la prévention contre le cancer et dans la diminution du cholestérol [4]. Ce dernier cas est aussi induit par un régime élevé en β-glucanes, dont l'avoine est riche [5].

Des phytoalexines de la famille des avenanthramides (avenanthramide A, B et C) ont été identifiées dans l'avoine. Ces molécules ne sont produites qu'en réponse à un stress particulier, en l'occurrence ici en réponse à l'attaque d'un pathogène [6]. Il est possible mais peu probable que nous puissions en retrouver dans la TM, car ce sont des molécules synthétisées dans des conditions particulières, souvent très localisées dans la plante, et produites à de faibles concentrations. De plus, elles sont généralement très vite métabolisées par la plante lorsqu'il n'y a plus de stress.

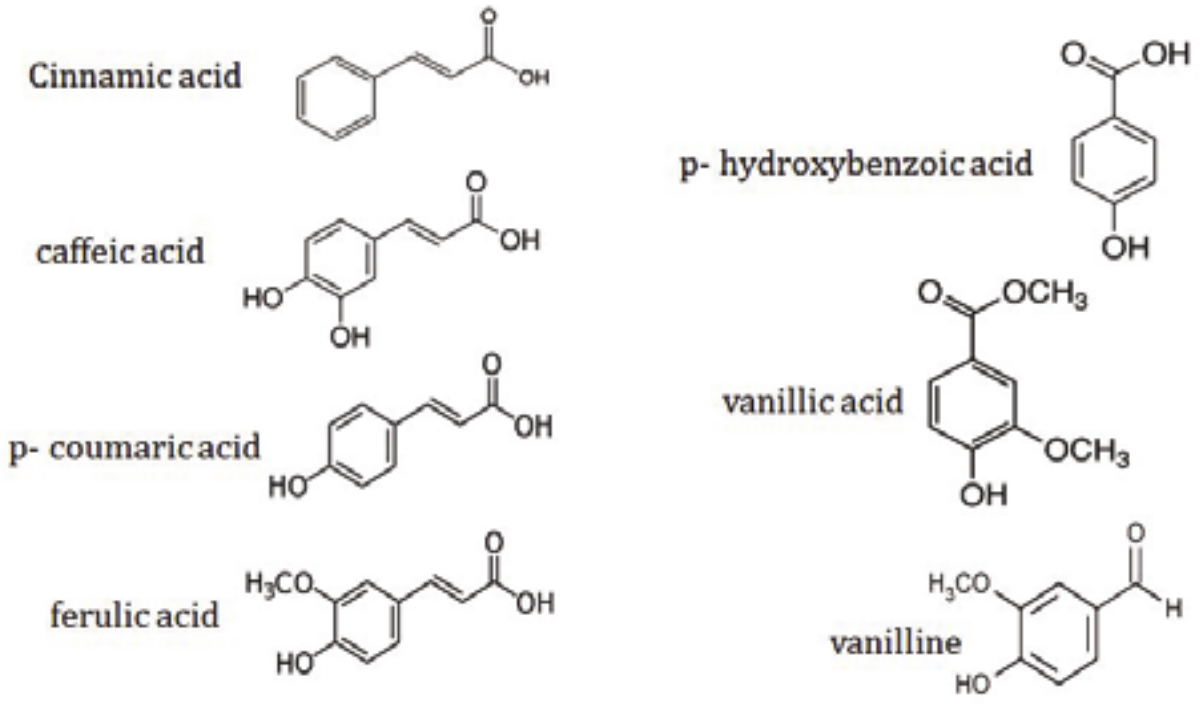


***Figure 2**: structures chimiques des principaux composés phénoliques identifiés chez l'avoine cultivée: l'acide cinnamique ($C_9H_8O_2$, MM : 148.16g.mol^{-1}), l'acide caféique ($C_9H_9O_4$, MM : 180.15g.mol^{-1}), l'acide p-coumarique ($C_9H_8O_3$, MM : 164.15g.mol^{-1}), l'acide férulique ($C_{10}H_{10}O_4$, MM : 194.18g.mol^{-1}); l'acide p-hydroxybenzoïque ($C_7H_6O_3$, MM : 138.12g.mol^{-1}), l'acide vanillique ($C_8H_8O_4$, MM : 168.15g.mol^{-1}) et la vanilline ($C_8H_8O_3$, MM : 152.15g.mol^{-1}).*

3. Résultats et discussion

a. Analyse des composés polaires de la TM en GC-MS après dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
valine - 1229-144
ethanolamine - 1282-174
leucine - 1286-158
isoleucine - 1309-158
proline - 1314-142
succinic acid - 1325-147
glyceric acid - 1347-292
fumaric acid - 1356-245
threonine - 1405-291
malic acid - 1502-233
pyroglutamic acid - 1534-156
4-Aminobutyric acid - 1540-304
threonic acid - 1578-292
xylose - 1677-307*
xylose - 1683-307*
aconitic acid - 1753-375
shikimic acid - 1819-204
fructofuranose, D- - 1828-437
citric acid - 1835-273
quinic acid - 1885-345
fructose - 1901-307
sorbose - 1912-307
galactose - 1923-319*
glucose - 1930-319
galactose - 1949-319*
1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester - 1965-149
myoinositol - 2130-318
guanine - 2148-352
sucrose - 2722-361
maltose - 2831-361
gentiobiose - 2906-361
1-kestose - 3501-361
MOLECULES PUTATIVES
[malic acid, 4-ethyl ester] - 1459-233
[oleamide] - 2432-338

Tableau 1 *: liste des molécules identifiées en GC-MS méthode polaire dans la TM Avena sativa. Nomenclature : NOM – Indice de rétention – Ion caractéristique. (*) : Formes ou nombre de groupements TMS différents.*

Parmi les nombreuses molécules identifiées, nous identifions l'acide aconitique, métabolite dosé pour le contrôle de la qualité de la TM. Cette méthode permettrait de doser précisément cette molécule et contrôler également une partie du métabolome de la TM en une seule analyse.

b. *Analyse des composés volatiles de la TM en GC- MS sans dérivation*

MOLECULES IDENTIFIEES
phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)- - 1515-191
MOLECULES PUTATIVES
[phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-, phosphite (3:1)] - 3443-441

Tableau 2 *: liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode apolaire dans la TM Avena sativa. Nomenclature : NOM – Indice de rétention – Ion caractéristique.*

c. *Analyse de la TM en UPLC-MS/MS mode MRM*

MOLECULES IDENTIFIEES
kaempferol-3-O-rutinoside
apigenin
dihydroquercetin
coumaric acid
phenylalanine
ferulic acid
tryptophane
coumaroyl-shikimate
coumaroyl quinate
coumaroyl-anthranilate
MOLECULES PUTATIVES
[peonidin]

Tableau 3 *: liste des molécules identifiées en UPLC-MS/MS dans la TM Avena sativa.*

Cette méthode est la méthode de choix pour identifier et doser les composés phénoliques présents dans la TM d'avoine.

4. Conclusion

Nous avons identifié une quarantaine de molécules dans la TM Avena sativa. La méthode GC-MS polaire a permis d'identifier à elle seule plus d'une trentaine de molécules, dont l'acide aconitique, qui est dosé pour le contrôle de la qualité de la TM. Nous avons pu confirmer la richesse en composés phénoliques de l'avoine par UPLC-MS/MS.

5. Bibliographie

1. *http://1000-arbres.com/liste-des-plantes-medicinale/plante-medicinale/avoine-cultive-avena-sativa*.

2. Rakić, S., et al., *The impact of storage on the primary and secondary metabolites, antioxidant activity and digestibility of oat grains (Avena sativa).* Journal of Functional Foods, 2014. **7**: p. 373-380.

3. Emmons, C.L., D.M. Peterson, and G.L. Paul, *Antioxidant capacity of oat (Avena sativa L.) extracts. 2. In vitro antioxidant activity and contents of phenolic and tocol antioxidants.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. **47**(12): p. 4894-4898.

4. Nakurte, I., et al., *Detection of the lunasin peptide in oats (Avena sativa L).* Journal of cereal science, 2013. **57**(3): p. 319-324.

5. Jean, Bruneton., *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)*. 2009: Lavoisier. p. 71-72.

6. Izumi, Y., et al., *High-resolution spatial and temporal analysis of phytoalexin production in oats.* Planta, 2009. **229**(4): p. 931.

Chapitre 19 : *Hyoscyamus niger*

1. Description générale

La jusquiame noire fait partie de la famille des Solanacées. Elle est originaire d'Europe et d'Afrique du nord, mais elle est également présente en Asie, en Amérique de nord et au Brésil [1]. La teinture-mère est fabriquée par macération de la plante entière fraiche dans un mélange éthanol/eau 45/55 v/v.

Figure 1*: photographie de la partie aérienne fleurie de la jusquiame noire [2].*

2. Bibliographie et connaissances scientifiques

Pour le contrôle de la bonne fabrication de la teinture-mère, nous dosons les alcaloïdes totaux, exprimés en hyoscyamine ($C_{17}H_{23}NO_3$, MM : 289.4 g.mol^{-1}). La teneur doit être comprise entre 0.02 et 0.05% m/m.

Tout comme dans l'espèce *Atropa belladonna*, la jusquiame noire est riche en alcaloïdes tropaniques : atropine, scopolamine et hyoscyamine [3]. Leurs structures chimiques sont présentées au « Chapitre 7, Figure 2 ». La plante peut également contenir des alcaloïdes non tropaniques appellés calystégines (***Figure 2***).

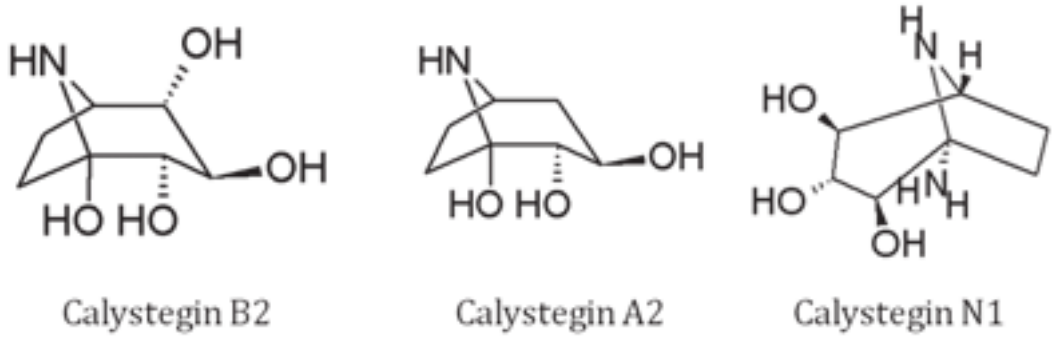


Figure 2*: structures chimiques des alcaloïdes: calystegin B2 ($C_7H_{13}NO_4$, MM: 175.182g.mol^{-1}), calystegin A2 ($C_7H_{13}NO_3$, MM: 175.182g.mol^{-1}) et calystegin N1 ($C_7H_{14}N_2O_3$, MM: 174.198g.mol^{-1}).*

Des withanolides (daturalactone-4 ; hyoscylamilactol et 16α-acetoxyhyoscyamilactol) et plusieurs coumarinolignanes (venkastin ; cleomiscosin **A** et **B**) ont été identifiées dans les graines de *Hyoscyamus niger* [4, 5].

D'autres familles phytochimiques ont été explorées chez *Hyoscyamus*. Nous pouvons retrouver des flavonoïdes, des composés phénoliques, des saponines et des lipides. La liste des molécules identifiées dans chaque famille est présentée en ***Annexe 1***.

3. Résultats et discussion

a. Analyse des composés polaires de la TM en GC-MS après dérivation

MOLECULES IDENTIFIEES
valine - 1229-218
ethanolamine - 1282-174
leucine - 1286-158
isoleucine - 1309-158
proline - 1313-142
succinic acid - 1324-147
glyceric acid - 1348-292
fumaric acid - 1355-245
aspartic acid - 1434-160
malic acid - 1502-147
pyroglutamic acid - 1534-156
4-Aminobutyric acid - 1540-174
threonic acid - 1578-292
α-ketoglutaric acid - 1584-198
ribose - 1683-307
xylose - 1698-307
citric acid - 1836-273
adenine - 1876-264
quinic acid - 1886-345
fructose - 1901-307
sorbose - 1912-307
galactose - 1923-319*
glucose - 1929-319
galactose - 1949-319*
myoinositol - 2130-318
guanine - 2148-352
3-trans-caffeoylquinic acid - 3048-345
chlorogenic acid - 3155-345
MOLECULES PUTATIVES
[ethyl phosphoric acid, di-TMS derivative] - 1238-211
[acetic acid, bis[(trimethylsilyl)oxyl]-, trimethylsilyl ester] - 1267-191
[ethyl-α-D-glucopyranoside] - 1817-204*
[ethyl-α-D-glucopyranoside] - 1848-204*
[ethyl-α-D-glucopyranoside] - 1962-204*
[maltose] - 2006-204
[caffeic acid] - 2094-352

***Tableau 1** : liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode polaire dans la TM Hyoscyamus niger. Nomenclature : NOM - Indice de rétention – Ion caractéristique. (*) : Formes ou nombre de TMS différents.*

b. *Analyse des composés volatiles de la TM en GC- MS sans dérivation*

MOLECULES IDENTIFIEES
benzoic acid, ethyl ester - 1169-105
benzeneacetic acid, ethyl ester - 1244-91
decanoic acid, ethyl ester - 1397-101
1,2-benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester - 1870-149
phytol - 2117-123
MOLECULES PUTATIVES
[heptane, 3,3,5-trimethyl] - 1021-71
[3-ethyl-3-methylheptane] - 1055-71
[1-hexanol, 3,5,5-trimethyl-] - 1065-84
[(+)-2-bornanone] - 1143-95
[octanoic acid, ethyl ester] - 1195-88
[macrosphelide F] - 1315-111
[phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-] - 1515-191
[9,12,15-octadecatrienoic acid, ethyl ester, (Z,Z,Z)-] - 2168-108
[phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-, phosphite (3:1)] - 3440-441

Tableau 1 *: liste des molécules identifiées et putatives en GC-MS méthode apolaire dans la TM drosera. Nomenclature : NOM – Indice de rétention – Ion caractéristique.*

c. *Analyse de la TM en UPLC-MS/MS mode MRM*

MOLECULES IDENTIFIEES
rutin (quercetin-3-O-rutinoside)
kaempferol-3-glucoside
dihydroquercetin
coumaric acid
phenylalanine
tryptophane
coumaroyl quinate
caffeoyl quinate

Tableau 2 *: liste des molécules identifiées en UPLC-MS/MS dans la TM drosera.*

d. *Collecte de fractions par HPLC semi-préparative et identification de métabolites d'intérêts par HRMS.*

- Méthode HPLC-semi-préparative

Tous les systèmes analytiques et les préparations d'échantillons sont décrits dans la « Partie II Matériel et Méthodes, VIII».

La méthode chromatographique utilisée pour la collecte des fractions de la TM *Hyoscyamus niger* est décrite dans le ***Tableau 3***.

Temps (min)	débit (mL.min-1)	% A	% B
0	3	95	5
2	3	95	5
8	3	70	30
25	3	65	35
35	3	60	40
40	3	5	95
60	3	4	96
68	3	0	100
71	3	0	100
74	3	95	5
80	3	95	5

Tableau 3 *: gradient de solvant utilisé pour la séparation et la collecte des fractions issues de la TM Hyoscyamus niger. Solvant A : eau + 0.1% acide formique ; solvant B : méthanol + 0.1% acide formique.*

Nous avons collecté six fractions dont trois pouvant contenir la scopolamine, l'hyoscyamine et la hyosgerine. Les autres fractions contiennent des molécules inconnues (***Tableau 4***). Au total, nous avons effectué six injections de 100µL de TM. Les six réplicats de chaque fraction ont été regroupés et séchés au concentrateur pour être stockés à 4°C en attendant les analyses HRMS.

Fractions	molécules potentielles	m/z	tensions de cône (V)	plages de collecte (min)
1	scopolamine	304	5	/
2	inconnue	205	5	/
3	hyoscyamine	290	5	/
4	inconnue	338	5	44.80 – 45.07
5	inconnue	485	5	45.59 – 45.81
6	hyosgerin	429	5	46.72 – 47.07

Tableau 4 *: Liste des fractions collectées à partir de la TM Hyoscyamus niger. Les fractions 1, 2 et 3 n'ont pas été collectées en fonction du temps de rétention mais en fonction des intensités des signaux MS (voir* ***Figure 3****).*

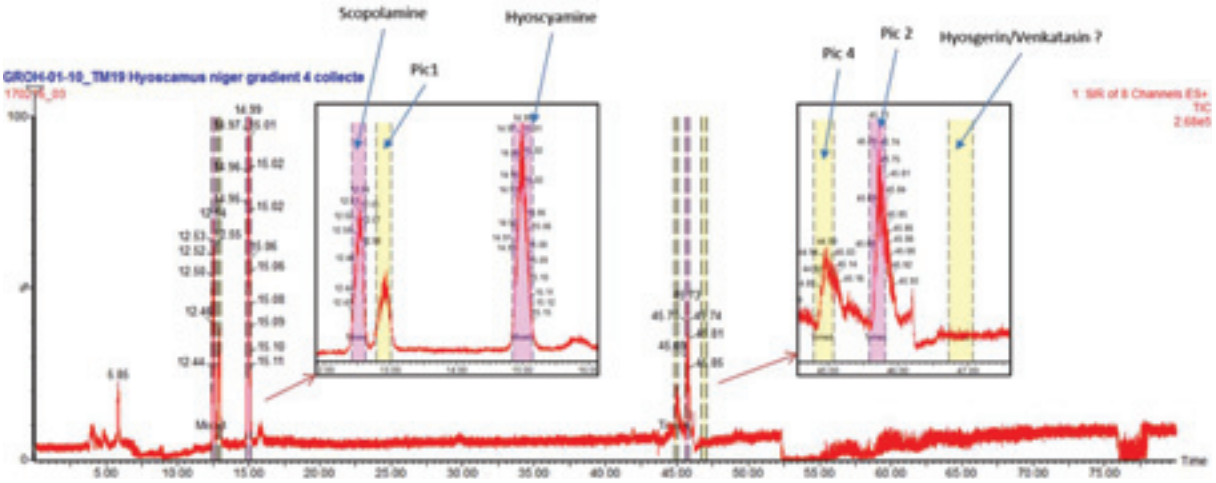


Figure 3 *: Chromatogramme HPLC-MS complet (0-80min) de la collecte des fractions de la TM Hyoscyamus niger. Le chromatogramme correspond à la somme des SIR enregistrés pour chaque m/z décrit dans le* ***Tableau 4****. Les plages de collecte sont représentées en jaune et violet. Les intensités des signaux MS étaient suffisamment bonnes pour effectuer la collecte en se basant dessus.*

- Identification par HRMS

Avant d'être analysée en HRMS, chaque fraction a été vérifiée en UPLC-MS Scan. Toutes les masses collectées ont été retrouvées, excepté pour la fraction 6. La masse attendue m/z 429 n'était pas présente. L'ensemble des identifications est résumé dans le ***Tableau 5***.

Fractions	m/z mesurés en UPLC-MS	m/z exacts mesurés en HRMS	Formules brutes	Molécules identifiées en HRMS/MS
1	304	304.1537	$C_{17}H_{21}NO_4$	scopolamine
2	205	205.0971	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	tryptophan
3	290	290.1748	$C_{17}H_{23}NO_3$	atropine / dl-hyoscyamine
4	338	338.2329	$C_{19}H_{31}NO_4$	/
5	485	485.3103	$C_{26}H_{45}O_8$	/

Tableau 5 *: Liste des formules brutes et des molécules identifiées en HRMS dans la TM Hyoscyamus niger.*

Grace à cette méthode, nous avons obtenu cinq formules brutes. Nous avons purifié et identifié les deux alcaloïdes scopolamine et hyoscyamine. Nous avons également identifié le tryptophane.

4. Conclusion

A l'aide des approches GC-MS, LC-MS et HRMS, nous avons identifié une cinquantaine de molécules dans la TM *Hyoscyamus niger*. Parmi elles, nous retrouvons principalement des acides organiques, des sucres et des acides phénoliques. Nous avons également confirmé la présence d'alcaloïdes tels que la scopolamine et la hyoscyamine.

5. Annexes

Annexe 1 : liste des métabolites non-alcaloïdes identifiés dans les graines de *Hyoscyamus niger*.

Secondary metabolite	Name of the compound
Lignans	Hyosmin, Cannabisin D, Cannabisin G, Grossamide, Hyoscyamide, Hyoscyamal, Balanophonin
Coomarinolignans	Cleomiscosin A, Cleomiscosin B, Hyosgerin, Venkatasin, Cleomiscosin A, Methyl ether
Withanolides	Hyoscyamilactol, 16α-acetoxy-hyoscyamilactol, Daturalactone
Glycerides	1- *O* -octadecanoyl glycerol, *1- O - (9Z,* 12Z-octadecadienoyl) glycerol, 1- *O* - (9Z, 12Z-octadecadienoyl) - 3 - *O* –nonadecanoyl glycerol, 1- *O*-(9z, 12Z-octadecadienoyl)–2- *O*-(12Z-octadecadienoyl)glycerol, 1- *O* - (9Z, 12Z-octadecadienoyl)-3 -*O*-(9Z-octadecanoyl) glycerol
Flavonoids	Rutin, Spiraeoside, 3', 5-Dihydroxy-3, 4', 5', 6, 7- pentamethoxyflavem
Flavonoids glyceride	Pongamoside C, Pongamoside D
Steroidal glycosides	AtroposideA, Atroposide C, Atroposide E, Petunioside L
Saponins	Hyoscyamoside A, B, B1, B2, B3, C, CI, C2, D, D1 E, EI, F, FI, J and J1
Phenolics	Vanillic acid, Vanillin, Pinoresinol, *N*-trans- feruloyltyramine
Miscellaneous	5-(Hydroxymethyl) furfural, Daucosterol, β-sitosterol, 1, 24- tetracosanedioldiferulate, Riboflavin

6. Bibliographie

1. Jean, Bruneton., *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)*. 2009: Lavoisier. p. 965-973.

2. *https://fr.wikipedia.org/wiki/Hyoscyamus_niger*.

3. Alizadeh, A., et al., *Black henbane and its toxicity–a descriptive review.* Avicenna journal of phytomedicine, 2014. **4**(5): p. 297.

4. Ma, C.-Y., I.D. Williams, and C.-T. Che, *Withanolides from hyoscyamus niger seeds.* Journal of natural products, 1999. **62**(10): p. 1445-1447.

5. Sajeli, B., et al., *Hyosgerin, a new optically active coumarinolignan, from the seeds of Hyoscyamus niger.* Chemical and pharmaceutical bulletin, 2006. **54**(4): p. 538-541.

PARTIE III

Le L52

Introduction

Le produit L52 a été créé en 1948 par René Lehning suite à l'épidémie de grippe espagnole survenue après la seconde guerre mondiale. L pour Lehning et 52 pour le numéro de la formulation (référence interne). C'est un médicament homéopathique, présenté sous la forme d'une solution buvable en gouttes, traditionnellement utilisé dans les états grippaux, les courbatures fébriles, les toux non productives, l'asthénie post-grippale (***Figure 1***).

Figure 1 *: flacon de 30mL de L52 et son emballage.*

Le L52 est un mélange des dix teintures-mères suivantes :

- *Eupatorium perfoliatum* 3DH
- *Aconitum napellus* 4DH
- *Bryonia* 3DH
- *Arnica montana* 4DH
- *Gelsemium sempervirens* 6DH
- *China Rubra* 4DH
- *Belladonna* 4DH
- *Drosera rotundifolia* 3DH
- *Polygala senega* 3DH
- *Eucalyptus globulus* 1DH

Ces teintures-mères sont diluées plus ou moins fortement dans de l'éthanol et de l'eau. Rappelons qu'une DH (décimale hahnemannienne) correspond à une dilution 1/10ème, deux DH à une dilution 1/100ème, etc…

Pour cette étude, nous avons utilisé 3 flacons de 30ml de L52 correspondant au début, au milieu et à la fin de production du lot CK706, ainsi que plusieurs flacons du lot de fabrication CK930. Tous les lots de L52 sont fabriqués dans les Laboratoires Lehning à Sainte-Barbe.

Cette partie regroupe l'ensemble des travaux réalisés sur le L52. Comme pour les teintures-mères, nous avons utilisé plusieurs techniques analytiques pour explorer au maximum l'ensemble du métabolome. Le développement de chaque technique et l'ensemble des résultats sont présentés dans les chapitres suivants.

Chapitre 1 : analyses LC-MS du L52

1. Introduction

L'analyse du produit a été abordée de manière similaire à tous les autres extraits de plantes. La chromatographie liquide couplée à la spectrophotométrie UV et à la spectrométrie de masse reste ici une méthode de choix pour observer, dans un premiers temps, la composition globale du métabolome du produit.

2. Matériel et méthodes

a. Préparation des échantillons

2 mL de chaque échantillon de L52 ont été filtrés à 0.2µm à l'aide de filtres Rotilabo® (Spitzenfilter 13 mm PTFE 0.2 µm Carl Roth). Ces échantillons correspondent au début (52D), au milieu (52M) et à la fin (52F) de la fabrication du lot CK706. Ces aliquots sont stockés à 4°C et ont servi de solution stock pour la suite des analyses. 200 µL ont été prélevés et mis dans des tubes en verre UPLC à fond conique et fermés avec des bouchons pré-percés pour être injectés en UPLC.

b. Méthode chromatographique UPLC

Les analyses ont été faites sur le même système UPLC-UV-MS/MS Waters présenté dans la « Partie II Matériel et Méthodes ». Nous avons utilisé une colonne Waters Acquity HSS T3 1.8 µm, 2.1 x 100 mm. La température du four colonne était de 35°C. Les solvants utilisés sont : eau + 0.1% acide formique (A) et méthanol + 0.1% acide formique (B). Le gradient de solvant était : 2% méthanol pendant 2 min puis augmentation du pourcentage de méthanol à 100% pendant 34 min, 100% méthanol pendant 2 min puis retour à 2% méthanol pendant 2 min. Le débit était constant à 0.35ml.min^{-1}. La durée total de l'analyse était de 40 min. 3 µL de chaque échantillon ont été injectés en mode « full loop ».

c. Paramètres DAD et MS

Le détecteur à barrette de diode était en mode Scan de 190 à 500nm, 10 points/sec pendant 40min. Le spectromètre de masse fonctionnait avec quatre méthodes Full Scan différentes pendant 40min: deux méthodes scannant les masses de 100 à 1000 Da, en mode positif et en mode négatif ; deux méthodes scannant les masses de 1000 à 2000 Da, en mode positif et négatif

également. La fréquence d'acquisition était de 1 scan par seconde, le voltage du cône était ± 25V, le solvant delay était de 1,5min.

3. Résultats et Discussion

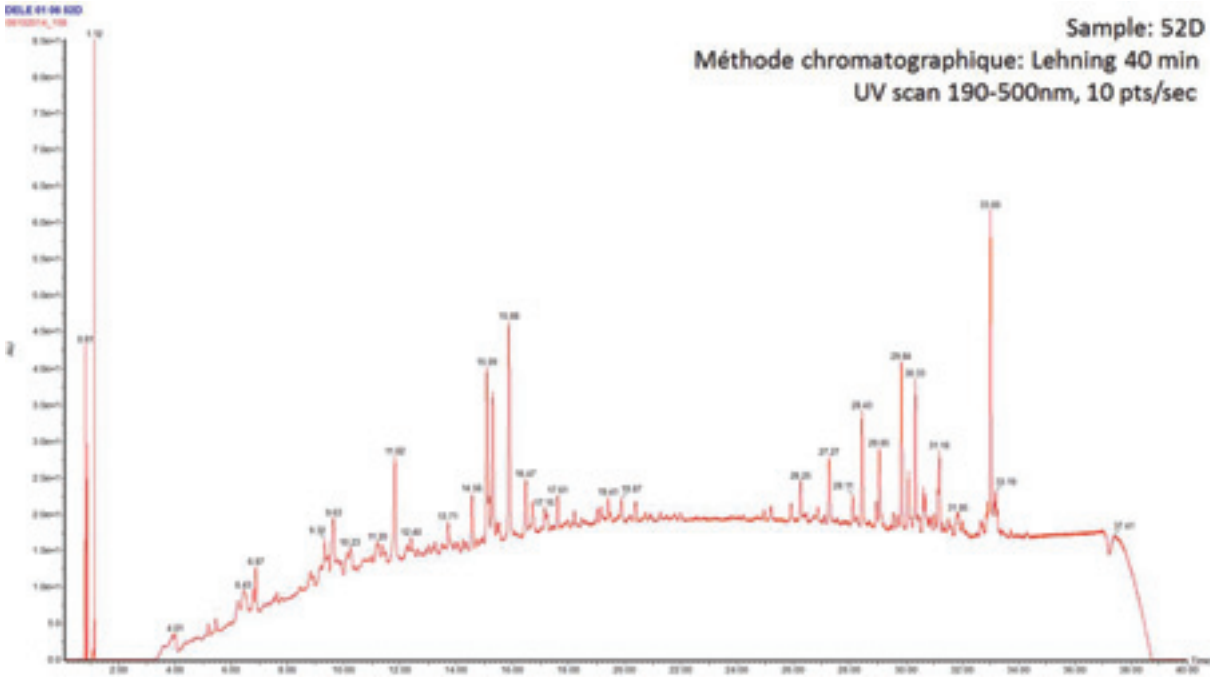


Figure 2 *: chromatogramme UV Scan 190-500nm complet (0-40min) du L52 (échantillon 52D). Nous pouvons observer la présence de nombreuses molécules absorbantes en UV.*

Pic majoritaire	Temps de rétention (min)	aire sous pic	λmax (nm)
1	0.81	798116	255>199
2	0.87	955796	203
3	1.12	1201947	221>198
4	15.09	1499281	194>255>355
5	15.3	1423236	193>215>265
6	15.88	1911684	194>253>368
7	28.43	898942	196>218>279>326
8	29.84	1085084	195>215>276
9	30.33	1076263	197>217>276
10	33	2318125	198>276

Tableau 1 *: Liste des dix pics chromatographiques les plus abondants en UPLC-UV classés en fonction de leur temps de rétention.*

Nous pouvons observer que les trois premiers pics sortent dans le volume mort, les molécules correspondantes sont trop polaires pour être retenues par la colonne. Cela nous laissent penser que dans le L52 seraient présents de nombreux métabolites polaires tels que des sucres, des acides aminés et des acides organiques.

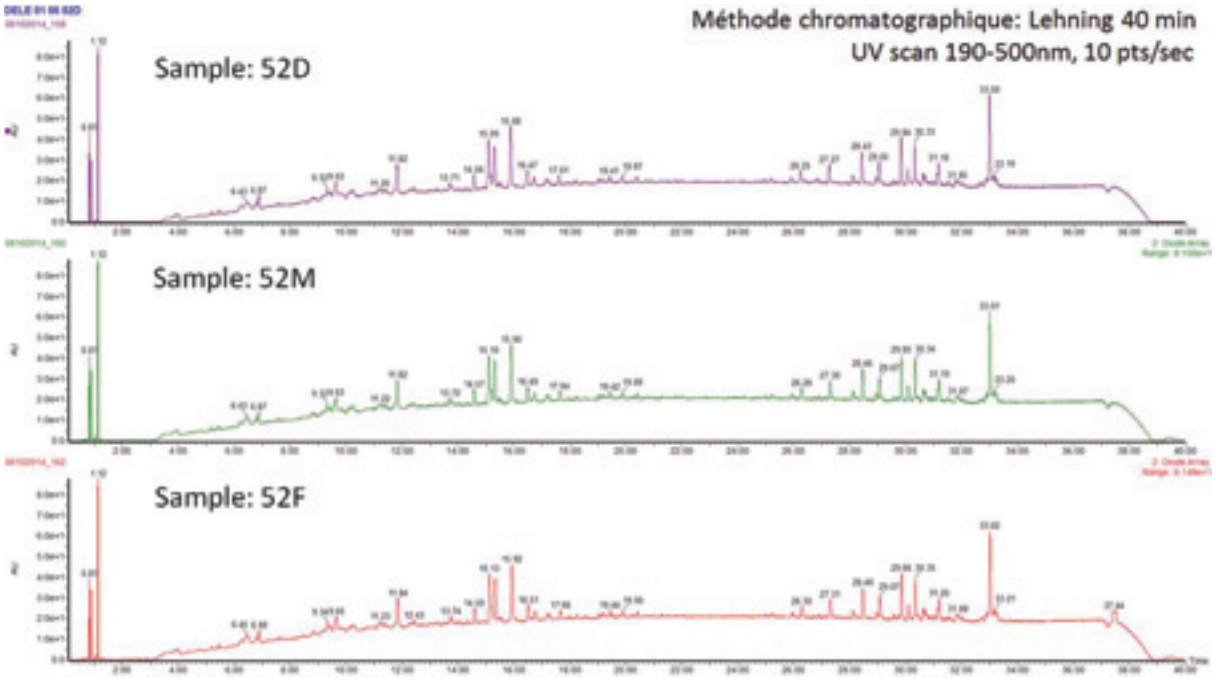


Figure 3 *: chromatogrammes UV-visible SCAN 190-500nm complets (0-40min) du L52 échantillons 52D, 52M et 52F. La superposition des chromatogrammes nous donne un aperçu sur la reproductibilité qualitative d'un même lot du début à la fin de sa fabrication.*

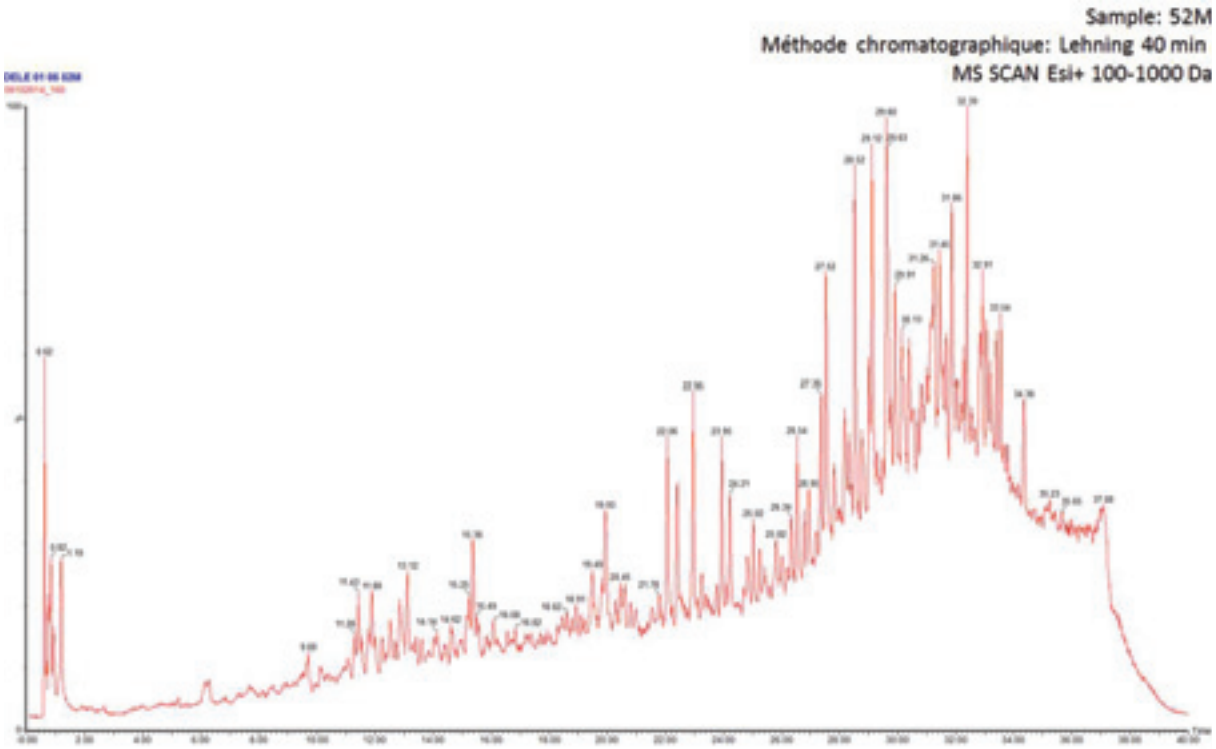


***Figure 4** : chromatogramme Scan Esi mode positif 100-1000Da complet (0-40min) du L52 échantillon 52M.*

Le chromatogramme nous montre la richesse du contenu métabolique du L52. Beaucoup de pics sont présents à de fortes intensités. Nous retrouvons trois zones chromatographiques : la première, en début de chromatogramme, nous renseigne sur la présence de métabolites très polaires. Au milieu du chromatogramme (10-25min) nous retrouvons des pics intenses correspondant à des molécules moyennement polaires. A la droite du chromatogramme se trouve un massif de pics correspondant à des molécules apolaires (***Figure 4***).

Pic majoritaire	temps de rétention (min)	aire sous pic	Ions majoritaires (m/z)
1	22.02	1417678	259>219>237>201>260
2	22.93	1841376	259>237>219>260>238>254
3	23.91	1867583	237>259>238>260>495
4	26.49	5082448	301>279>579>302>205
5	27.32	4053294	313>314>335>647>295>336
6	28.49	2902223	327>328>349>675>
7	29.1	2940266	487>509>488>995>504>510
8	29.6	6779905	455>247>931>477>456

9	31.43	7505495	437>519>247>497>438>520
10	32.39	4729401	338>360>675>339>361>676

***Tableau 2** : Liste des dix pics chromatographiques les plus abondants en UPLC-MS classés en fonctions de leur temps de rétention.*

Nous observons que de nombreux pics majoritaires ont un temps de rétention proche de la fin de l'analyse, ce qui laisse envisager que dans le L52 sont également présentes des molécules assez apolaires.

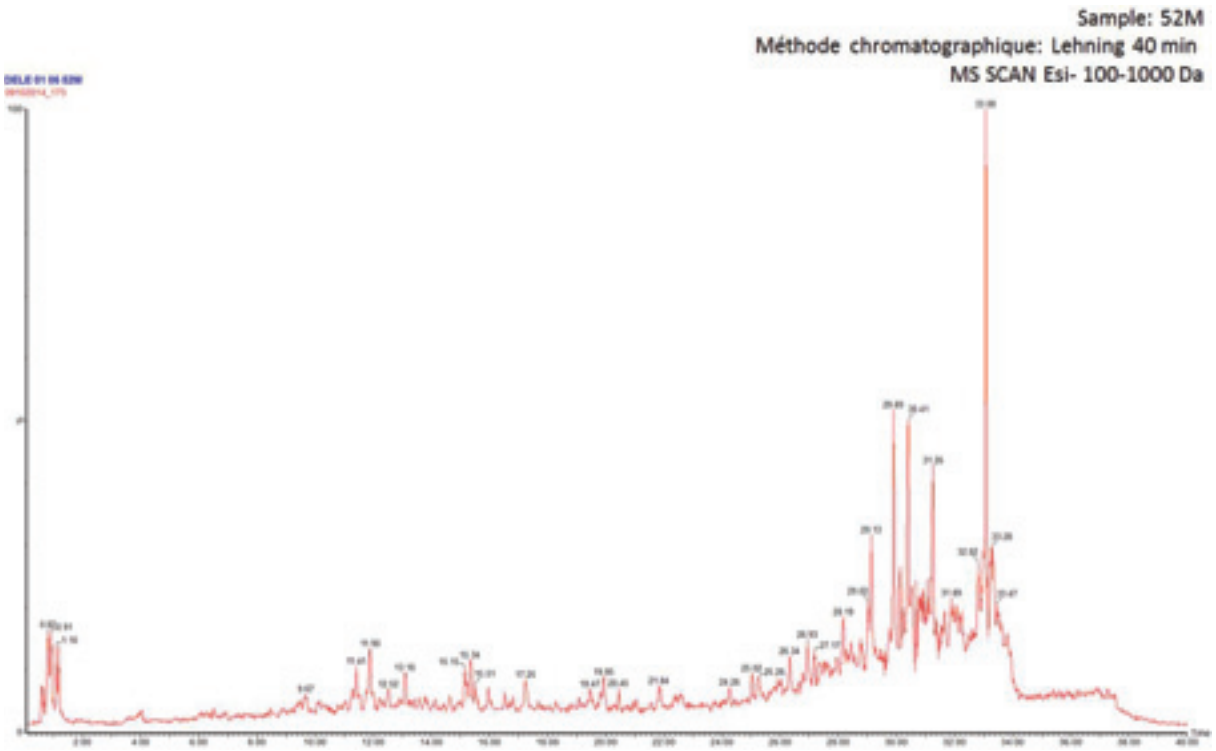


***Figure 5** : chromatogramme Scan Esi mode négatif 100-1000Da complet (0-40min) du L52 échantillon 52M.*

Nous observons moins de pics qu'en ionisation positif, ce qui nous laisse penser que la majorité des molécules dans le L52 s'ionisent mieux en mode positif. Certains pics sont néanmoins très intenses en fin de chromatographie.

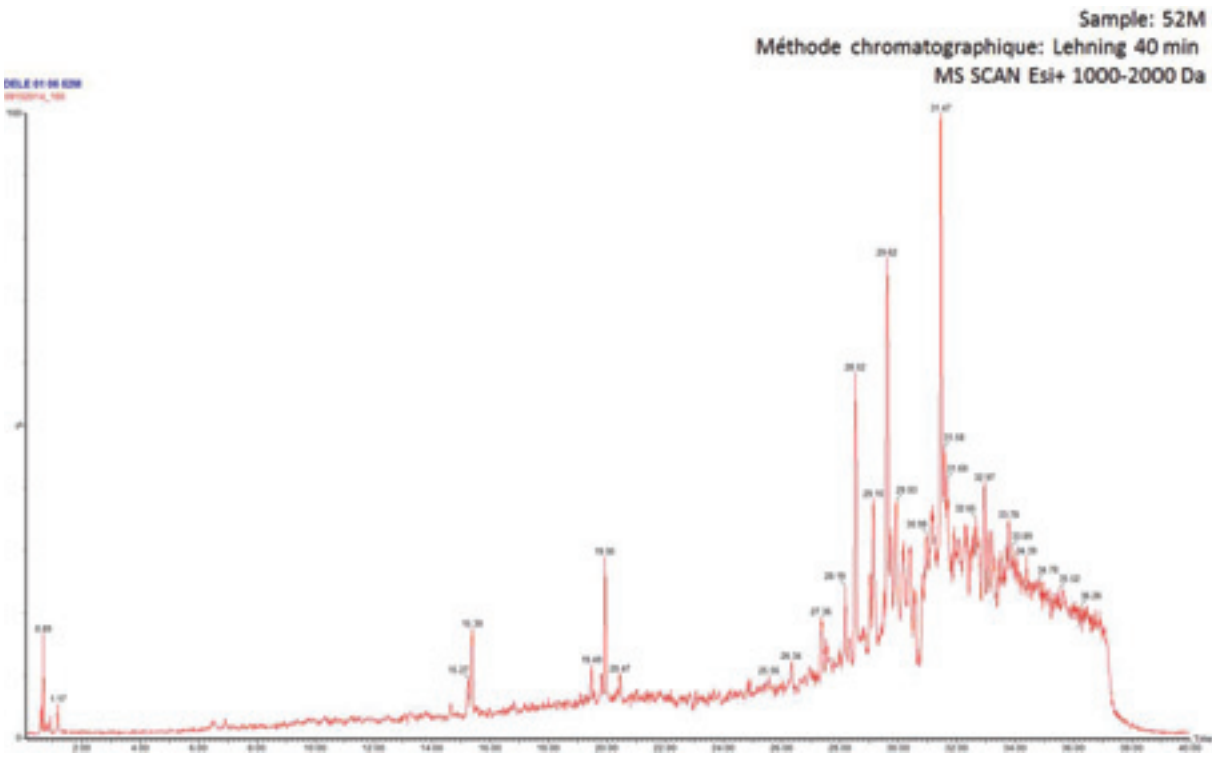


***Figure 6** : chromatogramme Scan Esi mode positif 1000-2000Da complet (0-40min) du L52 échantillon 52M.*

L'observation de quelques pics intenses nous indique la présence de grosses molécules, de masses moléculaires supérieures à 1000Da.

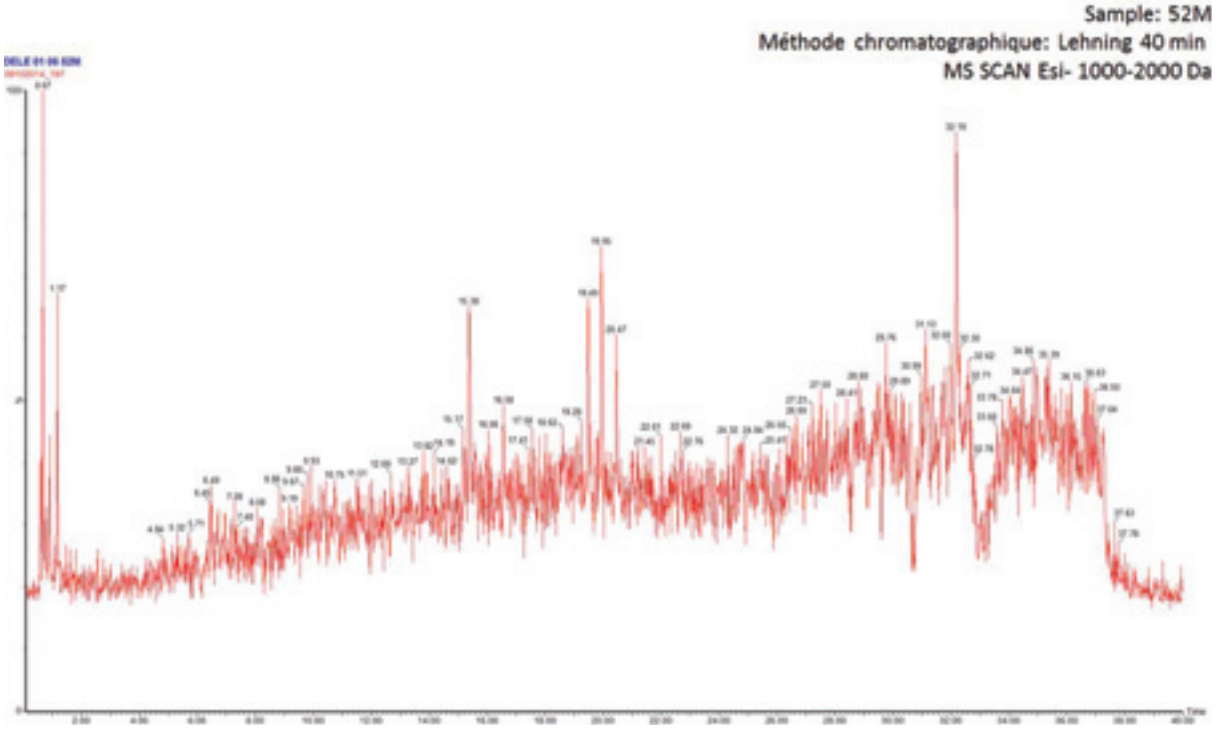


***Figure 7** : chromatogramme Scan Esi mode négatif 1000-2000Da complet (0-40min) du L52 échantillon 52M.*

Le chromatogramme nous indique qu'il y a peu de molécules de masses supérieures à 1000Da s'ionisant en mode négatif.

4. Conclusion

Les observations du L52 en chromatographie liquide couplé à un détecteur à barrette de diode et à un spectromètre de masse nous ont montré que le produit est extrêmement riche en métabolites. De nombreuses molécules sont détectées à la fois en UV et en masse, mais beaucoup de ces molécules ne sont pas détectées par les deux en même temps. Les molécules qui apparaissent donc majoritairement sur le chromatogramme UV ne le sont pas forcément sur le chromatogramme MS, et inversement.

Les différents chromatogrammes nous donnent directement un aperçu de la nature physico-chimique des métabolites présents dans le L52. Leurs temps d'élution, en fonction du gradient de solvants appliqué à la colonne chromatographique, nous permettent de déterminer si les molécules sont très polaires, dans ce cas elles ne sont pas retenues par la colonne et sortent dans le volume mort avant les deux premières minutes de l'analyse. Ensuite viennent les molécules retenues par la colonne et éluées tout au long du gradient de solvant, entre 2 et 36 min, des plus polaires au plus apolaires. L'observation de pics nombreux et majoritaires en début d'analyse, indiquant la présence de petites molécules polaires, telles que des sucres, des acides aminés et organiques, nous a conduit à utiliser une méthode de chromatographie gazeuse dédiées à l'identification de ce type de molécules.

Nous observons la complexité du contenu métabolique du L52 et, bien que la méthode chromatographique dure 40 min, ce qui est long pour une chromatographie type UPLC, nous ne séparons que partiellement les molécules. Beaucoup d'entre elles coéluent et rendent donc la future identification plus difficile. Néanmoins, nous pouvons utiliser cette méthode chromatographique ainsi que les paramètres de détection UV et MS comme contrôle qualitatif et quantitatif de différents lots de L52.

Chapitre 2 : analyses GC-MS du L52

1. Introduction

Les analyses en LC-UV et LC-MS nous ont montré la présence probable de petites molécules polaires. Nous avons donc décidé d'analyser le L52 en GC-MS avec dérivation de l'échantillon. De plus, l'odeur dégagée lors de l'ouverture d'un flacon de L52 nous a poussé à analyser le L52 en GC-MS sans dérivation et à développer une méthode de « capture » de composés volatils. Nous avons utilisé au final trois techniques de préparation d'échantillons différentes afin d'identifier un maximum de molécules par cette technique. Les trois méthodes ciblent les composés polaires, les composés apolaires et les composés volatiles.

2. Analyse GC-MS pour les composés polaires

La méthode utilisée a été développée pour observer les métabolites de petites tailles (< 500 Da) et polaires tels que les sucres, les acides organiques, les acides aminés. La préparation des échantillons, la méthode GC-MS et le principe d'identification des métabolites sont les mêmes que ceux présentés dans la « Partie II Matériel et Méthode, IV. ».

Nous avons décidé de quantifier les métabolites identifiés dans le L52. Pour cela, le nonadecane (C_{19}) a été utilisé comme standard interne. Il fait partie des 9 alcanes ajoutés lors de la dérivation chimique et est présent en quantité égale dans tous les échantillons. Il permet, dans un premier temps, la normalisation des aires des pics afin de pouvoir comparer les autres pics d'un échantillon à l'autre. Une gamme étalon a été faite à partir des standards commerciaux afin de quantifier chaque molécule identifiée. Au minimum trois concentrations différentes pour chacun des standards ont été dérivés puis analysés afin d'obtenir les différentes courbes de calibration. La comparaison des aires se fait à l'aide du module QuanLynx du logiciel MassLynx (Waters, USA).

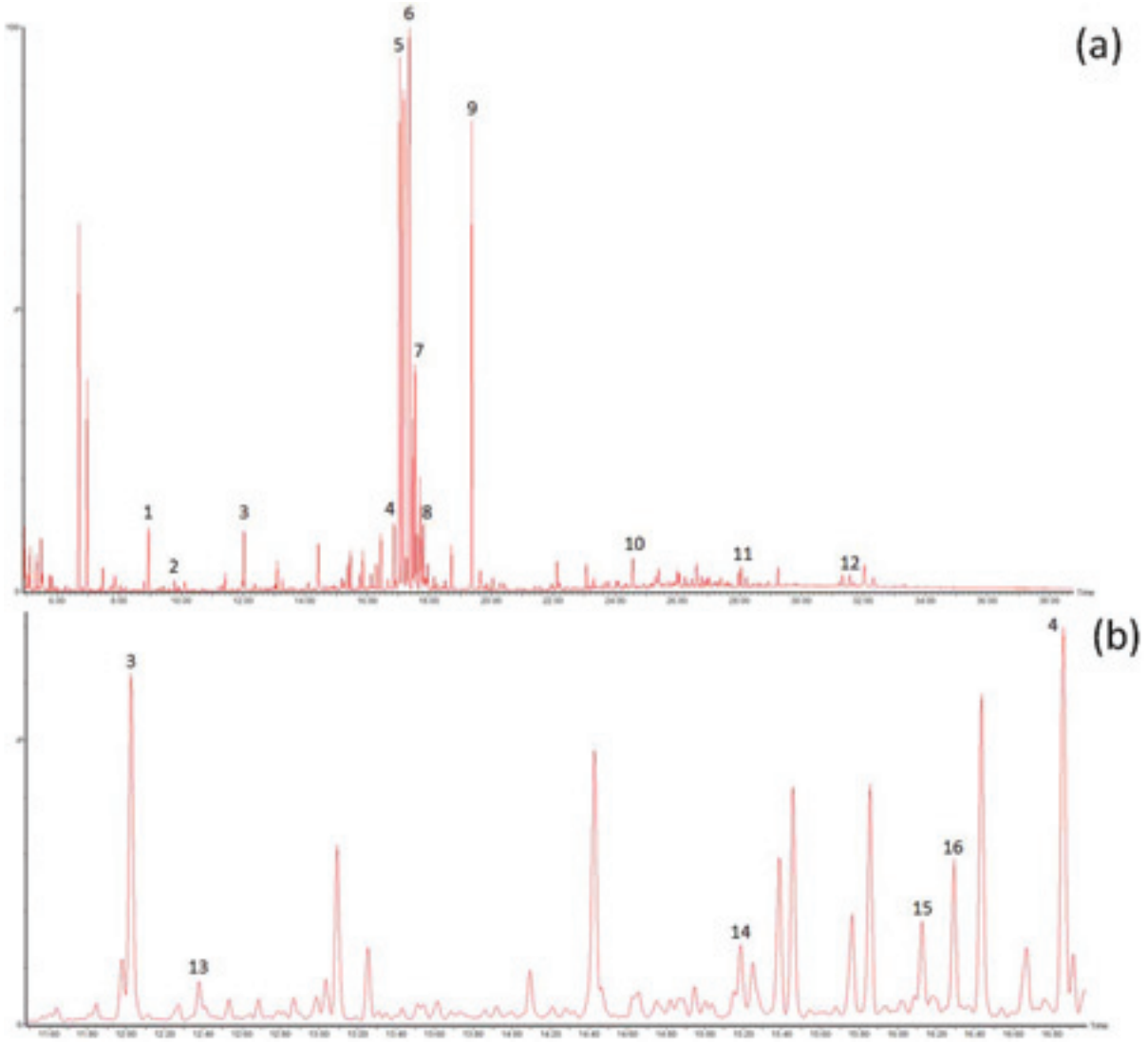


Figure 8 *: Chromatogramme TIC (Total Ion Chromatogram) GC/MS d'extrait brut de L52. (a) Chromatogramme complet , 4.80-38.0 min. (b) Démonstration de la complexité d'un échantillon de L52 par le zoom du chromatogramme complet sur la région 11.50-17.00 min. Identification des pics : 1, glycérol; 2, acide glycérique; 3,acide malique; 4, acide quinique; 5, fructose/sorbose (les deux composés n'ont pu être différenciés); 6, glucose; 7, galactose; 8, acide gallique; 9, myoinositol; 10, sucrose; 11,acide chlorogénique, 12, acide oléanolique, 13, erythritol ; 14, xylitol; 15, acide shikimique; 16, acide citrique.*

Au total, 122 pics ont été détectés. Parmi eux, 24 molécules ont été identifiées (***Figure 8, Tableau 3***). Avec cette méthode, le fructose et le sorbose ne peuvent pas être différenciés. Les deux composés produisent en GC-MS chacun deux pics, aux mêmes temps de rétention, avec des ions caractéristiques identiques. Ce sont tous les deux des cétohexoses de formule brute $C_6H_{12}O_6$ et de masse molaire 180.16 g.mol^{-1}. De même, le galactose et le mannose, le xylitol et l'arabitol

n'ont pu être clairement identifiés car ils possèdent tous les mêmes temps de rétention et les mêmes ions caractéristiques. Les molécules ont été quantifiées à l'aide des courbes étalons des standards (***Tableau 3***).

NOM	m/z	µg.ml^{-1}	SD	R^2
acides organiques				
citric acid	273	51.755	0.612	0.9938
fumaric acid	245	50.536	0.116	0.9927
gluconic acid	333	41.384	0.163	0.9964
glyceric acid	292	11.050	0.267	0.9996
glycolic acid	147	50.055	0.010	0.9976
malic acid	147	42.672	0.898	0.9974
quinic acid	345	11.256	0.172	0.9995
shikimic acid	204	34.377	0.154	0.9943
succinic acid	247	8.476	0.02	0.9998
sucres				
fructose/ sorbose	307	64.226	3.736	0.9984
galactose / mannose	319	8.052	0.05	0.995
gentiobiose	361	15.561	0.150	0.9994
glucose	319	41.981	2.238	0.9993
sucrose	361	43.209	0.450	0.9963
xylose	307	3.772	0.030	0.9999
sucres-alcools				
Erythritol	217	66.685	0.003	0.9986
glycerol	205	12.006	0.360	1
myoinositol	318	12.347	0.030	0.9991
xylitol / arabitol	319	17.488	0.080	0.9993
composés terpéniques				
oleanolic acid	482	/	/	/
phytol	143	/	/	/
flavonoïdes et composés phénoliques				
gallic acid	458	5.006	0.0001	0.9985
catechin	368	29.123	0.198	0.997
chlorogenic acid	345	35.747	0.467	0.9991

Tableau 3 *: Métabolites identifiés dans le L52 en GC-MS et quantifiés à l'aide des courbes étalons. SD (standard deviation) : écart-type. R^2 : coefficient de détermination des courbes étalons.*

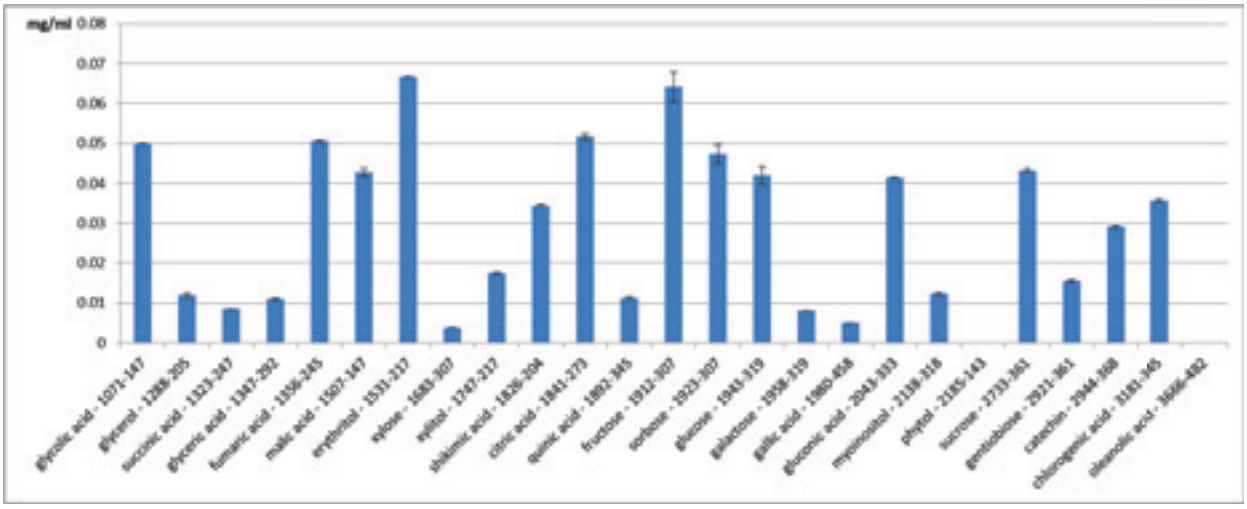


Figure 9 *: concentrations des métabolites identifiés dans le L52. Elles correspondent à la moyenne de 3 réplicas de 3 lots de L52. Nous n'avons pas obtenu de réponse linéaire dans la gamme étalon pour quantifier précisément le phytol ni l'acide oléanolique.*

Il est intéressant de comparer ces données à celles obtenues pour chaque TM composant le L52, voir « Partie III les teintures-mères, Chapitres 1 à 10 ». Chaque TM apporte son mélange de métabolites, de façon plus ou moins importante en fonction des dilutions. Certains métabolites identifiés dans le L52 peuvent provenir de toutes les TMs, c'est le cas pour les sucres tels que le fructose (et/ou son isomère le sorbose), le galactose (et/ou son isomère le mannose) et le glucose. Le myoinositol est également présent dans toutes les TMs. La plupart des autres métabolites identifiés dans le L52, notamment les acides organiques, sont présents dans de nombreuses TMs. En revanche, certaines molécules ne sont apportées que par quelques TMs particulières. C'est le cas de l'acide chlorogénique, que nous retrouvons dans les TMs d'*Eupatorium perfoliatum*, *Gelsemium*, *China rubra* et *Eucalyptus globulus*. Le sucre-alcool erythritol n'est retrouvé que dans les TMs *Polygala* et *Eucalyptus*. La catéchine, flavonoïde antioxydant, a été identifiée dans les TMs *China rubra* et *Eucalyptus*.

Seulement deux métabolites ont été identifiés uniquement dans une seule TM : le sucre gentiobiose retrouvé dans la TM *Bryonia alba*, et l'acide shikimique retrouvé dans la TM *Eupatorium perfoliatum*.

Le phytol est une molécule qui peut être détectée à la fois par la méthode GC-MS avec dérivation et sans dérivation. Nous la retrouvons ici dans le L52 avec la méthode avec dérivation, mais nous l'avions identifiée dans 6 TMs avec la méthode sans dérivation. Nous pouvons supposer que ses

propriétés physicochimiques de molécule amphiphile rendent difficile le dosage du phytol en GC-MS.

Enfin, nous identifions l'acide oléanolique dans le L52, alors que nous le détectons dans aucunes des TMs. Nous observons dans la TM d'*Eucalyptus* l'aldéhyde ursolique en molécule putative. Les groupements aldéhydes s'oxydent facilement pour donner des groupements acides carboxyliques, surtout en solution dans un mélange éthanol/eau. Il se peut donc qu'au sein du mélange L52 se forme l'acide ursolique. Ce dernier est un isomère de l'acide oléanolique et présente un spectre de masse très proche et le même indice de rétention que l'acide oléanolique. Nous ne pouvons différencier ces 2 molécules avec cette méthode GC-MS. Néanmoins cette molécule a été identifiée comme l'acide oléanolique car elle était présente dans les banques de données GC-MS, contrairement à l'acide ursolique.

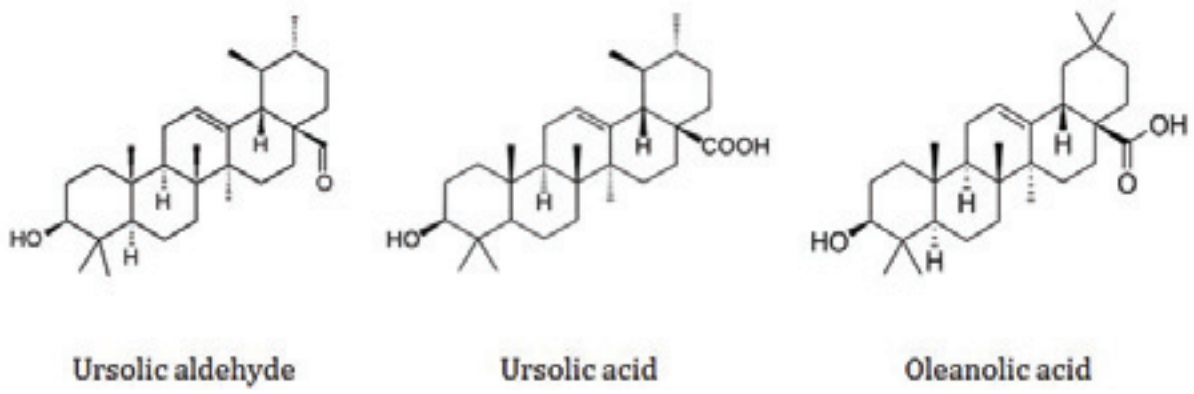


***Figure 10** : structures chimiques des triterpènes aldéhyde ursolique, acide ursolique et acide oléanolique.*

3. Analyses GC-MS pour les composés apolaires

Des essais de préparation d'échantillon ont été faits sur 2 lots différents de L52 (CK706 et CK930). Le premier fut de prélever 50µL de L52, le mettre dans un tube en verre 1.5mL à fond plat, puis de le placer au concentrateur afin d'éliminer le solvant (eau et éthanol). Enfin, nous reprenions le tout dans 130µL d'hexane afin de re-solubiliser les molécules apolaires.

Plusieurs conditions pour le concentrateur ont été testées, comme la durée et la température. Nous avons pu remarquer une différence sur les chromatogrammes en fonction des conditions. Moins de molécules étaient détectées lorsque nous augmentions la durée et la température du concentrateur. Nous en avons déduit que le concentrateur n'était pas une étape idéale pour les

composés apolaires. Nous avons donc changé de stratégie de préparation des échantillons, afin de s'affranchir du concentrateur.

Une dernière analyse a été effectuée afin de tester une nouvelle méthode d'extraction des métabolites apolaires. C'est une méthode d'extraction liquide/liquide : 500µl de L52 ont été mélangés à 200µl d'hexane comportant les alcanes (pour calculer les indices de rétention). Le tout est vortexé 1min, puis centrifugé 1min. La phase apolaire (environ 150µl) est ensuite récupérée pour être injectée. Cette méthode permet de s'affranchir du concentrateur. Cette dernière méthode est la plus intéressante et a été appliquée aux différentes teintures-mères. La préparation des échantillons, la méthode GC-MS et le principe d'identification des métabolites sont présentés dans la « Partie II Matériel et Méthode, V. ».

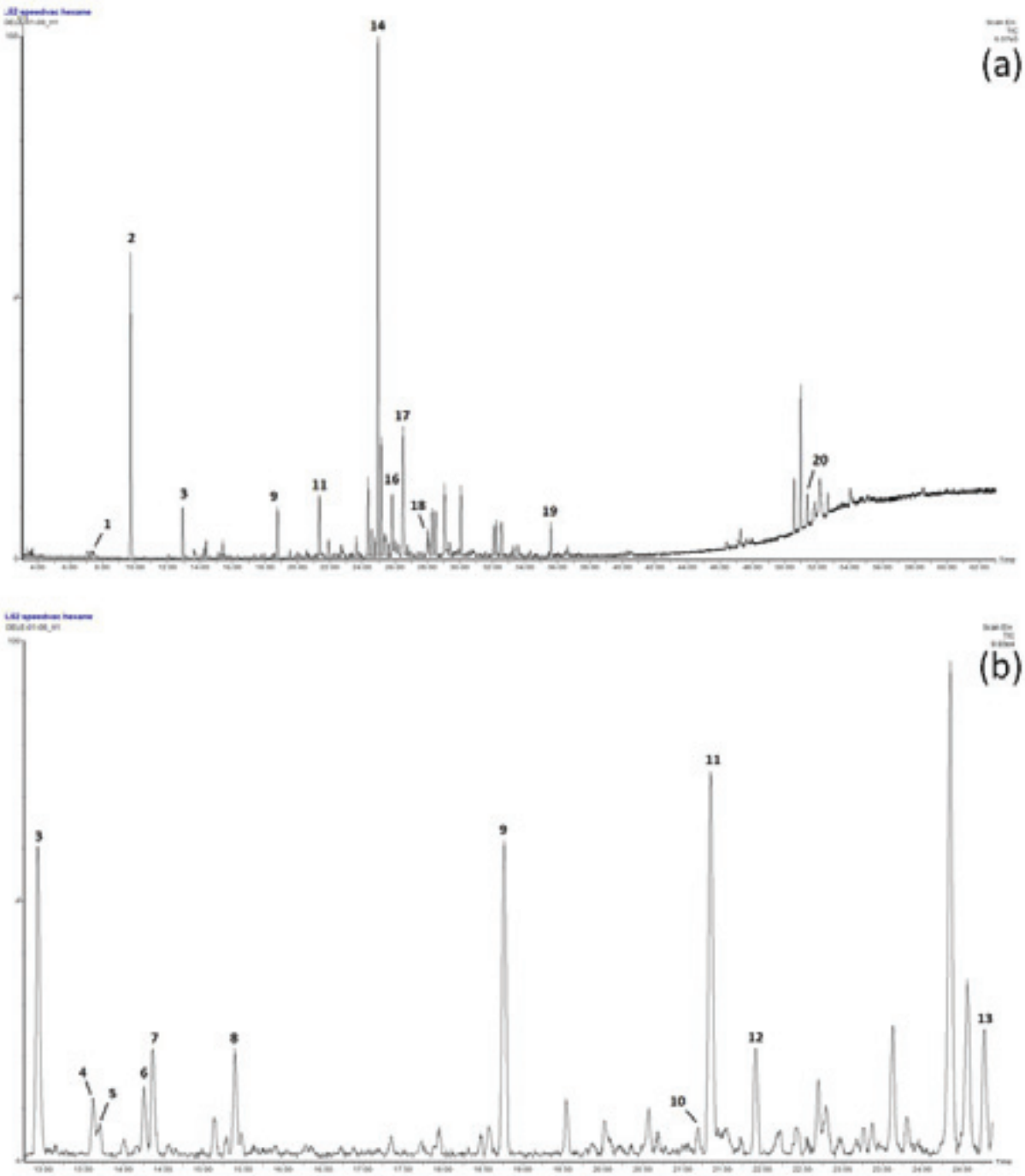


Figure 11 *: Chromatogrammes TIC (Total Ion Chromatogram) GC/MS des composés apolaires du L52.*
(a) chromatogramme complet, 3.0-63.0 min. (b) zoom du chromatogramme sur la région 12.80-24.80 min. 1, camphene; 2, eucalyptol; 3, pinocarveol; 4, pinocarvone; 5, borneol; 6,trans-verbenol; 7, α-terpineol; 8, p-mentha-2,8-dien-1-ol; 9,α-terpinyl acetate; 10, calarene; 11, aromadendrene; 12, alloaromadendrene; 13, (+)spathulenol; 14, globulol ; 15, viridiflorol ; 16, rosifoliol ; 17, eudesmol ; 18, (-)spathulenol ; 19, phytol ; 20, α-tocopherol.

Au total environ 61 pics ont été détectés. 20 d'entre eux ont pu être identifiés à l'aide des banques de données publiques et internes. Les données brutes sont présentées en annexe 1.

Monoterpènes	Sesquiterpènes	Diterpènes
camphene	calarene	phytol
eucalyptol	aromadendrene	
pinocarveol	alloaromadendrene	
pinocarvone	epiglobulol	
borneol	globulol	**Lipides**
verbenol	(-) spathulenol	α-tocopherol
terpineol	(+) spathulenol	
p-mentha-2,8-dien-1-ol	viridiflorol	
α-terpinyl acetate	rosifoliol	
	eudesmol	

Tableau 4 *: molécules identifiées dans le L52 par la méthode GC/MS en apolaire.*

Contrairement à l'analyse GC-MS méthode polaire, où chaque TM apportait son lot de métabolites, l'analyse des composés apolaires nous montre que la majorité des molécules détectées par cette méthode sont des métabolites provenant de la TM d'*Eucalyptus globulus*. Le pic majoritaire correspond au globulol, un sesquiterpène présent dans de nombreuses huiles essentielles, et plus particulièrement celles d'Eucalyptus [1, 2]. La majorité des composés identifiés sont des dérivés terpéniques (monoterpènes, sesquiterpènes et diterpènes).

Nous retrouvons le phytol, déjà observé avec la méthode avec dérivation. Nous avons également essayé de doser ce dernier à l'aide de la méthode apolaire, mais le même problème est survenu, c'est-à-dire pas de réponse linéaire des aires des pics du chromatogramme de la molécule pour sa gamme étalon.

4. Analyses GC-MS pour les composés volatils (Headspace)

Cette approche permet de renseigner sur la composition du L52 en composés volatils, c'est-à-dire les molécules responsables des senteurs, des arômes. Ces molécules sont présentes en général dans les huiles essentielles des plantes et possèdent de nombreuses propriétés bénéfiques pour la santé humaine. De nombreuses molécules composent les huiles essentielles de plantes utilisées en parfumerie et cosmétique. Nous avons mis au point une méthode de préparation d'échantillon permettant de piéger uniquement les molécules volatiles libérées par le L52. Ces dernières sont confinées dans une enceinte hermétique puis piégées sur une cartouche (***Figure 12***).

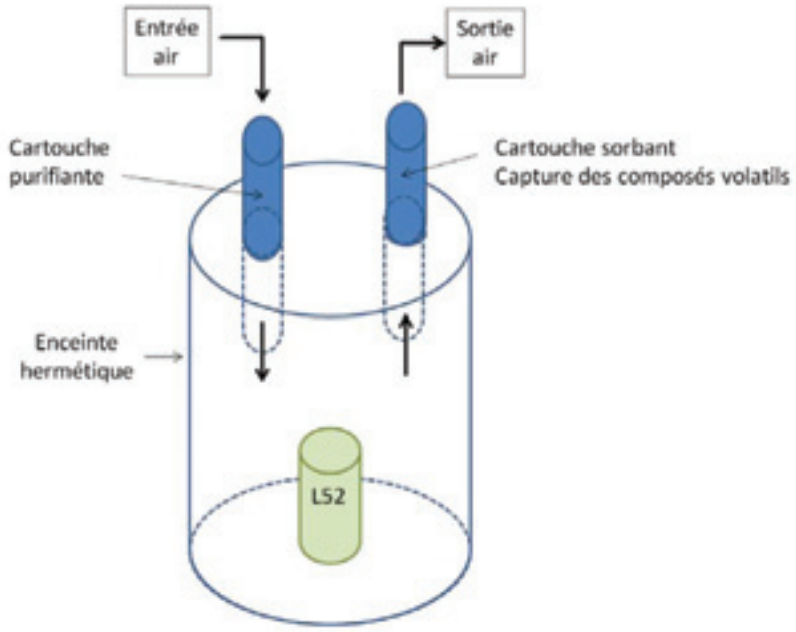


Figure 12 *: principe de capture des composés volatils du L52. Ce système a été entièrement développé au sein de la plateforme métabolomique de l'IBMP.*

a. Préparation des échantillons

8mL de L52 ont été déposés dans un flacon en verre, ouvert au sein d'une enceinte hermétique. Dans cette enceinte, de l'air purifié entre à l'aide d'une pompe en passant par une cartouche comportant du charbon actif. Une fois dans l'enceinte, l'air se charge des molécules volatiles issues du L52. Ces molécules sont piégées par une cartouche comportant un sorbant (Porapak Q 50-80 Mesh, Waters, USA). La cartouche est conditionnée pendant plusieurs heures à 350°C sous argon, puis est rincée plusieurs fois à l'hexane avant d'être utilisée. Le dispositif est laissé pendant 24h à température ambiante. La cartouche est ensuite récupérée et les molécules sont éluées avec 200 µl d'hexane dans un tube en verre 1.5mL pour être directement analysé en GC/MS.

b. Méthode GC-MS Headspace

1µl de chaque échantillon est injecté en mode Splitless. Le système GC-MS comprend un GC Perkin Elmer Clarus 680 et un spectromètre de masse Perkin Elmer 600T, le tout piloté par le logicieil TurboMass Ver5.4.2. La chromatographie gazeuse s'est faite sur une colonne Agilent HP-5MS 30m de longueur, 0.25mm de diamètre interne et 0.25µm d'épaisseur du film. La température de l'injecteur était de 250°C. Le gaz vecteur utilisé était de l'Hélium à un débit constant de 1.2ml/min. Le programme de température du four était de 0.5min à 50°C, puis une augmentation de 10°C par min jusqu'à 330°C, enfin 6.50min à 330°C. Le spectromètre de masse travaillait en mode Scan de 50 à 600 m/z, 3 scans par seconde, avec un solvant delay de 3min. La température de la source était de 250°C. Les données ont été traitées par le logiciel libre AMDIS.

c. Identification des métabolites

L'identification se fait suivant le même protocole que pour l'analyse GC-MS des composés polaires. Une fois les chromatogrammes et les spectres de masse enregistrés, ils sont analysés à l'aide du logiciel libre AMDIS. Les indices de rétention et les ions caractéristiques sont identifiés et permettent à nouveau d'interroger les banques de données publiques et internes.

d. Résultats

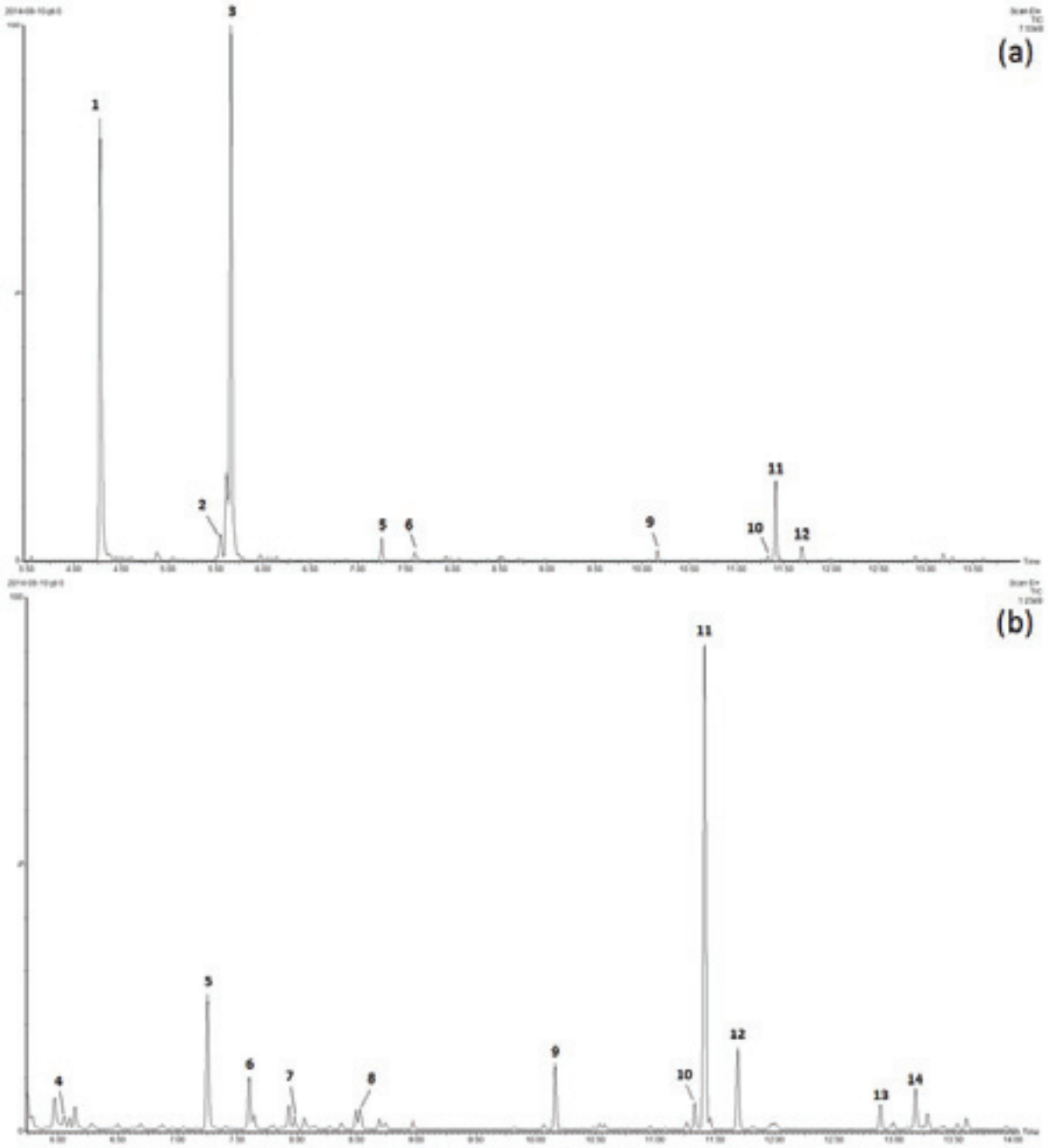


Figure 13 *: Chromatogrammes TIC (Total Ion Chromatogram) GC-MS des composés volatils du L52. (a) Zoom sur le chromatogramme TIC de la région 3.50-14.80 min. (b) Zoom sur la région 5.80-14.0 min. 1: α-pinene; 2:m-cymene; ; 3 : eucalyptol ; 4 : terpinene ; 5 : trans-pinocarveol ;6 : pinocarvone; 7 :p-mentha-1-en-ol ; 8 : itaconic acid diethyl ester ; 9 : α-terpinyl acetate ; 10: calarene ; 11 :aromadendrene ; 12 : alloaromadendrene ; 13 : viridiflorol ; 14 : globulol.*

Monoterpènes	Sesquiterpènes	acide carboxylique
α-pinene	Calarene	Itaconic acid diethyl ester
m-cymene	Aromadendrene	
Eucalyptol	Alloaromadendrene	
Terpinene	Globulol	
Pinocarveol	Viridiflorol	
Pinocarvone		
p-menth-1-en-8-ol		
α-terpinenyl acetate		

Tableau 5 *: métabolites identifiés dans le L52 avec la méthode GC-MS « Headspace ». Au total, 14 métabolites ont pu être clairement identifiés.*

5. Conclusion

Les premières analyses sur le L52 nous ont permis d'identifier clairement 39 métabolites différents parmi lesquels nous trouvons principalement des sucres, des sucres alcools, des acides organiques et des dérivés terpéniques (mono-, sesqui- et di-terpènes). La technique GC-MS a été privilégiée dans un premier temps car elle présente plusieurs avantages :

- préparation simple et rapide des échantillons.
- la méthode permet d'identifier un grand nombre de molécules en une seule analyse.
- il existe des bases de données publiques facilitant l'identification des métabolites.

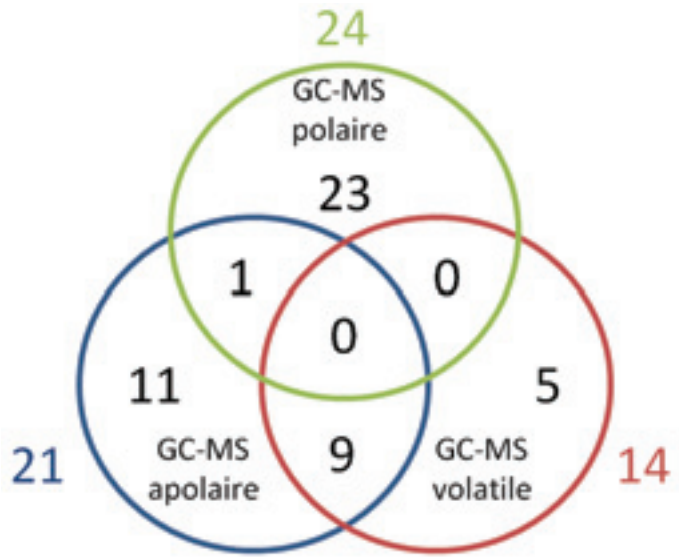


Figure 14 *: bilan des 3 principales méthodes GC-MS utilisées pour l'identification des métabolites dans le L52 (diagramme de Venn). Nous observons que les 3 méthodes GC-MS sont complémentaires car aucun métabolite n'est identifié par les 3 méthodes.*

La présence de composés polaires tels que des sucres ou des acides organiques était attendue au vue des études préliminaires faites sur les teintures-mères composant le L52. Néanmoins, la nature des composés se retrouvant dans le L52 n'en est pas moins atypique si nous comparons ces résultats avec une analyse des composés polaires d'une plante modèle comme *Arabidopsis thaliana* [3]. Plus particulièrement nous pouvons citer la présence d'acide gallique, pouvant présenter des activités antibactériennes et antioxydantes [4], d'acide shikimique, important précurseur dans la fabrication de vaccins antigrippaux [5] et d'acide oléanolique, aux propriétés immunostimulantes [6]. Les activités de ces molécules peuvent être reliées avec l'utilisation du L52 qui est de traiter les états grippaux, affaiblissant le système immunitaire du malade. Nous ne connaissons pas les mécanismes d'actions précis du L52 contre la maladie, mais nous pouvons supposer qu'il ne s'agit pas ici de l'action d'une seule molécule mais bien d'une synergie entre toutes ces molécules.

De même, les premières investigations concernant les composés volatils nous montreraient la présence d'eucalyptol et d'acide itaconique, présentant respectivement des propriétés anti inflammatoire des voies respiratoires [7] et antibactériennes [8].

La liste des molécules identifiées dans le L52 est loin d'être exhaustive car seulement deux types de molécules ont été analysées, à savoir les molécules polaires de petites tailles et les molécules volatiles. D'autres travaux seront nécessaires afin d'identifier d'autres familles de molécules moins polaires, plus grandes, telles que les alcaloïdes, les lipides, les peptides, pouvant présenter des propriétés bénéfiques intéressantes. D'autres outils seront alors nécessaires pour mener à bien ces investigations, comme la LC-MS/MS haute résolution et la RMN (résonnance magnétique nucléaire).

Chapitre 3: autres analyses GC-MS

Les trois méthodes GC-MS présentées dans le chapitre 2 sont les trois méthodes qui ont été retenues parmi plusieurs testées sur le L52. Ce chapitre décrit quelques-unes des autres méthodes testées ayant conduit à l'identification de molécules.

1. GC-MS : méthodes d'extractions à l'éthyle acétate

Le but de cette méthode d'extraction à l'éthyle acétate est d'extraire majoritairement les molécules volatiles et apolaires du L52.

a. Matériel et méthodes

- Préparation des échantillons

600 µL de L52 sont mélangés à 200µL d'une solution d'éthyl acétate + nonyl acétate 100mM (comme standard interne) dans un tube en verre. Le tout est vortexé pendant 30 secondes, reposé 1 min puis centrifugé 1 min pour séparer les phases. La phase supérieure (apolaire) est récupérée (environ 500 µL) et déposée dans un « filtre » de sulfate de sodium pour sécher l'échantillon. Le filtre est préparé en faisant glisser une bille de verre au fond d'une pipette pasteur, puis du sulfate de sodium est versé à l'aide d'un entonnoir, sur environ 2 cm de hauteur. Une fois l'échantillon déposé, le filtre est élué avec de l'éthyle acétate dans un tube en verre et dilué jusqu'à obtenir 1 mL d'échantillon.

- Méthode GC-MS

1µl de chaque échantillon est injecté en mode Splitless. Le système GC-MS comprend un GC Perkin Elmer Clarus 680 et un spectromètre de masse Perkin Elmer 600T, le tout piloté par le logiciel TurboMass Ver5.4.2. La chromatographie gazeuse s'est faite sur une colonne Agilent HP-5MS 30m de longueur, 0.25mm de diamètre interne et 0.25µm d'épaisseur du film. La température de l'injecteur était de 250°C. Le gaz vecteur utilisé était de l'hélium à un débit constant de 1.2ml/min. Le programme de température du four était de 0.5min à 50°C, puis une augmentation de 10°C par min jusqu'à 330°C, enfin 6.50min à 330°C. Le spectromètre de masse travaillait en mode Scan de 50 à 600 m/z, 3 scans par seconde, avec un solvant delay de 3min. La température de la source était de 250°C. Les données ont été traitées par le logiciel libre AMDIS.

b. *Résultats et Discussion*

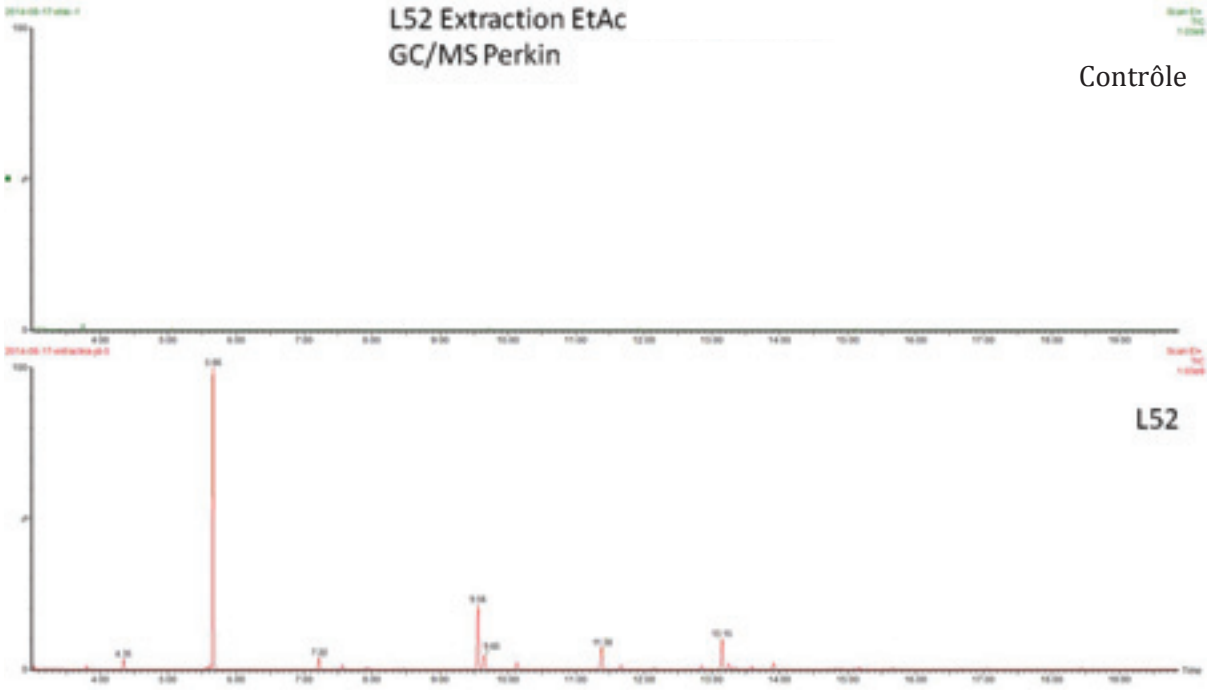


Figure 15 *: Chromatogrammes TIC (Total Ion Current) GC-MS des composés du L52 extrait à l'éthyle-acétate, injecté sur la GC-MS Perkin.*

Avec cette méthode, 30 pics ont été détectés, dont 12 ont été identifiés (***Annexe 2***). Nous retrouvons 2 molécules supplémentaires qui n'ont pas été identifiées avec les autres techniques GC-MS : 2-methoxy-5-vinylphenol et l'acide octanoïque ethyl ester. Nous observons un faible nombre de pics chromatographiques. Nous nous sommes demandé si l'étape de « séchage » sur cartouche de sulfate de sodium était nécessaire. Nous avons effectué une nouvelle extraction à l'éthyle-acétate avec et sans passage sur la cartouche.

Une quinzaine de pics ont été détectés et 8 molécules ont pu être identifiées (A***nnexe 3***). Toutes ces molécules sont retrouvées par les 3 méthodes GC-MS développées dans le chapitre 2. Entre les deux conditions, avec ou sans le passage de l'échantillon sur la cartouche, il n'y a pas de différences qualitatives (***Figure 16***). Mais nous observons un meilleur signal sans le séchage au sulfate de sodium. Il est possible que cette étape entraine un peu de perte de l'échantillon.

Pour démontrer si l'obtention d'un faible nombre de pics avec la méthode d'extraction à l'éthyle acétate était due à la méthode d'extraction ou à la pauvreté du L52 en molécules, nous avons décidé de partir d'un échantillon de L52 plus concentré. Pour cela, nous avons pris 500µL de L52 que nous avons amené à un volume d'environ 200µL à l'aide d'un concentrateur. Puis nous avons effectué les mêmes étapes que précédemment.

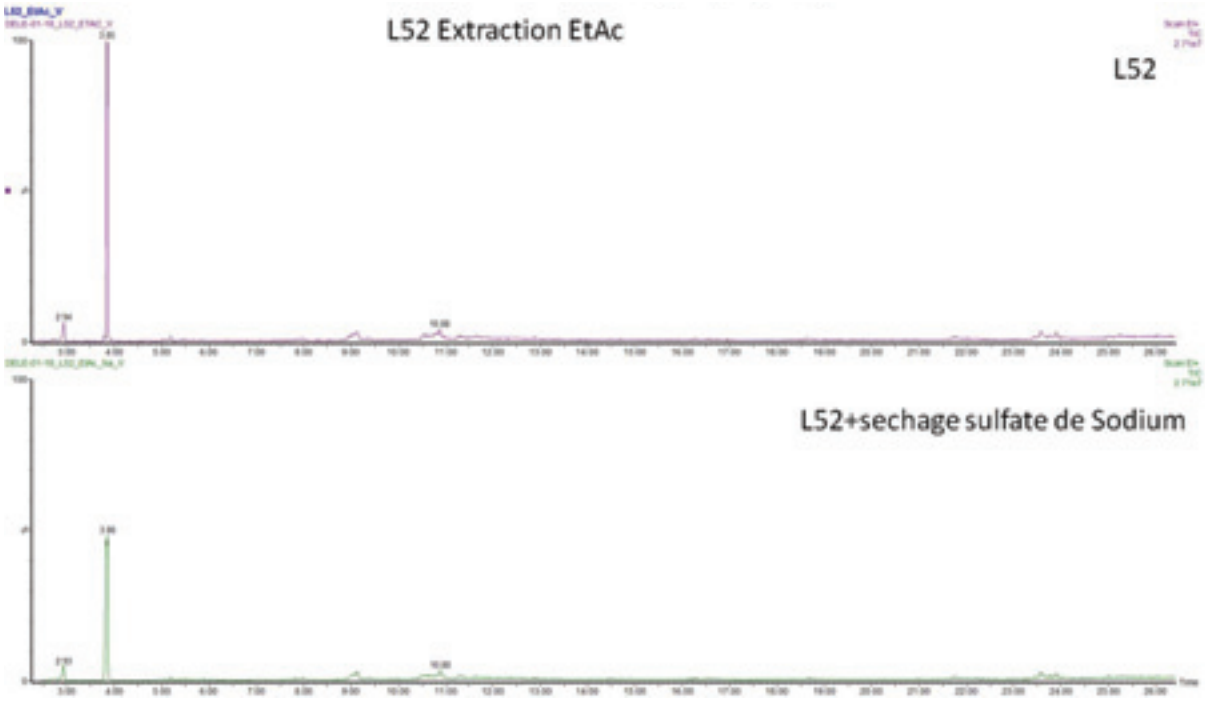


Figure 16*: Chromatogrammes TIC (Total Ion Current) GC-MS des composés du L52 extrait à l'éthyle-acétate, avec ou sans passage sur cartouche sulfate de sodium.*

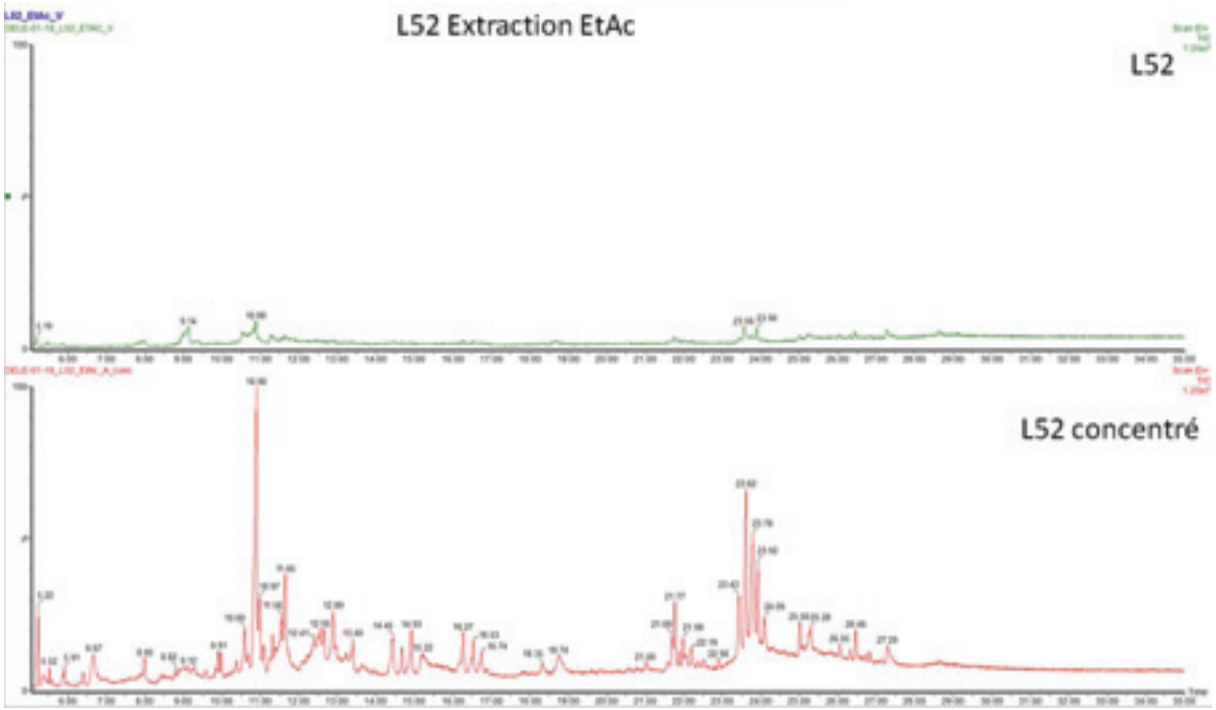


Figure 17 *: Chromatogramme TIC (Total Ion Current) GC-MS des composés du L52 concentré, extrait à l'éthyle-acétate.*

Avec cette méthode, 63 pics ont été détectés et 16 molécules identifiées (***Figure 17***, ***Annexe 4***). Parmi elles, nous retrouvons 8 molécules que nous n'avons pas détectées avec les méthodes précédentes : hydroxymethylfurfurane, selin-4,7(11)-diène, pyrogallol, α-gurjunene, cadina-1,4-diene, 1H-Cyclopropa[a]naphthalene, 1a,2,3,3a,4,5,6,7b-octahydro-1,1,3a,7-tetramethyl-, hexadecanoic acid et le farnesol .

Nous retrouvons beaucoup moins de molécules volatiles. Ceci est probablement causé par le passage de l'échantillon au concentrateur. L'extraction liquide-liquide à l'éthyle-acétate du L52 s'avère une méthode intéressante pour l'analyse des composés apolaires et volatiles.

Nous avons testé par la suite une dernière méthode d'extraction liquide-liquide avec de l'hexane, sans passage par un concentrateur. Cette méthode nous a apporté de meilleurs résultats et a donc été utilisée par la suite pour toutes les teintures-mères. Elle est décrite dans la « Partie II Matériel et Méthode, V».

2. GC-MS : méthode pour les composés apolaires

Cette expérience a été réalisée dans le but d'observer la présence de certains composés apolaires de types lipidiques et stéroliques.

a. Matériel & méthodes

- Préparation des échantillons

Extraction liquide-liquide de 500 µL de L52 avec 500µL d'éthyle acétate. L'ensemble est vortexé 30sec, reposé 1min, puis centrifugé 1min à 13200rpm. Environ 400µL de surnageant est récupéré puis séché au concentrateur. Le culot est repris dans 100µL d'éthyle acétate.

- Méthode GC-MS

1µl est injecté en mode Splitless dans le système GC-MS Agilent décrit dans la « Partie II Matériel et Méthode, V. ». La chromatographie gazeuse s'est faite sur une colonne Agilent HP-5MS 30m de longueur, 0.25mm de diamètre interne et 0.25µm d'épaisseur du film. La température de l'injecteur était de 250°C. Le gaz vecteur utilisé était de l'hélium à un débit constant de 1.0 $ml.min^{-1}$. Le programme de température du four était de 1min à 60°C, une augmentation de 30°C par min jusqu'à 220°C, puis une augmentation de 2°C par min jusqu'à 300, enfin 10 min à 300°C. Le spectromètre de masse travaillait en mode Scan de 50 à 600 m/z, 2 scans par seconde. La température de la source était de 250°C. Le délai de solvant était réglé à 5 min.

b. *Résultats et Discussion*

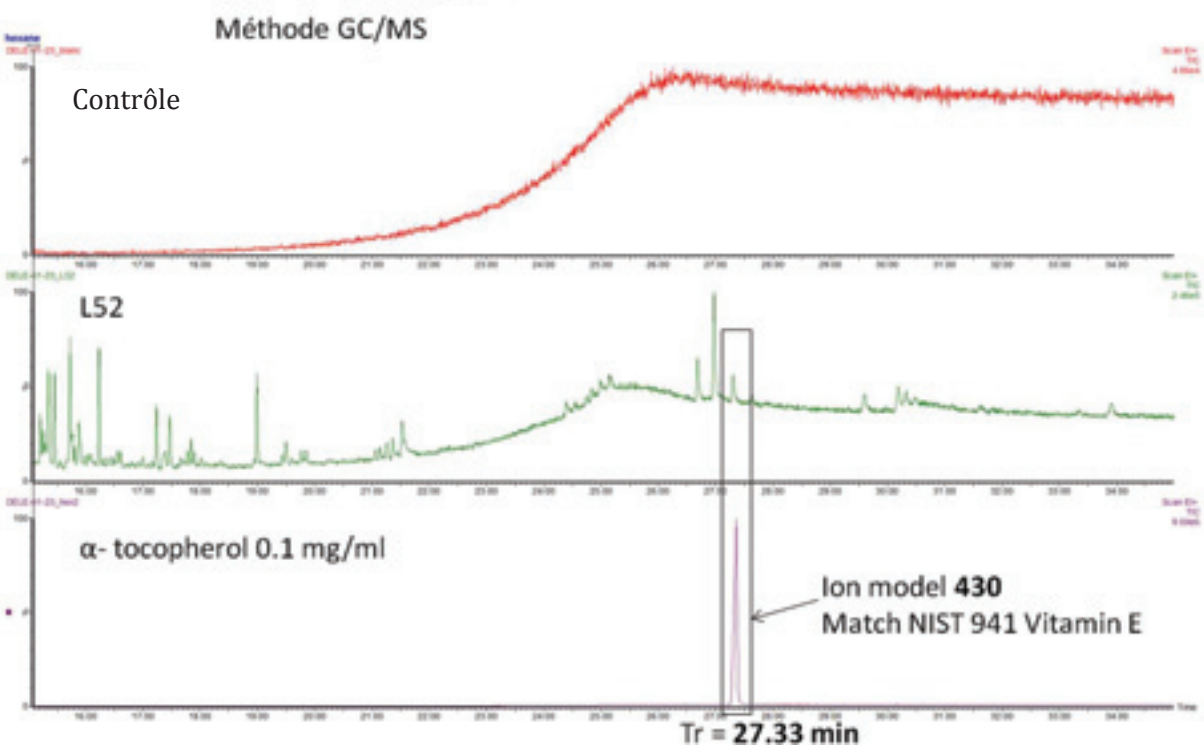


Figure 18 *: Chromatogrammes TIC (Total Ion Current) GC-MS du contrôle (ethyle actétate), du L52 extrait à l'éthyle-acétate et du standard pur d'alpha-tocophérol1 mg.mL^{-1}.*

Nous observons quelques pics pouvant correspondre à des composés stéroliques. Il serait intéressant d'étudier cette famille de molécules de manière plus spécifique. L'α-tocophérol (ou vitamine E) a été identifié grâce au standard commercial. L'α-tocophérol, reconnu pour être essentiel pour la santé humaine [9], est retrouvé dans 2 analyses GC-MS sur le L52 présenté dans le chapitre 2.

Chapitre 4 : la microscopie du L52

1. Microscopie optique

Nous avons décidé d'observer le L52 au microscope car, au vu de la richesse en composés métaboliques de ce dernier, nous ne pouvions exclure qu'il pourrait exister des macromolécules ou complexes issus de l'interaction de certaines molécules entre elles. Par ailleurs, la richesse des équipements présents à l'IBMP nous permettait de réaliser cette approche. L'observation du L52 s'est faite sur un microscope Leica DMRB, objectif x40 à sec Fluotar. Nous avons déposé une goutte de L52 entre lame et lamelle.

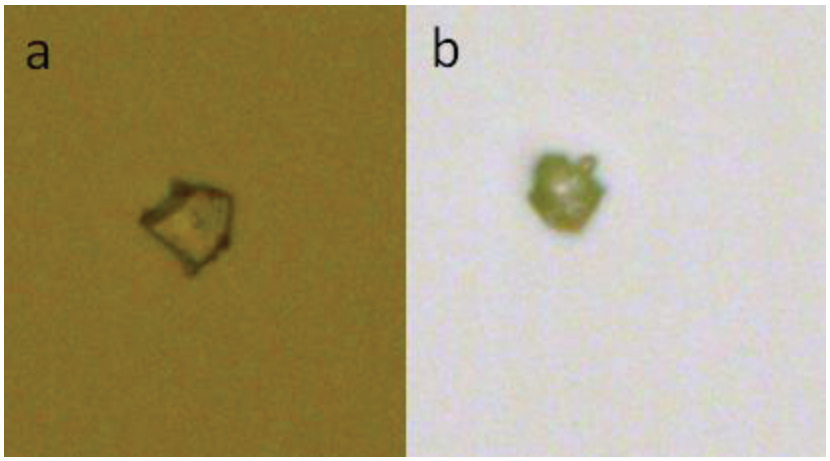


***Figure 19** : Photographies du L52 effectuées à l'aide d'un microscope optique (a, b). Nous n'observons pas de débris cellulaires, ni de parois végétales, mais quelques cristaux d'approximativement 10µm.*

2. Microscopie à fluorescence

Lorsque nous avons utilisé le filtre Dapi à 380nm, nous avons observé une forte fluorescence des cristaux. Ces cristaux ne sont probablement pas des cristaux de protéines. En utilisant un filtre plus large en fluorescence, nous avons confirmé que ces cristaux n'étaient pas non plus des parois cellulaires.

En général, lorsqu'un composé forme un cristal, c'est qu'il est trop concentré ou non soluble dans le solvant. Nous pouvons nous demander si c'est le cas ici dans le L52. Ou ce peut être également des débris liés au processus de fabrication.

3. Microscopie électronique à transmission

Une goutte (environ 8µL) de L52 est déposée sur une grille Formvar et laissée entre 1 et 2 minutes. La grille est ensuite séchée avec du papier Wattman, et recouverte de 8 microlitres

d'acétate d'uranyle 2% (dilué dans l'eau) pendant 5 secondes. La grille est de nouveau séchée et observée au microscope électronique à transmission (Hitachi H7500).

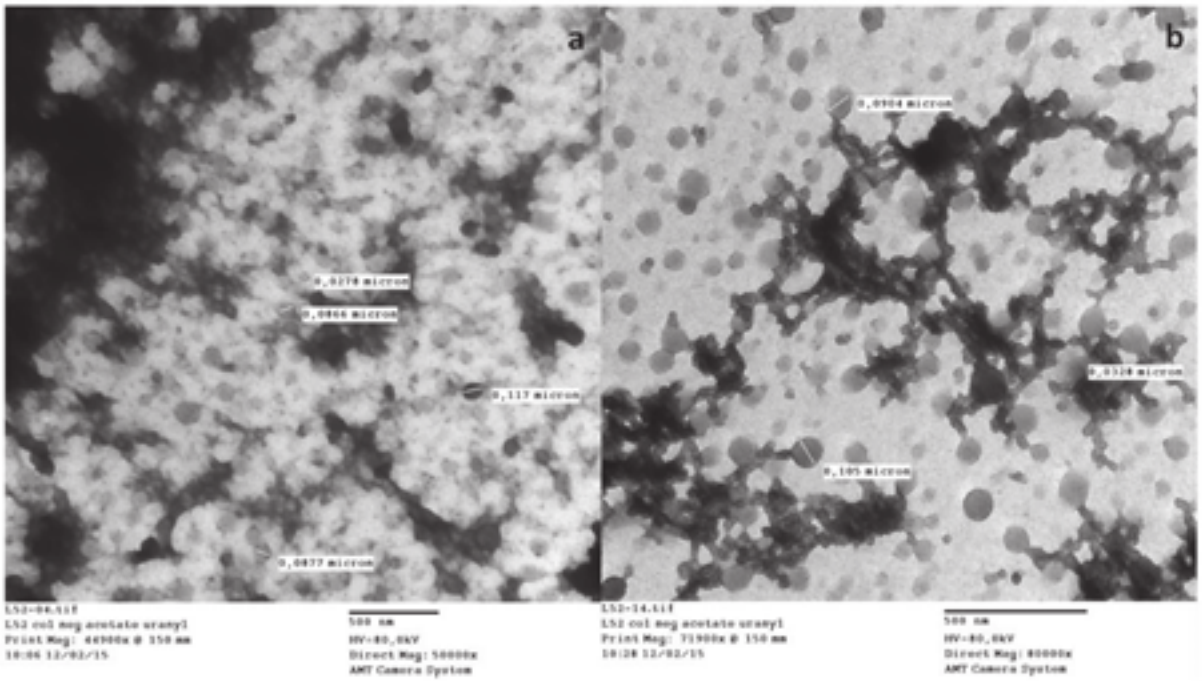


Figure 20 *: observation d'une goutte de L52 au microscope électronique à transmission. a) grossissement x 50 000. Nous observons des structures vésiculaires, plus grosses que des protéines. Ces vésicules sont probablement dues aux gouttelettes d'alcool qui, en s'évaporant lors de la préparation de la grille, auraient agrégé les molécules entre elles. Les zones plus sombres correspondent à des objets agrégés ou mal répartis sur la grille. b) grossissement x80 000. Les vésicules ont un diamètre d'environ 90nm à 120nm. Elles ressemblent à des gouttelettes lipidiques, voire parfois un chapelet qui fait penser à un filament de champignon. Mais les spores de champignons sont normalement beaucoup plus grosses que ces vésicules.*

4. Conclusion

Les analyses microscopiques du L52 nous ont permis d'observer la présence de cristaux d'environ 10µm de diamètre. Nous ne connaissons pas la nature de ces cristaux. Nous savons néanmoins que ce ne sont ni des protéines, ni des débris de parois cellulaires. Afin d'identifier la nature de ces cristaux, nous pourrions tenter de filtrer un grand volume de L52 pour récupérer un maximum de cristaux. Puis nous pourrions effectuer des tests physico-chimiques simples (couleur, température de fusion, solubilité) et utiliser des méthodes de radiocristallographie, telles que la diffraction de rayons X, de neutrons ou d'électrons, pour identifier la nature de ces cristaux.

Chapitre 5 : l'ADN du L52

1. Matériel et méthodes

Un volume de 1.2ml de L52 est réduit à 500µL au speedvac afin d'éliminer l'alcool. Dans un tube Eppendorf 1.5mL, 500µL de biphenol (saturé, tampon Tris pH 8) est ajouté au L52 aqueux. Le mélange est vortexé pendant 5 min puis centrifugé à 13200 rpm pendant 15min à température ambiante. La phase supérieure est récupérée et mise dans un nouveau tube Eppendorf 1.5mL. Y est ajouté 500µL de chloroforme, le mélange est vortexé pendant 5min, centrifugé à 13200rpm pendant 15min à température ambiante. La phase supérieure est récupérée et mélangée à 1/10 de volume d'acétate de sodium pH 5.2 (soit environ 25µL) et 2 volumes d'isopropanol (soit environ 500µL). Le tout est vortexé et stocké 2h30 à -20°C. Puis le mélange est centrifugé à 13200rpm pendant 15 min à 4°C. Le surnageant est jeté et le culot est rincé à l'éthanol 70% froid (2 x 500µL), puis laissé séché sous la hôte. Enfin, le culot est repris dans 50µL de tampon Tris 10mM pH 8. 10µL sont utilisés pour le dosage de l'ADN, le reste stocké à -20°C. L'expérience est réalisée en triplica (1 x 1.2mL L52 lot CK930 et 2 x 1.2mL lot CK235). Le dosage de l'ADN est fait à l'aide du Qubit.

2. Résultats et Discussion

Deux extractions sur trois ont fonctionné. La moyenne des deux réplicats est de 0.46ng/µL, soit 0.46 x 50 = 23ng pour les 1.2mL de L52. Ce qui nous fait environ 19 ng d'ADN double brin par mL de L52. A cette étape, nous ne pouvons pas savoir de quelle origine est l'ADN retrouvé dans le L52. Pour cela, nous devrions construire une banque plasmidique d'ADN à partir des différents fragments isolés du L52, puis séquencer chaque fragment pour en déterminer son origine.

Chapitre 6 : le poids du L52

1. Matériel et méthodes

3 x 1 mL de L52 lot CK930 ont été déposés dans 3 tubes en verre préalablement pesés. Ils ont été placés au concentrateur à température ambiante pendant 4h, afin d'être bien secs. Les tubes sont ensuite pesés avec les culots.

2. Résultats

Le poids sec moyen d'un millilitre de L52 est de 13mg (***Tableau 6***).

	Poids du tube vide (g)	poids du tube avec culot (g)	poids du culot (g)
1	2.3038	2.3196	0.0158
2	2.3385	2.3506	0.0121
3	2.3353	2.3478	0.0125

Tableau 6 *: résultats des pesées du L52.*

Chapitre 7 : la composition élémentaire du L52

1. Introduction

Afin d'obtenir une vision globale de la composition du L52, nous avons décidé de faire une analyse de la composition élémentaire du L52, c'est-à-dire des principaux atomes que nous retrouvons dans le tableau périodique des éléments. Certains d'entre eux sont essentiels pour l'Homme et sont retrouvés dans les tissus sains à une concentration de l'ordre du ppm (µg.g-1), voire du ppb (ng.g-1) pour des éléments tels que l'iode, le chrome ou le nickel [10]. Nous avons donc effectué une analyse en ICP-AES ou Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry, puis par ICP-MS ou Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry. Les atomes composant le L52 sont ionisés en étant injectés dans un plasma d'argon, qui est l'équivalent d'une flamme de 6000K environ. Ils sont ensuite analysés soit par un spectromètre d'émission, soit par un spectromètre de masse simple quadrupôle.

2. Résultats et Discussion

Techniques d'analyse : Mise en solution par attaque HNO_3 puis analyse par ICP-AES et ICP-MS.

Réf. IBMP Réf. ECPM	extrait 15-09-01-DH-1	Unité
Ca	8,3 ± 0,7	mg/kg
K	73 ± 3	mg/kg
Mg	13,5 ± 0,5	mg/kg
Mn	2,26 ± 0,03	mg/kg
Na	20,0 ± 0,7	mg/kg
P	4,7 ± 0,2	mg/kg
S	4,6 ± 0,2	mg/kg

On ne détecte pas (Limite de détection : 1 mg/kg) :
Li, Be, B, Al, Si, Sc, Ti, V, Cr, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Br, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, In, Sn, Sb, Te, Cs, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi, Th, U

Figure 21 *: résultats obtenus suite à l'analyse ICP-AES et ICP-MS du L52 lot CK 235, effectuée sur la plateforme analytique inorganique RePSeM, UMR 7178, CNRS.*

Nous retrouvons des éléments attendus dans un extrait de plante, tels que les alcalins (Potassium, Sodium) et les alcalino-terreux (Calcium, Magnésium), du Souffre et du Phosphore (***Figure 21***). Nous observons la présence de Manganèse, élément faisant partie des métaux de transition. Le manganèse fait partie des oligo-éléments essentiels pour la santé humaine. C'est un élément qui, sous forme Mn^{2+}, entre souvent en compétition avec le magnésium Mg^{2+} dans les systèmes biologiques.

La limite de détection de cette analyse est de 1 $mg.kg^{-1}$. Il serait intéressant d'étudier le produit en le concentrant préalablement afin d'augmenter les chances de détection d'autres éléments. L'idée étant que la plupart des oligo-éléments sont présents à des concentrations inférieures à 1 $mg.kg^{-1}$ dans notre organisme. Il ne serait donc pas incompatible, avec une concentration inférieure à 1 $mg.kg^{-1}$, de retrouver ces éléments en concentration thérapeutique lors de la prise du L52.

Conclusion

Au cours de ces travaux, nous avons utilisé différentes approches analytiques telles que la chromatographie, la spectrométrie de masse et la microscopie, afin d'obtenir un premier aperçu sur la composition en métabolites du produit phare des Laboratoires Lehning : le L52.

Les méthodes LC-MS nous ont permis d'orienter nos recherches vers des méthodes d'identification par GC-MS. Pour cela, nous avons optimisé trois méthodes de GC-MS complémentaires pour identifier les molécules polaires, les molécules apolaires et les molécules volatiles. L'optimisation de la méthode d'extraction des molécules apolaires a servi pour l'étude de l'ensemble des TMs. Le système de piégeage des molécules volatiles sur cartouche est unique et a été développé au laboratoire. Ces trois méthodes ont permis d'identifier finement une quarantaine de métabolites dont certains d'entre eux présentent des effets biologiques d'intérêts pour la santé humaine.

A l'heure actuelle, nous ne connaissons pas l'effet de chaque métabolite identifié, ou leur synergie, sur les symptômes traités par le L52. Mais les informations collectées au cours de ces travaux nous aideront, par la suite, à mieux comprendre les mécanismes d'actions du L52 sur l'Homme.

Annexes

Annexe 1 : données brutes de l'analyse du L52 par GC-MS méthode apolaire.

Temps de rétention	Ion model	Best match DB (match)	Masse molaire ($g.mol^{-1}$)	Formule brute
7.42	121	Camphene (897)	136.23	C10H16
9.72	154	Eucalyptol (966)	154.25	C10H18O
12.94	92	Isopinocarveol	152.23	C10H16O
13.15	122	Benzoic acid (924)	contaminant	
13.62	108	Pinocarvone (805)	150.22	C10H14O
13.71	95	Borneol (889)	154.25	C10H18O
14.25	109	Trans-verbenol (810)	152.23	C10H16O
14.36	121	Alpha-terpineol (924)	154.25	C10H18O
15.40	109	p-mentha-2,8-dien-1-ol (870)	152.23	C10H16O
18.77	121	Alpha-terpinyl actetate (933)	196.29	C12H20O2
21.20	161	Calarene (820)	204.35	C15H24
21.35	161	Aromadendrene (929)	204.35	C15H24
21.92	161	Alloaromadendrene (890)	204.35	C15H24
24.35	161	Epiglobulol (909)	222.37	C15H26O
24.78	205	(+)spathulenol (816)	220.35	C15H24O
24.95	161	Globulol (940)	222.37	C15H26O
25.15	161	Veridiflorol (939)	222.37	C15H26O
25.83	149	Rosifoliol (825)	222.37	C15H26O
26.48	149	Eudesmol (842)	222.37	C15H26O
28.01	205	(-)spathulenol (816)	220.35	C15H24O
35.6	71	Phytol (925)	296.53	C20H40O
51.39	430	Alpha-tocopherol (922)	430.71	C29H50O2

Annexe 2 : données brutes issues de l'analyse GC-MS du L52 à l'aide de la méthode d'extraction à l'éthyl-acétate (EtAc) injectée sur la GC-MS Perkin.

Temps de rétention	Ion model	Best match DB (match)	Synonyms
3.80	151	Methoxy-phenyl-oxime (822)	CONTA
4.35	93	Alpha-pinene (927)	Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6,6-trimethyl-
5.62	93	(-)-limonene (868)	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-
5.66	154	Eucalyptol (936)	Cineole, 1,8-cineole
7.23	91	trans-Pinocarveol (844)	Bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol, 6,6-dimethyl-2-methylene
7.56	108	Pinocarvone (815)	Bicyclo[2.2.1]heptan-3-one,6,6-dimethyl-2-methylene
7.60	95	U	
7.90	134	U	
7.94	121	p-ment-1-en-8-ol (834)	Alpha terpineol
8.34	109	U	
8.46	109	U	
9.56	98	Acetic acid, nonyl ester	Standard interne
9.65	150	2-methoxy-5-vinylphenol (895)	
10.13	136	Camphene	Bicyclo[2.2.1]heptane, 2,2-dimethyl-3-methylene
11.30	161	U	
11.38	161	Alloaromadendrene (886)	1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-,
11.66	161	Alloaromadendrene (867)	
12.15	191	U	
12.85	161	Veridiflorol (809)	Viridiflorol, 1H-Cycloprop[e]azulen-4-ol, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-,
13.15	204	Globulol (884)	1,1,4,7-Tetramethyldecahydro-1H-cyclopropa[e]azulen-4-ol ,
13.25	161	Veridiflorol (827)	Viridiflorol, 1H-Cycloprop[e]azulen-4-ol,

			decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-,
13.59	149	U	
13.91	149	Alpha-eudesmol	2-Naphthalenemethanol, decahydro-à,à,4a-trimethyl-8-methylene-, alpha-selinelol
15.17	121	U	
15.66	149	U	
16.68	195	U	
16.90	195	U	
17.06	149	U	
17.23	73	U	
17.31	88	Octanoic acid, ethyl ester (978)	Rmq: 2 pics dans spectre

Annexe 3 : données brutes issues de l'analyse GC-MS du L52 à l'aide de la méthode d'extraction à l'éthyl-acétate (EtAc) injecté sur la GC-MS Agilent.

Temps de rétention	Ion model	Best match DB (match)	Synonyms
2.94	93	alpha-pinene	
3.79	119	1-methyl-2-(1-methylethyl)-benzene (920)	O-cymene, O-cymol
3.86	154	Eucalyptol (968) *	1,8-cineole
5.03	92	U	
5.19	92	Trans-pinocarveol (915)	Bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol, 6,6-dimethyl-2-methylene-
5.51	108	U	
8.00	136	Alpha-terpinyl acetate (934)	Terpineol acetate
9.13	161	Calarene (799)	1H-Cyclopropa[a]naphthalene, 1a,2,3,5,6,7,7a,7b-octahydro-1,1,7,7a-tetramethyl-,
10.88	161	Veridiflorol (823)	Viridiflorol, 1H-Cycloprop[e]azulen-4-ol, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-,
11.27	126	U	

21.76	329	U	
23.56	326	U	
23.76	203	U	
23.90	430	Vitamin E (955)	Alpha-tocopherol

Annexe 4 : données brutes issues de l'analyse GC-MS du L52 à l'aide de la méthode d'extraction à l'éthyl-acétate (EtAc) injecté sur la GC-MS Agilent, avec l'échantillon de L52 concentré.

Temps de rétention	**Ion model**	**Best match DB (match)**	**Synonyms**
5.22	92	Trans-pinocarveol (921)	Bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol, 6,6-dimethyl-2-methylene-
5.52	108	Pinocarvone (782)	
5.58	95	U	
5.88	134	U	
5.91	136	Alpha-terpineol (848)	P-menth-1-en-ol,
6.14	172	U	
6.29	109	U	
6.39	109	U	
6.67	126	Hydroxymethylfurfurane HMF (939)	
8.00	136	Alpha-terpinyl acetate (898)	Terpineol acetate
8.43	131	U	
8.50	147	Silane, (butylthio)trimethyl-	CONTA
8.64	142	U	
8.83	204	Selin-4,7(11)-diene (866)	
8.96	126	1,2,3-benzenetriol (751)	Pyrogallol, pyrogallic acid
9.13	107	U	
9.30	107	U	
9.57	204	Ç-Eudesmol (803)	Naphthalenemethanol, 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-à,à,4a,8-tetramethyl-, (2R-cis)-
9.84	121	U	
9.90	204	1H-Cycloprop[e]azulene,	Alpha-gurjunene

		1a,2,3,4,4a,5,6,7b-octahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, (874)	
9.98	204	Naphthalene, hexahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-, [1S-(1à)]- (890)	Cadina-1,4-diene
10.39	152	U	
10.59	161	Veridiflorol (856)	
10.90	161	Globulol (929)	
11.09	149	Alpha-eudesmol (815)	Naphthalenemethanol, decahydro-à,à,4a-trimethyl-8-methylene
11.32	149	U	
11.55	126	U	
11.65	204	1H-Cyclopropa[a]naphthalene, 1a,2,3,3a,4,5,6,7b-octahydro-1,1,3a,7-tetramethyl- (846)	
12.56	178	U	
12.66	139	U	
12.89	135	U	
13.40	149	U	
14.42	233	U	
14.45	195	U	
14.68	195	U	
14.92	256	Hexadecanoic acid (866)	Palmitic acid
15.24	153	U	
16.27	123	Phytol (895)	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-,
16.53	95	U	
16.74	284	U	
18.35	261	U	
18.75	126	U	
21.02	261	U	
21.69	329	U	
21.77	329	U	
21.88	81	Farnesol (812)	2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-

			trimethyl-
21.98	329	U	
22.06	419	U	
22.20	419	U	
22.52	329	U	
22.90	217	U	
23.43	312	U	
23.62	326	U	
23.78	203	U	
23.92	430	Vitamin E (941)	Alpha-tocopherol
24.09	397	U	
25.00	414	U	
25.26	410	U	
26.06	411	U	
26.47	409	U	
26.71	316	U	
26.83	203	U	
27.30	203	U	

Bibliographie

1. Mann, T.S., et al., *Comparison of Eucalyptus cinerea essential oils produced by hydrodistillation and supercritical carbon dioxide extraction.* Natural product communications, 2011. **6**(1): p. 107-110.

2. Elaissi, A., et al., *Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils from fifteen Eucalyptus species growing in the Korbous and Jbel Abderrahman Arboreta (North East Tunisia).* Molecules, 2012. **17**(3): p. 3044-3057.

3. Fiehn, O., et al., *Identification of uncommon plant metabolites based on calculation of elemental compositions using gas chromatography and quadrupole mass spectrometry.* Analytical chemistry, 2000. **72**(15): p. 3573-3580.

4. Oyedeji, O., et al., *In vitro Antimicrobial and Antioxidant Analysis of Gallic Acid from the Leaves of Ludwigia abyssinica A. Rich.* European Journal of Medicinal Plants, 2014. **4**(9): p. 1098.

5. Rawat, G., P. Tripathi, and R. Saxena, *Expanding horizons of shikimic acid.* Applied microbiology and biotechnology, 2013. **97**(10): p. 4277-4287.

6. Ríos, J.-L., *Effects of triterpenes on the immune system.* Journal of ethnopharmacology, 2010. **128**(1): p. 1-14.

7. Juergens, U., *Anti-inflammatory properties of the monoterpene 1.8-cineole: current evidence for co-medication in inflammatory airway diseases.* Drug research, 2014. **64**(12): p. 638-646.
8. Michelucci, A., et al., *Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(19): p. 7820-7825.

9. Traber, M.G., *Vitamin E inadequacy in humans: causes and consequences.* Advances in Nutrition: An International Review Journal, 2014. **5**(5): p. 503-514.

10. Underwood, E., *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*. 2012: Elsevier Science.

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE

Ces travaux de recherche ont été effectués au travers d'une collaboration entre les Laboratoires Lehning et la plateforme métabolomique de l'IBMP. Le but de cette étude était de caractériser, sur le plan métabolomique, un ensemble d'extraits de plantes utilisé par les Laboratoires Lehning pour la fabrication de ses médicaments et de ses produits. Nous nous sommes focalisés sur dix-neuf extraits de plantes, appelés teintures-mères, entrants dans la fabrication des deux produits leaders des Laboratoires Lehning, le L52 et le 72. Suite à la demande spécifique des Laboratoires Lehning, nous avons inclus la caractérisation du produit L52. Il semblait intéressant de comparer les résultats du produit fini avec ceux de chaque teinture-mère prise indépendamment.

Nous avons utilisé des outils de métabolomique modernes afin de caractériser finement la composition en métabolites de chaque teinture-mère. La chromatographie liquide et gazeuse a permis de séparer les métabolites pour mieux les identifier. Nous avons également utilisé la chromatographie semi-préparative pour purifier certains composés, étape préalable et parfois nécessaire pour pouvoir identifier certains composés. Une fois les métabolites séparés, nous avons utilisé plusieurs outils de détection pour les identifier et parfois les quantifier, tels que la spectrométrie de masse et la spectrométrie UV-visible.

Nous avons développé une stratégie d'approche de métabolomique globale (ciblée et non ciblée) avec des outils analytiques complémentaires, dans le but d'identifier un maximum de molécules dans chaque TM. Une approche globale car l'objectif premier de ce travail de thèse a été de faire une cartographie fine des métabolites de chaque TM, sans apriori. Toutes les TMs sont sous la forme d'une solution hydro-alcoolique. D'un point de vue industriel, il est avantageux d'utiliser

un minimum de méthodes d'analyses différentes pour l'ensemble des contrôles. Néanmoins, nous observons une grande diversité entre chaque TM.

Tout d'abord, les plantes étudiées font parties de familles botaniques très diverses : les astéracées (*Eupatorium perfoliatum*, *Arnica montana)* ; les renonculacées (*Aconitum napellus*, *Stasphysagria*) ; les solanacées (*Atropa belladonna, Hyoscyamus niger*) ; les apiacées (*Sumbulus, Cicuta virosa, Asa foetida*), etc… Souvent, chaque famille botanique possède une ou plusieurs familles phytochimiques caractéristiques : les lactones sesquiterpèniques pour les astéracées, les alcaloïdes pour les renonculacées et les solanacées (de type tropaniques pour ces derniers).

Ensuite, la nature des organes végétaux utilisés est différente d'une TM à l'autre. Nous utilisons la plante entière pour fabriquer les TMs d'*Arnica montana* et d'*Atropa belladonna* ; les parties aériennes fleuries pour les TMs d'*Aconitum napellus* et d'*Eupartorium perfoliatum* ; les parties souterraines pour les TMs *Gelsemium*, *Bryonia* et *Polygala*. De plus, certaines plantes sont utilisées fraiches et d'autres sous forme séchées (*Quinquina*, *Eucalyptus*).

Enfin, nous utilisons des concentrations en éthanol différentes entre chaque TM, variant de 45% pour *Arnica montana* ou *Corydalis* à 90% pour la TM *Igniatia amara*. Par conséquent, les classes de métabolites extraits à ces différents pourcentages en éthanol ne sont pas les mêmes.

Cette hétérogénéité dans la nature des TMs nous conduit donc à utiliser une approche par des techniques d'analyses complémentaires, afin d'obtenir une caractérisation la plus générale et la plus large possible de chaque TM.

La première approche a consisté en une analyse UPLC-UV-MS. Cette approche nous a permis dans un premier temps d'observer la composition globale et la richesse en métabolites de chaque TM. Nous avons pu déduire que toutes les TMs étaient très riches en métabolites. Les profils globaux, en UV et en MS, présentaient de nombreux pics, reflet de la présence d'un grand nombre de molécules. Dans chaque TM se trouvent des métabolites de natures physico-chimiques différentes, des molécules les plus polaires aux molécules apolaires.

L'analyse pic par pic des chromatogrammes LC-UV-MS n'a été réalisée que pour quelques TMs (*Eupatorium*, *Aconitum*, *Bryonia*, *Arnica*, *Cicuta*). En effet, les informations retirées manuellement de ces données sont très difficilement exploitables pour l'identification de molécules. Etant donnée la richesse de chaque TM en métabolites, beaucoup d'entre eux co-éluent pendant la chromatographie. Il est donc difficile voire impossible de relier les données UV et les données MS pour une molécule. Néanmoins, il est tout à fait envisageable d'utiliser cette analyse LC-UV-MS pour vérifier le profil global d'une TM sans pour autant identifier toutes les molécules.

A la suite des résultats LC-UV-MS, nous nous sommes orientés vers des analyses en GC-MS. Nous avions pu ainsi observer la présence de molécules de faibles poids moléculaires et de nature polaire, ainsi que la présence de molécules apolaires. Nous avons donc développé trois méthodes GC-MS distinctes : une pour les composés polaires, une pour les composés apolaires et une uniquement pour les composés volatils. Cette dernière méthode n'a été utilisée que pour l'étude du L52.

L'avantage des analyses en GC-MS est l'existence de nombreuses banques de données spectrales et de banques de données d'indice de rétention (NIST, Wiley, Golm). De plus, nous avons développé, au cours de ces travaux, deux banques de données internes au laboratoire pour un totale d'environ 250 molécules. Si nous analysons de plus près le nombre de molécules identifiées par TM par rapport au nombre de pics détectés, nous nous rendons compte que malgré l'ensemble des banques de données utilisées, nous obtenons un pourcentage global d'identification assez faible, de l'ordre de 15% et de 20% pour les méthodes GC-MS polaires et apolaires respectivement (***Figure 1***).

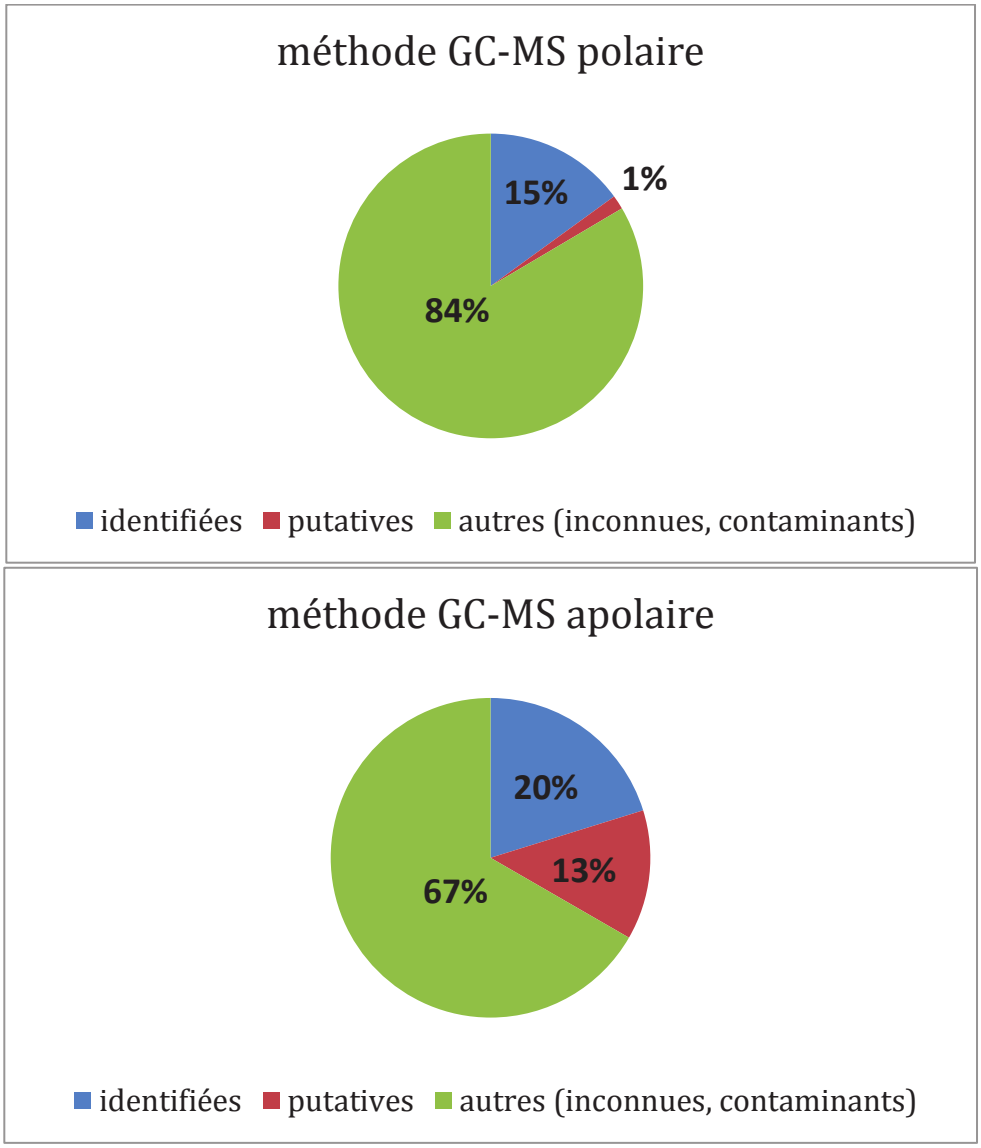


Figure 1 *: pourcentage de molécules identifiées, putatives et autres (inconnues et contaminants) par rapport à l'ensemble des molécules détectées à l'aide des méthodes GC-MS polaires et apolaires dans les 19 TMs.*

Pour la méthode GC-MS polaire, la majorité des molécules identifiées sont des composés du métabolisme primaire. Nous identifions des sucres (xylose, fructose, sorbose, sucrose, 1-kestose,…), des acides aminés (alanine, proline, valine, serine, thréonine,…) et des acides organiques (acides citrique, fumarique, malique, quinique,...). Ces molécules ne sont pas spécifiques d'une TM à l'autre, mais leurs proportions entre elles, leurs présences ou leurs absences peuvent nous renseigner sur la composition de la TM. C'est-à-dire sur la qualité des plantes utilisées pour la fabrication ou sur la qualité de la fabrication en elle-même.

Nous nous apercevons que certaines molécules n'ont pas pu être idéalement séparées et donc clairement identifiées, malgré le travail de déconvolution effectué sur les spectres de masse. Le

cas le plus redondant dans les TMs est l'exemple du fructose et du sorbose. Ces deux céto-hexoses donnent chacun deux pics chromatographiques aux mêmes indices de rétention (1894 et 1904, 1898 et 1904, pour le fructose et sorbose respectivement). Ils possèdent également tous les deux, pour les deux pics, l'ion caractéristique 307. La méthode GC-MS utilisée est une méthode de screening, permettant d'observer un maximum de molécules de natures différentes. Elle n'est donc pas optimisée pour une famille de molécules particulières. Si nous voulons séparer idéalement les différents sucres présents dans l'échantillon, il existe d'autres méthodes de préparations d'échantillons et de chromatographies (voir Partie III, chapitre 2).

Cette méthode GC-MS avec dérivation au TMS est également intéressante du point de vue du contrôle qualité car elle a permis d'identifier, pour certaines TMs, la molécule « contrôle » pour la validation de la bonne qualité de la TM. Nous retrouvons la gelsémine dans la TM *Gelsemium*, la quinine dans la TM *China rubra*, la plumbagine dans la TM *Drosera*, l'acide férulique dans la TM *Asa foetida* et l'acide aconitique dans la TM *Avena sativa*. Par une seule approche, nous pouvons contrôler la TM sur un métabolite d'intérêt et sur son profil global.

La méthode GC-MS apolaire a permis, quant à elle, d'identifier principalement des composés terpéniques (mono-, sesqui-terpènes), certains acides gras et des stérols. L'optimisation de la préparation d'échantillon, sans utiliser le concentrateur, a permis d'obtenir une meilleure identification des molécules les plus volatiles. Ainsi, un plus grand nombre de métabolites a pu être identifié en une seule méthode GC-MS.

La méthode UPLC-MS/MS développée au laboratoire nous permet d'identifier 84 métabolites appartenant aux familles des composés phénoliques et flavonoïdes. Nous avons vu à travers les différents chapitres que beaucoup de composés phénoliques sont connus pour leurs propriétés antioxydantes. Les TMs les plus riches en composés phénoliques sont les TM de *Drosera*, *Eucalyptus* et *Avena*. Nous pouvons également doser l'acide férulique dans *Drosera* pour le contrôle qualité de la TM en 15 min.

Ces trois méthodes ont permis d'identifier en moyenne une cinquantaine de molécules par TM. Chaque méthode permet d'identifier son lot de molécules, de façon complémentaire (***Figure 2***). Nous identifions moins de molécules avec l'HPLC-MS/MS qu'avec l'une ou l'autre des méthodes GC-MS car nous sommes dans une stratégie beaucoup plus ciblée. Nous pouvons observer un pourcentage d'identifications par la méthode de GC-MS légèrement plus élevée dans les TMs comportant plus d'eau. Cette observation n'est pas vérifiée pour la TM d'*Eucalyptus*, dont les feuilles séchées sont naturellement riches en huiles essentielles. Nous identifions, par conséquent, de nombreux métabolites avec la méthode GC-MS apolaire. Par contre, nous n'observons pas de lien entre le pourcentage de molécules identifiées par une méthode et le fait

que les plantes utilisées pour la fabrication des TMs soient fraiches ou sèches. Les TMs *Corydalis* et *Bryonia* sont toutes les deux fabriquées à partir de tubercules, séchés pour *Corydalis*, fraiches pour *Bryonia*. Nous retrouvons des pourcentages d'identifications similaires pour les différentes méthodes.

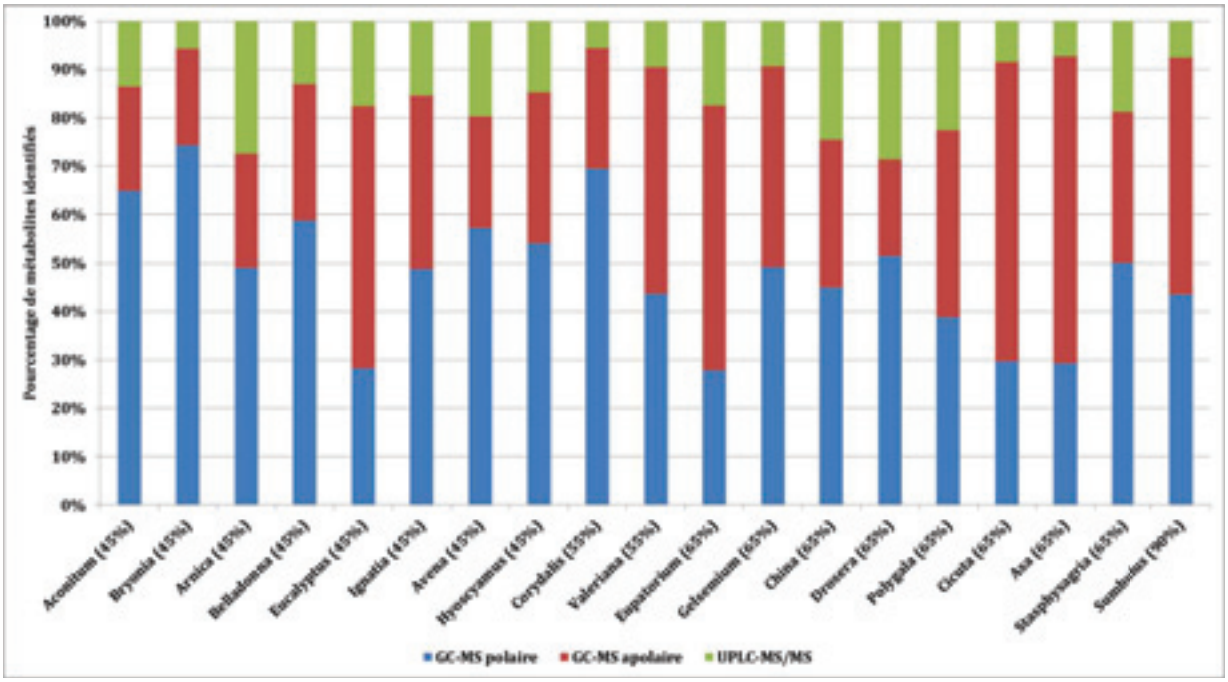


Figure 2 *: apport de chacune des trois techniques d'analyses, GC-MS polaire, GC-MS apolaire et LC-MS/MS, dans le pourcentage des identifications pour chaque TM. Entre parenthèse après chaque nom de la TM est indiqué le pourcentage d'éthanol dans la TM.*

Ces méthodes permettent d'obtenir un aperçu global sur la qualité des TMs. Elles peuvent facilement être utilisées pour un contrôle rapide de la TM, 40 min pour la méthode GC-MS et 15min pour la méthode LC-MS/MS. Elles permettent également d'identifier et de doser précisément une ou plusieurs molécules à la fois. Enfin, même si nous n'identifions pas l'ensemble des métabolites d'une TM, le profil chromatographique global peut être utilisé pour contrôler la qualité de la TM, sa stabilité ou la qualité des plantes d'un nouveau fournisseur.

L'une des limites à l'identification directe d'un métabolite inconnu dans un extrait biologique complexe est la séparation du métabolite avec tous les autres présents dans l'extrait. Ceci est vrai pour la spectrométrie de masse basse résolution (simple quadrupole) et pour la spectrométrie de masse haute-résolution (QTOF). Dans le premier cas, un spectre de masse et un temps de rétention ne sont pas suffisants. Nous devons fragmenter la molécule et sélectionner un fragment caractéristique, afin d'augmenter la spécificité et valider l'identification. Dans le deuxième cas, les interférences entre les signaux des massifs isotopiques empêchent la

détermination de la formule brute. Par ailleurs, si plusieurs métabolites arrivent en même temps dans la source d'un spectromètre de masse, nous pouvons obtenir des phénomènes dits de « compétitions à l'ionisation ». L'ionisation d'un métabolite se fera mieux au dépend des autres et nous perdons de l'information indispensable à l'identification.

Nous avons utilisé la spectrométrie de masse haute-résolution sur les TMs. Les premiers essais d'identifications non ciblées ont été infructueux pour les raisons décrites ci-dessus. La richesse en molécules de chaque TM ne nous permettait pas de séparer correctement les différents métabolites pour les identifier. Cela nous a conduit à adopter une stratégie plus ciblée, en utilisant l'HPLC semi-préparative pour collecter des fractions, voire purifier certaines molécules. Les fractions, contenant moins de molécules, sont alors analysées par HRMS.

Pour la première fois, ont été identifiés des métabolites d'intérêts pour la santé humaine, comme la sesquiterpène lactone 7-α-hydroxydehydrocostus lactone dans la TM d'*Arnica montana* ; le zaluzanine **C** et la germacrone dans la TM *Sumbulus* ; l'ammorésinol dans la TM *Asa foetida* ; ainsi que des alcaloïdes, plus ou moins toxiques, dans les TMs *Corydalis*, *Ignatia* et *Hyoscyamus*.

Dans certains cas, nous avons pu obtenir une formule brute mais pas d'identification de la molécule. Pour la majorité des cas, les spectres MS/MS n'étaient pas assez intenses pour obtenir les bons massifs isotopiques pour chacun des fragments. Les 2èmes et 3èmes isotopes n'étaient pas ou peu détectés. Or il est indispensable, pour déterminer une formule brute, d'obtenir un bon massif isotopique avec les intensités des isotopes correspondant. Sans les formules brutes des fragments, nous ne pouvons pas les comparer à ceux obtenus les programmes de modélisations de fragmentations *in silico*. Pour améliorer l'identification des métabolites dont nous avons obtenus les formules brutes, nous devons soit utiliser des fractions plus concentrées, soit optimiser pour chaque molécule à identifier les paramètres d'ionisation et de fragmentation.

Plusieurs limites existent à la HRMS. La première est que, dans le meilleur des cas, nous obtenons la formule brute du composé. Or, il est courant que plusieurs composés aient la même formule brute. Il nous faut donc des analyses complémentaires, d'autres techniques analytiques, comme la RMN, pour obtenir des données orthogonales et être certains d'identifier la bonne molécule. Néanmoins, en couplant nos analyses HRMS avec la chromatographie et la spectrophotométrie UV, nous obtenons des informations complémentaires et solides pour confirmer dans de nombreux cas les identifications.

La deuxième limite est la richesse des banques de données. Même si nous obtenons une formule brute avec les meilleurs scores, nous ne pouvons pas clairement identifier la molécule si elle n'est pas présente dans les banques de données. Soit parce qu'elle n'a pas était enregistrée dans

les banques, soit parce qu'elle n'a pas encore été découverte. Les travaux sur la TM de *Cicuta virosa* nous ont permis d'observer les étapes critiques lors de l'identification d'un composé et de prendre conscience des limites de chaque technique analytique.

L'étude des extraits de plante du type TM est également complexe. La solution hydro-alcoolique est un milieu propice aux réarrangements de certains composés organiques. L'avantage de l'éthanol est de permettre l'extraction de composés moins polaires par rapport à une extraction uniquement avec de l'eau. De plus, l'éthanol permet de garder la solution à l'abri des contaminations biologiques. Mais les molécules extraites peuvent évoluer chimiquement, se réarranger, réagir entre elles et avec la solution. Nous avons l'exemple de la plumbagine dans la TM *Drosera.* Sans le standard commercial, nous serions peut être passés à côté de son identification car la molécule, en solution hydro-alcoolique, peut perdre une insaturation et passer d'une masse de 188 à 190 Da. Nous avons également observé des différences de masses de +16 Da ou -18 Da entre certaines molécules inconnues, pouvant correspondre à une oxygénation ou une déshydratation de la molécule.

Nous avons pu montrer aux travers de ces travaux les limites technologiques de la chromatographie et de la spectrométrie de masse. Le design des sources d'ionisation change d'un appareil à l'autre. Bien que le principe reste le même d'une source Electrospray à l'autre, nous observons des différences entre les spectres de masses. Chaque appareil a également sa propre sensibilité. Comme nous l'avons vu lors des études d'identification de composés inconnus, lorsque nous passons des analyses UPLC-MS aux analyses HPLC semi-préparatives, nous perdons parfois de l'information car nous avons une détection moins sensible. Pour pallier à ce problème de sensibilité, nous pourrions concentrer l'échantillon avant de l'analyser en HPLC semi-préparative. Nous pouvons le passer au concentrateur, effectuer une pré-purification sur colonne Sephadex ou plaques HLB. Dans ces derniers cas, nous nous dirigeons vers une spécificité plus grande quant à la molécule à purifier et à identifier, ce qui n'était pas l'objectif premier de ces travaux de thèse, dont l'objectif était plutôt d'utiliser une approche plus globale en partant des TMs.

C'est un travail difficile de comprendre exactement comment un produit, une TM, voire une seule molécule, interagit avec un organisme pour le soigner. Les plantes étudiées dans ces travaux ne sont pas anodines. Elles renferment des familles phytochimiques souvent utilisées par l'Homme. En effet, les alcaloïdes sont présents dans huit espèces étudiées ici. Et nous retrouvons également des composés phénoliques, des flavonoïdes, des tanins, des sesquiterpènes lactones et des polyines. Nous avons vu au cours des différents chapitres que certaines de ces molécules font l'objet de recherche d'activités biologiques où sont déjà connues

pour présenter des activités antioxydantes, antiinflammatoires ou anticancéreuses par exemple. Les tests effectués pour mesurer l'activité biologique sont majoritairement effectués *in vitro*, sur des cultures cellulaires spécifiques à chaque activité. Les activités sont mesurées pour une molécule particulière. Or, nous avons montré à travers nos études, que les TMs et le produit L52 contenaient des centaines de molécules. Il serait intéressant de comparer l'activité d'une TM (dont nous avons identifié une molécule biologiquement active) sur une lignée cellulaire par rapport à la molécule pure. Nous observerons alors les effets synergiques s'ils existent et essayerons de mieux comprendre les modes d'actions des médicaments à base de plantes.

Pour aller plus loin dans les recherches sur les TMs, nous pourrions développer des méthodes plus ciblées sur les métabolites identifiés et les rechercher dans les différents produits Lehning. En ayant une vision plus précise sur le contenu métabolique de chaque produit, nous serions en mesure de mieux comprendre leurs mécanismes d'actions sur la santé humaine. Nous pourrions également développer de nouveaux produits, qui seraient toujours à base d'extraits de plantes, mais enrichis en composés d'intérêts ou dépourvus de molécules toxiques. Nous utiliserons alors des colonnes préparatives couplées à des détecteurs de masses et des collecteurs de fractions pour extraire les composés cibles.

Julien DELECOLLE

Approche métabolomique pour une caractérisation plus fine d'extraits de plantes d'intérêts pour la santé humaine

Résumé

Ces travaux de thèse ont pour but d'identifier des métabolites dans des teintures-mères (TMs) utilisées en homéopathie et en phytothérapie pour mieux connaitre la composition métabolique de chacune d'entre-elles afin de mieux contrôler la qualité des TMs et de mieux comprendre leur mode d'action sur la santé humaine. Nous avons étudié, par une approche de métabolomique globale, dix-neuf teintures-mères et un produit leader : le L52, fabriqués par les Laboratoires Lehning. Dans un premier temps, nous avons utilisé des approches non-ciblées en construisant des banques de données GC-MS et UPLC-MS/MS, afin d'identifier un grand nombre de molécules dans chaque extrait. Ensuite, nous avons fractionné certaines TMs et purifié, sur la basse de l'absorbance et de la masse, des métabolites inconnus, par chromatographie semi-préparative couplée à un collecteur de fractions afin d'obtenir des métabolites purs pour l'indentification en HRMS. Nous avons identifié de nombreuses molécules dans chaque TM, montrant que ces dernières sont très riches en molécules pouvant être utilisées pour le contrôle-qualité des TMs et valorisées pour la santé humaine. Une meilleure connaissance du contenu métabolique de ces TMs pourra, à présent, être valorisée dans le cadre d'une meilleure compréhension de ces produits et de leurs effets sur la santé humaine.

Mots clés : teintures-mères, GC-MS, UPLC-MS/MS, UPLC-HRMS, HPLC-UV-MS semi-préparative, homéopathie, phytothérapie.

Summary

Tinctures defined as hydro-alcoholic extracts have been used from centuries in homeopathy and phytotherapy, but their chemical compositions remain still unknown. During my PhD, metabolomics analyses of nineteen tinctures and one leader product, L52, made by Laboratoires Lehning, were conducted using untargeted metabolomic approach. We build GC-MS and UPLC-MS/MS databases to identify a large amount of metabolites. Then, we used semi-preparative HPLC with both UV and mass detection to isolate some compounds from tinctures. We used UPLC-HRMS to obtain chemical formula, a prerequisite for metabolites identification. Finally, we identified a broad range of different metabolites in each tincture, highlighting the metabolic complexity of the TMs. These molecules can now be used for quality-control and valued for a better understanding of these products on human health.

Key words: tinctures, GC-MS, UPLC-MS/MS, UPLC-HRMS, semi-preparative HPLC-UV-MS, homeopathy, phytotherapy.