

UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES FONDAMENTALES - SANTÉ N°619

THÈSE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : CHIMIE

Spécialité : Chimie des substances naturelles

Présentée et soutenue publiquement par

CÉDRIC BARTHEL

Le 24 mars 2021 – Amphithéâtre 4 – UFR de Pharmacie

Contribution à la connaissance des pharmacopées traditionnelles : biodisponibilité des substances naturelles et influence des saponosides

Thèse dirigée par **Pr. Catherine LAVAUD**

JURY

M. Jean-Hugues RENAULT,	Professeur,	Université de Reims Champagne-Ardenne,	Président
M. Pierre CHAMPY,	Professeur,	Université Paris-Saclay,	Rapporteur
Mme Dominique MATTAR,	Professeur,	Université de Lorraine,	Rapporteur
M. Farid CHEMAT,	Professeur,	Université d'Avignon,	Examineur
Mme Catherine LAVAUD,	Professeur,	Université de Reims Champagne-Ardenne,	Directeur de thèse
M. Georges MASSIOT,	Directeur de Recherche,	CNRS ; UMR 7312, Reims,	Invité



Remerciements

Ce mémoire est le résultat d'un travail réalisé au sein de l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR – UMR 7312 CNRS), groupe Chimie des Substances Naturelles, à l'Université de Reims Champagne-Ardenne.

Je voudrais adresser mes remerciements

Au Professeur Jean-Hugues Renault de l'Université de Reims Champagne-Ardenne,

Au Professeur Catherine Lavaud de l'Université de Reims Champagne-Ardenne,

Au Professeur Pierre Champy de l'Université de Paris-Saclay,

Au Professeur Dominique Laurain-Mattar de l'Université de Lorraine,

Au Professeur Farid Chemat de l'Université d'Avignon

pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce manuscrit

Je tiens à adresser ma reconnaissance à ma directrice de thèse, Madame le Professeur Catherine Lavaud, pour sa patience et sa disponibilité tout au long de ce projet de thèse. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse toute ma gratitude pour cela.

Je remercie également Monsieur le Directeur de Recherche Emérite Georges Massiot qui a su apporter une aide et des conseils précieux tout au long de cette thèse, notamment lors de la préparation des communications et des publications.

J'associe à ces remerciements les Docteurs Jean-Marc Nuzillard et Pedro Lameiras dont l'expertise en Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) m'a permis de mieux comprendre et utiliser cet outil, en particulier sur la problématique de la suppression du signal de l'eau. Ils m'ont beaucoup appris et j'ai apprécié leur enthousiasme et leur pédagogie.

J'adresse aussi de sincères remerciements au Docteur Céline Guillermain, Maître de Conférence Universitaire de l'équipe Polymères Fonctionnels et Réseaux de l'ICMR pour nous avoir accordé l'accès au tensiomètre à anneau de Du Noüy. La fiche explicative qu'elle nous a fournie et ses conseils d'utilisation nous ont été d'une aide précieuse.

J'étends de chaleureux remerciements au Docteur Christine Terryn, Ingénieure de Recherche de la Structure Fédérative de Recherche Cap Santé de l'URCA pour nous avoir accordé l'accès à la Plateforme en Imagerie Cellulaire et Tissulaire (PICT). Son expertise en microscopie fut la bienvenue pour l'observation des complexes micellaires en solution.

Bien entendu, atteindre les objectifs de cette thèse n'aurait pas été possible sans le soutien des ingénieurs et techniciens de laboratoire de l'équipe Chimie des Substances Naturelles. Je tiens surtout à remercier les ingénieurs d'étude Madame Agathe Martinez et Monsieur Anthony Robert pour nous avoir donné accès au Plateau Technique PIAnE et pour leur soutien technique essentiel au bon fonctionnement du spectromètre RMN. Je remercie également les assistants ingénieurs Madame Charlotte Sayagh et Monsieur Nicolas Borie pour leur aide au quotidien et leurs conseils pour la mise en place des protocoles de Chromatographie Liquide Haute Performance. J'associe à ces remerciements Monsieur Benjamin Bertaux dont les compétences techniques et les conseils amicaux ont contribué à améliorer le cadre de mon travail expérimental.

Je remercie aussi l'Agence Régionale de Santé pour le financement de cette thèse dans le cadre des quatre années de l'internat en pharmacie et du Diplôme d'Etude Supérieure en Innovation Pharmaceutique et Recherche. Je remercie également l'ICMR et l'URCA pour m'avoir accordé une extension de financement sur ces quatre derniers mois qui m'ont permis de finaliser la rédaction de ce manuscrit.

Je désire en outre remercier tous les doctorants, post-doctorants et stagiaires de Master 2 que j'ai pu rencontrer pendant ces quatre années de thèse et d'internat. Votre bonne humeur et nos délires en commun contribuent chaque jour à la bonne ambiance du laboratoire. Je remercie tout particulièrement mes comparses de bureau Evariste, François et Ritchy, ainsi que nos camarades du deuxième étage Marine, Julien, Pierre et Simon. J'envoie également mes bonnes ondes à Amandine, Camille, Céline, Judith, Noémie et Thomas pour leurs encouragements et leur soutien durant ces derniers mois de thèse.

Enfin, je tiens à exprimer un grand merci à ma sœur, Clélia, et à mes parents, Claire et Christian, pour leurs encouragements constants malgré la distance et les difficultés de la vie. Sans eux, je n'en serais pas là aujourd'hui.

Résumé

Les plantes renferment des substances pharmacologiques actives qui ont abouti à la découverte de médicaments « leader » dans de nombreux domaines thérapeutiques. Ces molécules actives présentent généralement une faible solubilité dans les milieux aqueux et biologiques qui contribue à une faible biodisponibilité ralentissant leur absorption *per os*. Si la phytothérapie occidentale mise sur un ingrédient actif unique pour soigner, l'herboristerie de la Médecine Traditionnelle Chinoise (MTC) mise sur l'effet conjugué des composants d'une plante ou d'un mélange de plantes pour créer des « formulations traditionnelles » dans lesquelles on retrouve des plantes à saponosides dans le rôle de plante « harmonisante ». Ces saponosides constituent un vaste groupe d'hétérosides connus pour leurs propriétés solubilisantes et tensioactivité naturelle. Nous nous proposons d'étudier cet effet solubilisant vis à vis d'autres métabolites naturels et d'élargir cette étude à des extraits complexes issus de plantes utilisées en MTC. Nous avons ainsi mis au point une méthode de mesure innovante du coefficient de partage par Résonance Magnétique Nucléaire pour mettre en évidence l'impact des saponosides sur le coefficient de partage des métabolites naturels. Selon les molécules étudiées, ces modifications du coefficient de partage dépendent du pouvoir hydrosolubilisant des saponosides et/ou de la formation de complexes micellaires. La cohérence de ces résultats et leur application en thérapeutique traditionnelle a été confirmée par l'observation des micelles en microscopie optique et par quantification en Chromatographie Liquide Haute Performance de l'extraction aqueuse de métabolites naturels.

Mots-clés : Biodisponibilité, Médecine Traditionnelle, Substances Naturelles, Saponoside, Coefficient de partage, RMN, Microscopie, Tensioactivité, Hydrosolubilité

Abstract

Contribution to the knowledge of traditional pharmacopoeia: bioavailability of natural products and influence of saponins

Plants possess many active substances on a pharmacological level that lead to the discovery of major medicines in numerous therapeutic fields. Many of these active molecules present a low aqueous solubility that translates into a low bioavailability, slowing oral absorption. While western phytotherapy cure diseases through a single active ingredient, traditional herbology from Traditional Chinese Medicine (TCM) uses the combined effects of every constituent of a plant or even a mix of multiple plants to build a “traditional formula” in which Saponin-rich plants are well represented as balancing/harmonizing agents. Saponins compose a vast natural heterosidic group known to possess solubilizing abilities linked to their natural tensioactivity. In this thesis, we wish to measure the solubilizing and complexation properties of saponins on bioactive natural metabolites and extend those measurements to complex mixture of medicinal plants used in TCM. For this purpose, we have created a novel method to measure partition coefficients using Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy to evaluate the impact of saponins on the partition coefficient of natural metabolites. Depending on the studied molecules, these changes in the partition coefficient depend on the water-solubilizing power of saponins and/or the formation of micellar complexes in solution. Those results and their therapeutic application were confirmed by the direct observation of micelles in optical microscopy and quantification of extracted natural metabolites through High Performance Liquid Chromatography.

Key words: Bioavailability, Traditional Medicine, Natural Product, Saponin, Partition Coefficient, NMR, Microscopy, Tensioactivity, Hydrosolubility

Table des matières

Remerciements	3
Résumé	6
Abstract	7
Table des illustrations.....	13
Liste des tableaux.....	18
Table des équations	19
Liste des abréviations.....	20
Introduction générale.....	21
Chapitre I : Saponosides et tensioactivité – Synthèse bibliographique.....	25
1 Généralités sur les saponosides (5) (6) (7).....	25
1.1 Structure chimique (9).....	25
1.2 Propriétés et utilisations	28
2 Tensioactivité.....	32
2.1 Généralités et définition (68)	32
2.2 Propriété d'auto-assemblage et Concentration Micellaire Critique	36
2.3 Applications et utilisations pharmaceutiques des tensioactifs	40
2.4 Tensioactivité des saponosides (89) (90).....	41
2.5 Pouvoir solubilisant des saponosides	43
3 Conclusion et objectifs.....	47
Chapitre II : Pharmacopées Traditionnelles et biodisponibilité	48
1 Spécificités des Pharmacopées Traditionnelles (108)	48
2 Focus sur la Médecine Traditionnelle Chinoise (111).....	51
2.1 Principes généraux	51
2.2 Plantes de la Pharmacopée Chinoise riches en saponosides.....	54
3 Biodisponibilité et absorption des substances naturelles (132)	65
3.1 Absorption (133).....	66
3.2 Absorption orale et tube digestif.....	69
3.3 Vectorisation et absorption orale (1)	70

4	Conclusion et objectifs	72
Chapitre III : Développement d'une méthode de mesure du coefficient de partage par RMN ¹ H		
		74
1	Généralités et définition	74
2	Méthodes conventionnelles de mesure du coefficient de partage	75
2.1	Méthode par agitation en flacon (146).....	75
2.2	Méthode par Chromatographie Liquide Haute Performance à polarité de phases inversée (CLHP) (147)	76
2.3	Méthode par brassage lent (148)	77
3	Nouvelle méthode de mesure par Résonance Magnétique Nucléaire	77
3.1	Introduction	78
3.2	Optimisation de la méthode.....	78
3.3	Limite quantitative de la méthode.....	86
3.4	Conclusion	86
Chapitre IV : Application de la méthode RMN à des métabolites naturels et influence des saponosides sur leur coefficient de partage.....		
		105
1	Introduction	105
2	Molécules testées et mesure de leurs coefficients de partage	107
3	Mesure des CMC des saponosides	115
4	Influence de la glycyrrhizine sur le log P de métabolites	118
4.1	Groupe A.....	119
4.2	Groupe B.....	127
4.3	Groupe C.....	129
4.4	Groupe D.....	131
4.5	Groupe E.....	132
4.6	Molécules non classées	135
5	Vérification et généralisation des résultats	135
5.1	Groupe A : l'acide salicylique	135
5.2	Groupe B : la (+)-catéchine	136

5.3	Groupe C : l'acide chlorogénique	137
5.4	Groupe D : la caféine	138
6	Conclusion.....	138
Chapitre V : Observation par microscopie des amas micellaires.....		140
1	Micelles de glycyrrhizine.....	141
2	Agrégats micellaires de glycyrrhizine en présence d'acide salicylique (groupe A)	142
3	Agrégats micellaires de glycyrrhizine en présence de catéchine (groupe B)	143
4	Agrégats micellaires de glycyrrhizine en présence d'acide chlorogénique (Groupe C).....	146
5	Agrégats micellaires de glycyrrhizine en présence de caféine (groupe D) ...	147
6	Conclusion.....	149
Chapitre VI : Etude sur des modèles expérimentaux de formulations traditionnelles		150
1	Cas de la (+)-catéchine (groupe B).....	150
2	Cas de l'aconitine (groupe A).....	155
3	Cas de l'artémisinine (groupe A).....	158
4	Cas de l'acide chlorogénique et de la caféine (groupes C et D)	162
5	Conclusion.....	167
Conclusion et perspectives.....		169
Matériels et Méthodes		172
1	RMN	172
Supplementary Data		174
1.1	General:	174
1.2	Tutorial for ERETIC2 (on a catechin sample).....	175
1.3	Selected examples:.....	177
2	Microscopie optique et mesure de micelles	182
	Mesure d'aire.....	182
3	Chromatographie Liquide Haute Performance.....	185

3.1	Préparation des solutions extractives aqueuses	185
3.2	Analyse de la (+)-catéchine.....	186
3.3	Analyse de l'aconitine.....	186
3.4	Analyse de l'artémisinine.....	186
3.5	Analyse de l'acide chlorogénique et de la caféine.....	187
	Bibliographie.....	188
	Annexes.....	203
1	Spectres des molécules étudiées par RMN ^1H ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 90/10) (A : avant partage contre l'octanol, B : après partage)	203
1.1	Acide acétylsalicylique	203
1.2	Acide ascorbique.....	203
1.3	Acide caféique.....	203
1.4	Acide chlorogénique.....	204
1.5	Acide gallique	204
1.6	Acide p-coumarique	204
1.7	Acide salicylique.....	205
1.8	Aconitine	205
1.9	Aldéhyde cinnamique	205
1.10	Amygdaline	206
1.11	Arbutine	206
1.12	Atropine	206
1.13	Caféine	207
1.14	Capécitabine.....	207
1.15	Cinchonidine	207
1.16	Cocaïne	208
1.17	Codéine	208
1.18	Colchicine	208
1.19	Ergotamine.....	209
1.20	Esculétine	209

1.21	Hespéridine.....	209
1.22	Lawsone	210
1.23	L-phénylalanine.....	210
1.24	L-tyrosine	210
1.25	Mangiférine	211
1.26	Morphine.....	211
1.27	Naringine	211
1.28	Paracetamol (ou acétaminophène).....	212
1.29	Quinine	212
1.30	Rutinoside.....	212
1.31	Saccharose.....	213
1.32	Stéviolside	213
1.33	Théobromine.....	213
1.34	Théophylline.....	214
1.35	Vanilline	214
1.36	Zolmitriptan	214
2	Courbes de CMC des saponosides en présence de métabolites secondaires	215

Table des illustrations

Figure 1 : Isopentényl-pyrophosphate (IPP) et diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP)	25
Figure 2 : Réaction de prénylation et biogenèse du géranyl-pyrophosphate (GPP). 26	
Figure 3 : Biogenèse du squalène par condensation de deux molécules de FPP sous l'action du squalène synthétase.....	26
Figure 4 : Cyclisation du 2,3 époxydosqualène en noyau lanostérol (triterpène) sous l'action d'une oxydosqualène cyclase	27
Figure 5 : Numérotation des atomes de carbone du noyau oléanane	27
Figure 6 : Principal saponoside issu de <i>Glycyrrhiza glabra</i> : la glycyrrhizine.....	28
Figure 7 : Représentation schématisée d'une molécule tensioactive (en bleu : tête hydrophile polaire ; en orange : partie apolaire hydrophobe)	32
Figure 8 : Le dodécylsulfate de sodium (SDS) également appelé SLS ou LSS pour laurylsulfate de sodium.....	34
Figure 9 : Les chlorures de benzalkonium. Chaîne hydrophobe de groupements alkyles (n=8, 10, 12, 14, 16 ou 18)	34
Figure 10 : La bétaine de cocamidopropyle. En rouge : charge positive ; en vert : charge négative	34
Figure 11 : Exemples de tensioactifs non-ioniques. Les cercles bleus représentent les parties hydrophiles et les rectangles orange représentent les parties hydrophobes	35
Figure 12 : Formation de micelles en fonction de la valeur de la tension de surface et de la concentration en tensioactifs (74)	37
Figure 13 : Diagramme de phase de la formation de micelles en fonction de la température et de la concentration en tensioactifs (76).....	38
Figure 14 : Micelles de <i>Quillaja saponaria</i> observées par cryo-microscopie électronique. Forme sphérique (A) et forme allongée à pH 3 (B) (91).....	42
Figure 15 : Agencement des saponosides à l'interface air-eau selon le nombre et la nature des chaînes glycosylées (chaînes glycosylées en bleu et sapogénines en orange). Configuration "end-on" (A), "side-on" (B) et "lay-on" (C) (92).....	42
Figure 16 : Ginsenosides extraits de <i>Panax ginseng</i>	44
Figure 17 : Photos de l'interaction entre la saikosaponine A (SSa) et divers ginsénosides (Ro, Rb ₁ , Rg ₁) (94).....	44
Figure 18 : Image de microscopie électronique en transmission des micelles de ginsénosides Ro (a), Rb ₁ (b), Rg ₁ (c) et la saikosaponine A (d) (95).....	45

Figure 19 : Page du Ben Cao Gang Mu de Li Shizhen (1518-1593) (112)	51
Figure 20 : A gauche : symbole du Yin (en blanc) et du Yang (en noir). A droite : représentation du Wu Sing et des interactions entre les éléments (flèche pleine : cycle de création ; flèche hachurée : cycle de destruction).....	52
Figure 21 : Exemple d'une formulation selon la classification Jun-Chen-Zuo-Shi	54
Figure 22 : Glycyrrhiza glabra L. (planche) (122), fleurs, partie aérienne et rhizome (123)	57
Figure 23 : Structure de la soyasaponin I	61
Figure 24 : Structure de l' α -hédérine	62
Figure 25 : Composition de la β -escine	63
Figure 26 : Structure principale de la β -escine	64
Figure 27 : Exemple de saponosides de Quillaja saponaria : QS-21.....	65
Figure 28 : Diffusion facilitée de petites molécules par canaux protéiques (à gauche) et protéines de transport (à droite) (135)	68
Figure 29 : Mécanisme de pinocytose et formation d'une vésicule dans le cytoplasme (136)	69
Figure 30 : Les trois voies du passage des systèmes particuliers à travers l'épithélium intestinal (140)	72
Figure 31 : Schéma du partage d'un analyte entre phase aqueuse et phase octanol (155)	79
Figure 32 : Echange des protons H6 et H8 de la (+)-catéchine avec le deutérium... 80	
Figure 33 : Spectre ^1H RMN de la catéchine dans le D_2O avant le partage contre l'octanol (tube A).....	81
Figure 34 : Spectre ^1H RMN de la catéchine dans le D_2O après le partage contre l'octanol (tube B).....	81
Figure 35 : Spectre ^1H RMN de la catéchine dans $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90/10) avant le partage contre l'octanol via la séquence de présaturation du signal de l'eau (tube A)	82
Figure 36 : Spectre ^1H RMN de la catéchine dans $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90/10) avant le partage contre l'octanol via la séquence d'excitation sculptée du signal de l'eau (tube A)....	83
Figure 37 : Tensiomètre à anneau de la marque Krüss (159) (à gauche) et représentation schématique de l'arrachement de l'anneau à l'interface air-solution (à droite)	106
Figure 38 : Courbe type représentative de F_{max} en fonction de la concentration en tensioactif	107
Figure 39 : Mesure de la CMC de la glycyrrhizine	116

Figure 40 : Mesure de la CMC de la glycyrrhizine en présence de 2g/L de caféine (à gauche) ou de (+)-catéchine (à droite)	116
Figure 41 : Evolution du coefficient de partage de l'acide salicylique au contact de la glycyrrhizine.....	120
Figure 42 : Evolution du coefficient de partage de l'acide acétylsalicylique, l'acide caféique, l'acide gallique, l'acide p-coumarique, l'atropine, la colchicine, la quinine et du lawsone au contact de la glycyrrhizine	121
Figure 43 : Evolution du coefficient de partage de la mangiférine et du stévioside au contact de la glycyrrhizine	122
Figure 44 : Structures de l'aconitine (à gauche) et de l'artémisinine (à droite)	122
Figure 45 : Evolution du coefficient de partage de l'aconitine au contact de la glycyrrhizine.....	123
Figure 46 : Evolution du coefficient de partage de l'aconitine au contact de l' α -hédérine.....	124
Figure 47 : Spectre ^1H RMN de l'artémisinine après partage à l'octanol sans glycyrrhizine.....	124
Figure 48 : Spectre ^1H RMN de l'artémisinine après partage à l'octanol en présence de 0.2 g/L de glycyrrhizine.....	125
Figure 49 : Evolution du coefficient de partage de l'artémisinine au contact de la glycyrrhizine.....	125
Figure 50 : Evolution du coefficient de partage du rutinoside au contact de la glycyrrhizine.....	127
Figure 51 : Evolution du coefficient de partage de la catéchine au contact de la glycyrrhizine.....	127
Figure 52 : Evolution du coefficient de partage de l'aldéhyde cinnamique, la cinchonine, la cocaïne, la L-phénylalanine, la L-tyrosine, la théobromine et la théophylline au contact de la glycyrrhizine	129
Figure 53 : Evolution du coefficient de partage de la codéine au contact de la glycyrrhizine.....	129
Figure 54 : Evolution du coefficient de partage du paracétamol, de l'acide chlorogénique, l'arbutine, la morphine, la vanilline et du zolmitriptan au contact de la glycyrrhizine.....	131
Figure 55 : Evolution du coefficient de partage de la caféine au contact de la glycyrrhizine.....	131

Figure 56 : Evolution du coefficient de partage de la capécitabine et de la naringine au contact de la glycyrrhizine	132
Figure 57 : Evolution du coefficient de partage de l'acide ascorbique au contact de la glycyrrhizine.....	133
Figure 58 : Mesure de la CMC de l'acide ascorbique	133
Figure 59 : Evolution du coefficient de partage de la glycyrrhizine au contact de l'acide ascorbique.....	134
Figure 60 : Evolution du coefficient de partage de l'acide ascorbique (0.05 g/L) au contact de la glycyrrhizine	134
Figure 61 : Profils d'évolution du coefficient de partage de l'acide salicylique en présence de différents saponosides	136
Figure 62 : Profils d'évolution du coefficient de partage de la (+)-catéchine en présence de différents saponosides	137
Figure 63 : Profils d'évolution du coefficient de partage de l'acide chlorogénique en présence de différents saponosides	137
Figure 64 : Profils d'évolution du coefficient de partage de la caféine en présence de différents saponosides.....	138
Figure 65 : Microscope à statif inversé Olympus® IX70 (182).....	141
Figure 66 : Agrégats micellaires de glycyrrhizine (1.00 g/L) observés par microscopie optique (x100).....	142
Figure 67 : Agrégats micellaires de glycyrrhizine (0.40 g/L) (>CMC) (cadre rouge) et amas d'acide salicylique (cadre bleu) observés par microscopie optique (x100) ...	143
Figure 68 : Particules de catéchine à 1.00 g/L observés par microscopie optique en absence de glycyrrhizine (x100)	144
Figure 69 : Agrégats de glycyrrhizine (0.05 g/L) (<CMC) en présence de catéchine (1.00 g/L) observés par microscopie optique (x100).....	144
Figure 70 : Agrégats de glycyrrhizine (0.10 g/L) (=CMC) en présence de catéchine (1.00 g/L) observés par microscopie optique (x100).....	145
Figure 71 : Agrégats micellaires de glycyrrhizine (0.30 g/L) (>CMC) en présence de catéchine (1.00 g/L) observés par microscopie optique (x100)	145
Figure 72 : Agrégats d'acide chlorogénique (1.00 g/L) en absence de glycyrrhizine observés par microscopie optique (x100)	146
Figure 73 : Agrégats d'acide chlorogénique (1.00 g/L) observés par microscopie optique en présence de 0.05 g/L de glycyrrhizine (<CMC)(x100).....	147

Figure 74 : Agrégats micellaires de glycyrrhizine (0.40 g/L) (>CMC) en présence d'acide chlorogénique (1.00 g/L) observés par microscopie optique (x100).....	147
Figure 75 : Agrégats de caféine (1.00 g/L) en absence de glycyrrhizine observés par microscopie optique (x100).....	148
Figure 76 : Agrégats micellaires de glycyrrhizine (0.50 g/L) en présence de caféine (1.00 g/L) observés par microscopie optique (x100).....	148
Figure 77 : Maximum d'absorption de la (+)-catéchine (en bleu) (190)	151
Figure 78 : Chromatogramme de référence de la monographie du thé vert de la Pharmacopée Européenne (189)	152
Figure 79 : Chromatogramme de la (+)-catéchine dans les conditions expérimentales	152
Figure 80 : Chromatogrammes de la (+)-catéchine (entourée en rouge) dans les infusions A ₁ , B ₁ et C ₁	153
Figure 81 : Maximum d'absorption de l'aconitine (194)	156
Figure 82 : Chromatogramme de l'aconitine dans les conditions expérimentales ..	156
Figure 83 : Chromatogrammes de l'aconitine (entourée en rouge) dans les macérations A, B, C et D	157
Figure 84 : Maximum d'absorption de l'artémisinine (196)	159
Figure 85 : Chromatogramme de l'artémisinine dans les conditions expérimentales	159
Figure 86 : Chromatogrammes de l'artémisinine (entourée en rouge) dans les décoctions A, B, C et D	160
Figure 87 : Chromatogrammes de l'artémisinine (entourée en rouge) dans les décoctions E et F.....	161
Figure 88 : Spectres d'absorption UV/Visible de la caféine (ligne continue) et de l'acide chlorogénique (ligne hachurée) à 25 °C (197).....	163
Figure 89 : Chromatogrammes de la caféine et de l'acide chlorogénique dans les conditions expérimentales (détection à 272 nm à gauche et à 326 nm à droite)	163
Figure 90 : Chromatogrammes la caféine et de l'acide chlorogénique dans les décoctions A, B, C et D (détectés à 272 nm et à 326 nm).....	164
Figure 91 : Chromatogrammes la caféine et de l'acide chlorogénique dans les décoctions E et F détectés 272 nm et à 326 nm.....	165

Liste des tableaux

Tableau 1 : Sous-classes de tensioactifs non-ioniques	35
Tableau 2 : Prédiction de l'organisation micellaire en fonction du paramètre d'empilement des tensioactifs.....	39
Tableau 3 : Ratio du nombre de guérisseurs ou de médecins par habitants en Afrique (110)	50
Tableau 4 : Exemples de plantes à saponosides de la Pharmacopée Chinoise et leur rôle dans les formulations (120)	55
Tableau 5 : Exemples de métabolites secondaires identifiés dans la réglisse	59
Tableau 6 : Mesure du log P de la (+)-catéchine par étalon interne	82
Tableau 7 : Mesure du log P de la (+)-catéchine par étalon interne après suppression du signal de l'eau par excitation sculptée	83
Tableau 8 : Mesure du log P de la (+)-catéchine par l'outil ERETIC2 après suppression du signal de l'eau par excitation sculptée	85
Tableau 9 : Liste des métabolites évalués dans le cadre de la thèse	108
Tableau 10 : substances médicamenteuses évaluées lors de la thèse	114
Tableau 11 : Tableau récapitulatif de la CMC des saponosides et en présence de métabolites naturels	117
Tableau 12 : Gamme de concentration de la glycyrrhizine pour l'évaluation du coefficient de partage de la (+)-catéchine.....	119
Tableau 13 : Système d'éluant pour la détection de la catéchine dans le thé vert .	151
Tableau 14 : Tableau récapitulatif de l'évolution de l'aire sous la courbe de la (+)-catéchine lors de l'ajout de glycyrrhizine (CMC=0.20 g/L).....	154
Tableau 15 : Comparaison des aires sous la courbe.....	154
Tableau 16 : Tableau récapitulatif de l'évolution de l'aire sous la courbe de l'aconitine lors de l'ajout de glycyrrhizine (CMC=0.10 g/L)	157
Tableau 17 : Tableau récapitulatif de l'évolution de l'aire sous la courbe de l'artémisinine lors de l'ajout de glycyrrhizine (CMC=0.15 g/L)	161
Tableau 18 : Système de solvant pour la détection de l'acide chlorogénique et de la caféine dans les graines de café vert	162
Tableau 19 : Tableau récapitulatif de l'évolution de l'aire sous la courbe de la caféine et de l'acide chlorogénique lors de l'ajout de glycyrrhizine (CMC = 0.20 g/L).....	165
Tableau 20 : Comparaison des aires sous la courbe par rapport à la décoction A.	166

Table des équations

Équation 1 : loi de Gibbs	36
Équation 2 : Paramètre d'empilement selon le modèle d'Israelachvili	38
Équation 3 : Coefficient de partage	74
Équation 4 : Expression du facteur de capacité k.....	76
Équation 5 : Coefficient de partage en fonction de k	76
Équation 6 : Calcul du coefficient de partage à partir des concentrations d'analyte en phase aqueuse	79
Équation 7 : Calcul d'une concentration inconnue par l'outil ERETIC 2	84
Équation 8 : Calcul du coefficient de partage en fonction de C_{unk}	84
Équation 9 : Expression de la force d'arrachement (F).....	106
Équation 10 : Expression du log D en fonction du log P, du pH et du pKa	115

Liste des abréviations

ADME : Absorption-Distribution-Métabolisme-Elimination

ANOVA : *Analysis of Variance*

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CMC : Concentration Micellaire Critique

CMT : Température Critique de Micellisation

DMAPP : Diméthylallyl-pyrophosphate

DXP : D-xylulose-5-phosphate

ERETIC : *Electronic REference To access In vivo Concentration*

FID : *Free Induction Decay*

FPP : Farnésyl-pyrophosphate

GPP : Géranyl-pyrophosphate

IPP : Isopentényl-pyrophosphate

MTC : Médecine Traditionnelle Chinoise

MVA : Acide mévalonique

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economique

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

QSAR : *Quantitative Structure-Activity Relationship*

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SDS : Dodécylsulfate de sodium

TPA : 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate

TSP : Triméthylsilylpropanoate de sodium

Introduction générale

Les plantes renferment de nombreuses substances pharmacologiquement actives telles que les alcaloïdes, les polyphénols, les terpènes, ... qui ont abouti à la découverte de médicaments « leader » (digitaline, quinine, colchicine, taxol, artémisinine, ...) dans de nombreux domaines thérapeutiques. Ces molécules naturelles présentent souvent une faible solubilité dans les milieux aqueux et biologiques entraînant de ce fait une faible biodisponibilité ; une mauvaise biodisponibilité se rencontre ainsi pour les formes orales de médicaments peu solubles dans l'eau et lentement absorbées. Le recours pour pallier à ce manque de biodisponibilité se réalise au travers d'une augmentation des doses, de l'élaboration de dérivés hydrosolubles, ou par la mise au point de vecteurs particulières à base de lipides (comme les liposomes, les nanoparticules à base de lipide ou les nanocapsules de lipides) ou de polymères (nanosphères) (1). Ces alternatives ne sont pas sans conséquences tant au point de vue des effets secondaires que d'un point de vue économique.

L'emploi des plantes dans la conception de remèdes traditionnels repose généralement sur une approche empirique des réactions biologiques et des théories parfois non conventionnelles à la médecine moderne. A la différence de la phytothérapie occidentale, prescrite de façon unitaire (une à trois plantes associées) selon des critères et conditions standardisées d'utilisation de la médecine moderne, la plupart des médecines traditionnelles, dont la Médecine Traditionnelle Chinoise (MTC), repose sur d'autres bases et principes. Si la pharmacologie et la phytothérapie occidentales misent sur un ingrédient actif pour régler un problème de santé, l'herboristerie traditionnelle chinoise, comme la plupart des autres médecines traditionnelles (Afrique, Amérique Latine, Asie, Océanie, ...), mise plutôt sur l'effet conjugué des divers composants d'une ou plusieurs plantes pour constituer une « formule/formulation ». Ces formulations permettent de profiter de la synergie des ingrédients et ainsi de minimiser les effets secondaires que pourrait causer une seule plante prise en grande quantité. En particulier, le phytothérapeute chinois choisit un mélange de plantes, jusqu'à parfois une vingtaine, et cette formule sera administrée sous formes de décoction aqueuse, de teintures alcooliques, de poudre de plantes ou de pommades. Ces formules sont utilisées depuis des milliers d'années en Chine et sont préparées à partir d'une pharmacopée se composant de plus de 800 plantes. En dehors des ingrédients actifs, les formulations traditionnelles contiennent

également des ingrédients et excipients permettant « d'harmoniser » et de « détoxifier » les autres composants de la formulation.

Parmi ces plantes, celles riches en saponosides peuvent être utilisées soit comme ingrédient principal thérapeutique (*Panax ginseng* « Ren Shen », *Bupleurum chinense* « Chai Hu »), soit comme plante adjuvante ou comme plante équilibrante-harmonisante. C'est le cas, par exemple, des racines de réglisse (*Glycyrrhiza glabra* L. et *G. uralensis* « Gan Cao », Fabacées), dont c'est le principal rôle dans la plupart des formulations de MTC (2).

Mais la biodisponibilité orale des molécules présentes dans une formulation peut-elle vraiment être modifiée par l'action des saponosides ? S'agit-il d'une activité relevant de la croyance et de l'ésotérisme ou d'une réalité scientifiquement vérifiable ?

Les saponosides constituent un vaste groupe d'hétérosides terpéniques et stéroïdiques rencontrés dans de nombreuses familles végétales comme les *Sapindaceae*, *Fabaceae*, *Agavaceae*, dont plusieurs espèces sont utilisées en MTC. Ces hétérosides sont connus pour posséder des propriétés solubilisantes. Ainsi des études anciennes ont montré que l'hydrosolubilité des saponosides du *Panax* est amplifiée par l'ajout de saponosides de *Bupleurum* et vice-versa, d'où leurs utilisations conjointes en MTC (3). De même les saponosides de *Bulbostemma* augmentent la solubilité de l' α -tocophérol (vitamine E) (4). Cette activité solubilisante est certainement liée à leur propriété tensioactive (surfactante) non ionique ou faiblement anionique, du fait de la nature amphiphile de leur structure, et de leur autre propriété complexante de certains composés comme les stérols et tanins, ce qui pourrait expliquer leurs rôles clés dans les formules traditionnelles de la MTC.

Dans ce contexte, la recherche scientifique doit en effet être capable d'analyser et de rationaliser les mécanismes pharmacologiques des plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle.

Dans ce projet de thèse, nous nous sommes intéressés à cette place particulière des plantes à saponosides au sein des formulations phytothérapeutiques des pharmacopées traditionnelles. Est-il possible de lier leur utilisation traditionnelle avec leur propriété tensioactive naturelle ? L'objectif de notre travail est d'étudier les effets solubilisants, micellaires et complexants des saponosides sur la potentialisation de métabolites bioactifs végétaux non solubles dans l'eau. Les effets solubilisants des saponosides vis à vis d'autres métabolites lipophiles ou moyennement polaires

comme des alcaloïdes, terpènes, composés phénoliques, stérols, lipides, ... et d'élargir cette étude à des extraits complexes issus de plantes médicinales dont celles utilisées en MTC. Les méthodes utilisées pour mener à bien ce projet et évaluer la biodisponibilité des extraits et substances naturelles exposées aux saponosides, reposeront sur des techniques d'analyse et de caractérisation de molécules naturelles et de mélanges complexes. Ces techniques d'analyse se baseront sur la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP), la mesure du coefficient de partage (système biphasique octanol/eau), de la tension superficielle et les techniques spectrales de Résonance Magnétique Nucléaire du proton (^1H RMN) qui sont disponibles au sein de l'ICMR et des plateformes PIANet et PICT de l'Université.

La finalité de ce travail pourrait aboutir à l'utilisation de saponosides dans la formulation de médicaments « classiques » pour faciliter la biodisponibilité de certains principes actifs, et améliorer leur solubilité aqueuse. Une mise en valeur et une meilleure compréhension physico-chimique de l'efficacité de certains remèdes de médecine traditionnelle dont ceux de la MTC pourront permettre de mieux utiliser ces thérapeutiques alternatives. Ce travail pourra aussi être valorisé par la commercialisation de saponosides pour faciliter la biodisponibilité de principes actifs naturels ou de synthèse, dans le domaine de la cosmétologie et du complément alimentaire.

Dans le premier chapitre, nous présenterons les saponosides en nous focalisant sur leurs nombreuses propriétés physico-chimiques qui expliquent leur utilisation comme tensioactifs naturels dans des secteurs industriels variés comme l'agroalimentaire, l'environnement ou le pharmaceutique.

Le deuxième chapitre mettra en avant la place des saponosides, et des plantes en contenant, dans les pharmacopées traditionnelles. Dans un premier temps nous ferons un focus sur la MTC qui documente l'utilisation de nombreuses plantes à saponosides, introduisant le concept de « plante messagère » et leur capacité à « harmoniser » les autres ingrédients des formulations traditionnelles. Puis dans un second temps, nous nous pencherons sur les paramètres nécessaires pour étudier la biodisponibilité et l'absorption des substances naturelles. Ces recherches bibliographiques nous permettront de mieux comprendre comment l'utilisation traditionnelle des plantes à saponosides peut être évaluée par des méthodes scientifiques et quantifiables.

Le troisième chapitre sera consacré aux méthodes de mesure du coefficient de partage qui est un paramètre-clé des études de pharmacocinétique concernant l'absorption et la biodisponibilité des molécules. Dans ce chapitre, nous discuterons la méthode innovante qui a été développée au cours de ce projet de thèse pour mesurer un coefficient de partage à l'aide de la RMN du proton.

Dans le quatrième chapitre, nous étudierons l'influence des saponosides sur le coefficient de partage de divers métabolites naturels et substances médicamenteuses. Nous verrons ainsi que les propriétés tensioactives, micellaires et solubilisantes des saponosides sont directement liées à des modifications des paramètres pharmacocinétiques des molécules en solution.

Le cinquième chapitre cherchera à confirmer les résultats du précédent par l'observation en microscopie optique des amas micellaires qui se forment lors de l'interaction des saponosides avec d'autres métabolites naturels. Cet examen microscopique nous permet de comparer les résultats obtenus en RMN avec le comportement micellaire des saponosides.

Dans la dernière partie nous avons tenté de relier nos résultats théoriques, réalisés sur des molécules purifiées, à des modèles de formulation en étudiant l'effet des saponosides sur l'extraction aqueuse de métabolites naturels à l'aide d'une analyse quantitative réalisée par CLHP. Nous mesurerons de cette manière un autre aspect du caractère « harmonisant » que la MTC attribue aux plantes à saponosides.

Chapitre I : Saponosides et tensioactivité – Synthèse bibliographique

1 Généralités sur les saponosides (5) (6) (7)

Les saponosides sont des composés non-volatils et tensioactifs possédant une large distribution dans le règne du vivant. Dans le règne animal, ils se retrouvent dans certains organismes marins appartenant à l'embranchement des *Porifera* (éponges de mer) et aux classes des *Holothuroidea* (concombres de mer) et des *Asteroidea* (étoiles de mer) (8). Dans le règne végétal, ces métabolites secondaires ou spécialisés se retrouvent principalement dans deux classes : les *Magnoliopsides* et les *Liliopsides*. Des plantes riches en saponosides comme la Saponaire (*Saponaria officinalis* L.) ou les noix de lavage (*Sapindus mukorossi* Gaertn.) ont été utilisées depuis l'Antiquité comme savon naturel (6), ce qui a par ailleurs donné le nom à cette classe de métabolites (du Latin *sapo-* signifiant "savon"). La combinaison d'une partie apolaire (sapogénine) et d'une partie polaire (chaîne(s) glycosylée(s)) confère aux saponosides des propriétés tensioactives importantes qui sont au cœur de ce projet de thèse.

1.1 Structure chimique (9)

Du point de vue chimique, les saponosides possèdent une grande diversité structurale caractérisée par un squelette carboné de nature triterpénique (à 30 carbones) ou stéroïdique (à 27 carbones) auquel se lient une ou plusieurs chaînes osidiques.

1.1.1 Sapogénine

Le noyau triterpénique ou stéroïdique, également appelé noyau aglycone ou sapogénine, résulte de l'assemblage d'unités pentacarbonées ramifiées dérivées du 2-méthylbutadiène appelées unités isopréniques. Les unités isopréniques existent sous deux formes mésomères actives phosphorylées : le diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP) et l'isopentényl-pyrophosphate (IPP) (Figure 1).

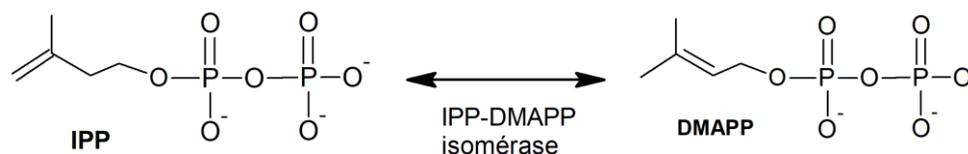


Figure 1 : Isopentényl-pyrophosphate (IPP) et diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP)

La synthèse enzymatique de l'IPP est obtenue soit par la voie du D-xylulose-5-phosphate (DXP), exclusive aux cyanobactéries et aux plantes, soit par la voie de l'acide mévalonique (MVA) universelle aux cellules eucaryotes supérieures.

Une réaction de prénylation catalysée par une prényltransférase permet par la suite d'assembler les unités IPP et DMAPP entre elles par addition (ou condensation) électrophile pour former le géranyl-pyrophosphate (GPP) (Figure 2).

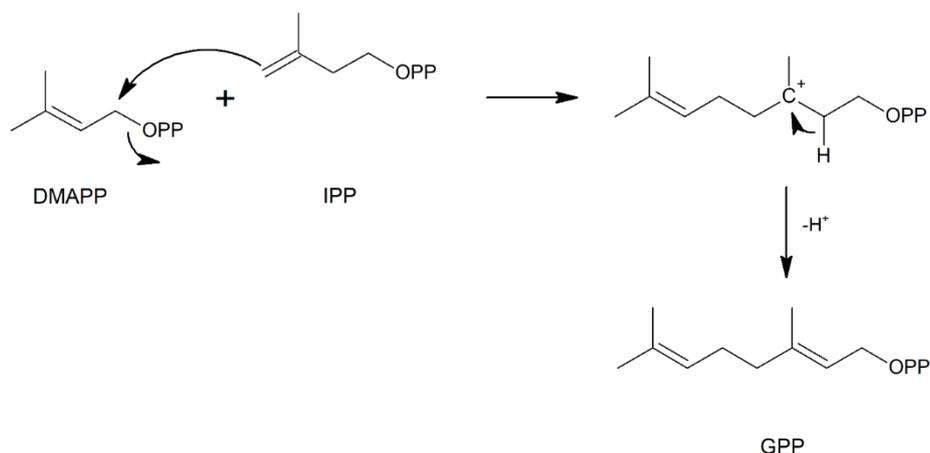


Figure 2 : Réaction de prénylation et biogenèse du géranyl-pyrophosphate (GPP)

Une troisième unité isoprénique IPP s'additionne au GPP pour former le farnésyl-pyrophosphate (FPP). Deux FPP s'assemblent ensuite par un couplage dit « queue-queue » et forment le squalène qui est un triterpène linéaire (Figure 3).

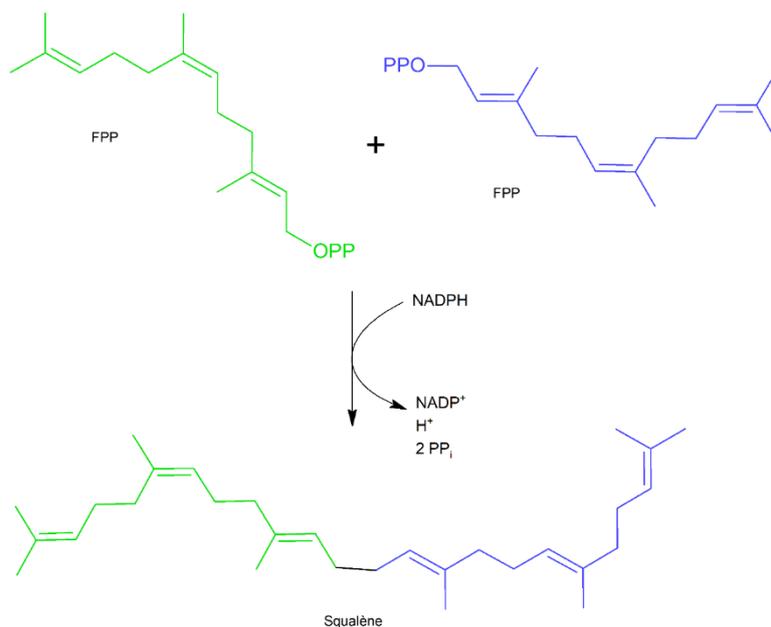


Figure 3 : Biogenèse du squalène par condensation de deux molécules de FPP sous l'action du squalène synthétase

Le squalène subit par la suite une réaction de cyclisation enzymatique qui passe par l'intermédiaire du 2,3-époxydosqualène pour obtenir le lanostérol (Figure 4), premier

noyau triterpénique à partir duquel dérivent les autres noyaux triterpéniques ou stéroïdiques.

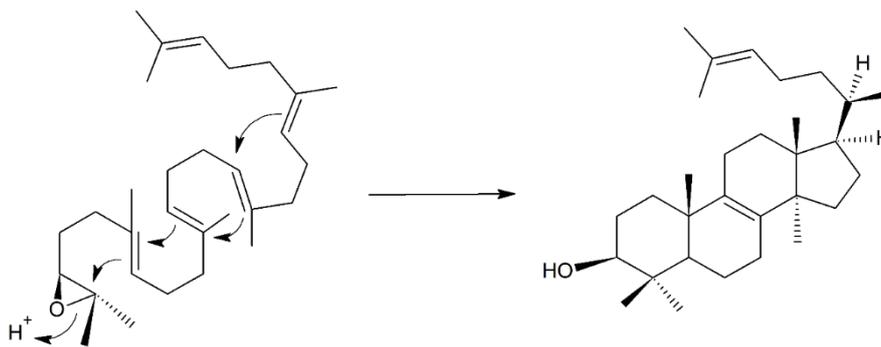


Figure 4 : Cyclisation du 2,3-époxydosqualène en noyau lanostérol (triterpène) sous l'action d'une oxydosqualène cyclase

Selon les réarrangements et cyclisations enzymatiques (cyclases) ultérieures, il est possible d'obtenir une grande variété de sapogénines différentes mais plus de la moitié des saponosides isolés appartiennent au type oléanane (Figure 5).

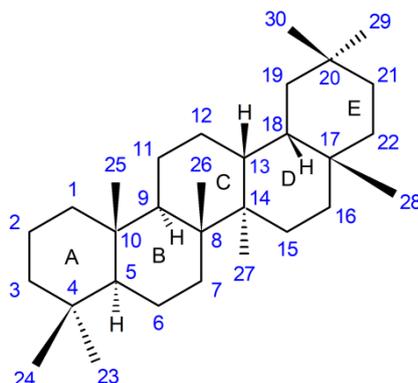


Figure 5 : Numérotation des atomes de carbone du noyau oléanane

1.1.2 Chaînes glycosylées

Les saponosides possèdent généralement un hydroxyle de configuration β en position 3 d'origine biosynthétique qui sera substitué par une chaîne osidique. L'addition des chaînes glycosylées se fait par des réactions d'éthérification ou d'estérification. Selon le nombre de chaînes glycosylées, on parlera de monodesmosides pour une chaîne, ou de bidesmosides pour deux chaînes. Les saponosides tridesmosidiques à trois chaînes existent mais sont plus rares car ils proviennent de découvertes récentes permises par le développement de méthodes chromatographiques plus performantes pour isoler les saponosides les plus polaires. Les saponosides bidesmosidiques possèdent leur seconde chaîne osidique usuellement en position 28 dans le cas de sapogénines pentacycliques. Les chaînes osidiques sont constituées d'une à douze unités osidiques liées de façon linéaire ou ramifiée. La configuration anomérique de ces sucres est β dans la série D et α dans

la série L. Les sucres les plus courants seront le D-glucopyranose, le D-galactopyranose, le L-rhamnopyranose, le D-fucopyranose, l'acide D-glucuronique, l'acide D-galacturonique et le L-arabinopyranose. La majorité des sucres se trouvent sous la forme pyrane et en conformation chaise.

1.1.3 Acides organiques

Des acides organiques comme l'acide acétique ou l'acide cinnamique peuvent également estérifier les hydroxyles des chaînes osidiques ou sur la génine.

1.2 Propriétés et utilisations

Les particularités structurales des saponosides leur confèrent de nombreuses propriétés pharmacologiques et physico-chimiques d'intérêt. A l'état naturel, les saponosides auraient un rôle de défense contre des agents pathogènes extérieurs comme les champignons, les bactéries ou les insectes dû à leurs propriétés hémolytiques, antimicrobiennes et molluscicides.

Les principales sources commerciales en saponosides utilisées en médecine et dans l'industrie chimique et agroalimentaire sont le Bois de Panama (*Quillaja saponaria* Molina), le Yucca du Mojave (*Yucca schidigera* Ortgies), la réglisse (*Glycyrrhiza glabra* L.), le Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Mey.), le Fenugrec (*Trigonella foenum-graecum* L.), la Luzerne cultivée (*Medicago sativa* L.), le Marronnier d'Inde (*Aesculus hippocastanum* L.), la Saponaire (*Saponaria officinalis* L.), la Gypsophile paniculée (*Gypsophila paniculata* L.) et la Salsepareille (*Smilax aspera* L.) (10).

1.2.1 Sucrantes

Les saponosides sont parfois utilisés en agroalimentaire pour leurs propriétés sucrantes. Lors de l'ingestion de certains saponosides comme la glycyrrhizine présente dans les racines de réglisse (*Glycyrrhiza glabra* L.) (Figure 6), la microflore intestinale libère l'acide glucuronique par hydrolyse de la chaîne glycosylée.

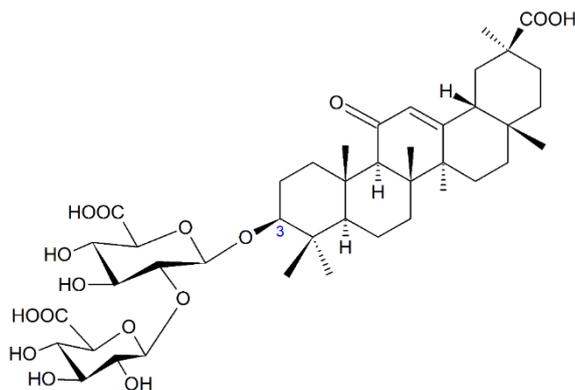


Figure 6 : Principal saponoside issu de *Glycyrrhiza glabra* : la glycyrrhizine

Ce sucre rejoint par la suite la circulation sanguine entéro-hépatique en se liant aux protéines plasmatiques (11) pour être entièrement métabolisé. Ce mécanisme permet d'expliquer le fort pouvoir sucrant (50 à 100 fois supérieur à celui du sucrose) des racines de réglisse (12) et justifie son utilisation en confiserie. En effet, bien que l'acide glucuronique seul ne possède pas un pouvoir sucrant remarquable, sa présence dans la structure de nombreux édulcorants amplifie considérablement leur pouvoir sucrant (13).

1.2.2 Hémolytiques

Les saponosides ont la capacité de rompre la membrane cellulaire des érythrocytes par interaction avec les stérols membranaires, provoquant l'augmentation de la perméabilité membranaire. Le déséquilibre osmotique engendre ensuite l'éclatement de la membrane érythrocytaire et une perte irréversible d'hémoglobine pouvant entraîner des hémorragies (14) (15). De fait, la forte toxicité hémolytique de certains saponosides, comme les escines contenues dans la graine du Marronnier d'Inde (*Aesculus hippocastanum* L.) (16), a tendance à limiter leur utilisation en médecine. Néanmoins, l'index hémolytique des saponosides varie amplement selon la structure des molécules, ce qui permet leur emploi à des doses raisonnables.

1.2.3 Antifongiques et antibactériennes

Comme mentionné précédemment pour leur rôle de défense contre les pathogènes extérieurs, les saponosides possèdent effectivement des propriétés antifongiques capables d'inhiber la croissance de certaines souches fongiques comme *Microides interdigitalis*, *Candida albicans* (17), *Aspergillus fumigatus* ou *Cryptococcus neoformans* (18) (19). Les propriétés antibactériennes des saponosides sont présentes mais faibles. Par exemple, les saponosides extraits du Yucca du Mojave (*Yucca schidigera* Ortgies) présentent une légère activité bactériostatique contre de faibles concentrations de *Bacillus pasteurii* (20). D'autres saponosides auront des activités bactériostatiques contre *Bacillus subtilis* (21) et *Mycobacterium intracellulare* (22).

1.2.4 Antivirales

Les saponosides ont démontré une activité inhibitrice sur la synthèse de l'ADN du virus *Herpes simplex* (HSV) de type 1 (23). D'autres saponosides présentent également une activité contre le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) par inhibition de l'entrée du virus dans leurs cellules cibles (24) ou inhibition des protéases virales (25). Récemment, la glycyrrhizine a fait l'objet d'une revue

concernant ses effets antiviraux, notamment dans le cadre de l'épidémie de la COVID-19 (26). En effet, outre son application *in vivo* contre les virus responsables des hépatites A, B et C, la glycyrrhizine possède également une activité antivirale *in vitro* vis-à-vis de nombreux virus comme le virus varicelle-zona, le virus Epstein-Barr, le virus Influenza A, la dengue, le VIH ou le chikungunya. De plus, en 2003, un article mentionnait déjà les propriétés inhibitrices de la glycyrrhizine contre la réplication du coronavirus responsable de l'épidémie de Syndrome Respiratoire Aigu Sévère (SRAS ou SARS) de 2002 (SARS-CoV-1) à une concentration efficace médiane (CE50) de 300 mg/mL (27). L'évaluation clinique de la glycyrrhizine seule ou associée à d'autres molécules contre le SARS-CoV-2 est à l'heure actuelle en cours de développement (28) (29) (30). Cette activité antivirale serait liée à une inhibition du domaine de liaison au récepteur (*Receptor Binding Domain*) de la protéine S virale, limitant ainsi son interaction avec le récepteur ACE2 (*Angiotensin-Converting Enzyme 2*) des cellules cibles. En février 2021, un article de revue (31) propose d'employer des extraits de réglisse pour soigner les infections secondaires induites par le SARS-CoV-2. Des essais cliniques randomisés sont néanmoins nécessaires pour valider cette utilisation.

1.2.5 Anti-inflammatoires

Les saponosides possèdent des propriétés anti-inflammatoires et anti-œdémateuses reconnues (32) (33) (34). Par exemple, l'escine des graines de Marronnier d'Inde est utilisée comme veinotonique et anti-inflammatoire (35).

Des essais sur modèle murin (36) et des études *in vivo* (37) suggèrent une activité dose dépendante des saponosides issus du genre *Bupleurum* sur la réduction d'œdèmes auriculaires induit par le 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) qui est un promoteur tumoral et inflammatoire induisant la production d'espèces réactives de l'oxygène.

Enfin, le ginseng (*Panax ginseng* C.A. Mey.) possède une action inhibitrice sur le système du complément par le biais du ginsenoside Ro.

1.2.6 Cytotoxiques

La cytotoxicité des saponosides fait l'objet de nombreuses études. La plupart des saponosides stéroïdiques sont cytotoxiques ou cytostatiques pour la lignée HL-60 de cellules leucémiques (38) (39) (40) (41) (42). Certains saponosides stéroïdiques ont présenté une activité cytotoxique sur des fibroblastes murins présentant la mutation p53 (43). Les sapogénines stéroïdiques de type spirostanol et furostanol ont

également prouvé leur efficacité contre les carcinomes 26-L5, les fibrosarcomes HT-1080, les mélanomes B16 BL6 (44) et les cellules leucémiques de la lignée HL-60 (45).

Les saponosides triterpéniques possèdent une activité cytotoxique sur les lignées cellulaires tumorales humaines, notamment les cellules KB et HeLa-S3 (46). Les ginsenosides du *Panax ginseng* C.A. Mey. ont également démontré une activité cytotoxique sur les lignées tumorales du cancer de la prostate et une activité inhibitrice sur les carcinomes de la lignée cellulaire LCNaP qui serait due à une activation de l'expression des inhibiteurs des cycline-kinases p21 et p27 qui bloquent les cellules LNCaP dans leur phase G1, entraînant un mécanisme d'apoptose induit par la caspase-3 (47).

1.2.7 Ichtyotoxiques et molluscicides

Il est connu que les plantes riches en saponosides sont utilisées par des populations amérindiennes pour la capture des poissons du fait de leur ichtyotoxicité (6). En effet, bien que toxiques pour les espèces à sang froid, les saponosides ont une très faible toxicité *per os* pour les espèces à sang chaud, ce qui permet leur emploi sans nécessiter une détoxification des proies capturées.

Par ailleurs les saponosides ont également une activité molluscicide contre les mollusques des genres *Biomphalaria* et *Bulinus* qui sont des vecteurs des trématodes parasites responsables de la bilharziose urinaire (48) (49) (50) (51) (52).

1.2.8 Autres activités biologiques

Les saponosides possèdent de nombreuses autres activités biologiques. Par exemple, le ginseng est traditionnellement utilisé pour ses propriétés adaptogènes¹ et aphrodisiaques. En 1979, une étude de Hiai *et al.* (54) a relié les activités adaptogènes à une action indirecte des ginsenosides sur la glande pituitaire induisant la stéroïdogénèse. Les propriétés aphrodisiaques du ginseng ont été étudiées sur le corps caverneux des lapins ; les ginsenosides produiraient une libération de monoxyde d'azote par les cellules endothéliales provoquant la relaxation du corps caverneux pénien (55) (56). Ce mode de libération du monoxyde d'azote explique également les propriétés cardioprotectrices attribuées au ginseng (57). Enfin, les ginsenosides confèrent également à cette plante des propriétés

¹ Adaptogène : terme inventé en 1947 par un toxicologue russe pour désigner une plante capable d'améliorer la résistance du corps face au stress chimique, biologique ou physique (53)

hypoglycémiantes par augmentation de la libération d'insuline et la production de récepteurs à l'insuline (58), antinociceptives (59), hépatoprotectrices (60), cicatrisantes (61) et antioxydantes (62).

D'autres saponosides possèdent des activités antiulcéreuses (63), adjuvantes immunologiques (15) (64), immunostimulantes (65), insecticides (66) et anti-appétentes (67).

2 Tensioactivité

2.1 Généralités et définition (68)

Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles capables de s'absorber à l'interface air-eau et de réduire la tension superficielle de l'eau. Schématiquement, les tensioactifs sont représentés par une tête hydrophile et une (ou plusieurs) chaîne(s) hydrophobe(s) (Figure 7).

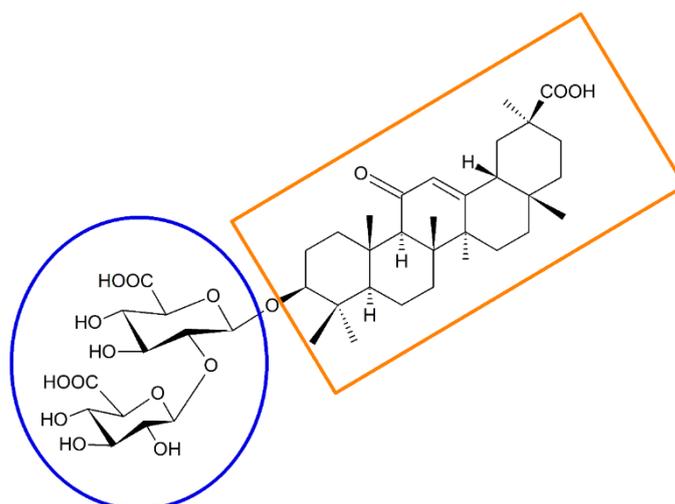


Figure 7 : Représentation schématique d'une molécule tensioactive (en bleu : tête hydrophile polaire ; en orange : partie apolaire hydrophobe)

On parle de tensioactif mono- ou bi-caténaire selon que la tête polaire porte une ou deux chaînes hydrophobes.

Ce caractère amphiphile est responsable des nombreuses propriétés physico-chimiques conférant aux tensioactifs de nombreuses fonctions remarquables :

- **Détergents** : les tensioactifs sont capables d'enlever les salissures. La tête polaire de la molécule permet leur insertion à l'interface eau-lipide et peut ainsi détacher les graisses des surfaces. Les tensioactifs détergents sont omniprésents dans les produits d'entretien mais ils sont également des additifs courants dans les carburants car ils permettent de détartrer les carburateurs et les injecteurs des moteurs à combustion. Les détergents sont

aussi utilisés en biologie pour isoler et purifier les protéines des membranes cellulaires.

- **Agents moussants (ou émulseurs)** : la formation d'une mousse permet de disperser un grand volume de gaz dans un faible volume de liquide. Les mousses constituent un film aqueux pouvant servir d'isolant thermique avec la surface. Les agents moussants sont largement employés dans la lutte contre les incendies et sont des constituants clés dans les extincteurs.
- **Agents mouillants** : le mouillage correspond à l'étalement d'un liquide sur un solide. La diminution de la tension superficielle permet d'accroître l'étalement des liquides résultant également à une mise en suspension des particules solides (propriété dispersante). Les produits mouillants sont utilisés dans l'industrie textile pour permettre une pénétration optimale des colorants ou agents de blanchiment au cœur des fibres. Les agents mouillants sont également des additifs dans les extincteurs et dans les réserves d'eau des véhicules incendies pour que l'eau ou la mousse pénètrent en profondeur les surfaces.
- **Agents émulsifiants** : les tensioactifs facilitent la formation d'une émulsion entre deux liquides habituellement non solubles en formant un film protecteur autour des gouttelettes dispersées. Selon l'équilibre entre les parties hydrophiles et hydrophobes, l'émulsion résultante peut être de type « eau dans l'huile » (E/H) lorsque la phase aqueuse est dispersée dans la phase lipidique ou de type « huile dans l'eau » (H/E) lorsque l'équilibre est inversé.
- **Antiseptiques** : certains tensioactifs ont un pouvoir bactériostatique ou bactéricide. Ils perturbent l'intégrité de la paroi bactérienne, entravant ainsi les fonctions respiratoires et de reproduction de certaines bactéries.

La classification des tensioactifs distingue les tensioactifs non-ioniques et les tensioactifs ioniques. Au sein des tensioactifs ioniques des sous-groupes apparaissent selon la charge portée par la tête hydrophile.

- **Les tensioactifs de type anionique** présentent une partie hydrophile chargée négativement comme les carboxylates, les sulfonates ou les sulfates. Ces tensioactifs sont souvent utilisés comme détergents et agents moussants. Les tensioactifs anioniques peuvent cependant être irritants pour la peau (69). Exemple : le dodécylsulfate de sodium (sulfonate) également appelé SDS utilisé dans les shampoings (Figure 8)

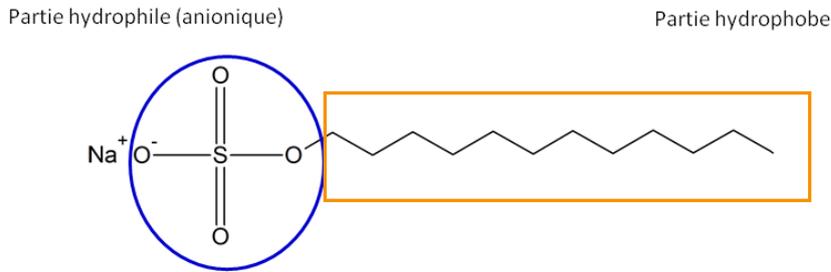


Figure 8 : Le dodécylsulfate de sodium (SDS) également appelé SLS ou LSS pour laurylsulfate de sodium

- **Les tensioactifs de type cationique** ont une partie hydrophile portant une charge positive comme les sels d'ammonium. Ces molécules possèdent également des propriétés antimicrobiennes et antistatiques mais leur coût de production dépasse celui des tensioactifs anioniques (70). Exemple : les chlorures de benzalkonium utilisés dans les lessives et les adoucissants textiles (Figure 9).

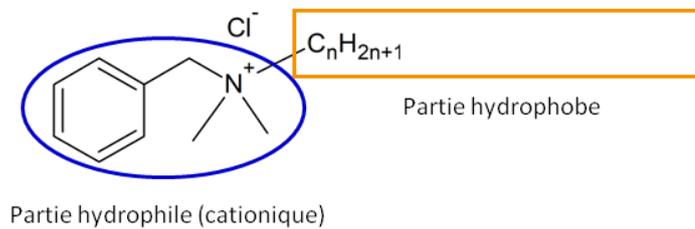


Figure 9 : Les chlorures de benzalkonium. Chaîne hydrophobe de groupements alkyles ($n=8, 10, 12, 14, 16$ ou 18)

- **Les tensioactifs de type zwitterionique (ou amphotères)** possèdent une partie hydrophile de charge globale neutre mais présentant à la fois une charge positive et une charge négative, comme les aminoacides ou les bétaïnes. Ils ont une faible toxicité mais sont sensibles aux variations de pH (71). Exemple : la bétaïne de cocamidopropyle, dérivé de l'huile de noix de coco que l'on retrouve dans les gels douche et les shampoings (Figure 10)

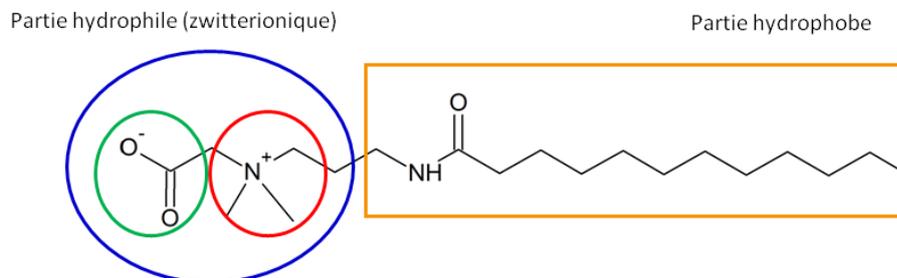


Figure 10 : La bétaïne de cocamidopropyle. En rouge : charge positive ; en vert : charge négative

- **Les tensioactifs non-ioniques** ne portent aucune charge ce qui les rend particulièrement stables, peu toxiques et peu irritants pour la peau (70). Leur partie hydrophobe est généralement de nature alkyl, fluoroalkyl ou

stéroïdique, et leur tête hydrophile est composée de groupements oxyéthylène ou hydroxyle. Cette classe de tensioactifs peut se subdiviser de nouveau selon leurs structures chimiques pour différencier les alcools gras, les éthers, les esters et les copolymères (Tableau 1 et Figure 11) (72).

Tableau 1 : Sous-classes de tensioactifs non-ioniques

Sous-classes	Exemples
Alcools gras	Alcool cétyle, alcool stéarylique
Ethers	Polyoxyéthylèneglycol dodécyl éther (Brij 35), lauryl glucoside
Esters	Polysorbates (Tween)
Copolymères	Poloxamères

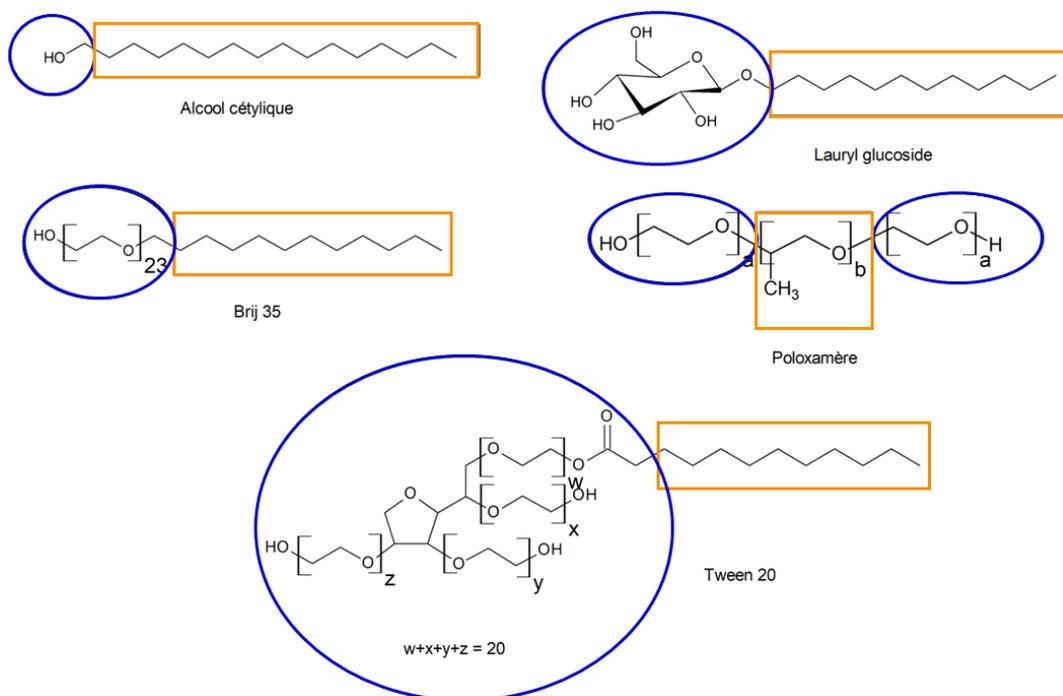


Figure 11 : Exemples de tensioactifs non-ioniques. Les cercles bleus représentent les parties hydrophiles et les rectangles orange représentent les parties hydrophobes

La longueur de la chaîne alkyle, le nombre d'atomes de carbone, de ramifications ou de saturations influenceront grandement les propriétés du tensioactif.

Les saponosides appartiennent généralement au groupe des tensioactifs non-ioniques mais certains comme la glycyrrhizine peuvent être non-ioniques sous leur forme acide (groupements COOH) ou anioniques sous leur forme de sel (groupements COO⁻).

2.2 Propriété d'auto-assemblage et Concentration Micellaire Critique

Chaque molécule au sein d'un liquide est soumise dans son environnement proche à de nombreuses forces intermoléculaires. Puisque les molécules voisines sont identiques les unes aux autres, les forces en action s'équilibrent et la résultante est nulle. En revanche, si on se situe à l'interface entre la phase liquide et l'air, l'homogénéité des interactions est perturbée et les forces intermoléculaires cessent de se compenser. Les molécules ont donc tendance à se déplacer vers le cœur du liquide et à minimiser le contact avec la surface. Ce déplacement provoque une contraction spontanée de la surface du liquide qui forme un film tendu responsable de la tension de surface.

Les molécules tensioactives vont abaisser la tension superficielle des liquides dans lesquels ils sont ajoutés et stabiliser la surface. Ces molécules tensioactives sont capables de s'autoassembler en phase aqueuse grâce à leur propriété amphiphile. A faible concentration, les tensioactifs forment des monomères se substituant à certaines molécules d'eau à l'interface eau/air. Les molécules s'organisent à la surface afin de placer la tête hydrophile au contact de l'eau et la chaîne hydrophobe tournée vers l'air. Les interactions intermoléculaires du liquide sont ainsi remplacées par des interactions plus favorables qui réduisent l'énergie libre de surface et donc la tension superficielle de l'eau. Ce phénomène suit la loi de Gibbs (Équation 1) et dépend donc de la concentration en tensioactif (73).

$$d\gamma = -R \times T \times \Gamma \times d \ln C$$

Équation 1 : loi de Gibbs

Avec

γ : Tension de surface en N.m^{-1}

R : Constante universelle des gaz parfaits ($8.314 \text{ J.mol}^{-1}\text{K}^{-1}$)

T : Température en K

Γ : Excès de surface en mol.m^{-2}

C : Concentration en tensioactif en mol.L^{-1}

L'abaissement de la tension de surface de l'eau dépend de la nature des tensioactifs et de leur concentration : si leur concentration augmente, leur accumulation à la surface eau/air augmente et la tension de surface diminue. A partir d'une concentration seuil nommée Concentration Micellaire Critique (CMC), la surface est

saturée en tensioactifs et une monocouche de quelques nanomètres d'épaisseur se forme à l'interface eau/air. L'augmentation de la concentration au-delà de la CMC n'influence plus la tension de surface qui reste constante (γ_{cmc}) (Figure 12).

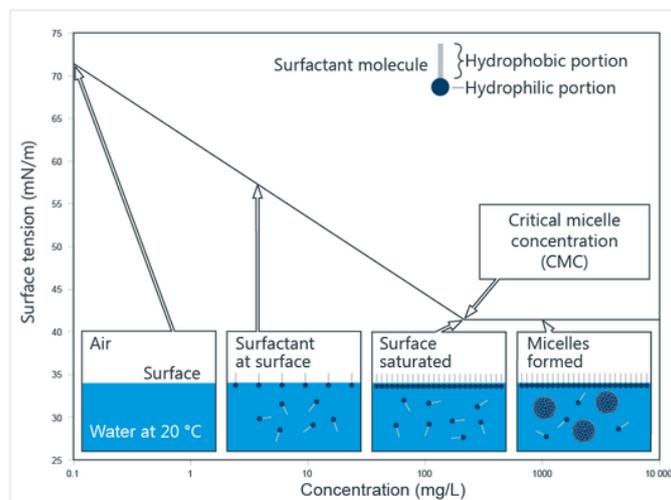


Figure 12 : Formation de micelles en fonction de la valeur de la tension de surface et de la concentration en tensioactifs (74)

La capacité des tensioactifs à s'auto-assembler se déclenche après avoir atteint la CMC. Les tensioactifs forment alors des agrégats appelés « micelles » dont la taille et la forme varient selon la nature du tensioactif et des conditions du milieu. Ce processus porte le nom de « micellisation ».

Deux facteurs vont influencer la micellisation : la solubilité du tensioactif et la température du milieu. En général ces deux facteurs sont liés, et la solubilité des tensioactifs augmente avec la température. A partir d'une température critique appelée température de Krafft (T_k), la solubilité du tensioactif est égale à la CMC (75). A une concentration inférieure à la CMC, les molécules amphiphiles existent sous forme de monomères dans l'eau quelle que soit la température. A partir de la CMC, deux phénomènes peuvent avoir lieu selon la température. En dessous de T_k , une partie des monomères se solidifie et forme des cristaux hydratés en solution, ce phénomène se traduit par de la matière en suspension. Au-dessus de T_k , les micelles se forment et gardent la solution limpide. T_k représente donc également la température critique de micellisation (CMT) et le point de fusion des cristaux de tensioactifs (Figure 13).

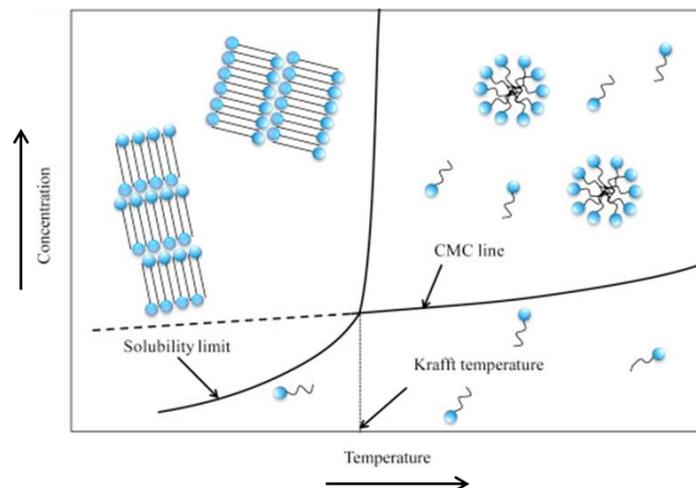


Figure 13 : Diagramme de phase de la formation de micelles en fonction de la température et de la concentration en tensioactifs (76)

Les tensioactifs les plus efficaces présentent une bonne solubilité, un T_k faible, une CMC faible et une tension de surface à la CMC (γ_{cmc}) faible. On parlera également du paramètre C20 correspondant à la concentration de tensioactifs requise pour réduire la tension de surface de 20 mN.m^{-1} par rapport à l'eau pure.

Pour les tensioactifs non-ioniques dérivés d'oxyéthylène, un autre phénomène peut être observé. Il s'agit d'une séparation de phases liée à la déshydratation de la tête hydrophile aux températures élevées (77). Cela provoque l'apparition d'un trouble en solution caractérisée par une température de trouble (T_c). Au-dessus de T_c , le système micellaire devient biphasique avec une phase diluée pauvre en tensioactif et une phase en suspension riche en tensioactif.

Notons que certains tensioactifs dérivés de sucres pourront présenter à la fois une température de Krafft et une température de trouble.

Enfin, la structure des micelles en elle-même dépendra de la forme moléculaire des tensioactifs. Selon l'agencement spatial, les forces de tension exercées par la nature des parties hydrophiles et hydrophobes, les conditions de température, de viscosité et de polarité du solvant, l'organisation micellaire adoptera différentes structures. En 1976, Ninham et Israelachvili proposent un modèle pour déterminer la forme que prendront les agrégats tensioactifs à partir du paramètre d'empilement P du tensioactif défini par l'Équation 2 (78).

$$P = \frac{V}{l_c \cdot a_0}$$

Équation 2 : Paramètre d'empilement selon le modèle d'Israelachvili

Avec :

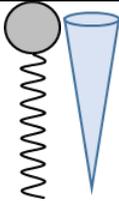
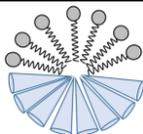
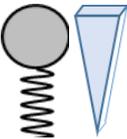
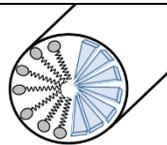
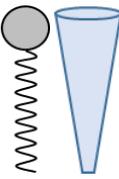
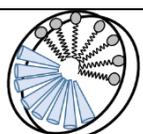
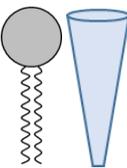
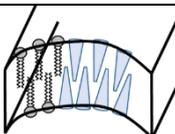
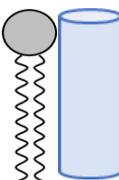
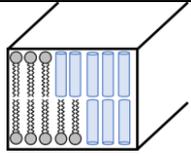
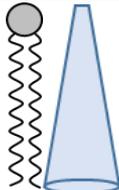
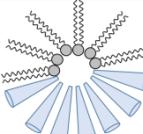
V : le volume (en \AA^3) occupé par la partie hydrophobe au cœur de la micelle

l_c : la longueur critique (en \AA) de la chaîne hydrophobe

a_0 : la surface (en \AA^2) occupée par la partie hydrophile à l'interface micelle-solution

La forme géométrique des tensioactifs découle de ce paramètre d'empilement, et permet d'en déduire la structure que prendront leurs micelles (79) (Tableau 2).

Tableau 2 : Prédiction de l'organisation micellaire en fonction du paramètre d'empilement des tensioactifs

Tensioactif	P	Forme géométrique	Organisation micellaire
Monocaténaire à large tête hydrophile	$0 < P < 1/3$		 Micelle sphérique
Monocaténaire à courte chaîne hydrophobe	$1/3 < P < 1/2$		 Micelle cylindrique
Monocaténaire non-ionique	$1/2$		 Micelle globulaire ou discoïde
Bicaténaire à large tête polaire	$1/2 < P < 1$		 Micelle lamellaire flexible
Bicaténaire	1		 Micelle lamellaire, bicouche planaire
Bicaténaire à petite tête polaire	> 1		 Micelle inversée

2.3 Applications et utilisations pharmaceutiques des tensioactifs

Les capacités d'adsorption aux interfaces et d'auto-assemblage des tensioactifs sont responsables de nombreuses applications dans le domaine de la chimie colloïdale et dans le milieu industriel comme dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques, agro-alimentaires ou pétrochimiques. Près de 10 millions de tonnes de tensioactifs sont produites chaque année sur le marché mondial (80). Par exemple, les tensioactifs peuvent renforcer la mouillabilité des surfaces en agissant sur la polarité et l'affinité des substances (81). La diminution de la tension superficielle de l'eau permet également aux tensioactifs de faciliter la dispersion d'une phase dans une autre phase immiscible en formant des émulsions et des mousses, ce qui améliore la stabilité des systèmes thermodynamiquement instables (82). Les solutions détergentes emploient également de nombreux tensioactifs utilisés seuls ou en mélange. Enfin, l'utilisation de tensioactifs permet d'influencer de nombreux paramètres physico-chimiques comme la solubilité, la mobilité, la biodisponibilité et la biodégradation de composés organiques hydrophobes ou insolubles dans l'eau (83).

Dans le cas de l'industrie pharmaceutique, une faible solubilité dans l'eau limite grandement la biodisponibilité orale des molécules hydrophobes. Or plus de 40 % des drogues administrées oralement sont caractérisées par une faible solubilité dans l'eau (84). La dissolution lente ou incomplète de ces molécules par les fluides gastro-intestinaux limite leur biodisponibilité orale et constitue un enjeu de taille dans le développement de nouveaux médicaments. Pour améliorer la solubilité des molécules hydrophobes, l'industrie pharmaceutique emploie de nombreux tensioactifs micellaires. Les tensioactifs les plus fréquemment utilisés par l'industrie pharmaceutique sont les polysorbates, les esters de sorbitane, les éthers alkylés de polyoxyéthylènes (non-ioniques) et le dodécylsulfate de sodium (anionique). Néanmoins, il existe un intérêt grandissant pour l'utilisation de nouveaux tensioactifs moins toxiques et présentant un meilleur pouvoir émulsifiant et une plus grande stabilité en solution (84).

Par exemple, les micelles polymériques présentent une grande diversité structurale et fonctionnelle permettant la délivrance ciblée et non toxique de médicaments (85). Ces micelles polymériques sont généralement constituées d'une couronne hydrophile composée de polyéthylène glycol ou de dérivés du polyvinyle. Des substances actives hydrophobes comme le diazépam² ou la doxorubicine³ ont pu

² Diazépam : benzodiazépine à activité hypnotique, myorelaxante et anxiolytique

³ Doxorubicine : anthracycline à activité anticancéreuse de la famille des agents intercalants

être solubilisées dans ces micelles polymériques. La doxorubicine ainsi incorporée a démontré des propriétés antitumorales supérieures à celles de la substance seule dans le traitement de leucémies sur un modèle murin et humain. Cette augmentation de l'activité était également accompagnée d'une diminution significative de sa toxicité liée à une meilleure diffusion de l'anticancéreux dans les tissus tumoraux, épargnant ainsi leurs effets néfastes sur les tissus sains. Par ailleurs, son temps de circulation et sa biodisponibilité sont proportionnels à la taille des micelles polymériques : de plus longues chaînes de polyéthylène glycol augmentent le temps de circulation dans l'organisme.

Une autre approche emploie des chaînes d'acides gras couplées à une tête polaire de la famille de l'acide glutamique pour améliorer la solubilité aqueuse de médicaments anticancéreux insolubles (86). Ces tensioactifs dérivés de l'acide glutamique présentent une CMC comprise entre 200 et 920 µg/L et une cytotoxicité moindre que le polysorbate 80. Par exemple, le couple acide stéarique (partie hydrophobe) et acide diglutamique (partie hydrophile) forme des micelles sphériques capables d'augmenter la solubilité dans l'eau d'une substance insoluble de 0.15 µg/mL à 11.1 mg/mL (x 74 000).

La conjugaison de polysaccharides (pullulane, cellulose, héparine, dextrane) avec une partie hydrophobe (acides gras, cholestérol, acide polylactique) présente également des résultats prometteurs (87) ; les carboxyméthylpullulanes amphiphiles CMP₄₉C₈ et CMP₁₂C₈ sont parvenus à solubiliser efficacement le docétaxel⁴ tout en diminuant sa cytotoxicité (88).

2.4 Tensioactivité des saponosides (89) (90)

Comme mentionné précédemment, les saponosides possèdent des propriétés tensioactives remarquables causées par la combinaison de leur noyau triterpénique ou stéroïdique hydrophobe avec la(es) chaîne(s) glycosylée(s) hydrophile(s). Le nombre de chaînes glycosylées influencera également la tensioactivité : les monodesmosides ont de meilleures propriétés émulsifiantes que les bi- ou tridesmosides. En solution aqueuse, les saponosides forment des micelles dont la taille et la forme dépendent non seulement des structures chimiques de la molécule, mais également du pH, de la force ionique et de la température du milieu. Par exemple, les micelles issues de *Saponaria officinalis* forment de petites micelles

⁴ Docétaxel : alcaloïde diterpénique à activité anticancéreuse de la famille des antimitotiques par inhibition de la dépolymérisation des microtubules

dimériques tandis que celles issues de *Quillaja saponaria* sont de plus grosse taille et composées d'une cinquantaine de molécules. Celles-ci ont généralement une forme sphérique mais peuvent prendre une forme allongée en milieu acide (Figure 14).

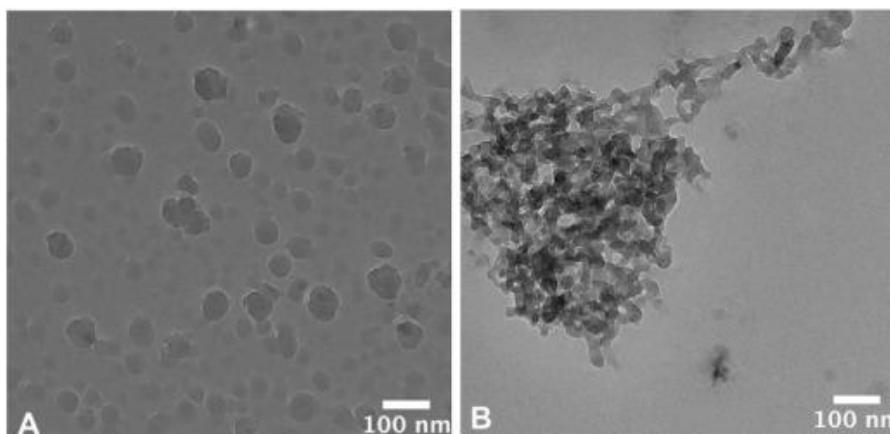


Figure 14 : Micelles de *Quillaja saponaria* observées par cryo-microscopie électronique. Forme sphérique (A) et forme allongée à pH 3 (B) (91)

Les saponosides peuvent aussi former des micelles entassées au contact des acides biliaires qui sont de plus grande taille que les micelles en phase aqueuse.

La surface de contact à l'interface air-eau est influencée par l'orientation des saponosides. En effet selon le nombre et la nature des chaînes glycosylées, les molécules peuvent s'orienter dans une configuration « *end-on* », « *side-on* » ou « *lay-on* » (Figure 15).

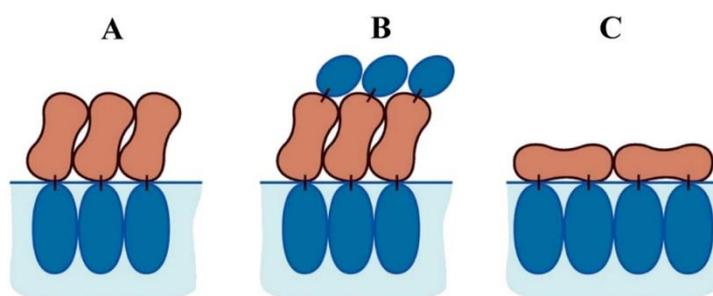


Figure 15 : Agencement des saponosides à l'interface air-eau selon le nombre et la nature des chaînes glycosylées (chaînes glycosylées en bleu et sapogénines en orange). Configuration "end-on" (A), "side-on" (B) et "lay-on" (C) (92)

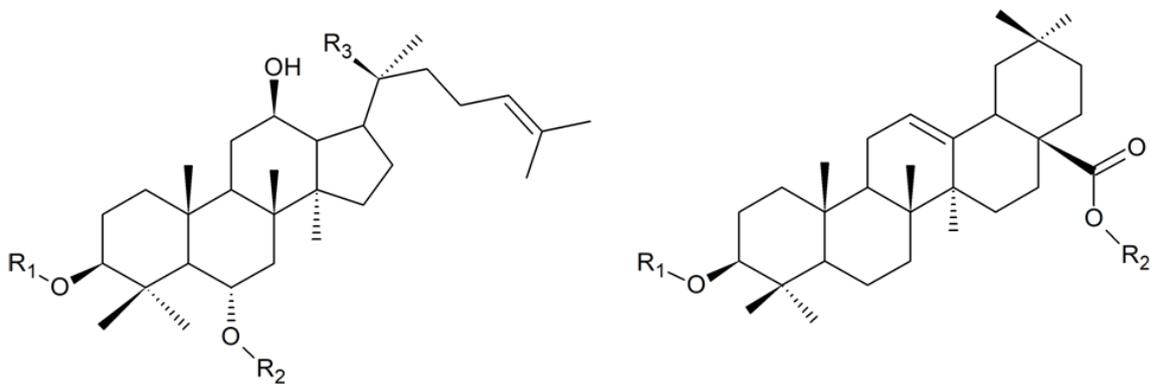
La configuration « *end-on* » intervient lorsque les sapogénines des molécules voisines se positionnent perpendiculairement à l'interface air-eau et parallèlement entre-elles (Figure 15 A). Cet arrangement intervient principalement chez les monodesmosides. La configuration « *side-on* » est similaire à la « *end-on* » mais concerne les bidesmosides lorsque la seconde chaîne glycosylée est maintenue hors de la phase aqueuse, au prolongement de la sapogénine (Figure 15 B). Les

bidesmosides peuvent également prendre la configuration « *lay-on* » lorsque les deux chaînes glycosylées sont plongées dans la phase aqueuse, orientant la sapogénine parallèlement à l'interface air-eau (Figure 15 C). La complexité structurale et la découverte récente des tridesmosides n'ont pas encore permis d'établir de modèles de leur agencement à l'interface air-eau.

2.5 Pouvoir solubilisant des saponosides

La solubilité est la capacité d'une substance à se dissoudre dans une solution pour former un mélange homogène. Une molécule (ou soluté) est d'autant plus soluble dans un solvant que son affinité avec les molécules de ce dernier est importante. Les interactions entre soluté et solvant sont souvent des interactions faibles de type van der Waals et favorisées par l'établissement de liaisons hydrogènes. La solubilité d'un soluté apolaire dans un solvant polaire (comme l'eau) est défavorable car les interactions entre les molécules du solvant entre elles (tension superficielle élevée) sont plus fortes que les interactions avec le soluté, ce qui limite la dissociation et la dispersion du soluté. Il est cependant possible d'accroître la solubilité d'un composé apolaire en utilisant des tensioactifs qui, comme mentionné précédemment, abaissent la tension superficielle et la force des interactions des molécules de solvant entre elles.

Les propriétés solubilisantes des saponosides ont engendré de nombreuses études et applications. Par exemple, dans les années 80, des études ont porté sur les interactions entre la saikosaponine A de *Bupleurum chinense* DC. et les ginsenosides du ginseng (*Panax ginseng* C.A. Mey.) (3) (Figure 16)



	R ₁	R ₂	R ₃
Rb1	Glc ¹⁻² Glc	Glc ¹⁻⁶ Glc	H
Rg1	H	Glc	Glc

	R ₁	R ₂
Ro	Glc ¹⁻² Glc	Glc

Figure 16 : Ginsenosides extraits de *Panax ginseng*

En 2013, il a été déterminé que la saikosaponine A peut former des agrégats solubles et de petite taille avec la ginsenoside Ro tandis que son interaction avec d'autres ginsenosides produit des complexes moins solubles (93) (Figure 17).

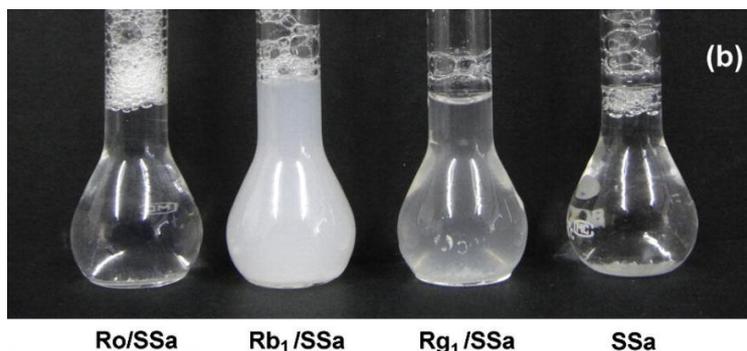


Figure 17 : Photos de l'interaction entre la saikosaponine A (SSa) et divers ginsénosides (Ro, Rb₁, Rg₁) (94)

La microscopie électronique en transmission a permis d'observer les micelles produites par ces saponosides (Figure 18).

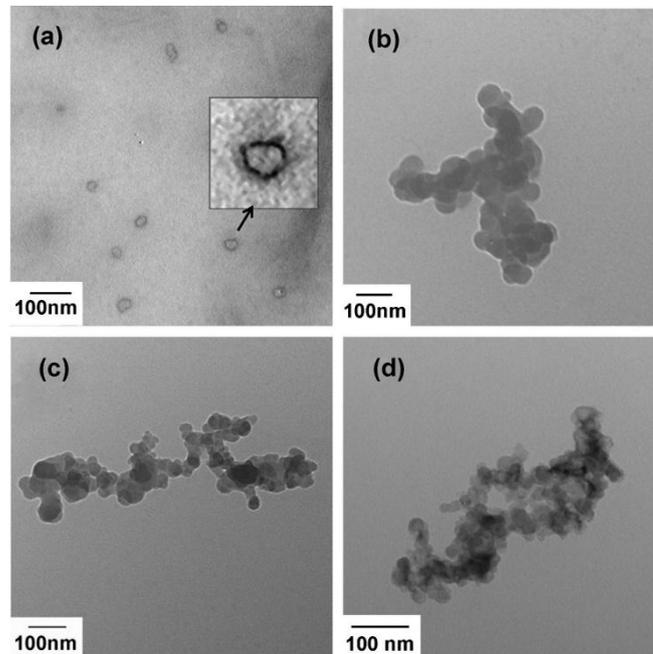


Figure 18 : Image de microscopie électronique en transmission des micelles de ginsénosides Ro (a), Rb₁ (b), Rg₁ (c) et la saikosaponine A (d) (95)

En 1983, une étude japonaise s'est intéressée aux mécanismes de solubilisation de la glycyrrhizine et de ses dérivés ainsi que leurs applications en cosmétique et en parfumerie (96). Ces chercheurs ont pu établir les facteurs essentiels à la formation de gel micellaire à base de glycyrrhizine pour l'utilisation d'acétate de géranyle ou d'ionone qui sont des substances apolaires lipophiles habituellement employées en cosmétique.

Plus récemment, les propriétés biosurfactantes⁵ et la capacité des saponosides à former des micelles sont aussi utilisées dans les sciences environnementales pour solubiliser les cycles aromatiques et les polluants telluriques comme les métaux lourds (97) (98) (99). Un article de 2017 (100) passe en revue l'utilisation intensive des saponosides dans la capture et l'élimination tellurique de polluants organiques hydrophobes comme le phénanthrène et les hydrocarbures de pétrole en utilisant des saponosides issus de *Quillaja saponaria* seuls ou en association avec d'autres tensioactifs comme les rhamnolipides ou le SDS. Ces saponosides sont également employés pour décontaminer les sols et les plantes de métaux lourds comme le plomb, le nickel, le cuivre, le cadmium, le zinc ou l'arsenic.

Dans l'industrie agroalimentaire, la solubilisation de protéines alimentaires et le transport de vitamines liposolubles sont également rendus possibles par l'ajout d'extrait de saponosides d'écorce de *Quillaja saponaria* (4) (101).

⁵ Biosurfactant : Composé actif synthétisé par un organisme vivant à action détergente qui met en solution ou en suspension les souillures adhérentes à des surfaces.

Les saponosides peuvent également intervenir dans la modulation de la biodisponibilité des médicaments, notamment en agissant sur la perméabilité de la barrière intestinale par action sur les récepteurs du transport transmembranaire, mais également en améliorant la solubilité de molécules habituellement insolubles dans l'eau (102) (103).

Selon un brevet de 2017, l'inclusion de saponosides permettrait d'augmenter la solubilité en milieu aqueux de glucocorticoïdes comme le budésonide⁶ et la fluticasone⁷ (104). Les saponosides testés dans ce brevet sont l'escine à une concentration variant de 0.02 à 0.5 % (w/v) et la glycyrrhizine à une concentration variant de 0.1 à 5 % (w/v).

Dans les années 2000, des études allemandes ont tenté de rationaliser les variations de solubilisation de molécules naturelles : la digitoxine⁸, du rutinoside⁹ et de l'esculine¹⁰ sous l'influence de différents types de saponosides sans toutefois parvenir à établir un modèle prédictif de ces variations (105). Les saponosides testés dans cet article proviennent d'une grande variété de plantes et ont été utilisés sur un gradient de concentration à la fois en-dessous et au-dessus de leur CMC respective, débutant à une concentration de 0.01 g/L jusqu'à atteindre une concentration de 10 g/L

- Ginsenosides extraits du ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer)
- Primulasaponines extraites de la primevère des bois (*Primula elatior* Hill)
- β -escine extrait du marronnier d'Inde (*Aesculus hippocastanum* L.)
- Saniculasaponines extraites de la sanicle d'Europe (*Sanicula europaea* L.)
- Glycyrrhizine extrait de la réglisse (*Glycyrrhiza glabra* L.)
- Bellissaponines extraites de la pâquerette (*Bellis perennis* L.)
- Hederasaponines extraites du lierre (*Hedera helix* L.)
- Ruscosaponines (de type stéroïdique) extraites du Fragon petit houx (*Ruscus aculeatus* L.)

⁶ Budésonide : glucocorticoïde à activité anti-inflammatoire utilisé dans le traitement de l'asthme, de la rhinite non infectieuse et de la maladie de Crohn

⁷ Fluticasone : glucocorticoïde anti-inflammatoire utilisée dans le traitement de la bronchopneumopathie chronique obstructive, de l'asthme, de la rhinite allergique et des maladies de peau

⁸ Digitoxine : hétéroside stéroïdique cardiotonique extrait de la digitale pourpre (*Digitalis purpurea* L.) utilisé dans le traitement de l'insuffisance cardiaque

⁹ Rutinoside : hétéroside flavonoïdique

¹⁰ Esculine : glucoside coumarinique présente dans diverses espèces du genre *Aesculus*

Il ressort de cette étude que les modulations de solubilité seraient dues à des interactions individuelles entre le saponoside et la substance étudiée.

Plusieurs études ont également cherché à améliorer la biodisponibilité de la metformine¹¹ (106) et de l'héparine¹² (107) par voie orale. Dans le cas de la metformine, des lots de comprimés ont été préparés en incorporant des extraits secs de fruits du tribule terrestre (*Tribulus terrestris* L.) (utilisé en Médecine Traditionnelle Chinoise sous le nom de *Ji Li*) riches en saponosides stéroïdiques. Ces comprimés ont ensuite subi divers contrôles granulométriques (friabilité, solidité, désintégration...) avant d'être absorbés sur un modèle *in-vitro* d'intestin de poulet. Les résultats de l'étude ont démontré que des comprimés contenant 200 mg de metformine et 25 mg d'extrait de tribule terrestre permettaient l'absorption intestinale de la même quantité de metformine que les comprimés de 500 mg de metformine seule. Dans le cas de l'héparine, son absorption intestinale est limitée par les jonctions serrées intercellulaires des cellules épithéliales intestinales dont la perméabilité peut être influencée par la présence de saponosides. L'étude cherche à augmenter l'absorption intestinale d'une concentration fixe (100 mg/kg) d'héparine à travers ces jonctions, en ajoutant des saponosides extraits du raisin d'Amérique (*Phytolacca americana* L.) (utilisé en Médecine Traditionnelle Chinoise sous le nom de *Shang Lu*) : les phytolaccosides. Les résultats de cette étude ont démontré que le passage intestinal et l'activité antithrombotique de l'héparine deviennent possibles à partir d'une dose de 40 mg/kg de phytolaccosides B, D₂ ou E.

3 Conclusion et objectifs

Les saponosides sont des métabolites spécialisés bénéficiant d'une large distribution dans le règne du vivant ainsi que d'une grande diversité structurale. Leurs propriétés biologiques ont de nombreuses applications dans l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique. Par ailleurs, les saponosides sont également des tensioactifs naturels capables de s'auto-assembler en complexes micellaires de formes et de tailles variables. Cette tensioactivité s'accompagne d'un fort pouvoir solubilisant et de propriétés biosurfactantes. Au cours de ce projet de thèse, nous étudierons la place des saponosides dans les pharmacopées traditionnelles et nous verrons que leurs propriétés physico-chimiques particulières jouent aussi un rôle clé dans la biodisponibilité des formulations de médecine traditionnelle.

¹¹ Metformine : médicament antidiabétique de la famille des biguanides normoglycémiant utilisé dans le traitement du diabète de type 2

¹² Héparine : médicament anticoagulant de la famille des glycosaminoglycanes

Chapitre II : Pharmacopées Traditionnelles et biodisponibilité

1 Spécificités des Pharmacopées Traditionnelles (108)

A travers le monde, les Médecines Traditionnelles et, par extension, les Pharmacopées Traditionnelles, constituent soit les principales méthodes de soins de santé, soit des compléments aux méthodes conventionnelles. Pourtant, ces méthodes de soins ancestrales et profondément ancrées à chaque culture sont souvent sous-estimées par les systèmes de santé, bien qu'elles existent dans quasiment tous les pays du monde. Les Médecines Traditionnelles sont définies par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme la somme des connaissances, des compétences et des pratiques basées sur des théories, croyances ou expériences, explicables ou non, issues de différentes cultures et ayant pour objectif le maintien de la santé ainsi que la prévention, le diagnostic, l'amélioration ou le traitement de maladies physiques ou mentales.

Pour plusieurs millions de personnes, les médicaments à base de plantes, les traitements traditionnels et les praticiens traditionnels sont la principale voire l'unique source de soins de santé du fait de leur proximité et de leurs coûts abordables. Les soins traditionnels sont également culturellement acceptables et un grand nombre de personnes leur font confiance. Les Médecines Traditionnelles suscitent donc un intérêt grandissant face à l'explosion des frais de santé et à l'austérité devenue mondiale.

Afin de pouvoir instaurer une pratique sûre et qualifiée des Médecines Traditionnelles, de nombreux pays ont élaboré des réglementations sur la qualité et l'enseignement de leur Médecine Traditionnelle, proposant des programmes d'enseignement de haut niveau avec des diplômes de premier cycle, des masters ou des doctorats. En Afrique, où les méthodes ancestrales se transmettaient habituellement oralement entre tradipraticiens, certaines universités de la Communauté Economique des Etats de l'Afrique de l'Ouest, d'Afrique du Sud, de la République Démocratique du Congo et de Tanzanie intègrent désormais les Médecines Traditionnelles aux programmes des étudiants en pharmacie et en médecine.

De nombreux pays ont leurs propres formes de Médecine Traditionnelle ou indigène comme l'Ayurvéda et la Médecine yunâni en Inde, la Médecine Traditionnelle Chinoise (MTC) en Chine ou le Kampo au Japon. D'après une enquête réalisée en

Chine, le nombre de consultations en MTC était de 907 millions en 2009, ce qui représentait 18% de l'ensemble des consultations médicales dans les établissements interrogés. En 2015, les remèdes de MTC produisaient une valeur totale de 786.6 milliards de yuans soit environ 98.2 milliards d'euros, représentant près de 28.55 % du total généré par l'industrie pharmaceutique du pays (109). Au Laos, 80 % de la population vivent en zone rurale et chaque village compte au moins un ou deux tradipraticiens : au total 18 226 tradipraticiens réalisent les services de santé auprès de 80% de la population (soit près de 6 millions d'habitants).

Les schémas d'utilisation des Médecines Traditionnelles diffèrent d'un pays à l'autre en fonction de plusieurs facteurs tels que la culture, l'importance historique ou la réglementation en vigueur. Il existe principalement trois schémas d'utilisation

- *Utilisation dans les pays où la Médecine Traditionnelle est la source première de soins de santé.* Ces pays sont habituellement ceux où la médecine conventionnelle est peu disponible et/ou accessible. La présence locale des tradipraticiens ainsi que le coût abordable expliquent l'usage répandu des Médecines Traditionnelles en Afrique et dans les pays en voie de développement. Par exemple, l'Afrique dénombre en moyenne 1 guérisseur¹³ pour 500 personnes contre 1 médecin pour 40 000 personnes (Tableau 3).
- *Utilisation pour des raisons culturelles et historiques.* Dans certains pays comme Singapour ou la République de Corée, la médecine conventionnelle est bien établie mais près de 76 à 86 % des habitants recourent encore couramment aux Médecines Traditionnelles. C'est également le cas de la MTC en Chine.
- *Utilisation des Médecines Traditionnelles comme thérapie complémentaire.* Ce schéma est le plus fréquent dans les pays développés où le système de santé est mieux équilibré et mature, comme en Amérique du Nord et dans la plupart des pays d'Europe.

¹³ Guérisseur : personne généralement dépourvue de diplôme médical qui soigne en dehors de l'exercice légal scientifique de la médecine par des moyens empiriques ou magiques

Tableau 3 : Ratio du nombre de guérisseurs ou de médecins par habitants en Afrique (110)

Pays	Ratio guérisseur par habitants	Ratio médecin par habitants
Kenya (zone rurale)	1 : 345	1 : 70 000
Kenya (zone urbaine)	1 : 833	1 : 987
Zimbabwe	1 : 600	1 : 6 250
Swaziland	1 : 100	1 : 10 000
Nigeria	1 : 110	1 : 16 400
Afrique du Sud	1 : 1 200	1 : 17 400
Ghana	1 : 200	1 : 20 000
Uganda	1 : 700	1 : 25 000
Tanzanie	1 : 400	1 : 33 000
Mozambique	1 : 200	1 : 50 000

L'échec des traitements conventionnels et l'aspiration à une bonne hygiène de vie sont également des motivations du recours aux Médecines Traditionnelles. Aux Etats-Unis et en France, les patients souffrant de troubles musculo-squelettiques consultent d'avantage les praticiens proposant des solutions autres que la médecine conventionnelle (ostéopathie, acupuncture, hypnose, aromathérapie...). Tandis qu'en Chine, les principaux problèmes de santé qui ont donné lieu en 2008 à une admission dans un hôpital spécialisé en MTC sont les accidents vasculaires cérébraux, le déplacement d'un disque intervertébral, les hémorroïdes, les cardiopathies ischémiques et l'hypertension artérielle.

Sur la dernière décennie, l'automédication prend aussi une place de plus en plus importante car de plus en plus de consommateurs souhaitent prendre une part plus active dans leur santé. Beaucoup se tournent ainsi vers les plantes des Pharmacopées Traditionnelles en considérant, parfois à tort, que ce qui est naturel serait sans danger.

Les Médecines Traditionnelles ont toujours su exploiter les richesses naturelles. La préparation des ingrédients, la récolte des plantes médicinales et la constitution des formulations sont basées sur des concepts complexes qui échappent parfois à la méthode scientifique moderne. Néanmoins, les avancées en chimie analytique et extractive ont permis de « redécouvrir » les propriétés médicinales de la phytothérapie traditionnelle mais également de leur trouver de nouvelles applications.

2 Focus sur la Médecine Traditionnelle Chinoise (111)

2.1 Principes généraux

La Pharmacopée de la Médecine Traditionnelle Chinoise est l'une des plus anciennes et des mieux documentées. En effet, la MTC incorpore de nombreuses pratiques médicales et paramédicales dont les premières traces écrites remontent au II^{ème} siècle avant notre ère durant la dynastie Han. Au cours des siècles, la MTC s'est enrichie au fur et à mesure de l'agrandissement des frontières de la Chine et de son essor culturel et économique. Au XVI^{ème} siècle, durant la dynastie Ming, le Compendium de Matière Médicale (*Ben Cao Gang Mu*) rédigé par Li Shizhen décrivait plus de 2 000 drogues issues des règnes végétal, animal, minéral et fongique provenant des divers pays d'Asie et du Moyen-Orient ainsi que 10 000 formulations (Figure 19).



Figure 19 : Page du *Ben Cao Gang Mu* de Li Shizhen (1518-1593) (112)

Après la Seconde Guerre Mondiale et la proclamation de la République Populaire de Chine, le Parti Communiste Chinois a codifié l'usage de la MTC dans un souci de

convergence avec la médecine moderne avec l'ouverture d'universités et d'hôpitaux spécialisés en MTC. De nos jours, la MTC et la médecine moderne cohabitent au même niveau au sein de la Commission Nationale de la Santé, l'équivalent chinois du Ministère de la Santé.

La MTC est profondément ancrée au mouvement philosophique taoïste et repose sur 3 principes fondamentaux.

1. **La notion de Qi** (113) décrit une énergie universelle animant la matière et circulant au sein du corps et des organes dans un réseau complexe agrémenté de méridiens
2. **La notion de Yin et de Yang** (113) introduit deux étiquettes permettant de caractériser les composants d'une dualité complémentaire et opposée (Figure 20). Par exemple : masculin (*Yang*) versus féminin (*Yin*), Chaud (*Yang*) versus Froid (*Yin*), Jour (*Yang*) versus Nuit (*Yin*). Ces étiquettes sont également infiniment divisibles : au sein du Jour (*Yang*), on peut séparer le matin (*Yang*) et l'après-midi (*Yin*).
3. **La notion de Wu Xing** (113) introduit un système de cinq éléments interconnectés : le Bois, le Feu, l'Eau, le Métal et la Terre. Chaque élément représente un dynamisme particulier au sein de la nature et de l'organisme, et entre en relation avec les autres éléments dans un cycle de création et de destruction (Figure 20).

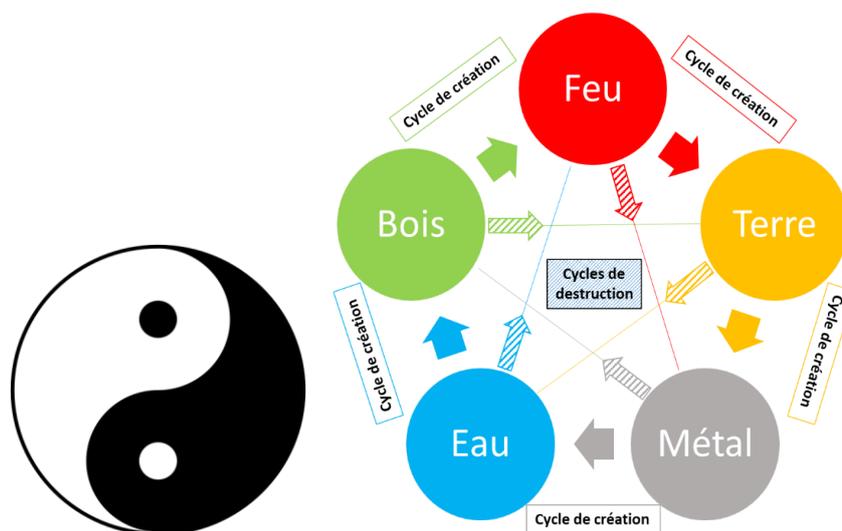


Figure 20 : A gauche : symbole du Yin (en blanc) et du Yang (en noir). A droite : représentation du Wu Xing et des interactions entre les éléments (flèche pleine : cycle de création ; flèche hachurée : cycle de destruction)

En MTC, les pathologies sont associées à des déséquilibres énergétiques au sein des trois notions précédemment citées. Les différentes techniques de soins ont donc pour rôle de rééquilibrer l'organisme par l'exercice physique (gymnastique

énergétique, massothérapie) (114), l'acupuncture et l'application de moxas¹⁴ (115), les apports alimentaires (diététique énergétique) (116), l'hygiène de vie et la prise de formulations issues de la Pharmacopée Traditionnelle.

En phytothérapie traditionnelle, chaque drogue est caractérisée par une Saveur énergétique associée au *Wu Xing* et par une Nature associée au *Yin* et au *Yang*. Des étapes de préparation de la matière permettent d'optimiser ces paramètres avant de les incorporer dans les formulations.

Lors de la conception de ces formulations, les différents ingrédients suivent une hiérarchie particulière appelée *Jun-Chen-Zuo-Shi* (Empereur, Ministre, Assistant, Messenger) selon l'effet thérapeutique recherché (117).

- La drogue *Jun* (Empereur) est l'ingrédient principal du remède. Il est responsable de l'activité thérapeutique de la formulation et cible directement les causes de la maladie. C'est également l'ingrédient qui est à la plus forte concentration au sein de la formulation.
- La ou les drogues *Chen* (Ministre) sont des drogues adjuvantes qui permettent de promouvoir l'activité de la drogue *Jun* ou de traiter les symptômes de la maladie.
- La ou les drogues *Zuo* (Assistant) servent à réduire les effets secondaires des autres drogues de la formulation.
- La ou les drogues *Shi* (Messenger) permettent de « guider » les autres drogues sur le site de l'activité thérapeutique mais aussi d'harmoniser et de détoxifier la formulation.

A titre d'exemple, la formulation *Mahuang Tang* est représentée en Figure 21. Son indication est les syndromes de Vent et de Froid qui provoquent des frissons, les maux de tête, les douleurs articulaires, les crises d'asthme et de toux (118) (119).

¹⁴ Moxibustion ou moxa : Technique de stimulation des points d'acupuncture par des cônes à encens

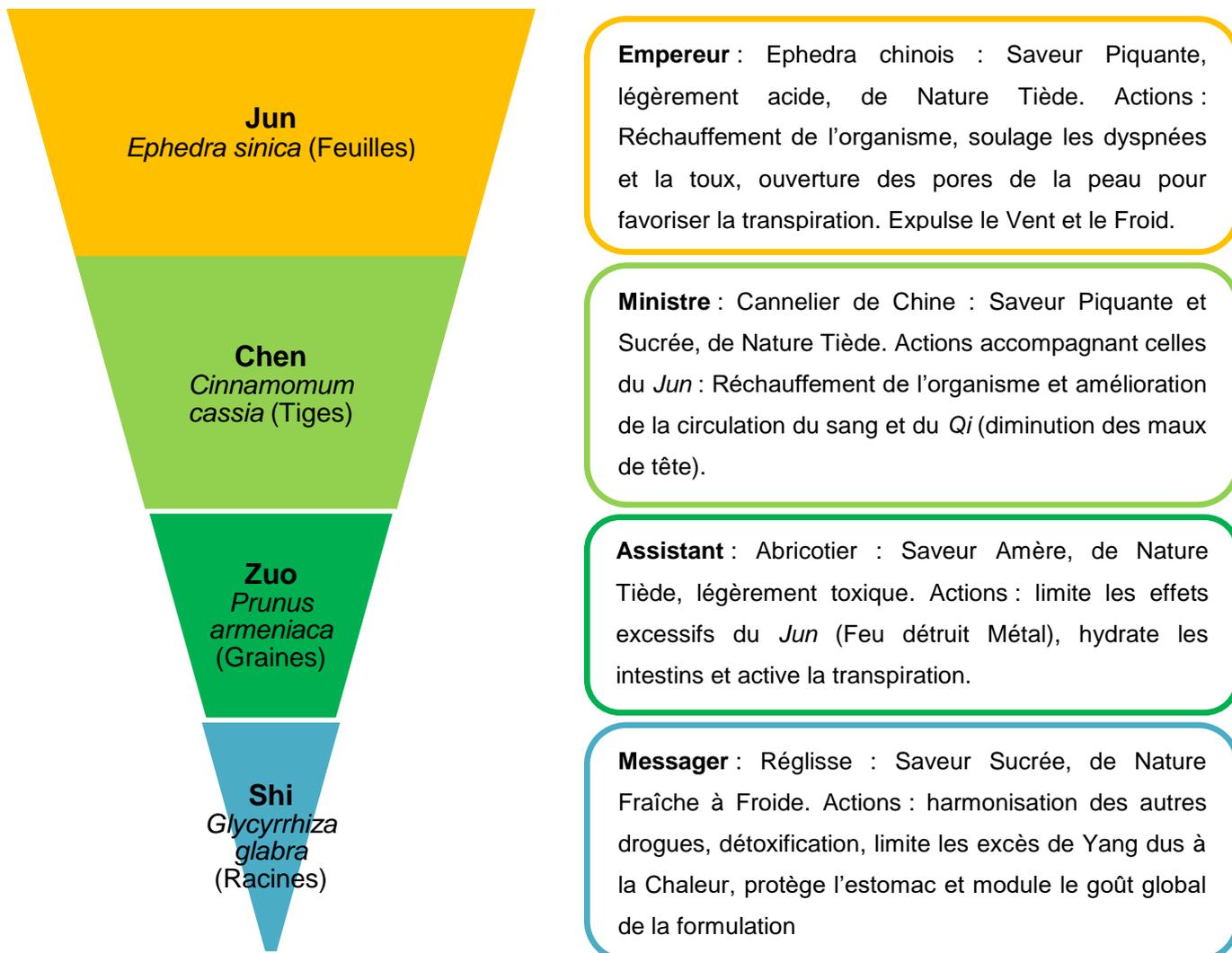


Figure 21 : Exemple d'une formulation selon la classification Jun-Chen-Zuo-Shi

De nombreuses plantes riches en saponosides se retrouvent ainsi dans le rôle de Messageur ou d'Assistant. Par exemple, la réglisse (*Glycyrrhiza glabra* L.) est essentiellement employée dans le rôle de Messageur lorsqu'elle est en combinaison avec des plantes toxiques (2). Ces observations nous amènent à penser que ce sont les saponosides qui sont responsables des effets de détoxification et de diminution des effets secondaires. De plus, la notion abstraite « d'harmonisation » des plantes Messagères pourrait se traduire par une modification de la biodisponibilité et de l'absorption des métabolites secondaires des autres plantes du mélange.

2.2 Plantes de la Pharmacopée Chinoise riches en saponosides

Comme mentionné précédemment, les saponosides possèdent une large distribution dans le règne du vivant. Il n'est pas étonnant de les retrouver dans de nombreuses drogues de la Pharmacopée Chinoise. Il est également particulièrement intéressant de s'interroger sur le rôle que prennent ces plantes riches en saponosides dans les formulations traditionnelles. Les exemples suivants constituent une liste non-

exhaustive de drogues riches en saponosides issues de la Pharmacopée Chinoise ainsi que leur utilisation (Tableau 4).

Tableau 4 : Exemples de plantes à saponosides de la Pharmacopée Chinoise et leur rôle dans les formulations (120)

Plantes	Rôle dans les formulations
<i>Achyranthes bidentata</i> Blume	Ministre : Tonification des Reins et du Foie, renforcement des tendons et des os, soulage les inflammations du rectum ou de la vessie.
<i>Acorus tatarinowii</i> Sol.	Messager : Rafrâchit l'esprit, harmonise l'Estomac, calme le Cœur.
<i>Adenophora tetraphylla</i> A. DC.	Ministre : Nourrit en Yin les Poumons et l'Estomac, dissipe la Chaleur et réduit les glaires.
<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	Empereur : Renforce la Rate, les Reins et les tendons, réduit les œdèmes et stoppe les saignements
<i>Allium schoenoprasum</i> L.	Empereur : disperse les syndromes de Froid et de Vent, renforce le Yang
<i>Amomum villosum</i> Lour.	Assistant : Réduit l'Humidité, réchauffe le Qi, soulage vomissement et diarrhée
<i>Angelica pubescens</i> Maxim.	Assistant : Disperse le Vent et l'Humidité, soulage la douleur
<i>Atractylodes lancea</i> Thunb.	Assistant : Réduit l'Humidité, renforce la Rate
<i>Cimicifuga heracleifolia</i> Kom.	Messager : Réduit la fièvre, disperse la chaleur, détoxifie
<i>Codonopsis pilosula</i> Franch.	Assistant : Renforce les Poumons et la Rate, active la production de fluides corporels
<i>Dioscorea polystachya</i> Turcz.	Assistant : Tonifie le Qi, renforce la Rate, les Poumons et les Reins.
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Messager : Disperse le Froid, soulage la douleur et harmonise l'Estomac
<i>Forsythia suspensa</i> Vahl	Messager : Disperse la Chaleur, détoxifie
<i>Gardenia jasminoides</i> J. Ellis	Messager : Disperse la Chaleur, active la diurèse, détoxifie
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	Messager : Tonifie le Qi, disperse les glaires, calme la toux et les spasmes, détoxifie, harmonise
<i>Indigo tinctoria</i> L.	Messager : Disperse la Chaleur, détoxifie
<i>Lonicera japonica</i> Thunb.	Messager : Disperse la Chaleur et le Vent, détoxifie
<i>Platycodon grandiflorus</i> A. DC.	Messager : Disperse les glaires et le pus, dirige l'action des ingrédients vers la partie haute du corps
<i>Polygala tenuifolia</i> Willd.	Assistant : Calme le Cœur, disperse les glaires

2.2.1 La réglisse (*Glycyrrhiza glabra* L.)

L'exploration de données sur plus de 96 000 formulations de MTC a révélé que la réglisse est la plante la plus fréquemment utilisée de la Pharmacopée Chinoise puisqu'elle est présente dans 26 185 formulations (2). Dans ces dernières, la réglisse est principalement employée comme plante Messagère (*Shi*) avec pour rôles d'harmoniser les autres plantes de la formulation (en augmentant leur effet thérapeutique et en diminuant leurs interactions antagonistes), et de diminuer leur toxicité. En effet, la réglisse est amplement utilisée en combinaison avec des plantes toxiques comme les racines d'aconit (genre *Aconitum*) et les rhizomes de *Pinellia ternata*, des minéraux comme le cinnabaris (sulfure de mercure) et le réalgar (sulfure d'arsenic), ou des animaux venimeux comme les scorpions (*Mesobuthus martensii* Karsch). Ces effets de détoxification et d'harmonisation sont attribués à la glycyrrhizine, un saponoside triterpénique qui constitue le métabolite secondaire largement majoritaire dans la racine de réglisse.

La glycyrrhizine et la réglisse constituent les modèles de référence pour le développement de ce projet de thèse lorsqu'il s'agit d'étudier les effets des plantes riches en saponosides sur la biodisponibilité des formulations de MTC. La glycyrrhizine commerciale que nous avons utilisée se présente sous forme de sel d'ammonium commercialisé par Extrasynthese®

2.2.1.1 Description taxonomique et botanique (121)

Le terme de réglisse réunit différentes plantes de la famille des *Fabaceae* et du genre *Glycyrrhiza* qui lui-même comprend une vingtaine d'espèces. Néanmoins, *Glycyrrhiza glabra* L. reste la source commerciale de réglisse la plus utilisée bien qu'il soit possible de la substituer avec *G. uralensis* Fish. ou *G. inflata* Bat. qui possèdent des compositions chimiques semblables. *G. glabra* est une plante herbacée pouvant mesurer entre 1 mètre et 1,5 mètre de haut, avec de grandes feuilles imparipennées composées de 11 à 17 folioles ovales lancéolées (Figure 22). Ses fleurs sont zygomorphes de couleur violette ou bleue pâle disposées dans une inflorescence de type grappe (Figure 22). Sa formule florale est : (5S) +5P + (1+9)E + 1C. Son fruit est une gousse plate de 2 à 3 centimètres de long (Figure 22). Enfin, ses racines se présentent sous la forme de rhizomes et de stolons qui constituent les parties habituellement employées en phytothérapie. Ces rhizomes sont peu ramifiés et recouverts d'une écorce brune ou gris-brun striée longitudinalement. Les stolons sont cylindriques d'un diamètre de 1 à 2 centimètres d'aspect similaire aux rhizomes

(Figure 22). La cassure des rhizomes et stolons est grenue et fibreuse. Le suber est mince tandis que l'écorce en elle-même est épaisse et jaune claire.



Figure 22 : *Glycyrrhiza glabra* L. (planche) (122), fleurs, partie aérienne et rhizome (123)

La poudre de racine de réglisse est jaune claire ou grisâtre et présente à l'examen microscopique des fragments de fibres à paroi épaisse et à lumen punctiforme accompagnés de cellules cristallifères contenant des prismes d'oxalate de calcium. Les vaisseaux ont des parois lignifiées avec de nombreuses ponctuations aréolées avec fentes. Il est également possible d'observer de nombreux grains d'amidon simples.

2.2.1.2 Utilisations traditionnelles en MTC (124)

Originnaire de Mésopotamie et d'Iran, la réglisse est aujourd'hui une plante dont la distribution s'est étendue à l'Eurasie, l'Australie et le continent américain. Son utilisation dans les médecines traditionnelles remonte à l'Antiquité. On retrouve sa trace sur des tablettes d'argile babyloniennes ainsi qu'en Assyrie, en Egypte, mais également en Chine dans le *Shennong Ben Cao Jing*, un ouvrage de MTC datant de la dynastie Han (-206 av J.-C. à +220 ap J.-C.). Dans son traité de pharmacologie *De*

Materia Medica datant du premier siècle ap J.-C., Dioscoride préconise l'emploi de la réglisse pour traiter les ulcères, les prurits et les hémorroïdes. Plus tard, les Européens attribueront à la réglisse des propriétés antitussives et antispasmodiques.

En Chine et au Tibet, l'utilisation traditionnelle de la réglisse concerne ses propriétés antipyrétiques, antalgiques et antitussives en plus de son rôle de plante Messagère précédemment mentionné. En MTC la plante est désignée sous le nom de *Gan Cao* de Saveur énergétique Sucrée et de Nature Froide (120).

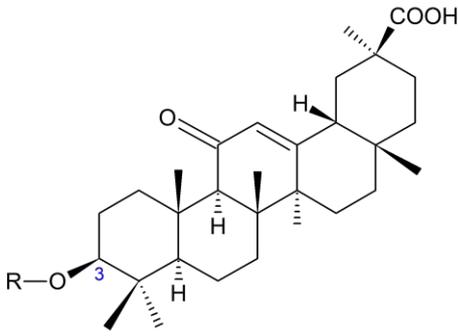
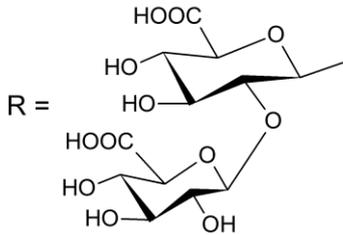
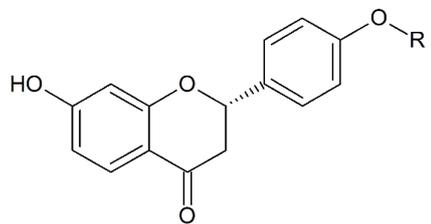
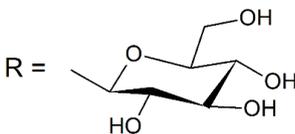
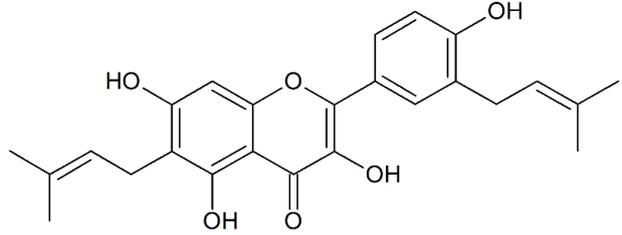
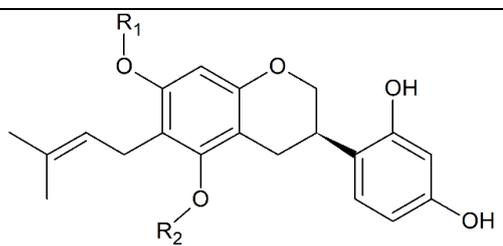
La réglisse trouve également une utilisation dans l'industrie alimentaire et en confiserie grâce à son fort pouvoir sucrant.

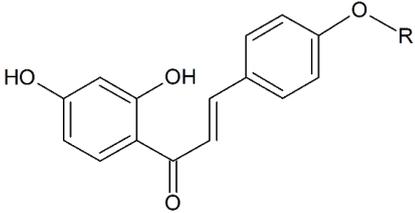
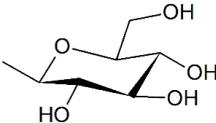
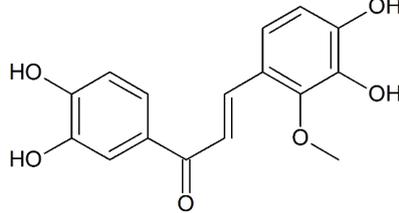
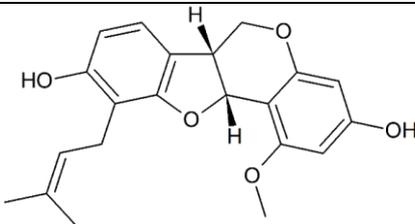
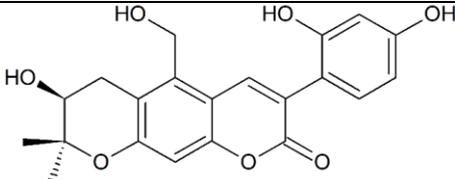
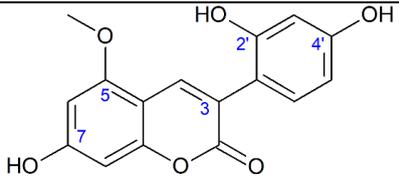
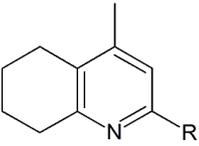
Bien que la réglisse ne soit pas considérée comme une plante toxique même à forte dose, son utilisation au long terme néanmoins peut provoquer des effets indésirables sérieux. La glycyrrhizine et son sel d'ammonium possèdent des effets hypertenseurs et hypokaliémiants et la réglisse est donc déconseillée en cas d'hypertension, d'hypokaliémie, d'insuffisance cardiaque ou rénale (125).

2.2.1.3 Phytochimie (126)

La réglisse a été le sujet de nombreuses études phytochimiques et plus de 200 molécules ont ainsi pu être isolées et identifiées. Les principales classes de métabolites identifiées sont les saponosides triterpéniques représentés par la glycyrrhizine mais on retrouve également des flavonoïdes, des coumarines ainsi que quelques alcaloïdes (Tableau 5).

Tableau 5 : Exemples de métabolites secondaires identifiés dans la réglisse

Saponosides	
	<p>$R = H \longrightarrow$ Acide glycyrrhétinique (ou Enoxolone) (Sapogénine non naturelle, obtenue par hydrolyse de la glycyrrhizine)</p> <p>$R =$  \longrightarrow Glycyrrhizine</p>
Flavanones	
	<p>$R = H \longrightarrow$ Liquiritigénine</p> <p>$R =$  \longrightarrow Liquiritine</p>
Flavonols	
	Glyaspérine A
Isoflavonoïdes	
	<p>$R_1 = H \quad R_2 = H \longrightarrow$ Glyaspérine B</p> <p>$R_1 = H \quad R_2 = CH_3 \longrightarrow$ Glyaspérine C</p> <p>$R_1 = R_2 = CH_3 \longrightarrow$ Glyaspérine D</p>

Chalcones	
	$R = H \longrightarrow$ Isoliquiritigénine $R = $  \longrightarrow Isoliquiritine
	Tetrahydroxy-méthoxy-chalcone
Stilbène (Ptérocarpane)	
	1- Méthoxyphaseollidine
Coumarines	
	Isolicopyranocoumarine
	7,2',4'-trihydroxy-5-méthoxy-3-arylcoumarine
Alcaloïdes	
	$R = CH_3 \longrightarrow$ 5,6,7,8-tétrahydro-2,4-diméthylquinoline $R = H \longrightarrow$ 5,6,7,8-tétrahydro-4-méthylquinoline

2.2.2 Autres saponosides issus de la MTC

Compte tenu de la place importante des racines de réglisse dans la MTC et des nombreuses sources commerciales de glycyrrhizine, nous avons fait de ce

saponoside notre modèle de référence pour la mise au point de nos protocoles d'expérimentation. Néanmoins, il était nécessaire de vérifier si notre modèle et nos observations s'appliquaient également à d'autres saponosides de sources et de structures différentes. Il était nécessaire de choisir des saponosides d'origine naturelle employés en médecine traditionnelle et dont les sources commerciales sont disponibles et faciles d'accès. Pour les monodesmosides, nous avons choisi la soyasaponin I, l' α -hédérine et la β -escine que l'on retrouve à la fois dans des plantes européennes mais aussi dans des plantes de MTC. Pour les bidesmosides, nous avons opté pour les saponosides extraits de *Quillaja saponaria* qui est la principale source commerciale de saponosides sur le marché.

2.2.2.1 Soyasaponin I (127) (128)

Les soyasaponines sont des saponosides pentacycliques habituellement extraits du soja (*Glycine max* Merr.) mais que l'on peut également retrouver dans de nombreuses graines des plantes de la famille de *Fabaceae* comme la luzerne (*Medicago sativa* L.). Elles peuvent appartenir à trois groupes distincts (A,B et E) selon la structure de leur sapogénine. La soyasaponin I (Figure 23) appartient au groupe B, possédant le soyasapogénol B comme génine.

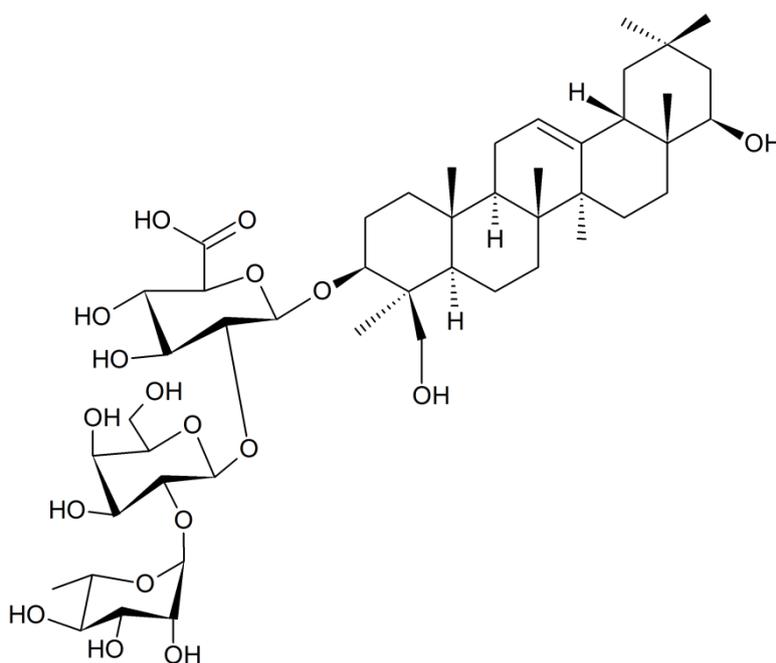


Figure 23 : Structure de la soyasaponin I

Le soja est une plante herbacée de la famille des *Fabaceae* présentant une grande diversité génétique. Cultivé en Chine depuis le XI^{ème} av J.-C., le soja est aujourd'hui cultivé globalement pour son utilisation en alimentaire. En effet, de nombreux aliments sont issus de sa culture comme le *miso*, la sauce soja, le *tofu*, le *nattō* et le

tempeh. En MTC le soja peut se présenter sous différentes formes : on retrouvera les graines de soja à différents degrés de fermentation (*Dan Dou Chi*) et de germination (*Da Dou Huang*), l'huile de soja (*Dou You*), le lait de soja (*Dou Fu Jiang*) mais aussi les feuilles (*Hei Da Dou Ye*) et les fleurs de soja noir (*Hei Da Dou Hua*). La forme la plus communément utilisée est la graine de soja fermentée (*Dan Dou Chi*) dans le rôle de drogue Ministre (*Chen*) ou Messenger (*Shi*) puisqu'on lui attribue des propriétés détoxifiantes et harmonisantes (120).

Pour ce projet de thèse, nous nous sommes procuré de la soyasaponin I (ou Bb) à partir d'extraits de graines de luzerne réalisés dans le cadre de travaux pratiques du Master Production et Valorisation des Substances Naturelles enseigné à l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims.

2.2.2.2 α -hédérine (129)

L' α -hédérine est un saponoside pentacyclique extrait du cumin noir (*Nigella sativa* L.) et du lierre grimpant (*Hedera helix* L.) (Figure 24).

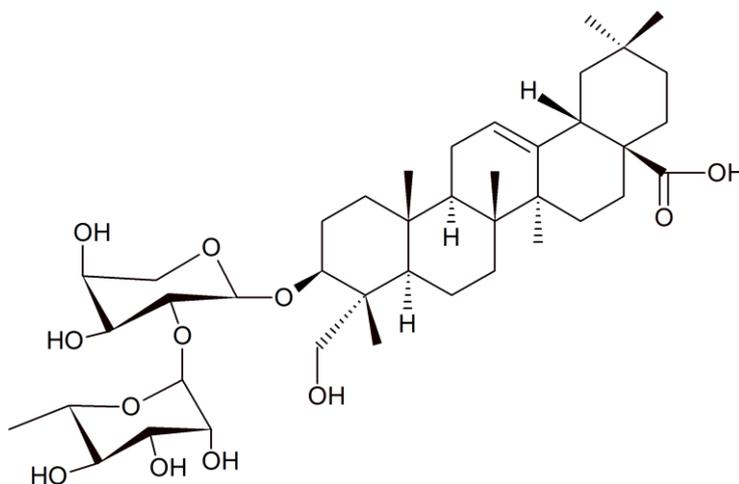


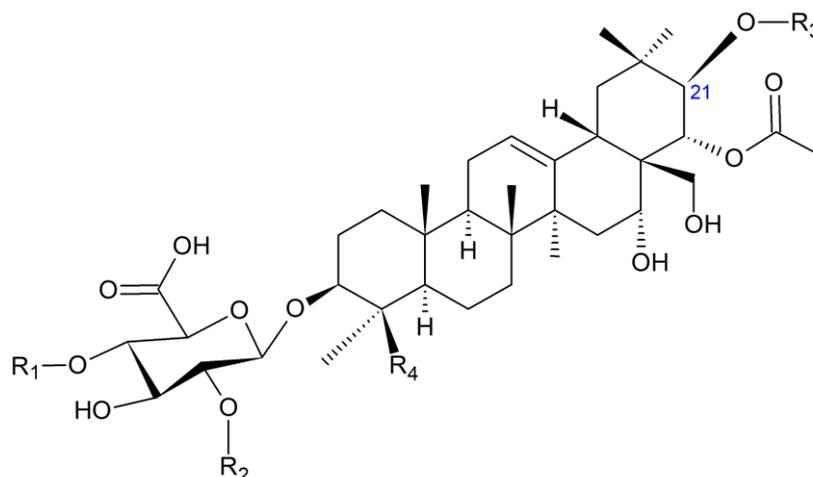
Figure 24 : Structure de l' α -hédérine

Le cumin noir est une plante herbacée de la famille des *Ranunculaceae* utilisée depuis l'Antiquité comme assaisonnement et plante médicinale. Originnaire du monde musulman, la plante est présente dans les écrits d'Avicenne pour le traitement des verrues et de la grippe. Elle est également utilisée en médecine ayurvédique comme stimulant, diurétique, emménagogue et vermifuge. Les graines broyées sont aussi utilisées pour traiter les éruptions cutanées. En MTC, les graines sont connues sous le nom de *Hei Zhong Cao Zi* et sont utilisées pour stimuler les cycles menstruels, activer la diurèse et éliminer les calculs rénaux. On attribue généralement à cette drogue le rôle de plante Ministre (*Chen*) ou Assistant (*Zuo*) (120).

Pour ce projet de thèse, l'α-hédérine provient de la société Extrasynthese®.

2.2.3 β-escine (130)

L'escine ou aescine est un mélange de saponosides pentacycliques anti-inflammatoires et vasoconstricteurs issus du fruit du marronnier d'Inde (*Aesculus hippocastanum* L.). Elle est composée d'un mélange de sapogénines de type protoaescigénine ou barringtogénol C, estérifiées en positions C₂₁ par l'acide tiglique (40%), l'acide angélique (33%), l'acide α-méthylbutyrique (15%) ou l'acide isobutyrique (10%) (Figure 25) (7).



R₁, R₂ = β-D-Glu, β-D-Gal ou β-D-Xyl

R₃ = Ac tiglique, ac angélique, ac α-méthylbutyrique ou ac isobutyrique

R₄ = CH₂OH (protoaescigénine) ou CH₃ (barringtogénol C)

Figure 25 : Composition de la β-escine

Néanmoins, le principal saponoside reconnu sous l'appellation de β-escine est le 3-O-[β-D-glucopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucuronopyranosyl]-21β-tigloyl-22α-acétylprotoaescigénine (Figure 26)

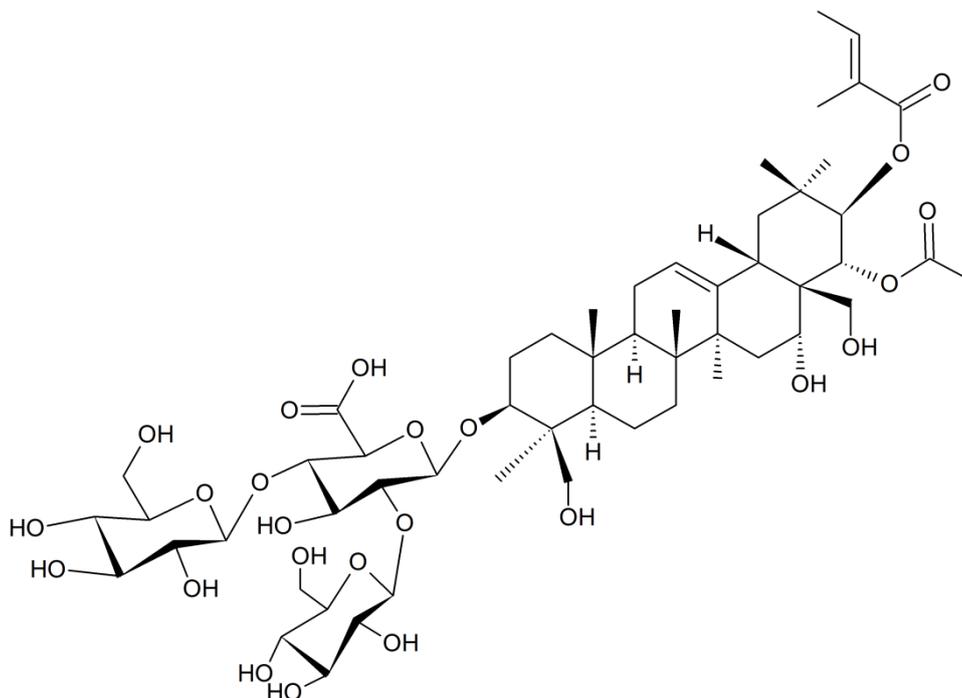


Figure 26 : Structure principale de la β -escine

Le marronnier d'Inde est un arbre de la famille des Sapindaceae principalement utilisé comme arbre d'ornement. Son écorce, ses fleurs et son fruit (les « marrons ») sont présents dans les pharmacopées traditionnelles depuis l'Antiquité. En Turquie, les graines étaient réduites en poudre pour soigner les maladies pulmonaires. En France, dès le XVIII^{ème} siècle, l'escine extraite de la graine entière permettait de traiter l'insuffisance veineuse, les varices, les phlébites ou les hémorroïdes. La graine du marronnier d'Inde est employée en MTC sous le nom de *Qi Ye Shu* et possède des propriétés diurétiques et anti-hémorragiques. On retrouve cette drogue dans les formulations de MTC dans le rôle de Ministre (*Chen*) ou d'Assistant (*Zuo*) (120).

Pour ce projet de thèse, la β -escine (Figure 26) que nous utilisons provient de la société Extrasynthese®.

2.2.4 Saponosides de *Quillaja saponaria* (131)

Les saponosides du Bois de Panama (*Quillaja saponaria* Molina) présentent une structure complexe pentacyclique et bidesmosidique (parfois tridesmosidique) (Figure 27).

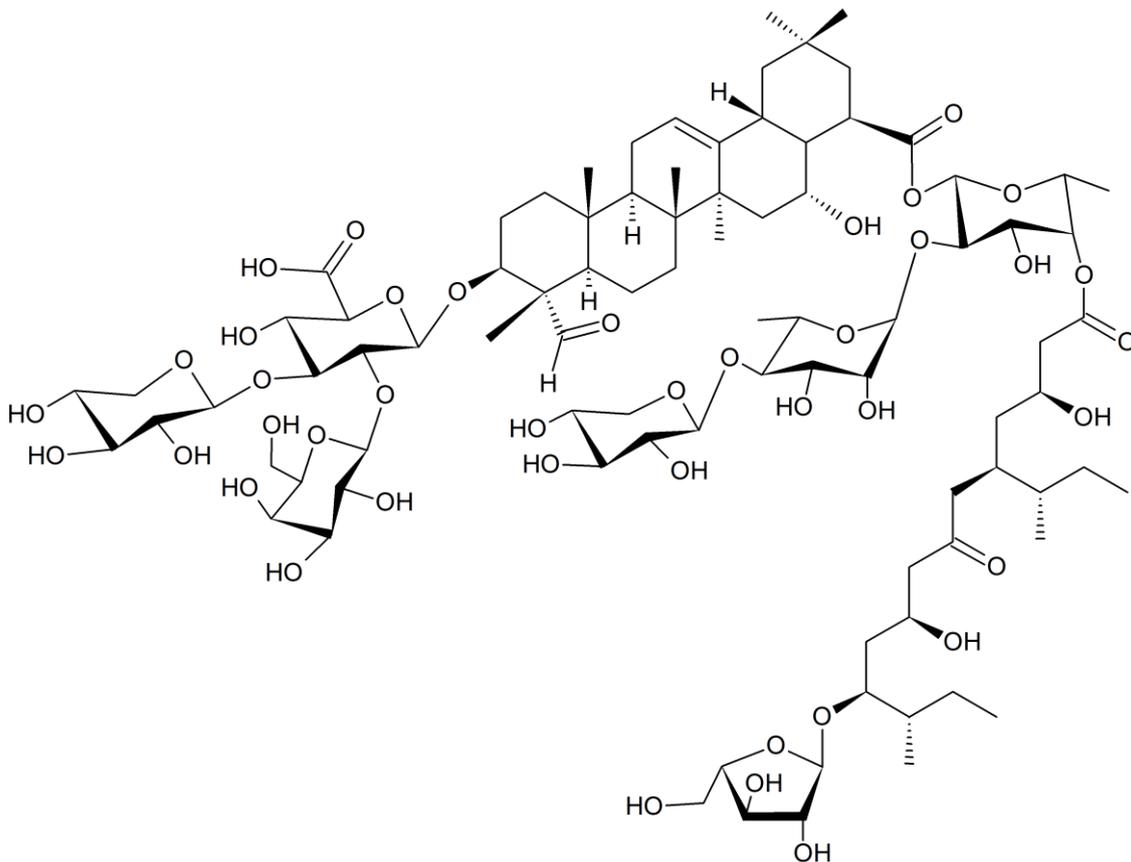


Figure 27 : Exemple de saponosides de *Quillaja saponaria* : QS-21

Quillaja saponaria est un arbre à feuillage persistant de la famille des *Quillajaceae* originaire d'Amérique du Sud. L'usage médical de cette plante se retrouve dans la population Andine qui l'utilisait pour traiter les problèmes pulmonaires. Son écorce riche en saponosides est connue sous le nom de Bois de Panama et ses extraits sont utilisés en alimentaire comme additif ou dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques comme agent moussant, émulsifiant ou adjuvant dans les vaccins.

Les saponosides de *Quillaja* utilisés dans ce projet de thèse proviennent de la dialyse sur membrane d'extraits de *Quillaja saponaria* fournis par Acros Organics®.

3 Biodisponibilité et absorption des substances naturelles (132)

Lors de la prise orale d'un médicament ou d'une substance active, seulement une faible proportion de la substance atteint la circulation sanguine. La biodisponibilité orale correspond au pourcentage de la dose orale qui atteint la circulation sanguine. Deux critères pharmacocinétiques l'influencent : l'absorption gastro-intestinale et le métabolisme hépatique.

Les critères physico-chimiques des molécules influenceront l'absorption à travers la barrière gastro-intestinale ainsi que l'interaction avec les protéines et enzymes du métabolisme. Les molécules hydrophiles se dissolvent facilement dans la lumière

intestinale mais rencontrent beaucoup de difficultés à passer les barrières cellulaires de la paroi. Inversement, les molécules hydrophobes se solubilisent difficilement mais ont une meilleure affinité avec les lipides membranaires et les transporteurs transmembranaires. Le contrôle de la biodisponibilité nécessite donc une optimisation de l'hydrophilie des molécules.

3.1 Absorption (133)

L'absorption est déterminée en grande partie par les propriétés physico-chimiques, la forme galénique et la voie d'administration des molécules. Quelle que soit la voie d'administration, les molécules doivent être solubilisées pour pouvoir être absorbées. Pour les formes solides prises par voie orale, que ce soit les comprimés de la médecine moderne ou les poudres et pilules des médecines traditionnelles, cela signifie également être capables de se désagréger et de se désintégrer.

Les molécules doivent passer de nombreuses barrières biologiques semi-perméables composées d'une matrice en bicouche lipidique avant de rejoindre la circulation systémique. Or les membranes cellulaires sont des barrières biologiques sélectives. Les substances actives peuvent néanmoins passer ces barrières cellulaires par quatre types de diffusion : la diffusion passive, la diffusion facilitée, le transport actif et la pinocytose

3.1.1 Diffusion passive (134)

Lors de la diffusion passive, les molécules traversent la membrane cellulaire en suivant la loi de Fick, c'est-à-dire que la diffusion a lieu le long d'un gradient de concentration du compartiment le plus concentré au compartiment le moins concentré, sans consommation d'énergie. Le taux de diffusion est alors proportionnel au gradient mais dépend tout de même de la solubilité des molécules pour la phase lipidique, de leur taille, de leur degré d'ionisation et de l'aire de la surface d'absorption. Puisque les membranes cellulaires sont de nature lipidique, ce sont les petites molécules lipophiles qui bénéficient le plus de la diffusion passive.

Lorsque les molécules sont sous forme non-ionique, elles sont en général liposolubles et diffusent facilement à travers la membrane cellulaire. Leur forme ionique est hydrophile et produit une grande résistance électrochimique bloquant la diffusion membranaire. Le pH du milieu et la constante de dissociation acide (pKa) des substances actives sont des paramètres clés pour déterminer la proportion de molécules sous leur forme non-ionique. Lorsque $\text{pH} = \text{pKa}$, les concentrations des formes ioniques et non-ioniques sont égales mais lorsque $\text{pH} < \text{pKa}$, la forme non-

ionique des acides faibles est prédominante. Si on considère un acide faible avec un pKa de 4.4 lorsqu'il se situe dans les fluides gastriques à un pH de 1.4, la forme non-ionique est majoritaire et favorise la diffusion passive à travers les membranes cellulaires. Lorsque cet acide faible rejoint la circulation plasmatique à un pH de 7.4, c'est sa forme ionique qui sera majoritaire, ce qui limitera sa diffusion. Pour une base faible de même pKa, les résultats seront inversés et la molécule sera sous forme ionisée dans les fluides gastriques.

3.1.2 Diffusion facilitée (134)

Certaines molécules hydrophiles comme les sucres ainsi que des molécules ionisées traversent également la membrane cellulaire par le biais de transporteurs membranaires. Il s'agit de protéines intrinsèques à la membrane cellulaire lipidique qui présentent la particularité d'être plus ou moins sélectives à la conformation spatiale des molécules ciblées. La diffusion facilitée bénéficie de deux types de transporteurs membranaires : les canaux transmembranaires et les protéines de transport (ou perméases) (Figure 28).

Les protéines de transport se combinent de manière réversible avec leur molécule substrat à l'extérieur de la membrane. Le complexe transporteur-substrat diffuse ensuite rapidement à travers la membrane et relâche le substrat de l'autre côté de la membrane. Les protéines de transport sont spécifiques à la conformation spatiale de leur substrat et sont présentes en nombre limité à la surface de la membrane. Le processus ne dépense pas d'énergie et le transport ne peut pas se réaliser à l'encontre du gradient de concentration.

Les canaux transmembranaires forment des pores dans la bicouche lipidique et sont formés par de grands complexes protéiques traversant la membrane cellulaire de part en part. Les canaux sont moins sélectifs que les protéines de transport et différencient les molécules cibles par leur taille et leur charge ionique plutôt que par leur conformation spatiale. Les canaux ne sont pas toujours actifs et nécessitent souvent un déclencheur pour déverrouiller ou verrouiller l'ouverture des pores. Ce déclencheur peut être de nature électrique (un changement de potentiel de membrane), chimique (un neurotransmetteur) ou mécanique.

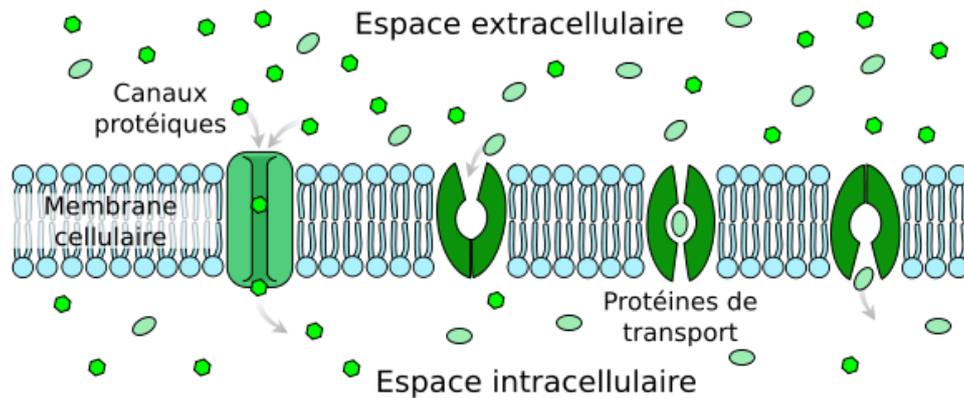


Figure 28 : Diffusion facilitée de petites molécules par canaux protéiques (à gauche) et protéines de transport (à droite) (135)

3.1.3 Transport actif (134)

Le transport actif permet le passage des molécules ioniques ou non-ioniques à travers la membrane cellulaire contre le gradient de concentration. Il s'agit d'un transport sélectif qui requiert la dépense d'énergie sous la forme d'adénosine triphosphate (ATP). Le caractère hautement sélectif de ce type de transporteurs transmembranaires limite leur utilisation dans le développement de nouvelles substances actives. Seules les molécules structurellement similaires aux substances endogènes (vitamines, sucres, acides aminés) sont reconnues.

3.1.4 Pinocytose (134)

La pinocytose est un mécanisme de transport particulier impliquant la formation de vésicules par invagination de la membrane cellulaire. Ce type d'endocytose permet l'absorption de fluides et de microparticules, et nécessite une dépense d'énergie.

Parmi les différents types de pinocytose, la forme la plus simple débute lorsque des filaments d'actine sont mobilisés pour déformer la membrane cellulaire afin de créer une poche englobant le fluide extracellulaire ou les microparticules ciblées. L'embouchure de la poche se pince pour rétablir l'intégrité de la membrane et former une vésicule intracellulaire nommée macropinosome de 0.5 à 5 μm de diamètre (Figure 29). Les autres formes de pinocytose nécessitent la présence de protéines membranaires spécifiques (exemple : endocytose clathrine¹⁵-dépendante, endocytose cavéole¹⁶-dépendante).

La pinocytose joue un rôle mineur dans l'absorption des médicaments mais joue tout de même un rôle dans l'absorption de certaines substances actives de type protéique.

¹⁵ Clathrine : protéine structurelle de l'enveloppe de certaines vésicules cellulaires

¹⁶ Cavéole : invagination lipidique de la membrane plasmique

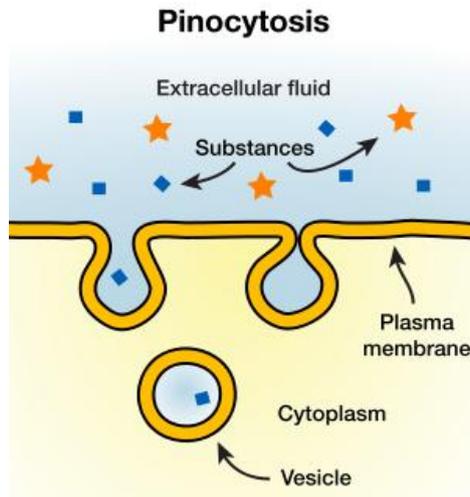


Figure 29 : Mécanisme de pinocytose et formation d'une vésicule dans le cytoplasme (136)

3.2 Absorption orale et tube digestif

Lors de la prise orale de substances actives, les molécules parcourent le tube digestif et sont soumises à de nombreuses enzymes de dégradation. Les principaux paramètres physiologiques jouant un rôle dans l'absorption des molécules par voie orale seront les variations du pH au cours de leur cheminement dans le tube digestif, les surfaces de contact avec les parois, la perfusion sanguine, la présence de bile et de mucus, et la nature des membranes épithéliales. Aux différentes étapes du tube digestif, les substances actives seront dégradées, transformées et/ou absorbées.

La muqueuse buccale est richement vascularisée et possède un épithélium fin favorisant l'absorption (137). Néanmoins le temps de contact est trop bref pour permettre une bonne absorption. Enfin, les enzymes salivaires ont peu d'activité, les plus efficaces étant l'alpha-amylase (catabolisme de l'amidon en maltose et dextrine) et la lipase linguale (hydrolyse des triglycérides en glycérides partiels et acides gras).

L'estomac possède une grande surface épithéliale mais est recouvert d'une couche de mucus épaisse qui limite l'absorption.

L'intestin grêle possède la plus grande surface de contact du tube digestif, sa membrane épithéliale est plus perméable que celle de l'estomac et son pH varie de 4-5 à l'entrée, atteignant 8 en arrivant au colon. Il s'agit du lieu privilégié de l'absorption des substances prises par voie orale et le lieu de nombreuses réactions enzymatiques (138). Du point de vue morphologique, il est composé de trois segments :

- Le duodénum se situe immédiatement à la suite de l'estomac et constitue le seul segment fixe de l'intestin grêle ainsi que le principal site d'absorption du

fer alimentaire. Le duodénum est aussi un site enzymatique important et reçoit les sécrétions de la vésicule biliaire, du foie et du pancréas contenant les lipases, les amylases et les trypsines nécessaires à la digestion de lipides, sucres et protéines.

- Le jéjunum est la partie centrale de l'intestin grêle. C'est une région hautement vascularisée, suspendue dans une membrane (mésentère) qui lui confère une grande mobilité. La paroi du jéjunum est recouverte par les villosités intestinales permettant l'absorption des nutriments dégradés dans le duodénum.
- L'iléon est la partie finale qui précède le colon. Bien que moins vascularisé, l'iléon participe également à l'absorption des nutriments non absorbés par le jéjunum comme le glycérol, des acides gras ou la vitamine B₁₂.

Le gros intestin est le dernier segment du tube digestif. Après le passage dans l'intestin grêle, presque tous les nutriments et substances actives ont déjà été absorbés par l'organisme et seulement quelques électrolytes comme le sodium, le magnésium ou le chlore sont encore disponibles à l'absorption.

Le microbiote intestinal est souvent considéré comme un organe à part entière compte tenu de sa très forte activité enzymatique. D'un point de vue physiologique, il participe au renouvellement de la muqueuse intestinale, à la vascularisation de l'épithéliale et à la taille des villosités. Ses fonctions digestives lui permettent de dégrader, transformer et synthétiser de nombreux acides aminés essentiels, des acides gras et des vitamines. Des études récentes démontrent également une interaction entre le microbiote intestinal et la biodégradation précoce des substances actives (139).

3.3 Vectorisation et absorption orale (1)

La voie d'administration orale d'un médicament est la plus naturelle et la moins contraignante, permettant de garantir la prise et l'observance du traitement. Cette voie est celle qui est privilégiée dans les médecines traditionnelles lors de la préparation d'infusions et d'autres préparations magistrales liquides (élixirs, macérations, émulsions) ou solides (pilules, poudres, gommages). Néanmoins, la plupart des molécules actives possèdent une faible disponibilité orale, ce qui limite leur potentiel thérapeutique. En effet, leur instabilité en milieu physiologique, leur dégradation en milieu acide stomacal et leur sensibilité aux enzymes digestives, s'opposent à leur administration par voie orale. De même, leur faible hydrosolubilité

et leur manque de traversabilité des membranes biologiques font qu'elles sont mal ou peu absorbées au niveau de la muqueuse intestinale.

Diverses solutions permettent d'améliorer cette biodisponibilité orale. Ainsi de nombreux moyens de vectorisation ont été développés par l'industrie pharmaceutique. Le but de cette vectorisation est de limiter la dégradation des substances actives par les fluides et enzymes digestifs, par l'administration simultanée d'inhibiteur ou par l'ajout de systèmes gastro-résistants. La technique consiste à piéger la molécule active dans un vecteur particulaire d'une taille de quelques nanomètres à quelques micromètres. Ces particules sont ensuite dispersées dans un milieu liquide adapté.

Les vecteurs particuliers consistent à piéger les substances actives dans des systèmes stables pour optimiser leur cinétique de dissolution et favoriser leur absorption à travers la muqueuse intestinale. Ces vecteurs doivent respecter diverses contraintes pour un usage pharmaceutique afin d'éviter les réactions toxiques, immunogènes ou inflammatoires et limiter leur accumulation dans l'organisme.

Les vecteurs particuliers à base de lipides comme les liposomes, les nanoparticules solides à base de lipides ou les nanocapsules de lipides, présentent l'avantage d'être constitués essentiellement d'une bicouche phospholipidique peu ou pas toxique à l'intérieur desquelles les substances actives sont dispersées. Ces vecteurs démontrent une grande capacité à promouvoir l'absorption mucosale des substances actives mais sont facilement déstabilisés dans le tractus digestif en absence d'un polymère hydrophile à la surface de leur paroi.

Les vecteurs particuliers à base de polymères se présentent sous forme de nanosphères constituées d'une matrice polymère continue dans laquelle la substance active est dispersée. Les polymères employés sont généralement issus de la synthèse chimique : comme les polycyanoacrylates d'alkyles ou les copolymères des acides lactiques et glycoliques, mais peuvent parfois être d'origine naturelle : comme les polysaccharides gélifiants tels que le chitosane, l'alginate ou l'acide hyaluronique.

Les vecteurs particuliers adhésifs permettent d'immobiliser les substances actives à la surface de la muqueuse intestinale pour une libération au plus proche du site d'absorption. La fixation du vecteur se fait soit au niveau épithélial soit au niveau du

mucus et se base essentiellement sur des interactions électrostatiques, hydrophobes, de Van der Waals ou des liaisons hydrogène. Les polymères hydrophiles de haute masse molaire comme le chitosane ou le polyéthylène glycol sont couramment employés comme vecteur adhésif, de même que certains dérivés thiolés capables de former des ponts disulfures avec les régions riches en cystéine du mucus. D'autres vecteurs peuvent aussi être synthétisés en greffant des ligands en surface de nanoparticules afin de cibler spécifiquement certains récepteurs membranaires des cellules épithéliales.

Pour les vecteurs particulaires, l'absorption intestinale en elle-même peut se faire par trois voies différentes : diffusion entre deux cellules épithéliales adjacentes (voie paracellulaire), absorption par les entérocytes (voie transcellulaire) ou capture par les cellules M présentes dans les tissus lymphoïdes de l'intestin (voie lymphatique) (Figure 30).

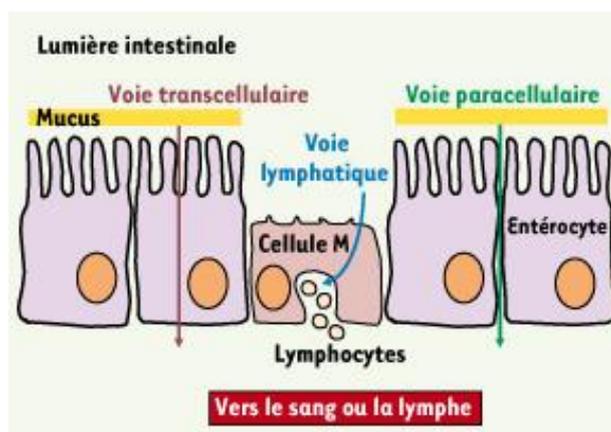


Figure 30 : Les trois voies du passage des systèmes particulaires à travers l'épithélium intestinal (140)

4 Conclusion et objectifs

L'un des objectifs de ce projet de thèse serait ainsi de pouvoir proposer les saponosides comme vecteurs d'origine naturelle pour le transport transmembranaire de substances actives. En théorie, les saponosides devraient se comporter comme les vecteurs particulaires à base de lipides : la micellisation « piègeant » les substances actives hydrophobes au sein du complexe micellaire, puis le caractère hydrophile de la couche extérieure de la micelle facilitant le passage membranaire de la substance active par la voie transcellulaire. Néanmoins, contrairement aux vecteurs particulaires, les agrégats micellaires ne constituent pas des capsules ou des nanosphères solides puisque divers facteurs environnementaux (température, pH, CMC, etc.) influencent constamment leur stabilité. Afin d'évaluer l'impact des saponosides sur l'absorption et la solubilisation des substances actives, nous

proposons de suivre l'influence des saponosides, de la tensioactivité et des agrégats micellaires sur le coefficient de partage et la biodisponibilité des substances actives.

Chapitre III : Développement d'une méthode de mesure du coefficient de partage par RMN ¹H

1 Généralités et définition

Lors de la conception de médicaments, de nombreux paramètres permettent de prédire la viabilité et la biodisponibilité d'un candidat médicament pour la voie orale. Les règles de Lipinski développées par Pfizer en 1997 (141) considèrent quatre paramètres à cet effet :

- Un nombre de liaisons donneuses d'hydrogène (nombre total de liaison azote-hydrogène et oxygène-hydrogène) inférieur à cinq,
- Un nombre de liaisons accepteuses d'hydrogène (nombre total d'atome azote et d'oxygène) inférieur à dix,
- Une masse moléculaire inférieure à 500 daltons,
- Un coefficient de partage exprimé en log P inférieur à 5.

Ce dernier paramètre correspond au ratio (noté P ou K_{ow}) des concentrations d'une molécule sous sa forme non-ionisée entre une phase aqueuse (hydrophile) et une phase organique (lipophile) à l'équilibre (142). Le coefficient de partage est un bon indicateur du caractère lipophile d'une molécule et se mesure en général en utilisant l'octanol comme solvant organique non miscible à l'eau. Afin de mieux comparer les valeurs obtenues, on l'exprime souvent sous sa forme logarithmique (log P ou log K_{ow}) (Équation 3).

$$\log_{10} P = \log_{10} \frac{C(\text{octanol})}{C(\text{water})}$$

Équation 3 : Coefficient de partage

Plus le log P est bas et négatif, plus la molécule est hydrophile tandis qu'un log P élevé correspond à une forte lipophilicité.

En dehors des produits pharmaceutiques, le coefficient de partage est utilisé dans les sciences environnementales pour prédire le devenir des Polluants Organiques Persistants (POP) (143) ou lors de la conception d'insecticides et d'herbicides (144). En effet, les molécules présentant une valeur élevée de log P ont tendance à se concentrer dans les tissus vivants (cerveau, foie, tissu adipeux) des organismes par bioaccumulation, augmentant leur l'impact environnemental et leur toxicité.

En métallurgie, le coefficient de partage permet de déterminer le degré d'impuretés distribuées entre le métal fondu et le métal solidifié. Il s'agit d'un paramètre critique lors du raffinage par zone fondue permettant de purifier les composés cristallisés stables à la fusion (145).

Le coefficient de partage est également utilisé en biologie pour estimer la distribution d'une substance à l'intérieur d'une cellule, entre la membrane (lipophile) et le cytosol (hydrophile).

2 Méthodes conventionnelles de mesure du coefficient de partage

La mesure du coefficient de partage peut se réaliser de diverses manières. L'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE) propose trois méthodes standardisées :

- La méthode par agitation en flacon (146)
- La méthode par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) (147)
- La méthode par brassage lent (148)

Néanmoins, d'autres méthodes viennent s'ajouter à ces méthodes « de référence ». On peut par exemple citer les méthodes pH-métriques (149), de voltampérométrie cyclique (150), de Chromatographie de Partage Centrifuge (151), et des méthodes employant l'outil *in silico* (152) qui se basent généralement sur les relations quantitatives structure-activité (ou QSAR pour *Quantitative structure-activity relationship*) pour déterminer la contribution de chaque groupe fonctionnel, type de liaison ou fragment de molécule.

Cependant la grande variété de méthodes disponibles engendre des variations dans les valeurs de log P attribuées aux nombreux paramètres (température, saturation des phases, miscibilité, pureté des solvants, état d'équilibre, pH, etc) qui peuvent perturber les conditions de mesure (153).

2.1 Méthode par agitation en flacon (146)

La méthode par agitation en flacon (aussi appelée *shake flask method*) permet de déterminer expérimentalement une valeur de log P théorique comprise entre -2 et +4 pour des substances non tensio-actives. La substance à étudier est solubilisée dans la solution biphasique octanol/eau puis agitée mécaniquement ou à la main. Après un temps de repos permettant d'atteindre l'équilibre, les deux phases sont séparées par centrifugation puis analysées individuellement par une technique d'analyse spécifique à la substance étudiée. Si les conditions optimales d'utilisation (pression,

température, qualité des solvants...) ont été respectées, la concentration du produit de chaque phase permet de calculer l'Équation 3.

La méthode par agitation en flacon est souvent considérée comme la méthode de référence pour la mesure de coefficient de partage car elle présente l'avantage d'être simple d'utilisation, reproductible et facilement automatisable, à condition d'être appariée à une technique analytique facile d'emploi. Néanmoins, sa forte sensibilité aux conditions expérimentales la rend vulnérable à la formation de microgouttelettes d'octanol dans la phase aqueuse pouvant perturber les mesures de concentration.

2.2 Méthode par Chromatographie Liquide Haute Performance à polarité de phases inversée (CLHP) (147)

La mesure du coefficient de partage par CLHP à polarité de phases inversée ne nécessite aucune séparation ou partage de phase. Après injection, les substances ne sont pas retenues selon leur coefficient de partage octanol-eau, mais par leur coefficient de partage hydrocarbure-eau au sein de la colonne chromatographique. A partir du temps de rétention (t_r) et du temps mort du solvant (t_0), on déterminera le facteur de capacité k selon l'Équation 4

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Équation 4 : Expression du facteur de capacité k

Puis à partir du facteur de capacité, il est possible de calculer expérimentalement le $\log P$ d'une molécule par l'Équation 5

$$\log_{10} P = a + b \times \log_{10} k$$

Équation 5 : Coefficient de partage en fonction de k

Les coefficients a et b sont les coefficients de régression linéaire déterminés à partir d'une courbe de calibration. Celle-ci s'obtient en mesurant les $\log P$ et les facteurs de capacité de substances de référence qui ont des $\log P$ théoriquement proches de celui de la molécule testée pour une colonne donnée. La ligne directrice de l'OCDE recommande de tracer cette courbe d'étalonnage en utilisant au moins six points. En pratique, six à dix substances de référence seront injectées simultanément pour calculer le $\log P$. L'équation de régression doit ensuite être exécutée régulièrement pour prendre en compte les modifications de performance de la colonne.

La méthode par CLHP couvre les plages de $\log P$ allant de zéro à six (molécules lipophiles) des substances non-ionisées. Les colonnes utilisées sont généralement

des colonnes analytiques en phase silice greffées par des chaînes C₈ ou C₁₈, et la phase mobile la plus couramment employée est un mélange méthanol/eau (3 : 1) en mode élution isocratique. La méthode reste cependant sensible à la nature de la phase mobile et aux impuretés. De plus, elle n'est pas applicable aux bases ou acides forts, aux complexes métalliques ou aux agents tensio-actifs, et dépend grandement de la qualité du graphique d'étalonnage.

2.3 Méthode par brassage lent (148)

Le brassage lent (ou *slow-stirring*) permet de déterminer des log P de valeurs supérieures ou égales à 5. Son principal avantage sur la méthode par agitation en flacon est de pouvoir réduire les surestimations de mesure engendrées par la formation de microgouttelettes d'octanol en phase aqueuse. Avant le début des expériences, la phase aqueuse est placée dans un large récipient thermostaté. La substance étudiée (lipophile) est ensuite solubilisée dans la phase octanolique puis ajoutée au système en prenant soin d'éviter un mélange turbulent. Par exemple, la phase octanolique sera versée à l'aide d'une pipette sur la paroi du récipient contenant la phase aqueuse. L'agitation en elle-même se fera lentement et de manière progressive de manière à créer un vortex de 2,5 cm maximum de profondeur à l'interface des deux phases. La minutie de ces opérations produit un temps d'équilibre d'au minimum un jour. De plus, chaque prélèvement doit être espacé d'au moins cinq heures pour ne pas perturber l'agitation du système. La ligne directrice de l'OCDE recommande également de réaliser un groupe de trois essais consécutifs pour s'assurer que l'équilibre était atteint au moment des prélèvements.

Comme pour la méthode par agitation en flacon, les conditions expérimentales de pression, de température et de pureté des solvants doivent être scrupuleusement contrôlées pour ne pas perturber le partage de la substance étudiée. Pour ces raisons, la méthode par brassage lent est particulièrement chronophage et donc peu adaptée aux mesures rapides de coefficients de partage.

3 Nouvelle méthode de mesure par Résonance Magnétique Nucléaire

Une méthode innovante de mesure du coefficient de partage par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) a été mise au point afin de suivre l'évolution du coefficient de partage de métabolites naturels au contact de divers saponosides. Cette nouvelle méthode fait l'objet d'une publication en cours de révision dans l'*European Journal of Medicinal Chemistry*. Les développements suivants permettent

de résumer cette publication et d'apporter davantage de précisions concernant la conception et l'optimisation de la méthode.

3.1 Introduction

Lors de la conception de nouveaux médicaments, l'étude de la lipophilicité prend une dimension particulière au sein des études de pharmacocinétique (*cf.* chapitre II). Le passage de la barrière intestinale constitue en effet une étape clé des études d'ADME (Absorption-Distribution-Métabolisme-Elimination). La biodisponibilité orale de ces nouvelles drogues peut ainsi être en partie prédite en étudiant le coefficient de partage en log P (voir les règles de Lipinski précédemment citées).

Le développement de nouveaux outils universels de mesure du coefficient de partage, performants et plus simples est ainsi devenu fondamental. Il est désormais possible de compléter les trois méthodes proposées par l'OCDE par des méthodes employant la RMN liquide. Ces techniques emploient généralement des variations de la méthode par agitation en flacon. On peut citer les études mettant en avant des techniques « sans deutérium », celles proposant une fragmentation virtuelle après une suppression du signal de solvant, ou celles combinant l'approche RMN avec les prédictions *in silico*. Deux études récentes proposent également l'utilisation de logiciels particuliers comme l'outil CRAFT (*Complete Reduction to Amplitude-Frequency Table*) de Varian® pour extrapoler les concentrations des molécules dans les différentes phases directement à partir des spectres (*cf.* « Introduction » de la publication).

3.2 Optimisation de la méthode

Le protocole de préparation des échantillons a connu différents aménagements avant celui présenté dans la publication (*cf.* « The NMR method » de la publication).

3.2.1 Préparation des échantillons

Dans un premier temps, nous voulions suivre la méthode décrite par Cumming et al. (154) (*cf.* référence 15 de la publication) qui consiste à utiliser la méthode par agitation directement dans des tubes RMN en utilisant le D₂O comme solvant, puis de comparer, dans la phase aqueuse, les intégrales des signaux de la molécule analysée avant et après le partage dans l'octanol (Figure 31).

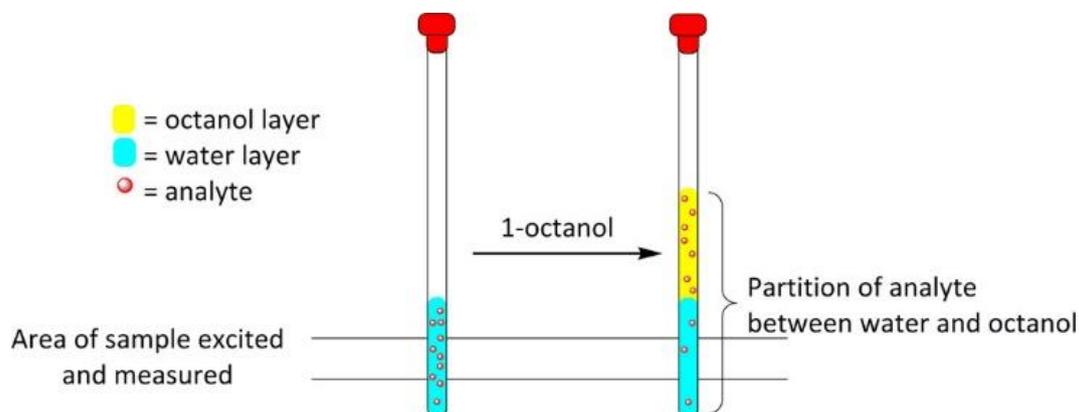


Figure 31 : Schéma du partage d'un analyte entre phase aqueuse et phase octanol (155)

Le coefficient de partage de l'analyte se retrouve en appliquant l'Équation 6.

$$\log P = \log \frac{C(\text{octanol})}{C(\text{water})} = \log \frac{C_w - C_{wo}}{C_{wo}}$$

Équation 6 : Calcul du coefficient de partage à partir des concentrations d'analyte en phase aqueuse

Avec C_w la concentration de l'analyte dans la phase aqueuse avant le partage, et C_{wo} sa concentration dans la phase aqueuse après son partage contre l'octanol. Or l'étroitesse des tubes ne permettait pas un mélange homogène des échantillons et une bonne séparation des phases.

Nous avons donc déplacé le mélange des échantillons dans des piluliers en verre de 5 mL. Dans la première version de notre protocole, 2 mg de la molécule à étudier étaient solubilisés dans 1 mL de D₂O puis séparés en deux solutions de 500 µL. La première solution permet de constituer le tube RMN A qui nous donnera la concentration de l'analyte en phase aqueuse C_w . La seconde solution est partagée contre 500 µL d'octanol et laissée au repos pendant 24h pour obtenir l'équilibre des phases. Les 500 µL de cette nouvelle phase aqueuse sont récupérés pour préparer le tube RMN B qui nous donnera la concentration C_{wo} . Dans cette première version du protocole, la séparation des phases contre l'octanol n'était pas optimale à cause de la faible différence de volume : un trop gros volume résiduel d'octanol était prélevé avec la phase aqueuse. Pour corriger ce défaut, la molécule étudiée est désormais solubilisée dans un plus gros volume de départ (1.5 mL) pour permettre un partage sur un plus gros volume de phase aqueuse (700 µL) avant de prélever les 500 µL nécessaires pour préparer le tube RMN B. Par ailleurs, dans le cas de molécules peu solubles dans l'eau, les résidus non dissous perturbent la prise des mesures, c'est pourquoi l'échantillon de départ passe au bain à ultrasons avant une étape de filtration utilisant un filtre seringue pour HPLC de la marque Machery-

Nagel® (pores de 0.45 µm de diamètre) (cf Figure 1 de la publication). Enfin, pour améliorer davantage le mélange et la séparation des phases, le partage contre l'octanol se fait désormais dans des microtubes *Eppendorf*® à fond conique permettant la centrifugation de l'échantillon.

3.2.2 Quantification

3.2.2.1 Utilisation du sel de triméthylsilylpropanoate de sodium comme étalon interne

Pour mesurer la concentration relative de la molécule testée, la méthode de référence de Cumming se base essentiellement sur une comparaison des intégrales entre les deux tubes. Dans l'application de cette méthode, nous avons également ajouté un étalon interne à base du sel de triméthylsilylpropanoate de sodium (TSP) (50 µL d'une solution à 1 g/L) directement dans les tubes RMN afin de mesurer plus précisément les concentrations en analyte dans chaque tube. Nos premiers essais ont porté sur la (+)-catéchine, un flavanol qui a été choisi pour sa bonne solubilité dans l'eau et son log P médian (0.51). Notons que les signaux des protons H6 et H8 ont tendance à disparaître des spectres à cause de leurs échanges partiels avec le deutérium du milieu (156) (Figure 32).

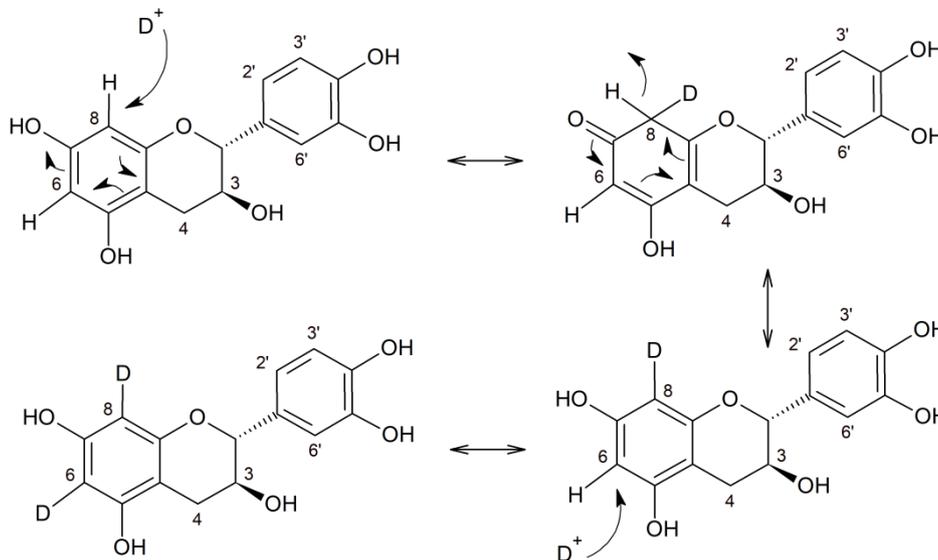


Figure 32 : Echange des protons H6 et H8 de la (+)-catéchine avec le deutérium

Son spectre dans le tube A (avant partage) permet de localiser les principaux signaux de référence de la molécule (Figure 33).

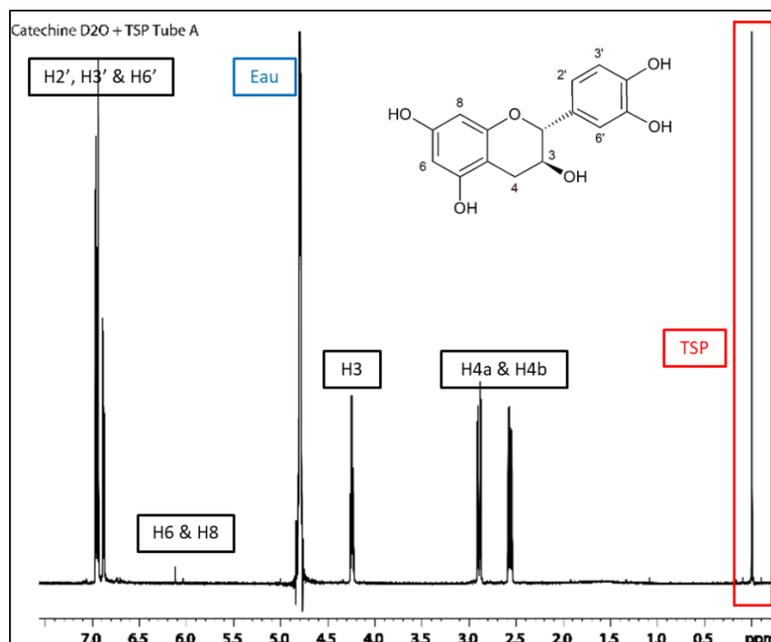


Figure 33 : Spectre ^1H RMN de la catéchine dans le D_2O avant le partage contre l'octanol (tube A)

Après le partage avec la phase octanol, le spectre de la catéchine est toujours détectable (Figure 34) mais la forte présence des signaux de l'eau et de l'octanol peut rendre difficile la mesure des concentrations, surtout si on envisage d'employer cette méthode avec des molécules plus hydrophobes et moins solubles en phase aqueuse.

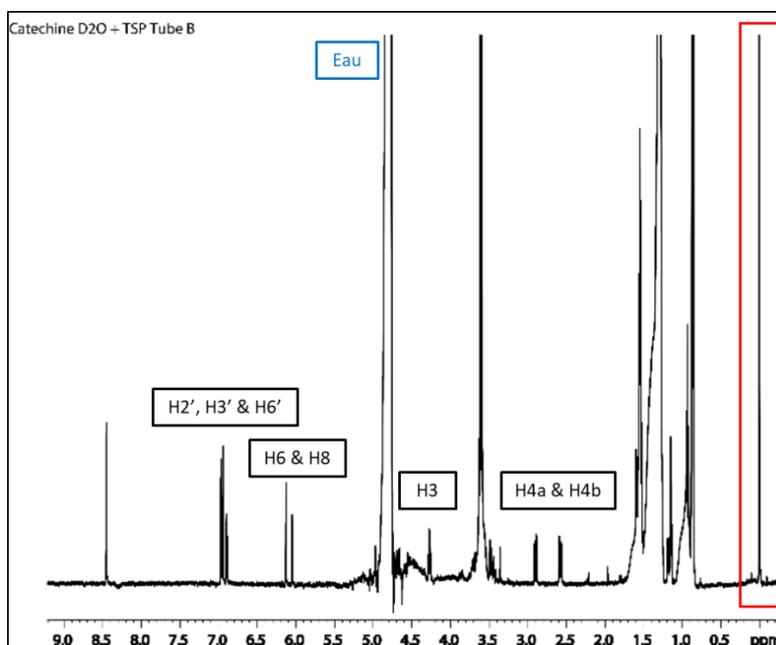


Figure 34 : Spectre ^1H RMN de la catéchine dans le D_2O après le partage contre l'octanol (tube B)

En se basant sur le signal du TSP et en calibrant sa valeur d'intégrale à 100.00 dans les tubes A et B, il devient possible de calculer les concentrations C_w et C_{wo} à partir de l'Équation 6 (Tableau 6)

Tableau 6 : Mesure du log P de la (+)-catéchine par étalon interne

	Protons sélectionnés		
	H2', H3' & H6'	H3	H4a & H4b
Valeurs d'intégrale tube A (I_w)	349.24	112.83	231.06
Valeurs d'intégrale tube B (I_{wo})	41.20	21.39	31.88
$\log P = \log \frac{I_w - I_{wo}}{I_{wo}}$	0.87	0.63	0.80

En utilisant cette méthode de calcul on obtient pour la (+)-catéchine un log P moyen de 0.77 qui est une valeur surévaluée par rapport à sa valeur dans la littérature (0.51). De plus, le signal du proton H3 est perturbé par sa proximité avec le signal de l'eau dans le tube B.

Afin de pouvoir diminuer le signal de l'eau et optimiser le rapport signal/bruit des molécules testées, nous avons opté pour l'utilisation d'un mélange H₂O/D₂O (90/10) comme solvant principal puisqu'il était possible de le coupler avec des méthodes de suppression du signal de l'eau. Nous avons d'abord employé la suppression du signal de l'eau par présaturation via la séquence de pulse zgpr (Figure 35).

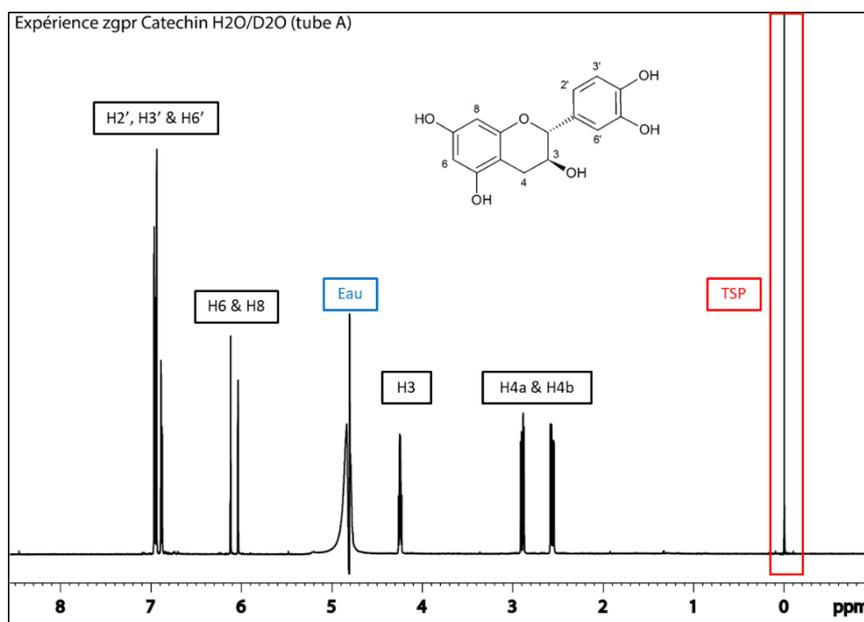


Figure 35 : Spectre ¹H RMN de la catéchine dans H₂O/D₂O (90/10) avant le partage contre l'octanol via la séquence de présaturation du signal de l'eau (tube A)

Par la suite, la méthode de suppression du signal de l'eau par excitation sculptée nous a permis de réduire davantage le signal de l'eau (Figure 36).

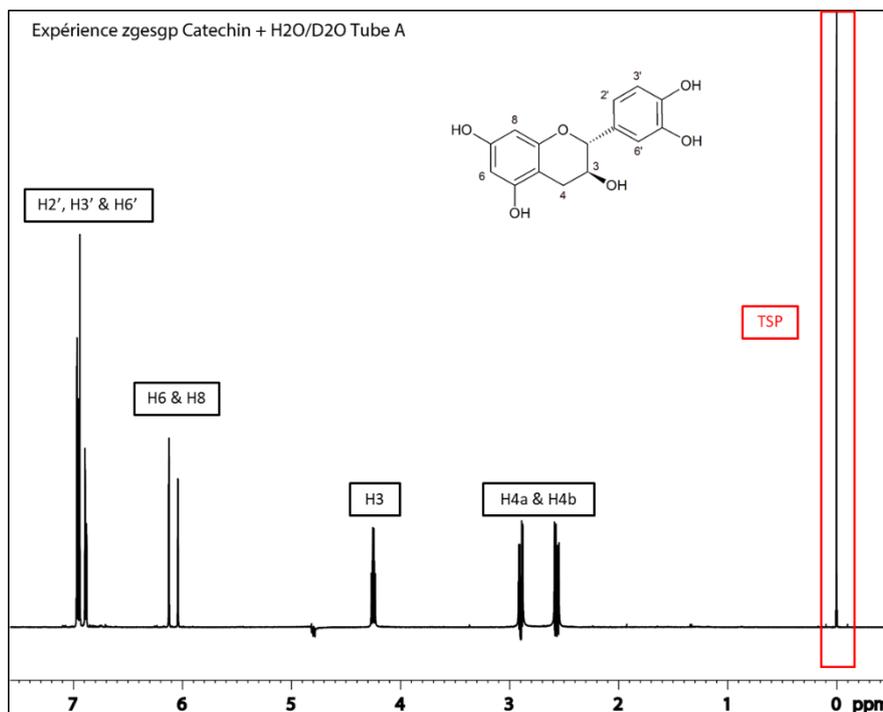


Figure 36 : Spectre ^1H RMN de la catéchine dans $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90/10) avant le partage contre l'octanol via la séquence d'excitation sculptée du signal de l'eau (tube A)

Cette méthode emploie la séquence de pulse zgesgp. Cette expérience d'écho de spin permet d'insérer un pulse de 180° entre deux gradients. Après l'excitation initiale, les deux champs de gradient déphasent les cohérences sur la bande de fréquence du signal de l'eau tout en limitant les distorsions de la ligne de base.

En appliquant la suppression du signal de l'eau par excitation sculptée avec l'étalon interne au TSP on obtient les résultats consignés dans le Tableau 7

Tableau 7 : Mesure du $\log P$ de la (+)-catéchine par étalon interne après suppression du signal de l'eau par excitation sculptée

	Protons sélectionnés		
	H2', H3' & H6'	H3	H4a & H4b
Valeurs d'intégrale tube A (I_w)	270.64	80.65	153.64
Valeurs d'intégrale tube B (I_{wo})	87.83	23.62	55.77
$\log P = \log \frac{I_w - I_{wo}}{I_{wo}}$	0.32	0.38	0.24

En utilisant cette méthode de calcul on obtient pour la (+)-catéchine un $\log P$ moyen de 0.31 qui est une valeur sous-évaluée par rapport à sa valeur dans la littérature (0.51).

3.2.2.2 Utilisation de ERETIC 2

Par la suite, l'utilisation de l'outil ERETIC 2 (*Electronic REference To access In vivo Concentrations*) nous a permis de retirer le TSP de notre protocole pour mesurer les variations de concentration. En effet, cet outil propre au logiciel Topspin de Bruker® permet de comparer les concentrations d'une molécule entre deux tubes RMN à l'aide d'un étalon interne virtuel pour corréler les intensités absolues de deux spectres (157). A partir d'une concentration de référence C_{ref} , il devient possible de calculer des concentrations inconnues C_{unk} à partir de l'Équation 7

$$C_{unk} = k C_{ref} \frac{I_{unk} T_{unk} \theta_{unk} n_{ref}}{I_{ref} T_{ref} \theta_{ref} n_{unk}}$$

Équation 7 : Calcul d'une concentration inconnue par l'outil ERETIC 2

Avec :

I : les valeurs d'intégrales,

T : la température,

θ : la durée des impulsions,

n : le nombre de transitions utilisé dans les expériences

k : un facteur de correction.

En pratique, T , θ , n et k sont automatiquement pris en compte par le logiciel de Bruker®. Lors du calcul du coefficient de partage par l'Équation 6, on remplacera C_w par C_{ref} (à laquelle on attribue la valeur relative de 100%), et C_{wo} par C_{unk} dont les valeurs sont données par l'outil ERETIC 2 (Équation 8)

$$\log P = \log \frac{C(\text{octanol})}{C(\text{water})} = \log \frac{100 - C_{unk}}{C_{unk}}$$

Équation 8 : Calcul du coefficient de partage en fonction de C_{unk}

En appliquant l'outil ERETIC aux précédents spectres de la (+)-catéchine, on obtient les résultats du Tableau 8.

Tableau 8 : Mesure du log P de la (+)-catéchine par l'outil ERETIC2 après suppression du signal de l'eau par excitation sculptée

	Protons sélectionnés		
	H2', H3' & H6'	H3	H4a & H4b
Valeurs ERETIC2 tube B (C_{unk})	25.54	20.61	24.33
$\log P = \log \frac{100 - C_{unk}}{C_{unk}}$	0.46	0.59	0.49

En utilisant cette méthode de calcul on obtient pour la (+)-catéchine un log P moyen de 0.51 similaire à la valeur de la littérature.

3.2.2.3 Validation de la méthode

Pour résumer, notre approche propose une méthode polyvalente et simple de mesure du coefficient de partage par RMN du proton. La préparation des échantillons se réalise dans un mélange H₂O/D₂O (90/10) et la mesure des concentrations se réalise en deux étapes : avant (tube A) et après (tube B) le partage dans l'octanol. La différence entre ces concentrations permettra de calculer la quantité de produit qui est passée de la phase aqueuse à la phase octanol. La suppression du signal de l'eau emploie la séquence de pulse zgesgp basée sur l'excitation sculptée. Une fois le spectre RMN obtenu, l'outil ERETIC 2 est utilisé pour évaluer la concentration relative de l'échantillon entre les tubes A et B.

Cette nouvelle méthode de mesure a été testée sur la catéchine puis sur une vingtaine de métabolites secondaires et substances actives médicamenteuses pour évaluer la portée de la méthode sur une plus large plage de coefficients de partage (cf Table 1 de la publication). Les molécules sélectionnées appartiennent à diverses classes de métabolites secondaires ou sont des substances actives thérapeutiques utilisées dans de nombreux médicaments. Dans un souci de comparaison et de généralisation, nous avons également évalué le coefficient de partage de quelques molécules médicamenteuses de synthèse comme le paracétamol¹⁷ ou le zolmitriptan¹⁸.

Afin de valider la répétabilité de la méthode, le coefficient de partage de trois séries de cinq échantillons de catéchine a été mesuré par notre méthode (cf Table 2 de la

¹⁷ Paracétamol (ou acétaminophène) : médicament dérivé de l'acide phénolique à activité antalgique et antipyrétique

¹⁸ Zolmitriptan : médicament de la famille des triptans agoniste sélectif de la sérotonine utilisé dans le traitement des crises migraineuses

publication) et les résultats ont subi une analyse de variance (par ANOVA) en utilisant la table de distribution de Fisher-Snedecor (*cf* Tables 3 et 4 de la publication). Avec une marge d'erreur de 5%, l'analyse statistique des résultats confirme l'homoscédasticité des variances qui est représentative de la répétabilité inter et intra groupe de la méthode.

3.3 Limite quantitative de la méthode

Cette méthode de mesure du coefficient de partage par RMN du proton est parfaitement adaptée à l'étude de métabolites naturels. Néanmoins, certains paramètres doivent être pris en compte avant de l'appliquer.

Dans un premier temps, il est important de travailler sur une solution homogène. Celle-ci s'obtient en général en ajoutant une étape de filtration de la solution avant le partage contre l'octanol. Cette étape permet d'éliminer les agrégats non dissous de la solution qui sera analysée par RMN. Par ailleurs, puisque l'outil ERETIC2 permet d'évaluer une concentration relative, il n'est plus nécessaire de connaître les concentrations exactes de métabolites dans chaque tube.

Dans un second temps, il est nécessaire que les métabolites testés génèrent des signaux suffisamment intenses en phase aqueuse pour être traités en RMN. Pour ce faire nous avons choisi de travailler avec au moins 2 mg de métabolite dans la solution de départ. Néanmoins, les signaux sont également lisibles pour de plus basses concentrations (jusqu'à 0.5 mg/mL). Ce paramètre est également la raison pour laquelle les molécules particulièrement hydrophobes ou insolubles dans l'eau ne peuvent pas être étudiées par cette méthode : la quantité de produit restant en phase aqueuse est insuffisante pour générer des spectres RMN utilisables avec un rapport signal sur bruit d'au moins 10 :1.

3.4 Conclusion

Cette nouvelle approche emploie les divers bénéfices de la technologie RMN pour l'appliquer à la mesure des coefficients de partage. Les spectres ont été acquis directement sur la phase aqueuse avant et après le partage de phase. Cette méthode de préparation présente de nombreux avantages :

- Seulement deux prises de mesure par molécule
- Faible quantité de produit nécessaire : 2 mg ou moins
- Aucune nécessité d'ajouter un étalon interne

- Faible quantité de solvant deutéré utilisée pour la suppression du signal de l'eau dans le mélange H₂O/D₂O (90/10) : pour une molécule seulement 150 µL de D₂O est nécessaire
- Temps d'analyse de seulement 5 minutes (8 scans pour 2 mg de molécule) par tube RMN

De plus, la grande sensibilité de la RMN permet d'identifier aisément la plupart des molécules testées. Enfin, la suppression du signal de l'eau par excitation sculptée et la comparaison des concentrations par l'outil ERETIC2 permettent d'enregistrer efficacement des coefficients de partage de molécules non-ioniques avec des valeurs théoriques de log P comprises entre -2 et +2.

An easy-to-use and general NMR method to determine partition coefficients of drugs and natural products

Cédric Barthel^a, Georges Massiot^b, Catherine Lavaud^{a*}

a - Université de Reims Champagne-Ardenne, Institut de Chimie Moléculaire de Reims, UMR CNRS 7312, UFR de Pharmacie, 51 rue Cognacq Jay, 51096 Reims Cedex, France.

b- Université de Reims Champagne-Ardenne, Institut de Chimie Moléculaire de Reims, UMR CNRS 7312, Case postale 44, UFR des Sciences Exactes et Naturelles, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France.

Keywords

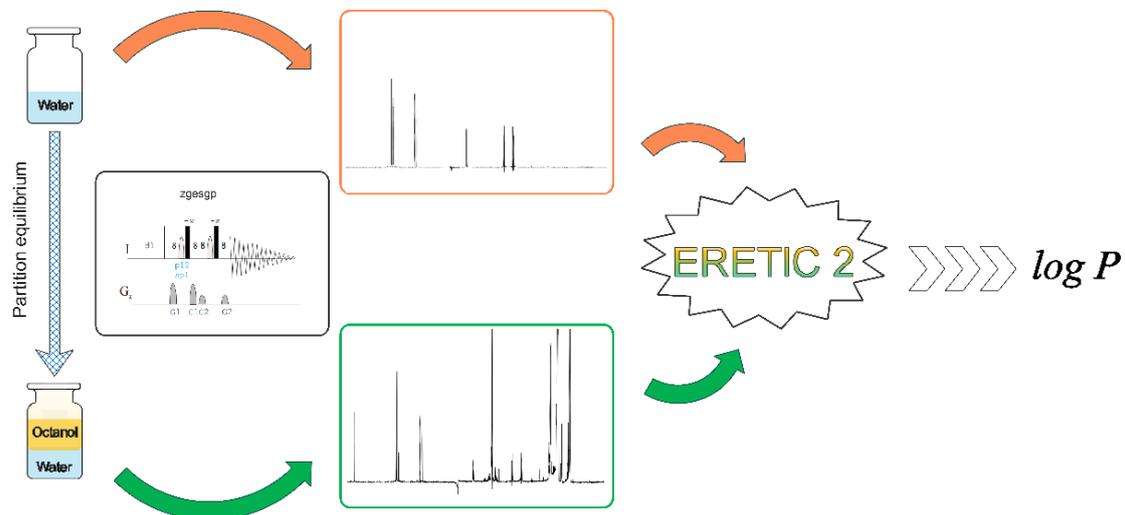
Partition coefficient; ¹H NMR; log *P*; *K_{ow}*; solubilization; pharmacokinetics

ABSTRACT

A simple, sensitive and quantitative ¹H NMR method has been developed for the experimental measurement of partition coefficients of natural compounds and pharmaceutical drugs. After partitioning and equilibration between water and octanol, the aqueous layers are analyzed using the highly efficient Water Suppression by Excitation Sculpting and signals of interest are directly quantified using the ERETIC (Electronic Reference To Access In Vivo Concentration) technique. Quantification is based on an electronic reference signal and does not need addition of a reference compound. The log *P* of 22 natural metabolites and 4 pharmaceutical drugs were determined and obtained values were in excellent agreement with literature data. The experiments were run on ca. 2mg material and this technique proved to be robust, reproducible and fit for log *P* values comprised between -2 and +2.

Graphical abstract

* Corresponding author. Université de Reims Champagne-Ardenne, Institut de Chimie Moléculaire de Reims, UMR CNRS 7312, UFR de Pharmacie, 51 rue Cognacq Jay, 51096 Reims Cedex, France.
E-mail address: catherine.lavaud@univ-reims.fr



Highlights

- a simple ^1H NMR method to determine the partition coefficient of drugs
- quantitative NMR according to ERETIC 2 (*Electronic REference To access In vivo Concentrations*)
- a convenient method to measure $\log P$ values comprised between -2 and +2

Introduction

The lipophilicity of new drugs provides critical clues on their pharmacokinetic and pharmacodynamic properties, which is particularly important in the early stages of the development of bioactive molecules. The ability to permeate the lipid bilayers in the intestinal epithelium is a key step in ADME (Absorption-Distribution-Metabolism-Excretion) studies [1]. Lipophilicity can also help determine the route of administration as well as the bioavailability and body distribution of new drugs [2] [3]. This lipidic affinity can be assessed through partitioning in two immiscible solvents, generally water and 1-octanol. The partition coefficient (P or K_{ow}) and its logarithmic value ($\log P$) [4] are calculated from the ratio of respective equilibrium concentrations of molecules in the two phases (Equation 1).

$$\log_{10} P = \log_{10} \frac{C(\text{octanol})}{C(\text{water})}$$

Equation 1 : Logarithmic value of partition coefficient

Measuring the partition coefficient of a drug candidate has become fundamental to evaluate oral absorption [5] and numerous techniques have been proposed, unfortunately producing a wide range of results due to experimental variability. The Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) proposes three “standard” ways to measure $\log P$: the shake flask method [6], the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method [7] and the slow-stirring

method [8]. The shake flask procedure provides a simple sample preparation, but is sensitive to the presence of impurities coming from the tested substance and to the transfer of octanol microdroplets into the aqueous phase. Precise operating procedures and strict temperature, pressure and pH conditions are required. Despite these difficulties, it remains the default method. The slow-stirring process only differs in sample preparation, since slow stirring reduces the formation of octanol microdroplets into the aqueous phase, but it demands a longer time to reach equilibrium. It remains however the most reliable approach to evaluate highly lipophilic compounds ($\log P$ values up to 8.2). In the HPLC procedure, neither actual partition nor phase separation are needed but a calibration graph must be established beforehand, based on the $\log P$ of appropriate reference compounds, with values that include the supposed $\log P$ of the tested substances. One of its limits is the need of an accurate detection, usually UV absorption. Impurities may complicate the interpretation of results due to uncertainties in peak assignment. Furthermore, the need to build such specific calibration graphs is a major drawback to quickly assess multiple analytes. $\log P$ can also be predicted *in silico* by extrapolations from prior known molecules, taking into account atomic or group contribution [9] [10].

These standards are now completed by liquid Nuclear Magnetic Resonance (NMR), which offers a way to rapidly evaluate compound concentrations. Furthermore, unlike HPLC, NMR can easily be applied to molecules without a UV chromophore. Sample preparation is usually a variation of the shake flask method, while the analysis part is based on innovative NMR solutions. In 2010, Mo et al. proposed a deuterium-free ^1H NMR method to measure $\log P$ of pharmaceutical agents [11]. This “no-deuterium” process required solvent suppression to measure concentrations in each layer and was limited by its low sensitivity linked to solvent interference, especially in the aqueous layer. In 2011, it was proposed to use a localized ^1H NMR experiment to measure the partition coefficient at the water-octanol interface [12]. The biphasic solution was virtually fragmented into slices, whence the concentration of analyte was measured by quantitative ^1H NMR after water signal suppression through presaturation. While this practice allowed studying the dynamic evolution of partition and distribution of analytes towards equilibrium, it suffered from poor reproducibility and long acquisition time due to the viscosity of octanol and the small contact surface between the two phases inside the NMR tube. Another approach combined NMR and *in silico* prediction of $\log P$ values through

Spectrometric Data-Activity Relationship (QSDAR) from NMR parameters [13]. It required little sample manipulation or specific preparation, but its accuracy was not always reliable and could not generally replace actual concentration measurements. A more direct way to measure partition coefficient with ^1H NMR has been the subject of two recent articles. The first one accessed quantification through CRAFT (Complete Reduction to Amplitude-Frequency Table) [14], a specific Varian software that extracts frequency, amplitude, phase and decay rate of Free Induction Decays (FIDs) on regions of interest from Fourier-transformed (FT) spectra using Bayesian probability theory. CRAFT ignores integration and peak fitting normally required in NMR analysis, thus reducing computational time. Coupling CRAFT with band-selective excitation allowed accurate concentration measurements in water and 1-octanol layers to determine $\log P$ values. The second article proposed to measure $\log P$ using a benchtop instrument [15] and was built around the shake-flask method with no need of phase isolation. Quantitative NMR measurement was performed in aqueous phase before and after addition of 1-octanol in the NMR tube to extrapolate the concentration of product in each phase. This method was only performed on liquid compounds that were fully water-soluble and no solvent suppression was employed, which limited its reproducibility. Furthermore, due to the inherent viscosity of 1-octanol, phase separation was difficult to assess within a narrow NMR tube and resulted in lower sensitivity, thus limiting the effective range of the method to $\log P$ values comprised between -1 and +1.

The present article offers a simple and general ^1H NMR method, comprising a solvent suppression sequence and an electronic signal for quantification to determine the partition coefficient of drugs and natural products with diverse structural features. Only 2 mg or less of compounds are used for determination of partition coefficient. Sample preparation takes place outside the NMR tube in order to achieve a better equilibrium partitioning and to improve water/octanol separation before NMR analysis. Unlike deuterium-free methods, a $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90/10) mixture is used as aqueous solvent and solvent suppression is performed by excitation sculpting to improve signal/noise ratio. Quantitative NMR is done using the *Electronic REference To access In vivo Concentrations* (ERETIC 2) tool built in Bruker's spectra processing software [16]. The resulting analysis allowed evaluating the partition coefficient of over twenty compounds, mostly drugs and natural products with $\log P$ values ranging from -2 to +2.

Results and Discussion

General principles

The main purpose of this work is to determine the partition coefficient of natural products using a simple, fast and robust NMR method, in order to measure the tendency of these molecules to dissolve into membranes, which correlates with their tendency to dissolve in an organic solvent. Even though most natural products are “soluble” in the complex medium of plant cells, they most often have a low solubility in purely aqueous media. This lack of solubility contributes to low bioavailability, which is most likely encountered in oral forms of drugs that are poorly soluble in water and slowly absorbed. Within the framework of a larger-scale project on natural medicines, we are interested in the digestive absorption of these natural products and in the effect of specific metabolites on the passive diffusion and hydrophilicity of other metabolites. This required developing a simple, easy, robust and reproducible process for measuring the partition coefficient of these compounds, alone and in mixtures. It should be noted that among methods previously developed using NMR as a measurement tool, few have been applied to natural products. For sake of comparison, some pharmaceuticals with known $\log P$ such as acetaminophen, acetylsalicylic acid or salicylic acid, which are usually used as reference drugs in the literature, were also tested.

In order to measure $\log P$, it is necessary to determine the concentrations of compounds in water before and after adding 1-octanol and waiting for partition equilibrium. This was achieved by quantitative ^1H NMR using an electronic signal as reference, thus avoiding all issues inherent to other quantitative methods like peak integration or the need to use internal standards. However, the high viscosities of 1-octanol and water preclude the use of narrow NMR tubes to efficiently apply the shake-flask method, which had to be accordingly modified. This is depicted in Figure 1: in a vial, the compound of interest is solubilized in water, which is filtered if the solubility limit is reached. An aliquot of this solution is placed in tube A to measure its concentration (C_w). Octanol is then added to the rest of the aqueous solution, shook, and separated. The aqueous phase corresponding to this second operation is transferred into tube B to allow the measurement of the remaining concentration in water after equilibrium partition (C_{w0}). These two concentrations allow to calculate the amount of compound that is displaced into the 1-octanol during partition, which is the

difference between the initial concentration and the concentration left in water after phase separation ($C_w - C_{wo}$) and therefore $\log P$ (Equation 2).

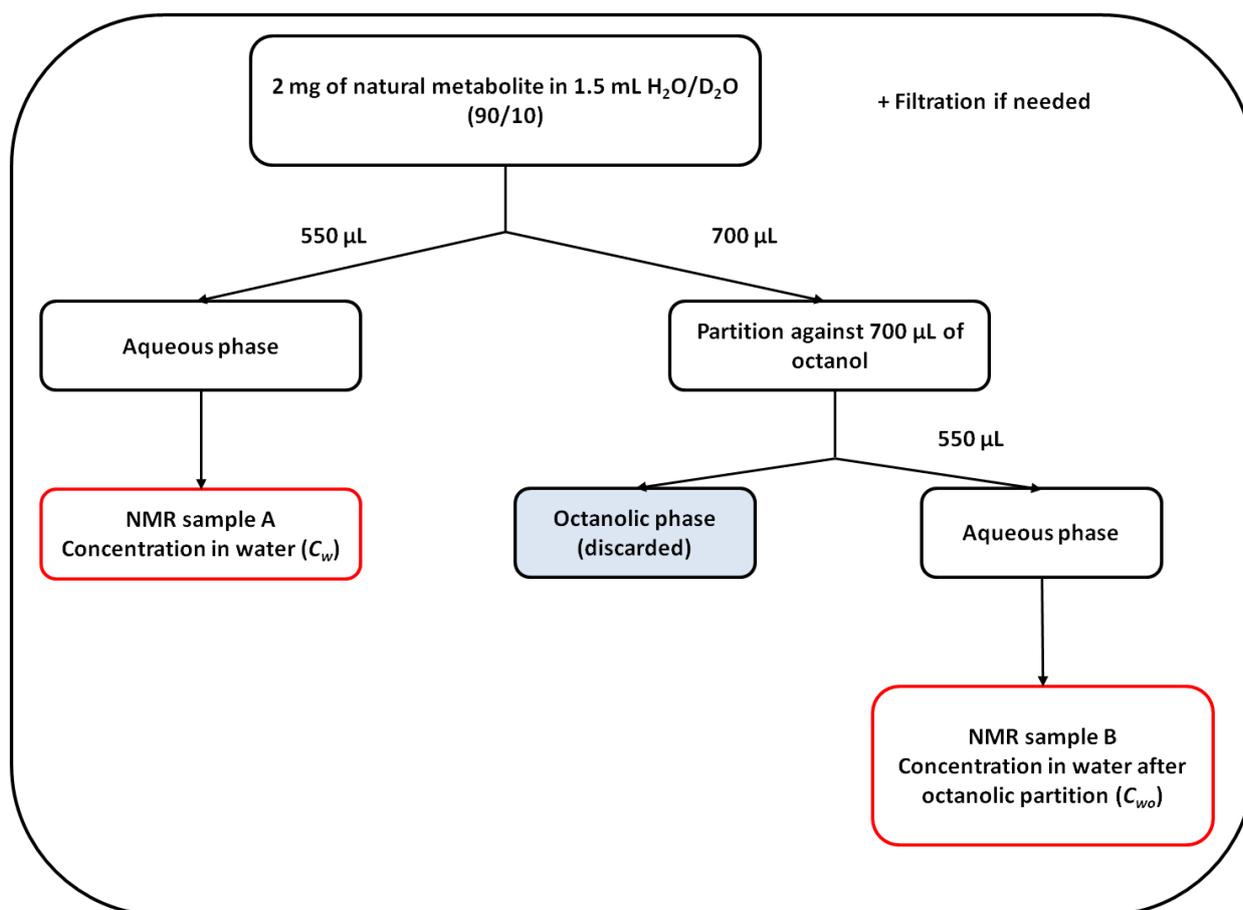


Figure 1: Sample preparation and phase separation

$$\log P = \log \frac{C(\text{octanol})}{C(\text{water})} = \log \frac{C_w - C_{wo}}{C_{wo}}$$

Equation 2

The NMR method

When properly measured, peak areas or integrals of ^1H NMR signals are proportional to the concentration of the molecules, which they are related to. In a mixture, it is generally possible to discriminate some particular signals belonging to the compound of interest, which are proportional to its concentration. Replacement of the concentrations by the integrals transforms Equation 2 into Equation 3 where I_w and I_{wo} are the integrals of suitable signals from the tested compound.

$$\log P = \log \frac{C(\text{octanol})}{C(\text{water})} = \log \frac{I_w - I_{wo}}{I_{wo}}$$

Equation 3

Most quantification methods rely on internal standards such as trimethylsilylpropanoic acid (TSP) to compare signal integrations and thence concentrations [17]. The ERETIC2 tool is however based on a virtual internal standard method that correlates absolute intensities of two different spectra and is proportional to the NMR signal intensity [16]. When the concentration of a sample is already known and the 90° pulse of the other samples is well calibrated, it becomes possible to calculate unknown concentrations through the following equation (Equation 4)

$$C_{unk} = k C_{ref} \frac{I_{unk} T_{unk} \theta_{unk} n_{ref}}{I_{ref} T_{ref} \theta_{ref} n_{unk}}$$

Equation 4

where *unk* and *ref* indices stand for unknown and reference sample, *I* is integral value, *C* is concentration, *T* is temperature, *θ* is the pulse length, *n* is the number of transients used for the experiments and *k* is a correction factor taking into account receiver gains of both samples. Under quantitative condition, ERETIC-2 calculates an unknown concentration from the integrals on a selected region based on integrals on the same region from another spectrum. In practice, temperature, pulse length, number of transients and *k* are automatically taken into account by the Bruker Topspin software. Therefore, the only parameters left to input are the concentration of reference and the selection of integrals. It has been chosen here to select a part of the spectrum from NMR sample A and its integrals were defined as the ERETIC reference with concentration value of $C_{ref} = 100\% = C_w$ in the calibration step. The same region of the spectrum in the NMR sample B was selected to calculate $C_{unk} = C_{wo}$ in the quantification step. In those conditions, C_{unk} is presented as a ratio of C_{ref} and C_w . The final equation to calculate partition coefficient value is done in Equation 5:

$$\log P = \log \frac{C(\text{octanol})}{C(\text{water})} = \log \frac{C_w - C_{wo}}{C_{wo}} = \log \frac{100 - C_{unk}}{C_{unk}}$$

Equation 5

ERETIC2 allows to calculate log P using ratios of concentrations at equilibrium instead of absolute values. Thus, the exact amount of filtered material is of no consequence for log P measurement.

A limitation of the ERETIC-2 system is the necessity of having clearly defined zones with a signal to noise ratio of at least 10:1 and devoid of any unrelated

parasitic signals. The presence of a huge solvent signal may hide signals and requires adding a solvent suppression technique to improve signal to noise ratio. It is proposed here to use Water Suppression by Excitation Sculpting, a spin-echo experiment in which the 180° pulse is embedded between two-pulsed field gradient [18], represented by the pulse program zgesgp (Figure 2). After initial excitation, two pairs of field gradients (G1 and G2) cause dephasing to all coherences set on the water frequency, while limiting all base-line distortions and phasing issues.

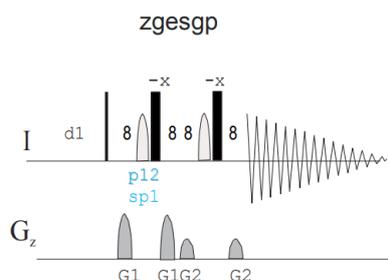


Figure 2 : pulse program for Water Suppression by Excitation Sculpting

Figure 3 illustrates Water Suppression by Excitation Sculpting and ERETIC2 on catechin in a H_2O/D_2O (90/10) mixture before partition.

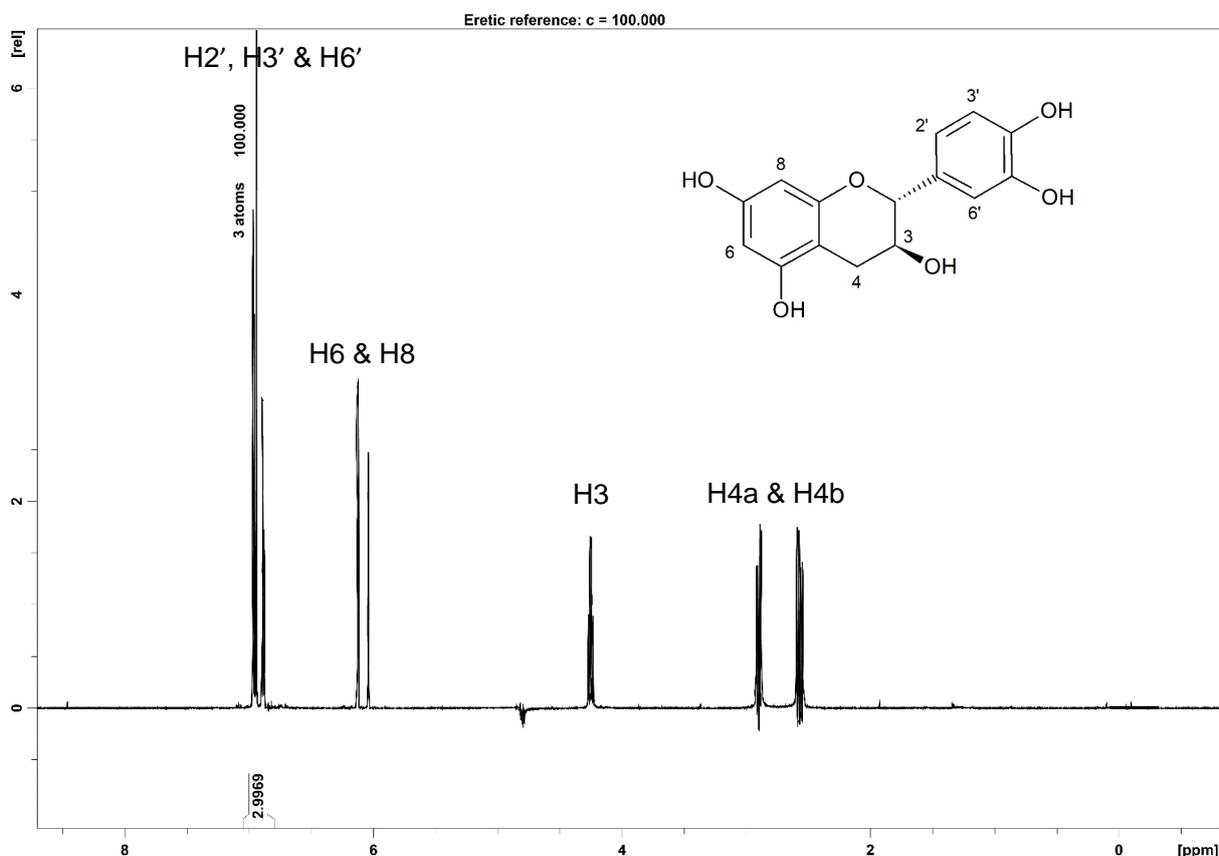


Figure 3 : 1H NMR spectrum of catechin using Water Suppression by Excitation Sculpting before partition equilibrium

All signals from catechin are well-separated and identified and, in principle, any of them could be used for quantification. However, there is a risk of intensity distortion in the vicinity of the site of solvent suppression and it is preferable to base the analysis on distant signals such as the aromatic protons H-2', 3' and 6'. ERETIC2 tool was used to set their concentration C_{ref} to 100. The two signals around 6 ppm featuring H-6 and H-8 are not considered as reliable since they are subject to partial chemical exchange with deuterium from the solvent [19]. This exchange is due to keto-enol equilibration, a phenomenon often observed in flavonoids and analogous compounds. Fortunately, most drugs contain aromatic protons or protons next to a carbonyl have resonances out of reach of the water suppression zone (4.5 ± 1 ppm) and the water suppression is not a serious drawback. Figure 5 shows the same catechin sample after treatment with octanol and all resonances are detected with little overlap from the many resonances of octanol. Selection of the same area and ERETIC2 calculation led to $C_{unk} = 26.9$ and, according to Equation 5, to a log P value of 0.43.

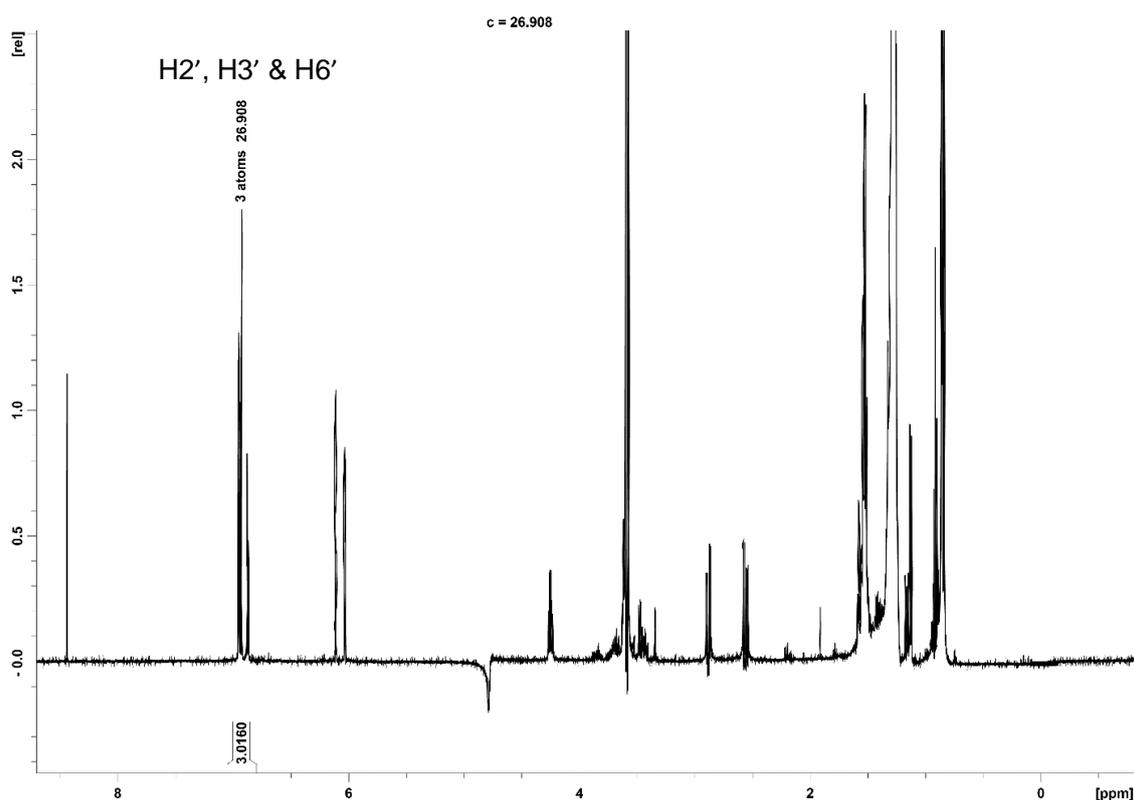


Figure 4: ¹H NMR spectrum of catechin using Water Suppression by Excitation Sculpting after partition equilibrium

Application of the method

The technique was applied to different classes of natural products, representatives of natural drugs or bioactive ingredients and for sake of comparison

and generalization, of well-known drugs on the market. The results are shown in Table 1 and are accompanied by reference values from databases (ChemIdPlus, ALOGPS and HMDB) [20] [21] [22]. Most partition coefficients, which are obtained here, are close to values from the literature. Included in the Table are compounds that gave unreliable results because no signals of quality were detected either before or after partition. Most of these compounds have either low water solubility or high lipophilicity. Poor water solubility renders peak integration and quantification hard to perform. For the same reason, it is also paramount for the analyte to leave a signal after partition against octanol. Compounds with high $\log P$ will have a better affinity for the octanol phase and will leave little or no signal in the aqueous phase for the NMR quantification method. Furthermore, due to the limitation in sensitivity, when C_{unk} becomes close to zero, $\log P$ will tend to infinity and when C_{unk} grows close to a hundred, $\log P$ reaches high negative numbers. It is even possible for C_{unk} to go above hundred or below zero due to the precision margin of the ERETIC method and to the quality of phasing and integration. In those cases, $\log P$ values cannot be calculated. Therefore, this method is only suitable to measure $\log P$ values comprised between -2 and 2.

The large deviation observed from literature value concerning morphine sulfate, codeine and zolmitriptan may be explained by the use of an unbuffered solvent. In the case of partially ionized compounds, the partition coefficient should not be expressed as $\log P$ but rather as $\log D$ (distribution coefficient), which is the ratio of concentration of neutral and ionized species in each of the two phases [23]. Most drug discovery studies involving partition in the human body would set a buffered solvent at the physiologic pH =7.4.

Compounds	Selected region of interest	$\log P$	$\log P$ ref	Sources
Acetaminophen	6.4-7.4 ppm	0.28	0.46	[20]
Acetylsalicylic acid	6.8-8.2 ppm	1.04	1.19	[20]
Aconitine	7.5-8.3 ppm	-0.63	0.13	[20]
Amygdalin	n.d		-4.34	[20]
Artemisinin	n.d		2.90	[20]

Compounds	Selected region of interest	log <i>P</i>	log <i>P</i> ref	Sources
Arbutin	6.8-7.2 ppm	-1.22	-1.35	[20]
Caffeic acid	6.1-7.7 ppm	1.24	1.15	[20]
Caffeine	7.6-8.2 ppm	-0.21	-0.07	[20]
Capecitabine	7.4-8.2 ppm	0.52	0.56	[20]
Catechin	6.8-7.0 ppm	0.43 (0.45) ¹	0.51	[21]
Chlorogenic acid	6.0-8.0 ppm	0.11	0.17	[21]
Cinchonine	n.d		2.68	[20]
Colchicine	7.0-7.8 ppm	1.09	1.03	[20]
Codeine	6.5-7.1 ppm	0.35	1.19	[20]
Curcumin	n.d		3.29	[20]
Daidzein	n.d		2.55	[20]
Docetaxel	n.d		2.83	[20]
Esculetin	7.6-8.2 ppm	0.94	0.98	[21]
Lawsone	7.6-8.2 ppm	1.18	0.99	[21]
L-Phenylalanine	7.2-7.6 ppm	-1.25 (-1.21) ¹	-1.38	[20]
Morphine sulfate	6.4-7.0 ppm	-0.66	0.89	[20]
Salicylic acid	6.5-8.0 ppm	2.40 (1.91) ¹	2.26	[20]
Theobromine	7.7-8.1 ppm	-0.10	-0.78	[20]
Thymol	n.d		3.30	[20]
Vanillin	6.8-7.8 ppm	1.18	1.36	[20]
Zolmitriptan	6.6-7.8 ppm	-1.01	1.60	[22]

Table 1 : comparison of Partition coefficients of secondary metabolites and drugs using NMR with literature values

n.d : not determined, ¹: values obtained with 0.5 mg samples

Validation of the process

Repeatability trials were performed to validate the partition procedure based on NMR. To do so, the partition coefficient of catechin was measured in fifteen replicates divided in three series of five samples (Table 2 and 3). The purpose of this procedure was to test the hypothesis stipulating that the NMR method present homoscedasticity. Thus, an analysis of variance (ANOVA) [24] using the Fisher-Snedecor-distribution was performed to probe the differences among inter and intra group variations (Table 4). The F-ratio is the ratio between each source of variation's mean square (Equation 7):

$$F = \frac{\text{Mean square}_{(\text{inter-group})}}{\text{Mean square}_{(\text{intra-group})}} = 2.63$$

Equation 6

F-ratio was compared with the 5% margin of error critical F value from the F-distribution table with 2 and 12 degrees of freedom:

$$F_{(0.05, 2, 12)} = 3.88$$

Equation 7

Because the calculated F-ratio is smaller than the critical F value, the homoscedasticity of the method can be acknowledged as well as its repeatability within a 5% margin of error.

Series 1	Series 2	Series 3
0.43	0.44	0.37
0.32	0.48	0.37
0.49	0.39	0.32
0.37	0.37	0.39
0.51	0.45	0.34

Table 2 : Partition coefficients of catechin within three series of measurement

Group	Samples number	Sum	Mean	Variance
Series 1	5	2.12	0.42	6.13×10^{-3}
Series 2	5	2.13	0.43	2.02×10^{-3}
Series 3	5	1.79	0.36	8.04×10^{-3}

Table 3 : Group Summary Statistics

Source of variation	Sums of squares	Degrees of freedom	Mean square
Inter-group	1.57×10^{-2}	2	7.83×10^{-3}
Intra group	3.58×10^{-2}	12	2.98×10^{-3}

Table 4 : Hypothesis test

Conclusion and perspectives

Partition coefficient assessments have become a pivotal step in the conceptual phase of drugs development. Yet the current available methods often require precise operating procedures or specific and time-consuming calibration graphs. The method presented in this paper offer an easy-to-use alternative to efficiently, robustly and accurately determine the partition coefficient of a compound using the perks of ^1H NMR technology. The spectra were acquired directly from aqueous phases after separation and no additional standards or large quantity of deuterated solvents are needed. Due to ^1H NMR sensibility, most drug-like compounds have readily identified and distinct protons which can be quantified with high accuracy using Water Suppression by Excitation Sculpting and the ERETIC2 tool. Minimal sample preparation is required and results are both quickly available and repeatable. Finally, the proposed method remains efficient on a broad variety of non-ionic compounds and is suitable to measure a wide range of $\log P$ values.

The development and refinement of this method should allow the investigation of molecular interactions within a mixture and their effects on partition coefficients. These subsequent studies could lead to new hypothesis on oral bioavailability of natural molecules known to have low oral absorption.

Experimental Section

All tested compounds were commercial samples from Sigma-Aldrich or Alfa-Aesar. Water was Millipore water and purified 1-octanol was purchased from ProLabo. The NMR spectrometer was a Bruker Avance III 600 MHz spectrometer using thin-wall NMR tube of size 5 mm x 178 mm and equipped with a TCI (Triple-resonance Inverse with Carbon observe) cryoprobe. Peak picking, integration and quantitative NMR were realized on the Topspin software (version 4.0.9) from Bruker. Temperature of the samples was regulated at 298 K.

Shake-Flask Method: about 2 mg (or 0.5 mg) of analyte was solubilized in a 5 mL vial with 1.5 mL of a H₂O/D₂O (90/10) mixture. The mixture was then placed in an ultrasonic bath for 5 to 10 minutes to optimize solubilization. The resulting solution was then filtered on a HPLC disposable syringe filter from Macherey-Nagel (pore size 0.45 µm). An aliquot (550 µL) of the filtered solution was placed in NMR tube A for analysis while 700 µL was placed in an Eppendorf tube for partition against 700 µL of 1-octanol. The Eppendorf tube was inverted at least 40 times, centrifuged at around 2 000 rpm for 10 minutes and left to rest for 24 hours to reach equilibrium. A portion (550 µL) from the aqueous phase was then sampled and placed into NMR tube B for comparative analysis.

Solvent suppression: the spectrometer frequency was locked onto D₂O and ¹H spectra were acquired by means of the zgesgp pulse sequence with 8 scans per FID and a 12s relaxation delay, resulting in a 4min55s recording time. The transmitter frequency offset (O1) was set at water frequency (around 2818 Hz) and gradient ratio (SMSQ10.100) were fixed to G1 = 31% and G2 = 11 %. A 180-degree shaped pulse (Squa100.1000) was fixed at p12 = 2 ms and power at SPW (-dB) = 33. The FIDs (64k points, spectral width = 12 000 Hz) were processed with LB = 0.3 Hz.

ERETIC2 method: ERETIC tool is integrated in the Topspin software from Bruker.

Acknowledgements

The authors warmly thank Dr. Pedro Lameiras (ICMR) for help with Water Suppression methods and the ERETIC2 tool. The Agence Régionale de Santé (ARS) Grand Est as well as the Centre Hospitalier Universitaire (CHU) of Reims (France) are also gratefully acknowledged for providing Cédric Barthel thesis grant.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Authors' contributions

Georges Massiot and Catherine Lavaud designed the study; Cédric Barthel carried out the study in the frame of his PhD thesis; this manuscript was written through contributions of all co-authors which reviewed and approved it.

Appendix A. Supplementary data (cf Annexes)

References

- [1] H. van de Waterbeemd, B. Testa, Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability, John Wiley & Sons, Hoboken, 2009.
- [2] S.S. Bharate, V. Kumar, R.A. Vishwakarma, Determining Partition Coefficient (Log P), Distribution Coefficient (Log D) and Ionization Constant (pKa) in Early Drug Discovery, Comb. Chem. High Throughput Screen. 2016, 19, 461–469. <https://doi.org/10.2174/1386207319666160502123917>.
- [3] N. Gulyaeva, A. Zaslavsky, P. Lechner, M. Chlenov, O. McConnell, A. Chait, V. Kipnis, B. Zaslavsky, Relative hydrophobicity and lipophilicity of drugs measured by aqueous two-phase partitioning, octanol-buffer partitioning and HPLC. A simple model for predicting blood–brain distribution, Eur. J. Med. Chem. 2003, 38, 391–396. [https://doi.org/10.1016/S0223-5234\(03\)00044-8](https://doi.org/10.1016/S0223-5234(03)00044-8).
- [4] Y. Kwon, Handbook of Essential Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Metabolism for Industrial Scientists, Springer Science & Business Media, Berlin, 2007.
- [5] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, Adv. Drug Deliv. Rev. 1997, 23, 3–25. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0).
- [6] OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method, OECD Publishing, Paris, 1995.
- [7] OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method, OECD Publishing, Paris, 2004.
- [8] OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), Partition coefficient (1-octanol/water): slow-stirring method, OECD Publishing, Paris, 2006.

- [9] C. Nieto-Draghi, G. Fayet, B. Creton, X. Rozanska, P. Rotureau, J.-C. de Hemptinne, P. Ungerer, B. Rousseau, C. Adamo, A General Guidebook for the Theoretical Prediction of Physicochemical Properties of Chemicals for Regulatory Purposes, *Chem. Rev.* 2015, 115, 13093–13164. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00215>.
- [10] A.A. Toropov, A.P. Toropova, I. Raska, E. Benfenati, QSPR modeling of octanol/water partition coefficient of antineoplastic agents by balance of correlations, *Eur. J. Med. Chem.* 2010, 45, 1639–1647. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.12.043>.
- [11] H. Mo, K.M. Balko, D.A. Colby, A practical deuterium-free NMR method for the rapid determination of 1-octanol/water partition coefficients of pharmaceutical agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010, 20, 6712–6715. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.08.145>.
- [12] P.C. Stein, M. di Cagno, A. Bauer-Brandl, A Novel Method for the Investigation of Liquid/Liquid Distribution Coefficients and Interface Permeabilities Applied to the Water-Octanol-Drug System, *Pharm. Res.* 2011, 28, 2140–2146. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0441-6>.
- [13] N. An, F. Van Der Mei, A. Voutchkova-Kostal, Global Model for Octanol-Water Partition Coefficients from Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectra, *Mol. Inform.* 2014, 33, 286–292. <https://doi.org/10.1002/minf.201300172>.
- [14] D. Soulsby, Band-selective excitation NMR spectroscopy and quantitative time-domain analysis using Complete Reduction to Amplitude-Frequency Table (CRAFT) to determine distribution coefficients during drug development, *Magn. Reson. Chem.* 2019, 57, 953–960. <https://doi.org/10.1002/mrc.4888>.
- [15] H. Cumming, C. Rücker, Octanol–Water Partition Coefficient Measurement by a Simple ¹H NMR Method, *ACS Omega.* 2017, 2, 6244–6249. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01102>.
- [16] S. Akoka, L. Barantin, M. Trierweiler, Concentration Measurement by Proton NMR Using the ERETIC Method, *Anal. Chem.* 1999, 71, 2554–2557. <https://doi.org/10.1021/ac981422i>.
- [17] S.K. Bharti, R. Roy, Quantitative ¹H NMR spectroscopy, *TrAC Trend. Anal. Chem.* 2012, 35, 5–26. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.02.007>.
- [18] S. Berger, 200 and More NMR Experiments - A Practical Course, 3rd ed., Wiley VCH, Weinheim, 2004.
- [19] M. Jordheim, T. Fossen, J. Songstad, Ø.M. Andersen, Reactivity of Anthocyanins and Pyranoanthocyanins. Studies on Aromatic Hydrogen–Deuterium Exchange Reactions in Methanol, *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 8261–8268. <https://doi.org/10.1021/jf071132f>.
- [20] National Institutes of Health (NIH), ChemIDplus Lite - Chemical information with searchable synonyms, structures, and formulas, (n.d.). <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidlite.jsp> (accessed 16 July 2020).
- [21] Virtual Computational Chemistry Laboratory, On-line Lipophilicity/Aqueous Solubility Calculation Software, (n.d.). <http://www.vcclab.org/lab/alogps/> (accessed 16 July 2020).

- [22] D.S. Wishart, D. Tzur, C. Knox, et al., HMDB: the Human Metabolome Database, *Nucleic Acids Res.* 2007, 35 (Database issue), D521-526. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl923>.
- [23] R.A. Scherrer, S.M. Howard, Use of distribution coefficients in quantitative structure-activity relations, *J. Med. Chem.* 1977, 20, 53–58. <https://doi.org/10.1021/jm00211a010>.
- [24] J. Kaufmann, A.G. Schering, Analysis of Variance ANOVA, in: *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*, American Cancer Society, Atlanta, 2014.

Chapitre IV : Application de la méthode RMN à des métabolites naturels et influence des saponosides sur leur coefficient de partage

1 Introduction

La méthode présentée dans le Chapitre III nous a permis de mesurer les coefficients de partage de divers métabolites naturels. En ajoutant une concentration croissante de saponoside, il devient possible d'évaluer l'influence de celui-ci sur le coefficient de partage. Comme nous l'avons présenté dans le Chapitre II, les saponosides testés sont la glycyrrhizine (sel d'ammonium) extraite de *Glycyrrhiza glabra*, l' α -hédérine présente dans le cumin noir (*Nigella sativa* L.) et le lierre grimpant (*Hedera helix* L.), l'escine présente dans le marronnier d'Inde (*Aesculus hippocastanum* L.), la soyasaponin I (ou Bb) extraite de la luzerne (*Medicago sativa* L.) et présent dans le soja (*Glycine max* Merr.), et des extraits dialysés de saponosides de Bois de Panama (*Quillaja saponaria* Mol.).

Comme mentionné dans le Chapitre I, la tensioactivité des saponosides et leur propriété d'auto-assemblage en solution sont responsables de nombreuses interactions avec les analytes. Lors de notre étude, il était donc nécessaire d'évaluer l'impact de la présence (ou de l'absence) des micelles sur le comportement des molécules en solution lors du partage entre les phases. Au préalable, cette évaluation nécessite de déterminer les CMC des différentes solutions préparées. Parmi les méthodes de mesure de la CMC, nous avons choisi une méthode de mesure directe de la tensiométrie qui nous permet de situer la zone de virage marquant l'apparition des micelles. Cette information nous permettra par la suite de différencier les effets dépendants de la micellisation des saponosides de ceux liés à la simple modification des tensions superficielles, de la complexification des molécules aux saponosides ou de phénomènes de saturation.

- Mesure des CMC des saponosides

Les CMC ont été mesurées par tensiométrie en utilisant la méthode à anneau de Du Noüy. Cet appareil présenté dans une publication de 1925 par Pierre Lecompte de Du Noüy permet de déterminer expérimentalement la tension de surface des liquides (158). Le tensiomètre est composé d'un support rigide surmonté d'un anneau constitué d'un alliage platine-iridium dont la hauteur est ajustable par un fil de torsion. Un cadran directement relié au système de torsion permet de mesurer la force

d'arrachement F (en Newton N) de l'anneau lorsque celui-ci est placé sous la surface d'un liquide (Équation 9) (Figure 37).

$$F = 2\pi \cdot (r_i + r_a) \cdot \gamma$$

Équation 9 : Expression de la force d'arrachement (F)

Avec r_i le rayon intérieur de l'anneau, r_a son rayon extérieur et γ la tension de surface.

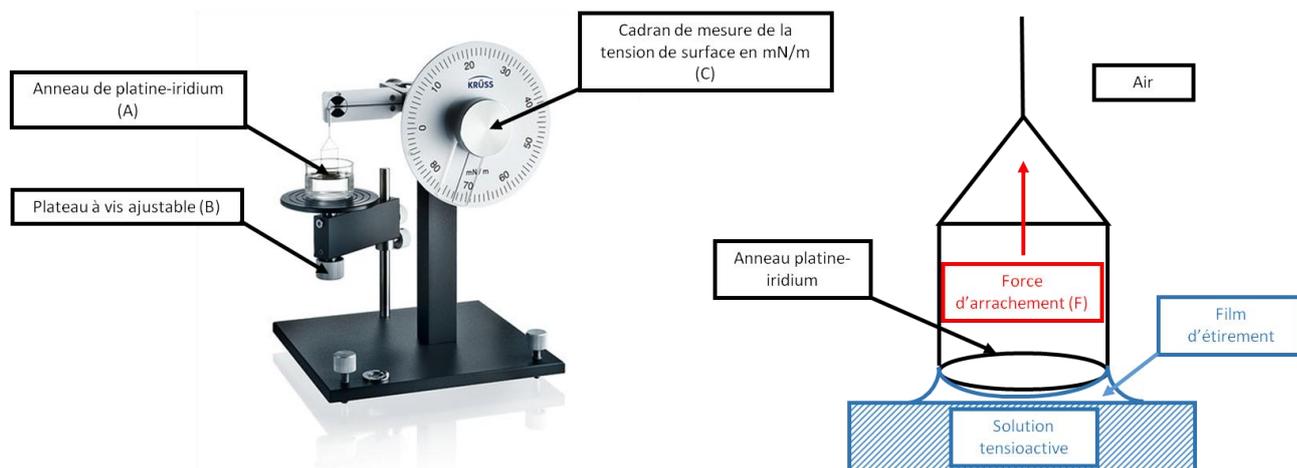


Figure 37 : Tensiomètre à anneau de la marque Krüss (159) (à gauche) et représentation schématique de l'arrachement de l'anneau à l'interface air-solution (à droite)

En pratique, l'échantillon étudié est solubilisé en milieu aqueux dans un cristalliseur puis amené au contact de l'anneau (A) à l'aide d'un plateau à vis (B) jusqu'à atteindre la surface du liquide. La manipulation du cadran (C) permet de déplacer l'anneau dans la direction opposée (augmentation de F) conduisant à l'étirement d'un film en dessous de l'anneau. A partir d'une force d'arrachement maximale F_{max} , le système passe par un seuil entraînant la rupture du film et le décollement complet de l'anneau (Figure 37).

La CMC est déterminée en réalisant la mesure des F_{max} pour une série de différentes concentrations de tensioactif. A de faibles concentrations de tensioactif, on observe une décroissance linéaire de la tension de surface. Cependant une fois la valeur de CMC atteinte, la surface de la solution est saturée en molécules tensioactives et la concentration n'aura plus d'incidence sur F_{max} . La courbe représentant la tension de surface (dépendante de F_{max}) en fonction de la concentration en tensioactif nous permet de déterminer rapidement la CMC (Figure 38) située au point d'inflexion de la courbe.

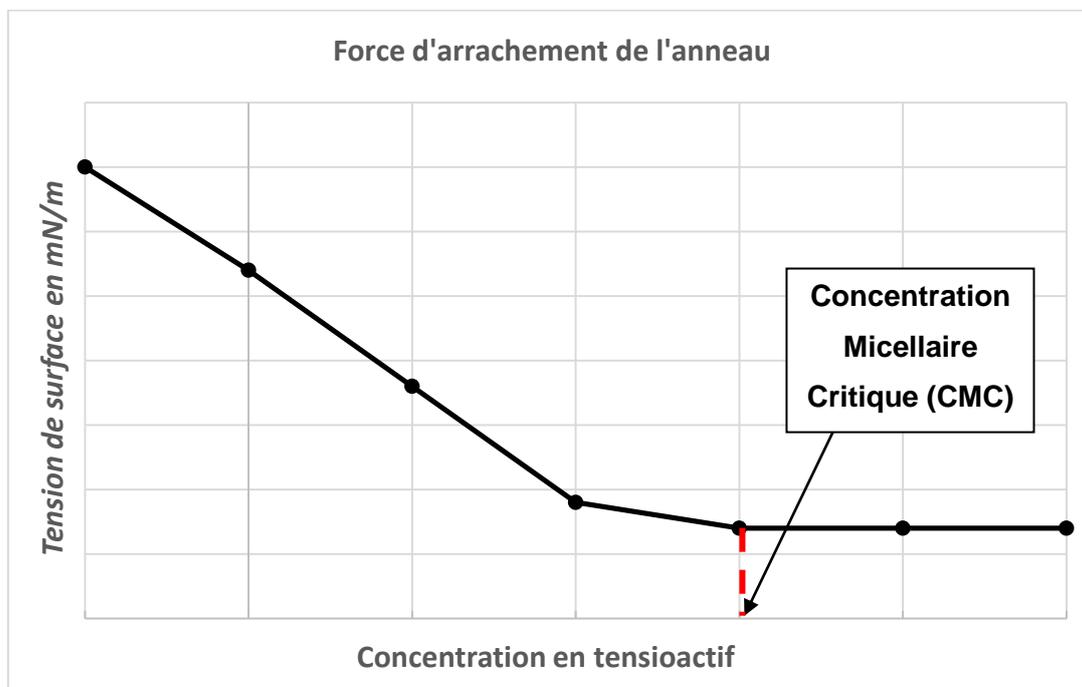
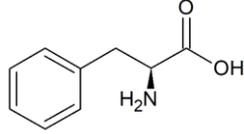
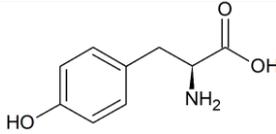
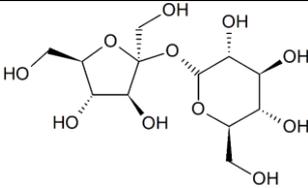
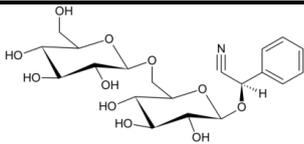
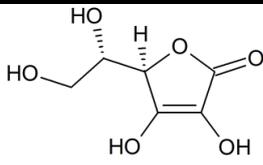
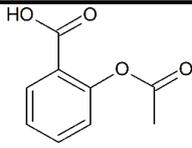
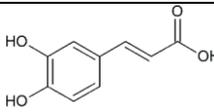
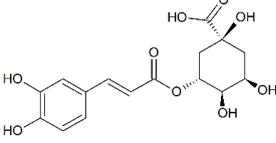


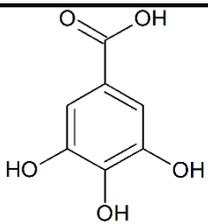
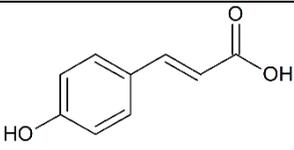
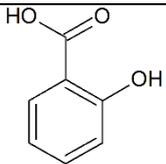
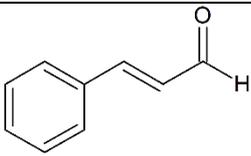
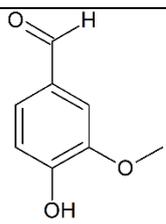
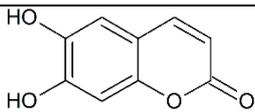
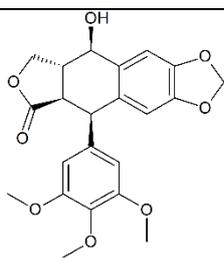
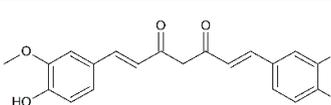
Figure 38 : Courbe type représentative de F_{max} en fonction de la concentration en tensioactif

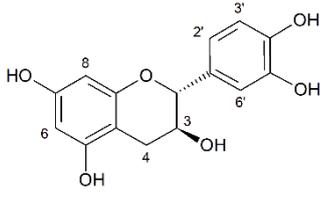
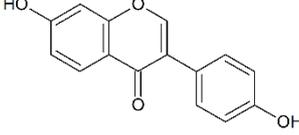
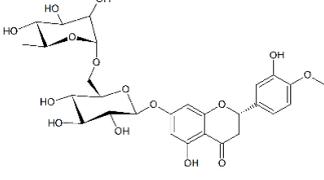
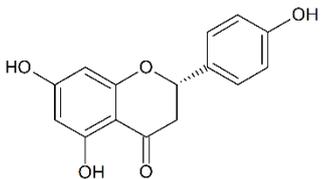
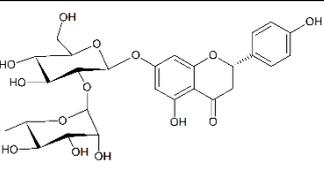
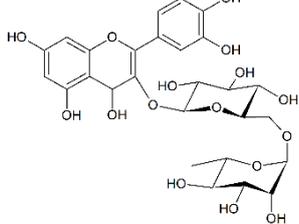
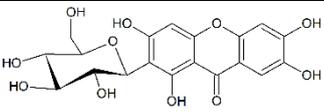
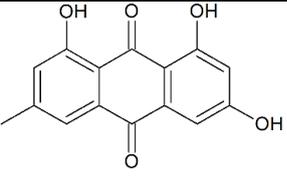
2 Molécules testées et mesure de leurs coefficients de partage

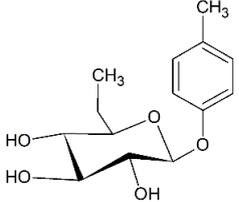
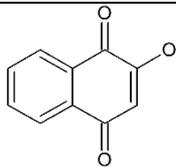
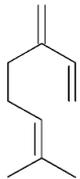
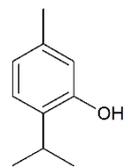
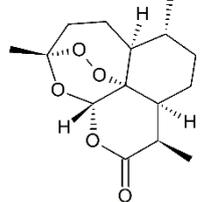
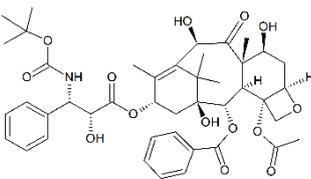
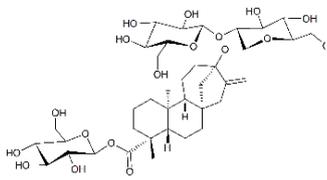
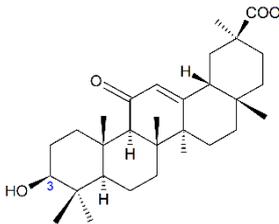
Notre méthode de mesure du coefficient de partage par RMN du proton a été employée sur une grande variété de métabolites naturels et de substances actives médicamenteuses. Les divers métabolites d'origine naturelle ont été sélectionnés en partie pour leur diversité structurale mais également pour leur distribution dans les plantes de la Pharmacopée Chinoise, leur variabilité d'hydrosolubilité et de coefficients de partage théoriques ainsi que leur disponibilité commerciale au sein de notre laboratoire. Avant de nous intéresser à l'effet des saponosides sur le coefficient de partage, il nous fallait établir si notre méthode de mesure par RMN du proton s'appliquait convenablement aux molécules que l'on souhaite tester (Tableau 9) (spectres RMN en annexes).

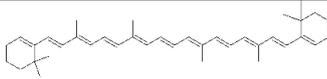
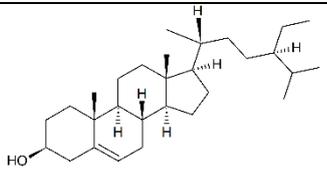
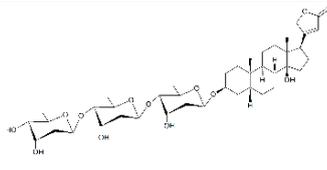
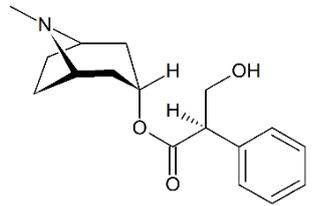
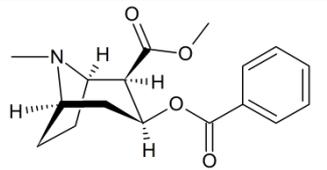
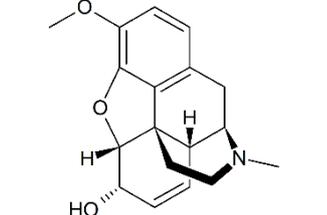
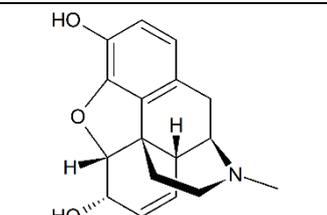
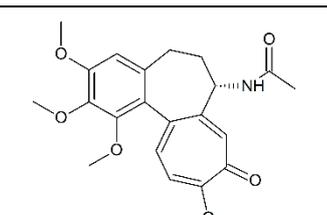
Tableau 9 : Liste des métabolites évalués dans le cadre de la thèse

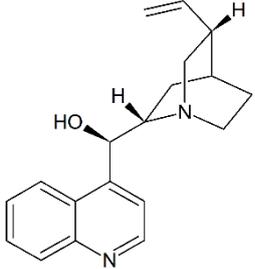
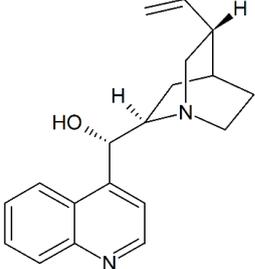
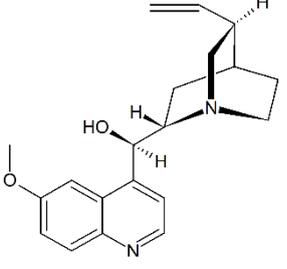
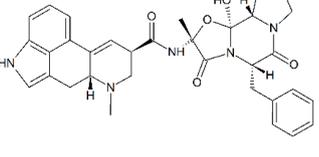
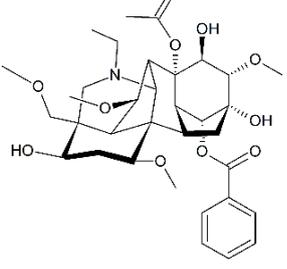
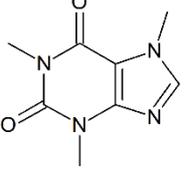
Classes de métabolites naturels	Noms	Structures	Solubilité aqueuse (g/L) (160)	Log P mesurés	Log P de référence (160) (161)	
METABOLITES PRIMAIRES						
Acides aminés	L-Phénylalanine		26.9	-1.25	-1.38	
	L-Tyrosine		0.5	-1.19	-2.26	
Glucides	Saccharose		2100	-2.21	-3.70	
Hétérosides cyanogènes	Amygdaline		83.0	Hors limites de détection (<<-2.00)	-4.34	
Polyols	Acide ascorbique		400	-1.11	-1.85	
METABOLITES SECONDAIRES						
Shikimates	Acides phénols	Acide acétylsalicylique		4.6	1.04	1.19
		Acide caféique		54.1	1.24	1.15
		Acide chlorogénique		40.0	0.11	-1.01

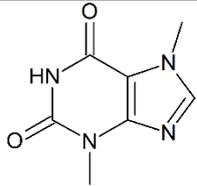
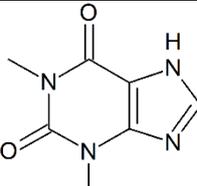
Classes de métabolites naturels	Noms	Structures	Solubilité aqueuse (g/L) (160)	Log P mesurés	Log P de référence (160) (161)	
Shikimates	Acides phénols	Acide gallique		11.9	0.44	0.70
		Acide para-coumarique		18.3	2.51	1.46
		Acide salicylique		2.2	2.40	2.26
	Aldéhydes phénols	Aldéhyde cinnamique		0.5	1.72	2.13
		Vanilline		11.0	1.18	1.21
	Coumarines	Esculétine		Insoluble dans l'eau	0.94	0.55
	Lignanes	Podophyllotoxine		Insoluble dans l'eau	Insoluble dans l'eau	2.01
	Diaryl-heptanoïdes	Curcumine		Insoluble dans l'eau	Insoluble dans l'eau	3.29

Classes de métabolites naturels	Noms	Structures	Solubilité aqueuse (g/L) (160)	Log P mesurés	Log P de référence (160) (161)
Shikimates	Flavonoïdes	(+)-catéchine 	63.1	0.51	0.51
		Daidzéine 	Insoluble dans l'eau	Insoluble dans l'eau	2.55
		Hespéridine 	0.005	0.13	-0.72
		Naringénine 	Insoluble dans l'eau	Insoluble dans l'eau	2.52
		Naringine 	1.0	-0.64	-0.44
		Rutinoside 	0.1	0.34	-2.02
		Xanthonoïdes	Mangiférine 	0.38	0.13
Polyacétates	Anthraquinones	Emodine 	Insoluble dans l'eau	Insoluble dans l'eau	4.01

Classes de métabolites naturels		Noms	Structures	Solubilité aqueuse (g/L) (160)	Log P mesurés	Log P de référence (160) (161)
Polyacétates	Hydroquinones	Arbutine		959	-1.22	-1.35
	Naphtoquinones	Lawsone		3.9	1.18	1.38
Terpènes et stéroïdes	Monoterpènes	Myrcène		Insoluble dans l'eau	Insoluble dans l'eau	4.17
		Thymol		Insoluble dans l'eau	Insoluble dans l'eau	3.30
	Sesquiterpènes	Artémisinine		0.05	Hors limite de détection (>2.00)	2.90
	Diterpènes	Docétaxel		Insoluble dans l'eau	Insoluble dans l'eau	2.83
		Stéviósíde		1.2	-0.60	-1.62
	Triterpènes	Acide 18β-glycyrrhétinique		Insoluble dans l'eau	Insoluble dans l'eau	6.90

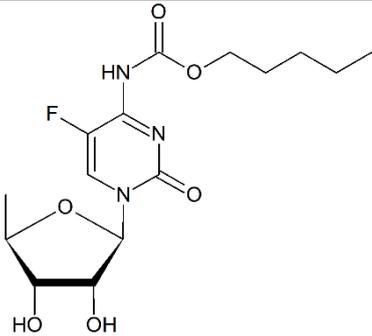
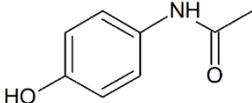
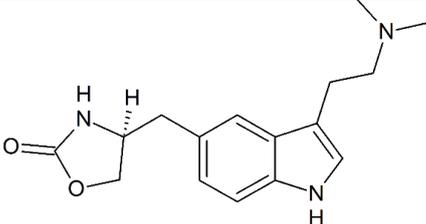
Classes de métabolites naturels		Noms	Structures	Solubilité aqueuse (g/L) (160)	Log P mesurés	Log P de référence (160) (161)
Terpènes et stéroïdes	Caroténoïdes	β -carotène		Insoluble dans l'eau	Insoluble dans l'eau	17.62
	Phytostérol	β -sitostérol		Insoluble dans l'eau	Insoluble dans l'eau	9.65
	Glycosides cardiotoniques	Digitoxine		Insoluble dans l'eau	Insoluble dans l'eau	1.85
Alcaloïdes	Tropanes	Atropine sulfate (tropanique)		2.2	0.03	1.83
		Cocaïne chlorhydrate (pseudo-tropanique)		1.8	-1.31	2.30
	Morphinanes	Codéine		9.0	0.35	1.19
		Morphine sulfate		0.1	-1.44	0.89
	Tropolones	Colchicine		45.0	1.20	1.30

Classes de métabolites naturels	Noms	Structures	Solubilité aqueuse (g/L) (160)	Log P mesurés	Log P de référence (160) (161)	
Alcaloïdes	Quinoléines	Cinchonidine chlorhydrate		0.2	-0.79	2.82
		Cinchonine		Insoluble dans l'eau	Insoluble dans l'eau	2.68
		Quinine chlorhydrate		47.6	-0.32	1.78
	Ergolines	Ergotamine tartrate (peptidique)		0.2	0.07	2.53
Pseudo-alcaloïdes	Terpénoïdiques	Aconitine		0.3	-0.63	0.13
Bases puriques	Dérivés xanthiques	Caféine		21.6	-0.21	-0.07

Classes de métabolites naturels		Noms	Structures	Solubilité aqueuse (g/L) (160)	Log P mesurés	Log P de référence (160) (161)
Bases puriques	Dérivés xanthiques	Théobromine		0.3	-0.10	-0.78
		Théophylline		7.4	-0.02	-0.02

Par ailleurs, trois substances actives médicamenteuses ont également été testées (Tableau 10).

Tableau 10 : substances médicamenteuses évaluées lors de la thèse

Nom de la molécule	Structures	Solubilité aqueuse (g/L) (160)	Log P mesurés	Log P de référence (160) (161)
Capécitabine		26.0	0.52	0.7
Paracétamol (ou acétaminophène)		14.0	0.28	0.46
Zolmitriptan		1.3	-1.01	1.72

Lors de cette étude, plusieurs conclusions peuvent être élaborées :

- Comme mentionné dans le Chapitre III, notre méthode de mesure du coefficient de partage par RMN du proton nécessite que les molécules étudiées génèrent des signaux détectables en milieux aqueux. Les molécules

peu solubles ou insolubles dans l'eau (comme l'émodine ou le β -sitostérol) présentent des signaux trop faibles ou inexistantes et ne peuvent donc pas être analysées convenablement par notre méthode de mesure du coefficient de partage.

- De même, il était difficile d'évaluer certaines molécules, comme l'artémisinine, ayant un coefficient de partage supérieur à 2.00 et dont les signaux disparaissent après le partage à l'octanol.
- De manière inverse, lorsque le coefficient de partage d'une molécule est trop faible, sa forte affinité pour la phase aqueuse rend les signaux avant et après le partage contre l'octanol difficile à comparer. Leur différence d'intensité est si faible que la fonction ERETIC2 décrite dans le Chapitre III ne permet plus de calculer correctement le coefficient de partage. C'est le cas par exemple de l'amygdaline dont le coefficient de partage théorique est très faible (-4.34).
- Les coefficients de partage des alcaloïdes sous forme de sel (atropine, cinchonidine, cocaïne, ergotamine, morphine, quinine) ont des valeurs de log P très différents des valeurs de la littérature. En effet, le log P ne tient pas compte de la concentration des molécules ionisées. Par conséquent, la répartition d'un composé entre le milieu aqueux et le milieu lipophile peut varier d'un facteur 1000 en fonction du pH et du pKa du composé étudié. En général, le log D présente une meilleure alternative au log P pour les molécules ionisées (Équation 10).

$$\log D_{acide} = \log P + \log \frac{1}{(1 + 10^{pH-pKa})}$$

$$\log D_{base} = \log P + \log \frac{1}{(1 + 10^{pKa-pH})}$$

Équation 10 : Expression du log D en fonction du log P, du pH et du pKa

3 Mesure des CMC des saponosides

Dans la littérature, la CMC de la glycyrrhizine pure est de 0.20 g/L (162). Cependant, selon les molécules qui l'accompagnent, cette valeur varie plutôt entre 0.10 g/L et 0.50 g/L lorsqu'elle est mesurée par tensiométrie à anneau de Du Noüy. En effet, l'ajout d'autres molécules en solution influence les interactions intermoléculaires ainsi que certaines propriétés physico-chimiques du mélange comme la viscosité, la conductivité ou l'absorbance qui à leur tour influencent la forme, la taille et la stabilité des micelles.

Ainsi, nous mesurons la CMC de la glycyrrhizine qui est déterminée à 0.15 g/L (Figure 39) Nous avons ensuite contrôlé la valeur de la CMC en présence d'octanol pour vérifier que celle-ci n'était effectivement pas modifiée. Nous avons déterminé une CMC de 0.22 g/L proche à celle de la glycyrrhizine pure.

Au contact d'une concentration constante de 2.00 g/L de catéchine, la CMC de la glycyrrhizine se situe aux alentours de 0.20 g/L (Figure 40) tandis qu'elle se situe autour de 0.30 g/L (Figure 40) en présence de 2.00 g/L de caféine. En annexe, nous présentons les courbes de détermination de la CMC de la glycyrrhizine en présence d'autres métabolites naturels.

Nous avons également évalué la CMC des autres saponosides : β -escine, α -hédérine, soyasaponin I et extraits de Quillaja saponaria, utilisés dans le cadre de ce projet (Tableau 11).

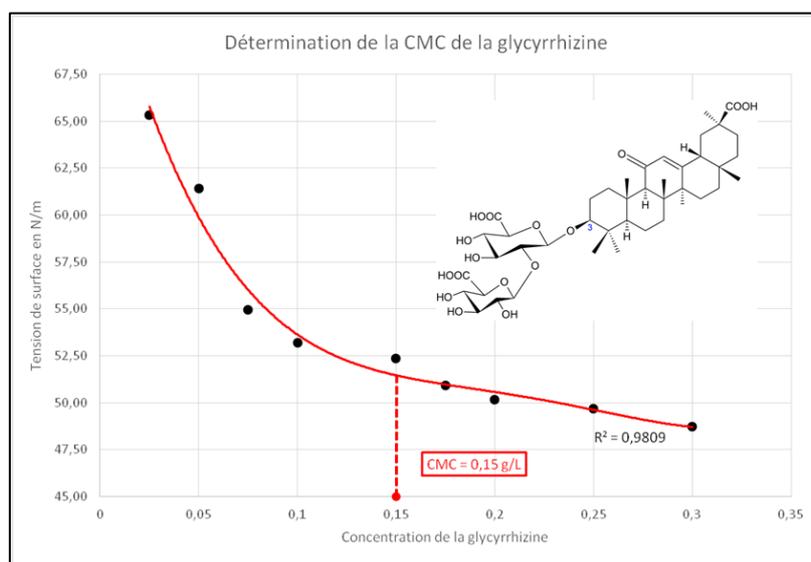


Figure 39 : Mesure de la CMC de la glycyrrhizine

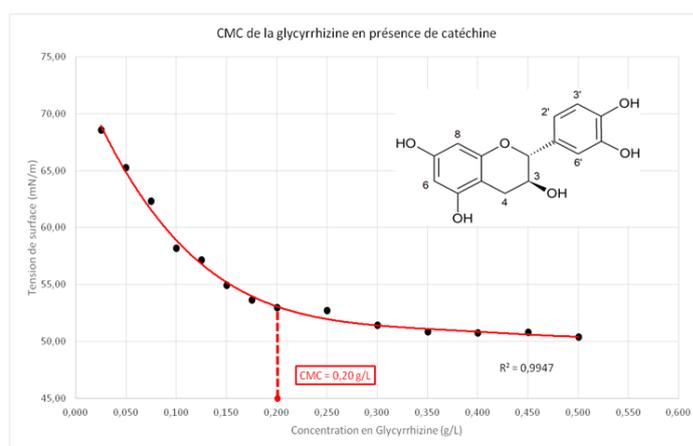
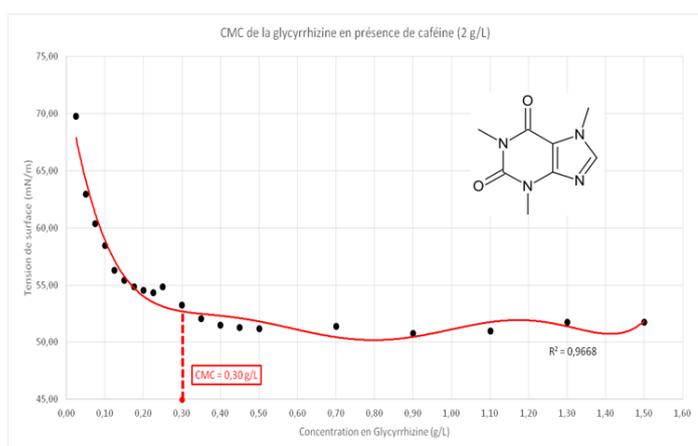


Figure 40 : Mesure de la CMC de la glycyrrhizine en présence de 2g/L de caféine (à gauche) ou de (+)-catéchine (à droite)

Tableau 11 : Tableau récapitulatif de la CMC des saponosides et en présence de métabolites naturels

Saponoside	Métabolite naturel	CMC (en g/L)
Glycyrrhizine	-	0.15 Valeur littérature : 0.20 (162)
	(+)-catéchine	0.20
	Caféine	0.30
	Acide acétylsalicylique	0.20
	Acide ascorbique	0.15
	Acide salicylique	0.07
	Cinchonine	0.10
	Lawsone	0.12
	L-Phénylalanine	0.15
	L-Tyrosine	0.15
	Vanilline	0.25
α-hédérine	-	0.008 Valeur littérature : 0.010 (163)
	(+)-catéchine	0.012
	L-Tyrosine	0.012
β-escine	-	0.10 Valeur littérature : 0.10 (163)
	(+)-catéchine	0.06
Soyasaponin I	-	0.16 Valeur littérature : 0.085 (164)
	(+)-catéchine	0.10
Extrait de <i>Quillaja saponaria</i>	-	0.05 Valeur littérature entre 0.14 et 0.77 (165)
	(+)-catéchine	0.06
	Acide salicylique	0.06
	Caféine	0.05

Dans les expériences qui suivent, nous avons effectué nos mesures par rapport à la CMC mesurée par tensiométrie à anneau de Du Noüy. Lorsque les mesures n'ont pas pu être effectuées, nous avons pris comme CMC les valeurs de la littérature.

4 Influence de la glycyrrhizine sur le log P de métabolites

En appliquant la méthode de mesure du coefficient de partage par RMN du proton détaillé dans le chapitre III, nous avons étudié l'évolution du log P des molécules sélectionnées lorsque la concentration en saponoside présente dans la solution augmente.

Cette étude a pour objectif de confirmer à travers le coefficient de partage les observations décrites dans le Chapitre I sur les propriétés tensioactives et solubilisantes des saponosides. Par ailleurs, la modification significative du coefficient de partage sous l'influence des saponosides permettrait également de corroborer ces observations avec leur utilisation dans les formulations traditionnelles de MTC comme discuté dans le Chapitre II.

La préparation des tubes RMN suit une version adaptée de la méthode de préparation développée dans le Chapitre III (Figure 1 de la publication). La solution analysée par RMN est préparée à une concentration en analyte de 1.33 g/L (soit 2.00 mg d'analyte dans 1.50 mL de solvant). Le solvant utilisé ici est une solution de saponoside préparée dans le mélange H₂O/D₂O (90/10) La concentration de cette solution est variable selon le tube analysé et une gamme de dilutions est préparée à partir d'une solution mère de saponoside.

Cette gamme débute à une concentration en saponoside inférieure à sa CMC, et va jusqu'à une ou des valeurs de concentration supérieures à sa CMC. Par exemple pour la (+)-catéchine (CMC glycyrrhizine à 0.20 g/L), on réalisera une solution mère à 2.00 g/L de glycyrrhizine pour préparer une gamme de huit concentrations différentes en glycyrrhizine (Tableau 12) soit huit tubes RMN.

Tableau 12 : Gamme de concentration de la glycyrrhizine pour l'évaluation du coefficient de partage de la (+)-catéchine

Concentration en glycyrrhizine (en g/L)	Volume de solution mère de glycyrrhizine à 2.00 g/L (en mL)	Volume du mélange H ₂ O/D ₂ O (90/10) (en mL)
0	0	1.5
0.02	0.015	1.485
0.04	0.03	1.47
0.08	0.06	1.44
0.16	0.12	1.38
0.32 (>CMC)	0.24	1.26
0.64	0.48	1.02
1.28	0.96	0.54

La détermination des valeurs de log P de l'analyte par RMN au travers de cette gamme de concentration permet d'évaluer l'impact de la tension superficielle et de la formation des micelles sur le comportement du coefficient de partage des métabolites naturels et substances actives médicamenteuses étudiés.

De l'étude des coefficients de partage, nous observons cinq grands groupes de comportements moléculaires selon l'évolution de la valeur du log P par rapport à la CMC des saponosides.

4.1 Groupe A

Les molécules du groupe A comme l'acide salicylique se caractérisent par un coefficient de partage qui diminue de manière non linéaire mais de façon continue lors de l'ajout de la glycyrrhizine en dessous et au-delà de sa CMC (Figure 41).

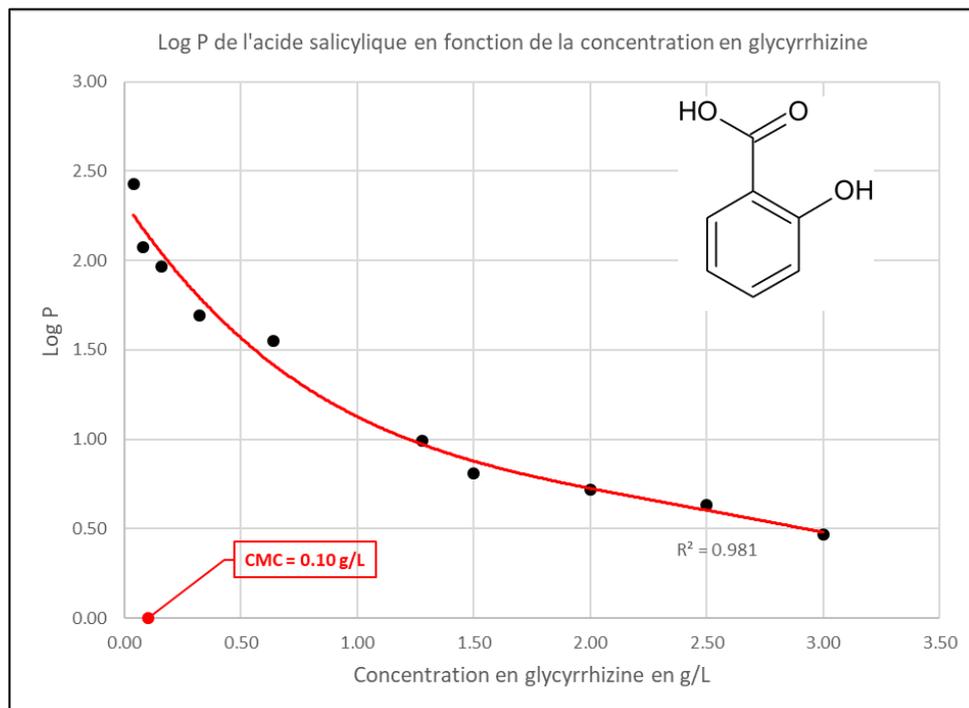


Figure 41 : Evolution du coefficient de partage de l'acide salicylique au contact de la glycyrrhizine

Cette diminution a lieu indépendamment de la formation de micelles et de la tension de surface puisqu'en théorie celle-ci atteint un maximum à partir de la CMC.

Ce comportement pourrait s'expliquer par la complémentarité de deux phénomènes :

- Dans un premier temps, la diminution de la tension superficielle favorise la dissociation et la dispersion des molécules apolaires dans le milieu aqueux. Cette augmentation de l'hydrosolubilité provoque la diminution du coefficient de partage dès les plus faibles concentrations en saponoside, avant même la formation des micelles.
- Dans un second temps, les micelles se forment à partir de la CMC pour former des agrégats capables de capturer ou de complexer les molécules en solution, augmentant davantage leur affinité pour la phase aqueuse. L'observation directe des micelles et de leur agrégat par microscopie permettra de mieux définir le type d'interaction entre les molécules et les micelles de saponosides.

Outre l'acide salicylique, l'acide acétylsalicylique, l'acide caféique, l'acide gallique, l'acide p-coumarique, l'atropine, la colchicine, la quinine, le lawsone (Figure 42), la mangiférine, le stévioside (Figure 43) et le rutinoside (Figure 50) présentent le même comportement en présence de glycyrrhizine : plus la concentration en glycyrrhizine

augmente, plus ces molécules sont hydrophiles, ce qui démontre le fort caractère solubilisant de la glycyrrhizine sur ces molécules.

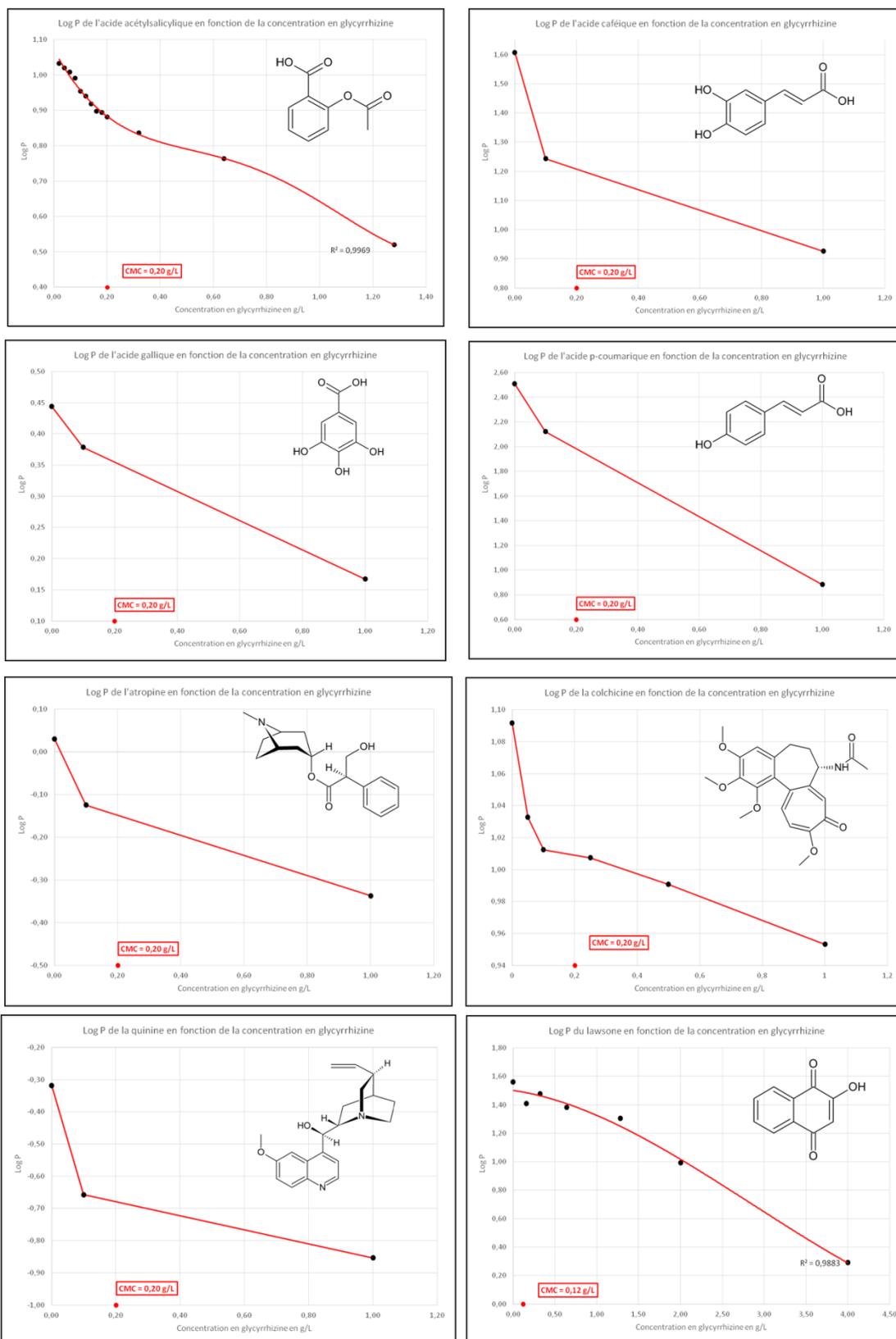


Figure 42 : Evolution du coefficient de partage de l'acide acétylsalicylique, l'acide caféique, l'acide gallique, l'acide p-coumarique, l'atropine, la colchicine, la quinine et du lawsone au contact de la glycyrrhizine

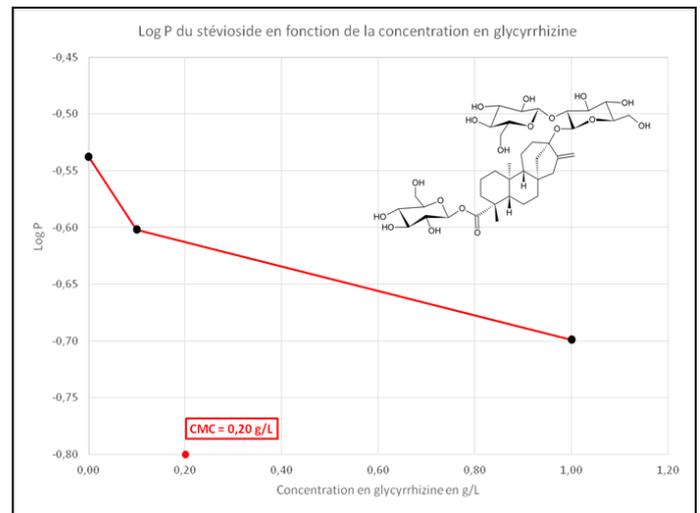
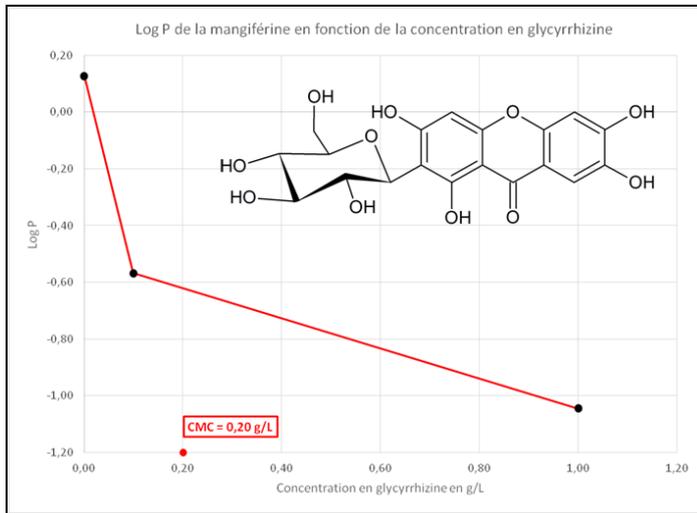


Figure 43 : Evolution du coefficient de partage de la mangiférine et du stévoside au contact de la glycyrrhizine

Dans ce groupe, l'aconitine (Figures 44-45) et l'artémisinine (Figure 49) présentent également une décroissance continue de leur log P en fonction de la concentration croissante en glycyrrhizine. Ces molécules possèdent des applications avérées en MTC (Figure 44) et nous pouvons relier ces utilisations à leur comportement en présence de glycyrrhizine.

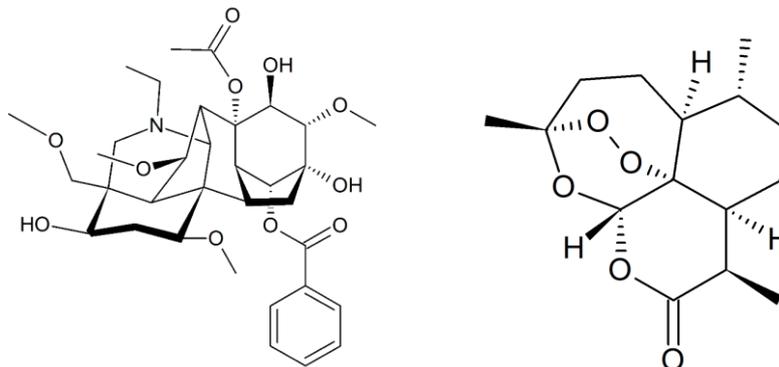


Figure 44 : Structures de l'aconitine (à gauche) et de l'artémisinine (à droite)

• Cas de l'aconitine

Naturellement présente dans les plantes du genre *Aconitum*, l'aconitine est un alcaloïde norditerpénique lipophile bien absorbée par la peau et les muqueuses, possédant une action neurotoxique en agissant sur les canaux sodium voltage-dépendants du cœur et des muscles. Les symptômes d'une intoxication provoquent la paresthésie, des vomissements puis une paralysie respiratoire ou un arrêt cardiaque (166). Sa dose létale varie de 2 à 5 mg chez l'homme. Pourtant cette plante est toujours utilisée dans les médecines traditionnelles, notamment en MTC (167) et dans la médecine traditionnelle tibétaine (168).

L'utilisation systématique de racines de réglisse (2) dans les formulations de MTC comme plante messagère (*Shi*) en présence des racines d'aconit suggère que la diminution du coefficient de partage (augmentation de l'hydrophilie) participe activement à la réduction de toxicité des formulations. Compte tenu des propriétés physico-chimiques des saponosides et des paramètres pharmacocinétiques de l'aconitine, plusieurs hypothèses peuvent être formulées :

- L'augmentation de l'hydrophilie peut provoquer une amélioration de l'excrétion urinaire de l'aconitine et son élimination
- L'encapsulation dans les micelles peut réduire l'interaction entre l'aconitine et les canaux sodium situé sur les membranes lipophiles
- L'augmentation de l'hydrophilie peut ralentir l'absorption intestinale, augmenter l'élimination fécale et réduire la dose atteignant la circulation sanguine

L'exploration de ces phénomènes sera reprise lors de l'étude des modèles expérimentaux par Chromatographie Liquide Haute Performance (*cf.* Chapitre V).

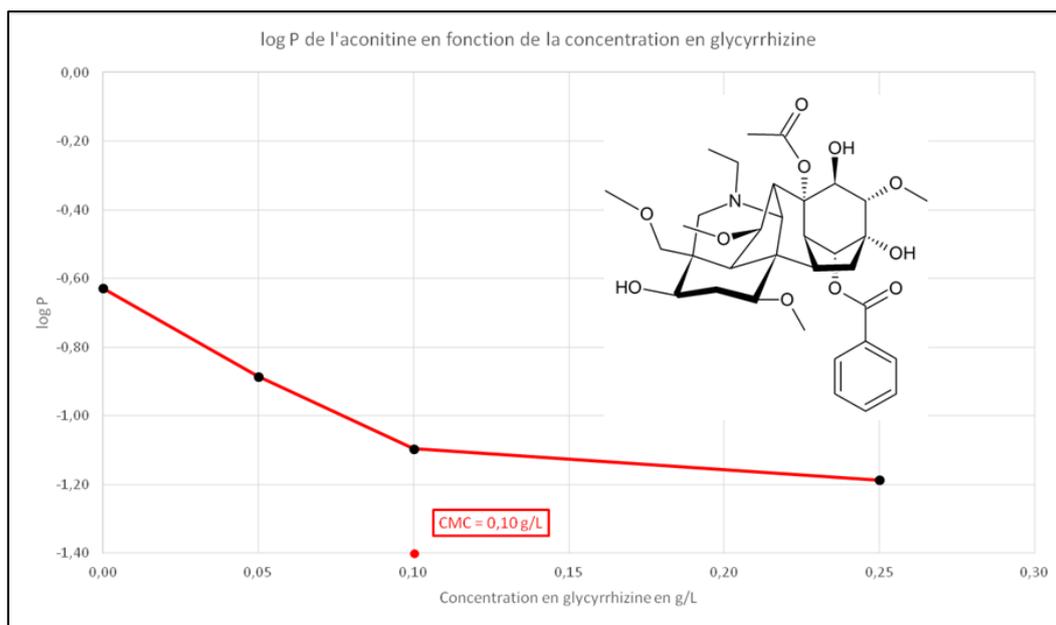


Figure 45 : Evolution du coefficient de partage de l'aconitine au contact de la glycyrrhizine

Ce profil d'évolution du coefficient de partage de l'aconitine se retrouve également en présence d'autres saponosides comme l' α -hédérine (Figure 46).

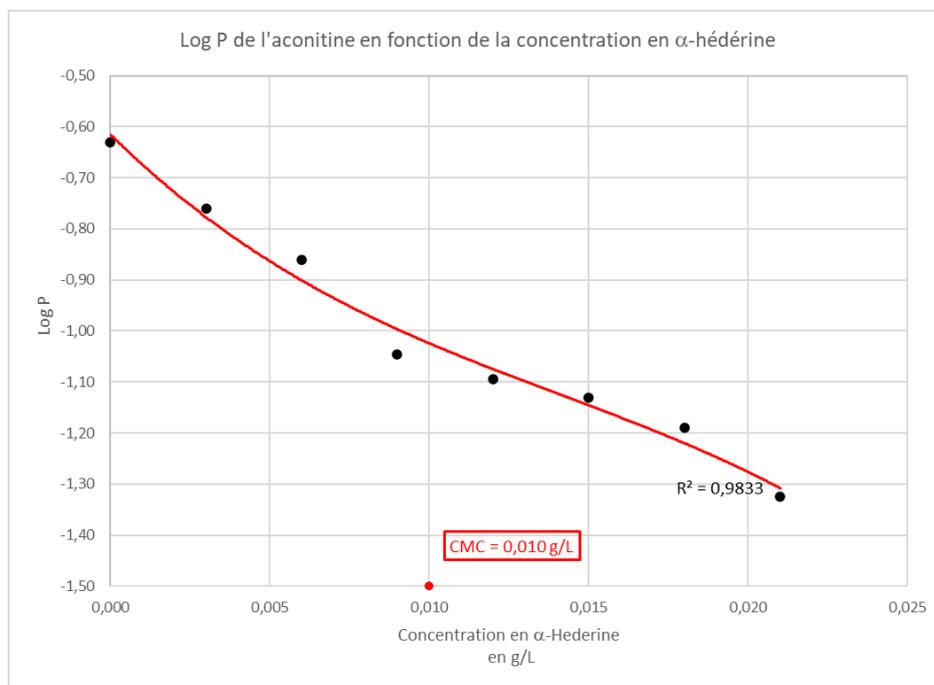


Figure 46 : Evolution du coefficient de partage de l'aconitine au contact de l' α -hédérine

- **Cas de l'artémisinine**

L'artémisinine est une lactone sesquiterpénique extraite de l'armoise annuelle (*Artemisia annua* L.) qui possède des propriétés antipaludiques qui ont valu à la chercheuse chinoise Youyou Tu le Prix Nobel de médecine 2015 (169) (170). Utilisée sous le nom de *Qing Hao* en MTC (120), les parties aériennes de l'armoise annuelle sont employées pour traiter les accès de fièvre palustre provoqués par les parasites du genre *Plasmodium*. L'artémisinine est un composé lipophile insoluble dans l'eau et moyennement soluble dans l'alcool. Compte tenu de son coefficient de partage théorique élevé ($\log P = 2.90$), notre méthode de mesure du coefficient de partage par RMN peinait à détecter la molécule après son partage contre l'octanol.

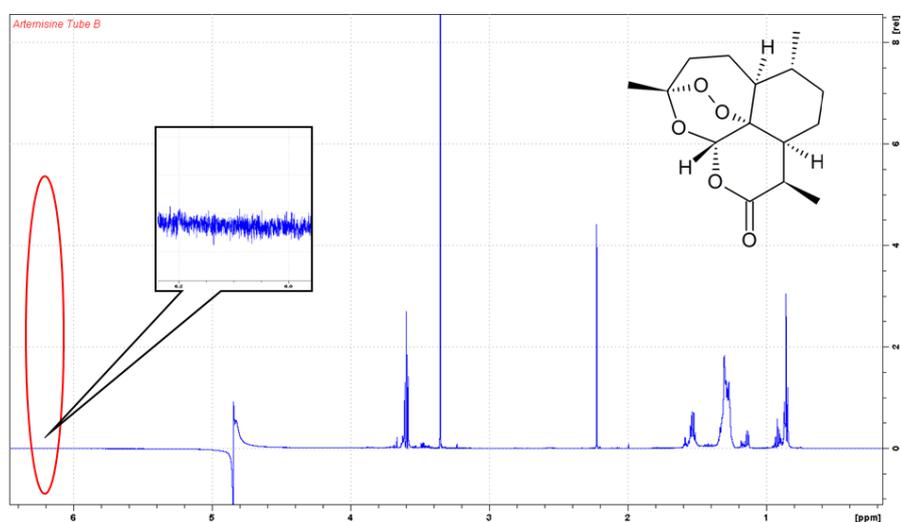


Figure 47 : Spectre 1H RMN de l'artémisinine après partage à l'octanol sans glycyrrhizine

Cependant l'ajout de glycyrrhizine a permis d'augmenter l'intensité du signal de la molécule dans la phase aqueuse et de rendre la mesure du coefficient de partage possible à partir de 0.20 g/L de glycyrrhizine (Figures 46 à 47).

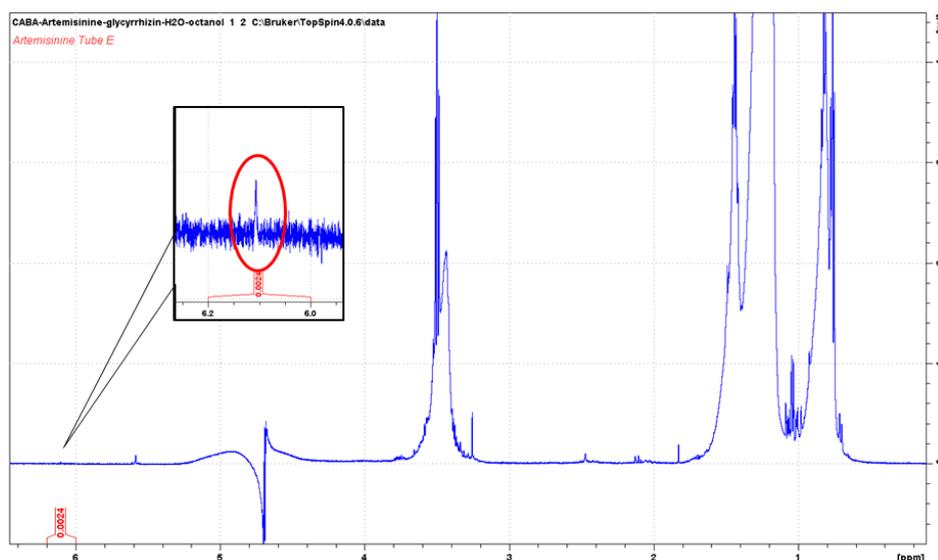


Figure 48 : Spectre ^1H RMN de l'artémisinine après partage à l'octanol en présence de 0.2 g/L de glycyrrhizine

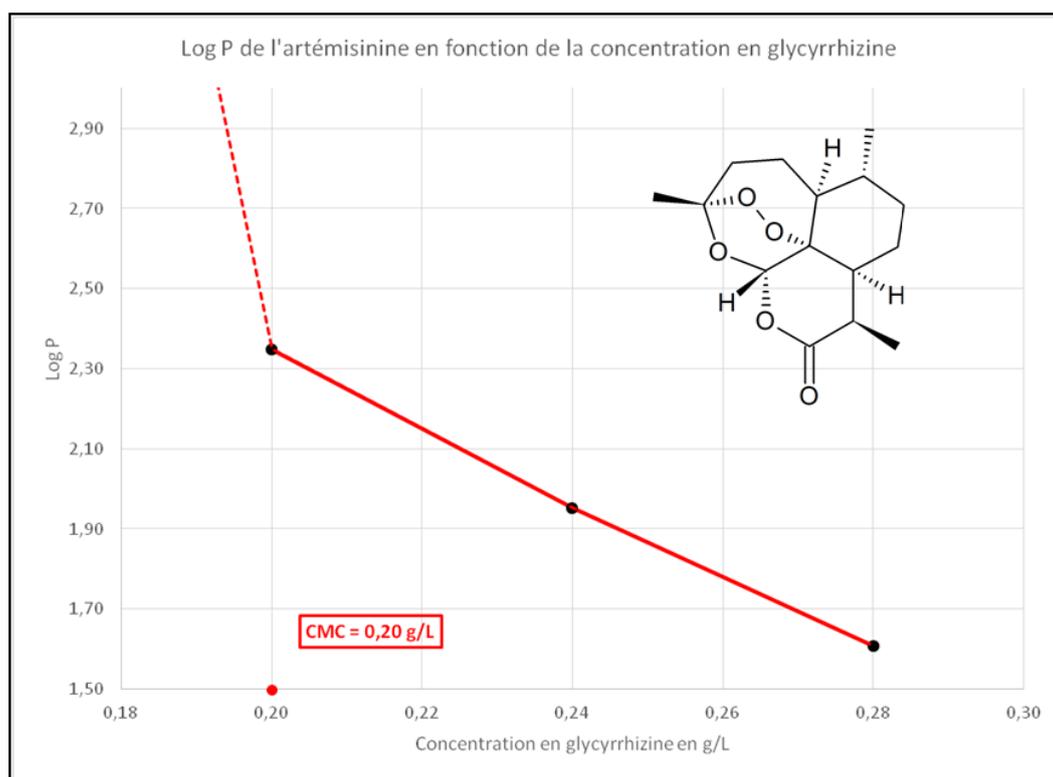


Figure 49 : Evolution du coefficient de partage de l'artémisinine au contact de la glycyrrhizine

Comme mentionné dans le Chapitre II, la voie d'administration orale est à la fois la voie la plus naturelle et la moins contraignante pour la prise de substances médicamenteuses en plus d'être la voie privilégiée dans les médecines traditionnelles. Or, certaines molécules comme l'artémisinine sont insolubles en phase aqueuse, ce qui devrait limiter leur utilisation dans les formulations

traditionnelles aqueuses prises oralement. Néanmoins, comme nous le voyons ici, l'ajout de plantes à saponosides dans ces formulations permettrait de grandement améliorer l'hydrosolubilité de ces molécules ainsi que leur biodisponibilité. L'utilisation en nature de l'Armoise a été déconseillée par l'OMS en 2012, quelle qu'en soit la méthode de préparation, compte-tenu de la variabilité de la teneur intrinsèque en artémisinine entraînant une posologie sous-dosée et un risque de développer des formes de *Plasmodium* résistantes à l'artémisinine (171). Une vectorisation de l'artémisinine à partir de complexes micellaires de saponoside serait également une piste à explorer afin d'optimiser la biodisponibilité orale et l'absorption intestinale des médicaments antipaludéens modernes comme les CTA¹⁹ (171). D'un point de vue physico-chimique, l'ajout de saponosides permettrait un mode industriel d'extraction plus performant en limitant l'utilisation de solvant à résidus comme l'éther de pétrole ou l'hexane, ou de solvant coûteux comme le CO₂ supercritique.

- **Cas du rutinoside**

Nous avons vu qu'une étude allemande de 2000 a mesuré l'effet de certains saponosides (dont la glycyrrhizine) sur l'hydrosolubilité de la digitoxine, de l'esculine et du rutinoside (105). Pour ce dernier composé, bien que l'étude ne soit pas parvenue à établir un modèle précis des variations, ces chercheurs ont cependant observé une augmentation significative de l'hydrosolubilité du rutinoside à partir d'une concentration en glycyrrhizine supérieure à sa CMC (0.10 g/L) : de +11% à 1.00 g/L et de +173% à 10.00 g/L. Dans nos résultats, nous avons également observé une forte diminution du coefficient de partage : de -71 % à 0.10 g/L à -95% à 0.20 g/L de glycyrrhizine (Figure 50) reliant l'effet hydrosolubilisant de la glycyrrhizine avec la diminution du coefficient de partage.

¹⁹ CTA : Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine

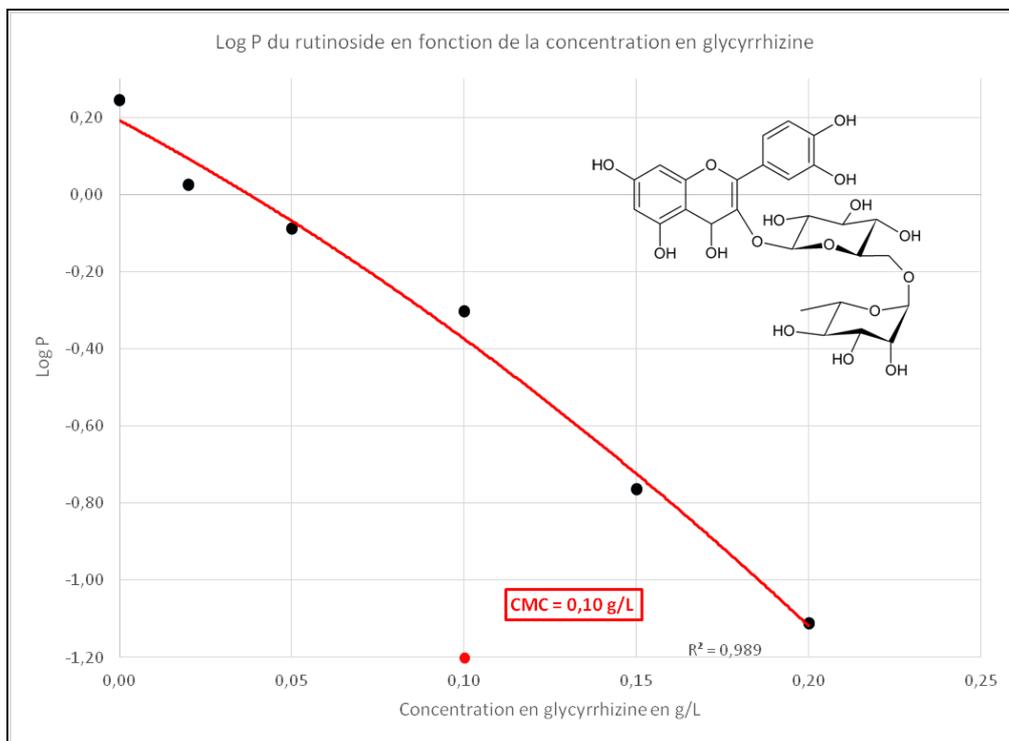


Figure 50 : Evolution du coefficient de partage du rutinoside au contact de la glycyrrhizine

4.2 Groupe B

Les molécules du groupe B comme la (+)-catéchine se caractérisent par un coefficient de partage qui diminue de manière non linéaire lors de l'ajout de la glycyrrhizine, puis qui atteint un seuil lorsque cette dernière atteint sa CMC (Figure 51)

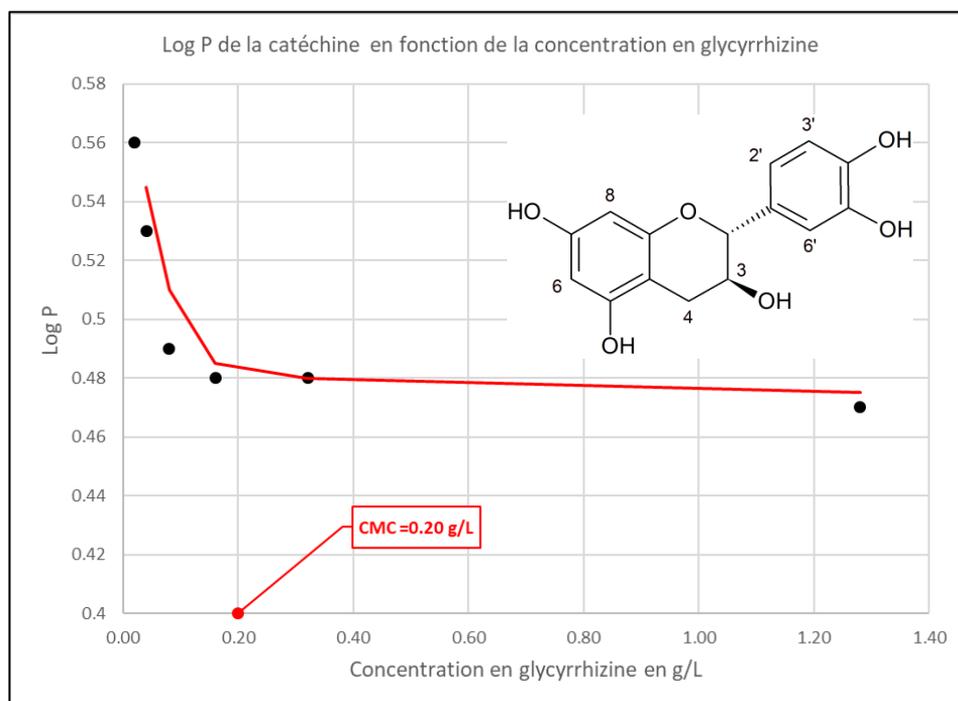
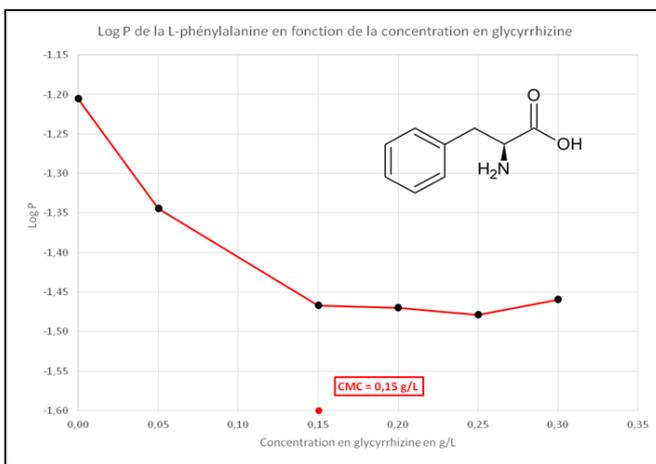
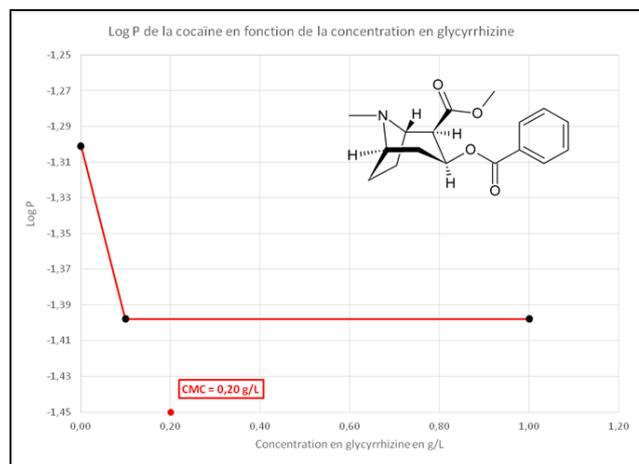
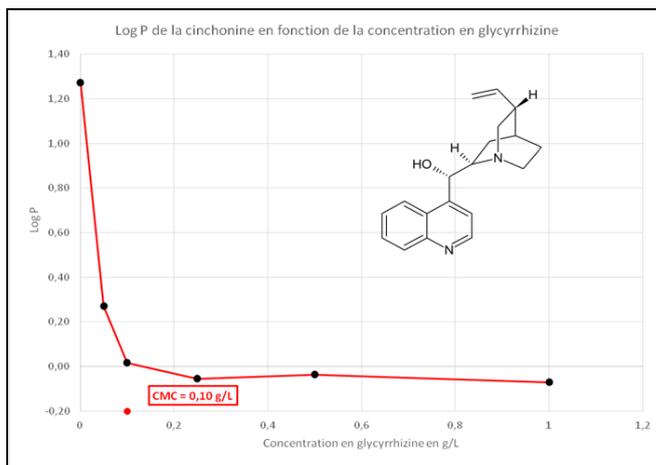
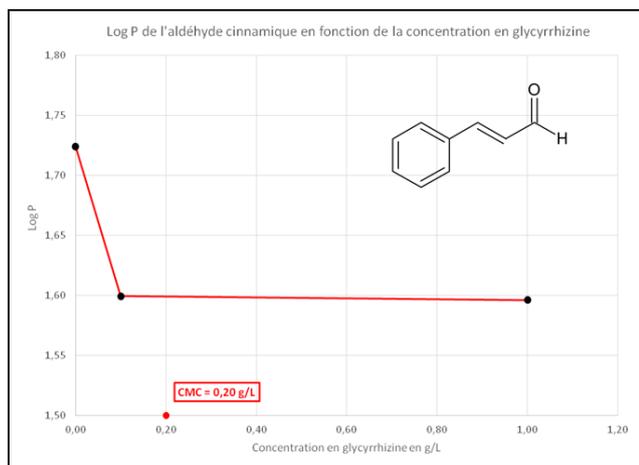


Figure 51 : Evolution du coefficient de partage de la catéchine au contact de la glycyrrhizine

La formation de micelles provoque donc une stabilisation de l'hydrosolubilité et du coefficient de partage. Celui-ci est donc uniquement dépendant de la tension de surface de la solution. Les saponosides réduisent les forces d'interaction des molécules de solvant (eau) entre elles, ce qui favorise les interactions de type van der Waals et la formation de liaisons hydrogène entre les molécules d'eau et les molécules de soluté entraînant une plus grande dispersion des molécules de (+)-catéchine dans la phase aqueuse. La formation de micelles ne semble pas intervenir dans la solubilité aqueuse des molécules du groupe B. Ces molécules atteignent une hydrosolubilité maximale lorsque la CMC est atteinte, c'est-à-dire lorsque la tension de surface est stabilisée. Les molécules du groupe B ne seraient donc pas incluses dans les micelles de saponosides et leur partage entre les deux phases (eau et octanol) se stabilise. L'observation des complexes micellaires par microscopie permettra de mieux comprendre les résultats obtenus. Outre la catéchine, l'aldéhyde cinnamique, la cinchonine, la cocaïne, la L-phénylalanine, la L-tyrosine, la théobromine et la théophylline (Figure 52) possèdent le même profil d'évolution du coefficient de partage et font également partie du groupe B.



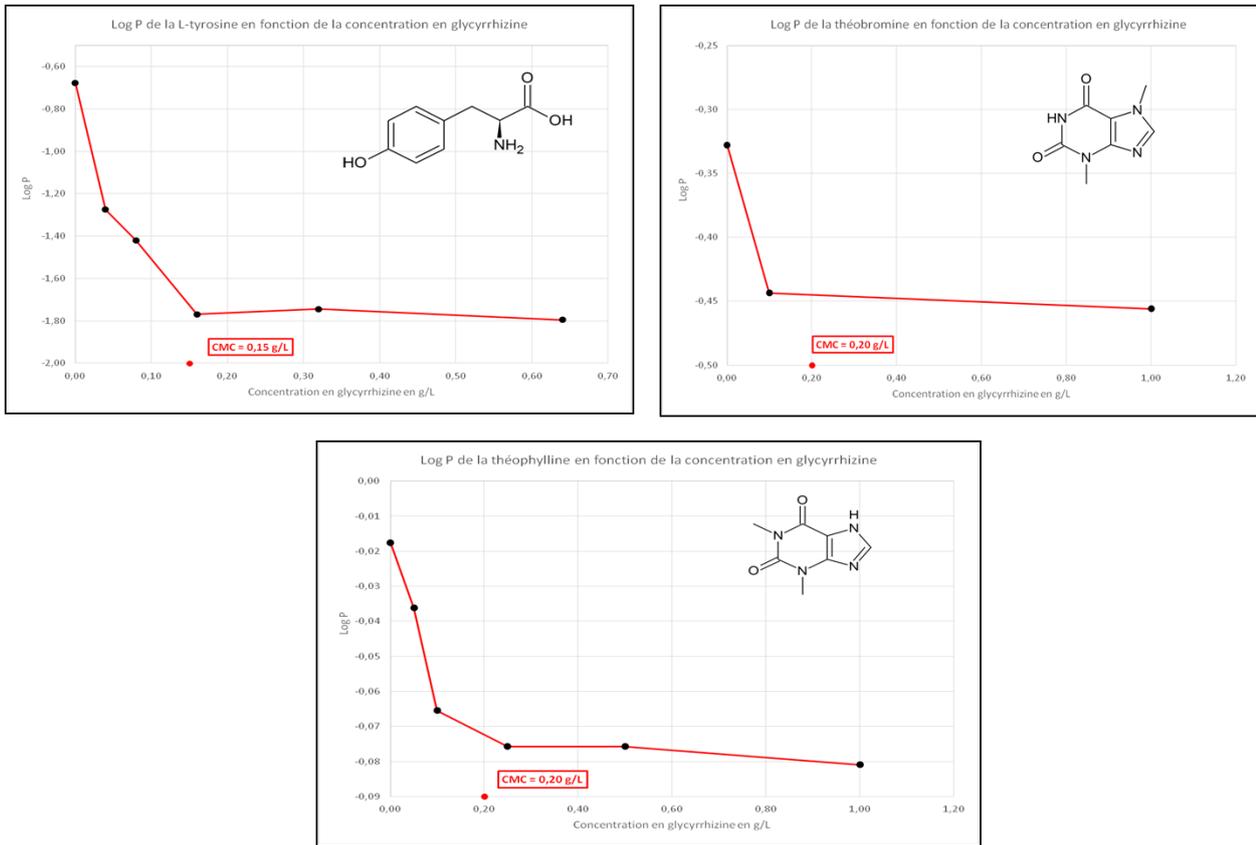


Figure 52 : Evolution du coefficient de partage de l'aldéhyde cinnamique, la cinchonine, la cocaïne, la L-phénylalanine, la L-tyrosine, la théobromine et la théophylline au contact de la glycyrrhizine

4.3 Groupe C

Les molécules du groupe C comme la codéine se caractérisent par un coefficient de partage qui diminue de manière non linéaire seulement à partir du moment où la glycyrrhizine atteint sa CMC et que les micelles se forment (Figure 53).

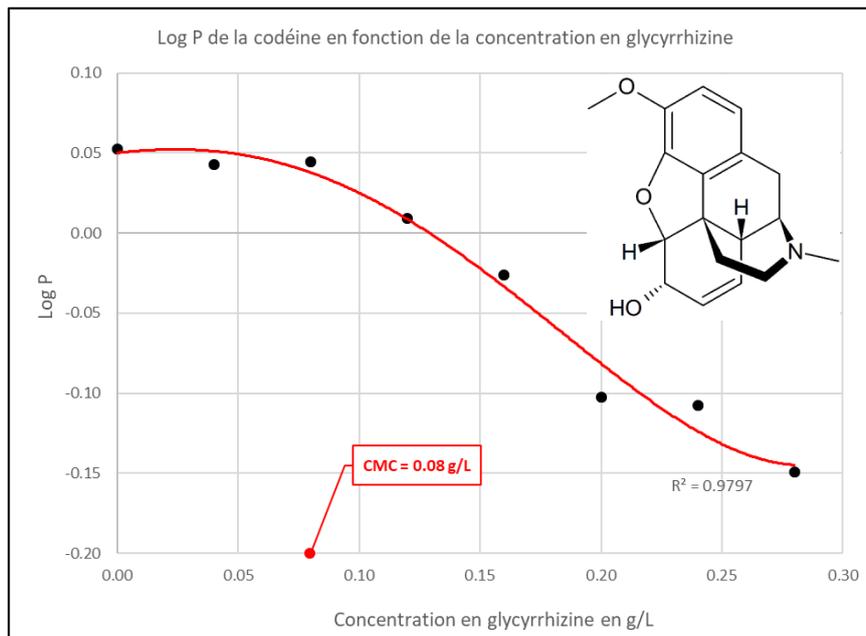
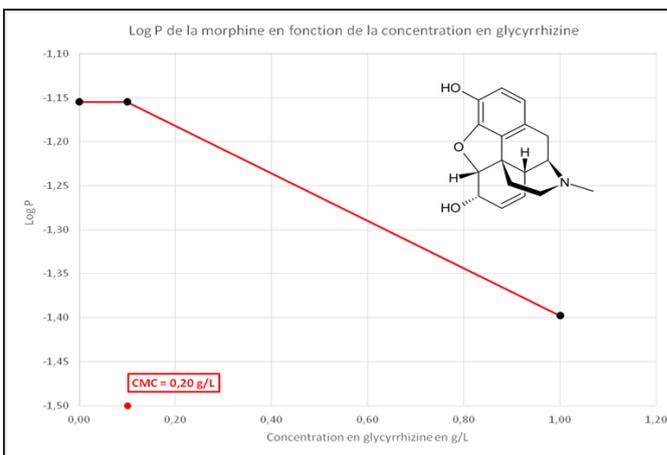
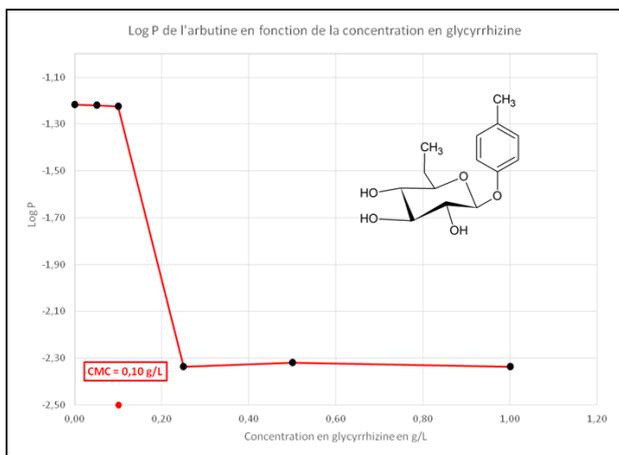
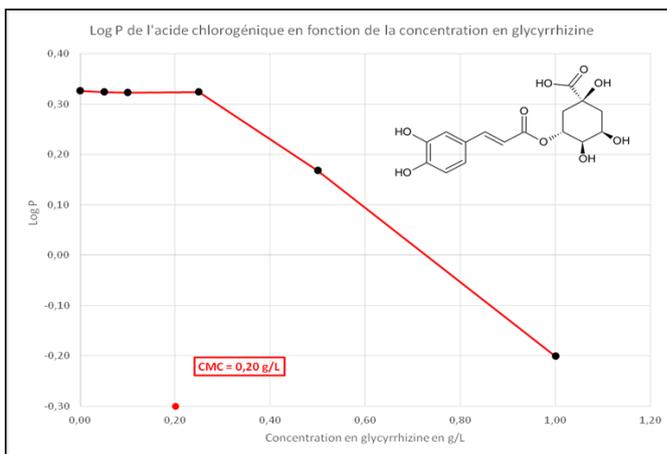
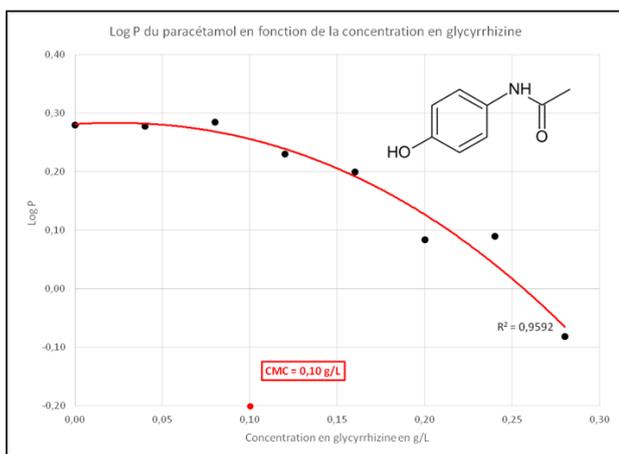


Figure 53 : Evolution du coefficient de partage de la codéine au contact de la glycyrrhizine

La solubilité de ces molécules n'est pas influencée par la diminution de la tension superficielle de l'eau mais plutôt par la présence et la quantité de micelles qui se forment en solution. Avant la formation des micelles, le pouvoir tensioactif de la glycyrrhizine est insuffisant et les forces de cohésion des molécules de soluté entre elles (représentées par la tension de surface) restent plus fortes que les interactions dispersives de la phase aqueuse. Ainsi la formation des micelles et de leurs agrégats provoquerait l'encapsulation ou la complexation des molécules de soluté avec un déplacement des molécules de soluté vers la phase aqueuse du système biphasique. La visualisation de ce phénomène par microscopie permettra de confirmer cette hypothèse. Outre la codéine, l'acétaminophène (ou paracétamol), l'acide chlorogénique, l'arbutine, la morphine, la vanilline et le zolmitriptan ont le même profil d'évolution de leur coefficient de partage en présence de glycyrrhizine et font partie du groupe C.



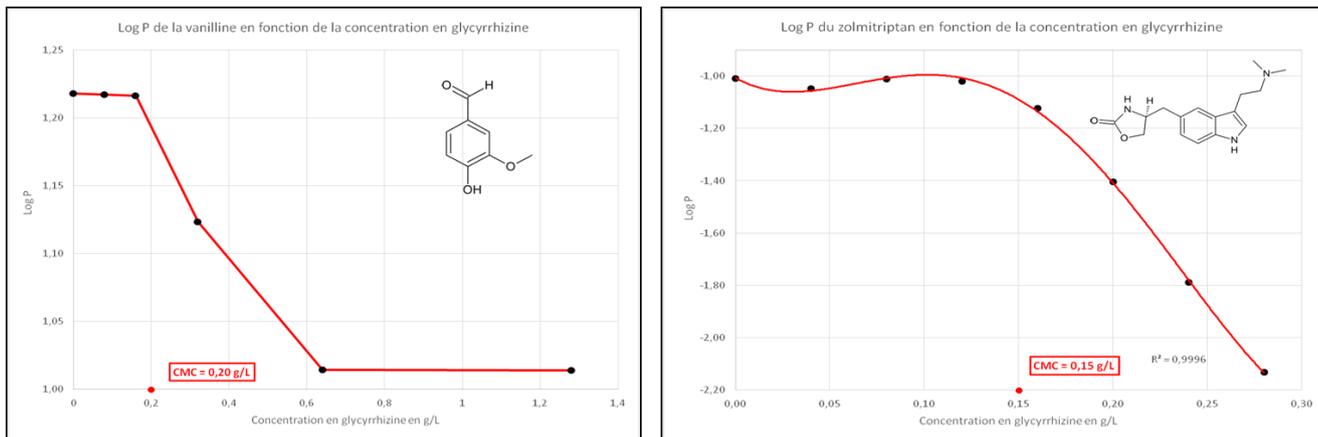


Figure 54 : Evolution du coefficient de partage du paracétamol, de l'acide chlorogénique, l'arbutine, la morphine, la vanilline et du zolmitriptan au contact de la glycyrrhizine

4.4 Groupe D

Les molécules du groupe D comme la caféine se caractérisent par un coefficient de partage qui augmente de manière non linéaire lors de l'ajout de la glycyrrhizine et atteint un seuil lorsque cette dernière atteint sa CMC (Figure 55).

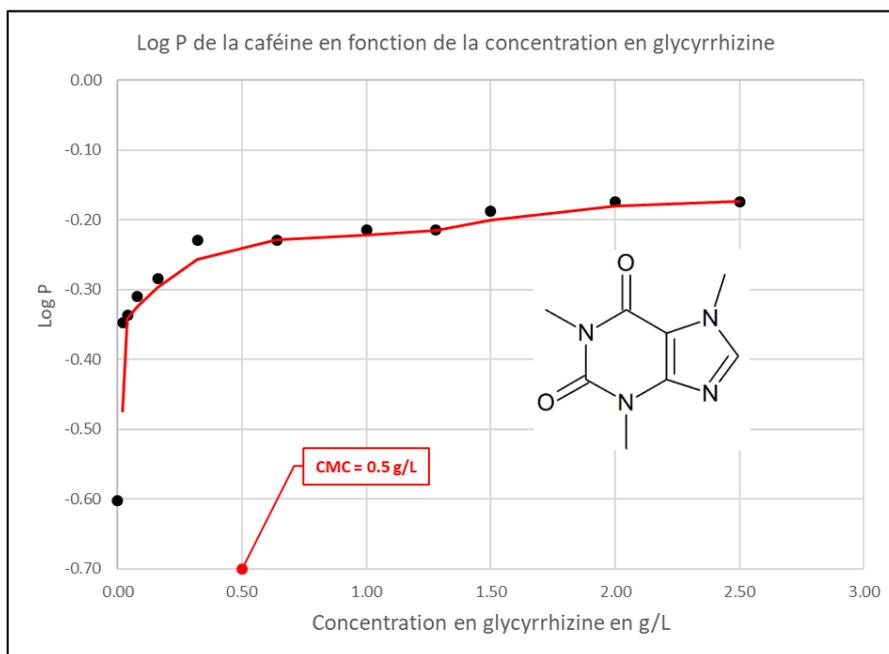


Figure 55 : Evolution du coefficient de partage de la caféine au contact de la glycyrrhizine

Le coefficient de partage est entièrement dépendant de la diminution de la tension de surface causée par le pouvoir tensioactif de la glycyrrhizine, tandis que la formation de micelles provoque sa stabilisation. Les forces dissociatives du solvant sont plus faibles que les forces d'interaction des molécules de soluté entre elles. Cependant, ce sont les interactions soluté-octanol qui finissent par l'emporter sur les interactions soluté-eau, augmentant l'affinité des molécules du groupe D pour la phase octanolique (hydrophobe) du système biphasique. Ce déplacement se traduit par une

augmentation du coefficient de partage. Outre la caféine, la capécitabine et la naringine (Figure 56) possèdent le même profil d'évolution du coefficient de partage et font partie du groupe D

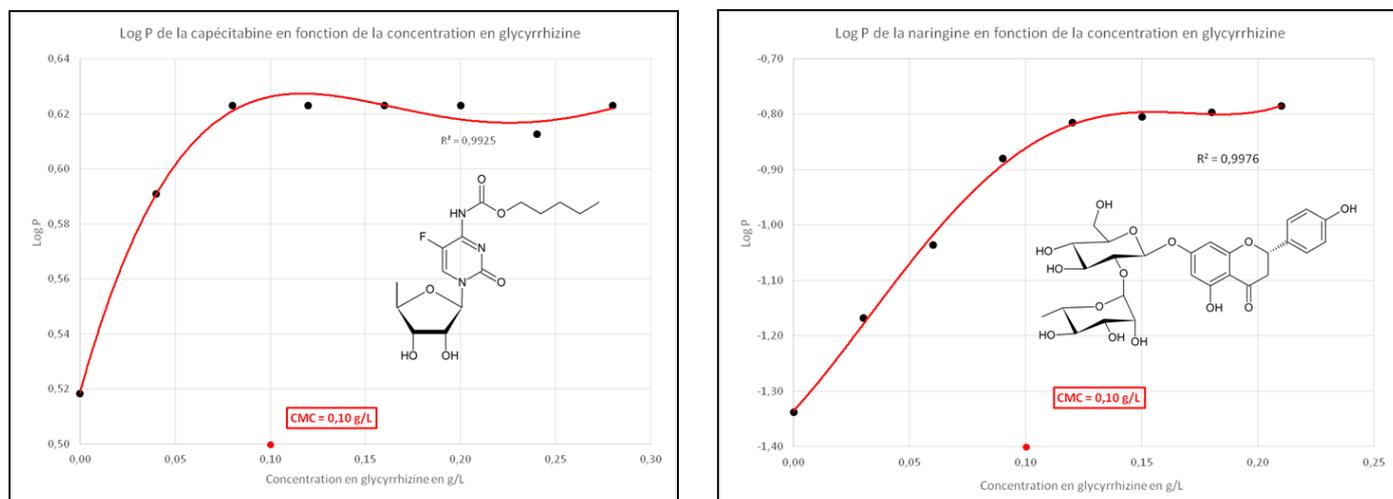


Figure 56 : Evolution du coefficient de partage de la capécitabine et de la naringine au contact de la glycyrrhizine

4.5 Groupe E

Les molécules du groupe E n'ont pas pu être classifiées dans les groupes précédents pour diverses raisons.

A l'heure actuelle, seule l'acide ascorbique appartient au groupe E. Cette molécule suit une courbe d'évolution erratique due à la complexité des interactions de l'acide ascorbique avec les molécules tensioactives (Figure 57).

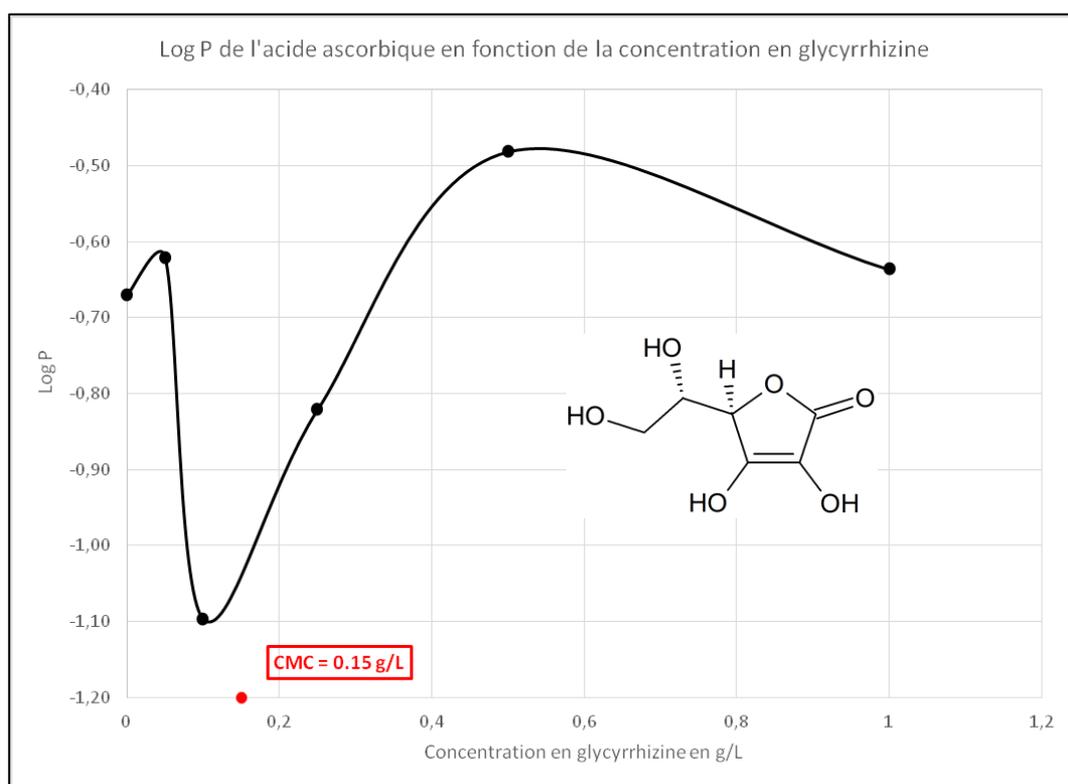


Figure 57 : Evolution du coefficient de partage de l'acide ascorbique au contact de la glycyrrhizine

En effet, une étude de 2013 indique que l'acide ascorbique a tendance à agir à la fois comme co-solvant et comme solubilisant des structures micellaires (172). Une autre étude confirme l'effet déstabilisant de l'acide ascorbique sur un tensioactif cationique (173).

Par ailleurs, l'acide ascorbique se comporte lui-même comme un tensioactif avec sa propre CMC (environ 0.10 g/L) que nous avons pu mesurer par tensiométrie à anneau de Du Noüy (Figure 58).

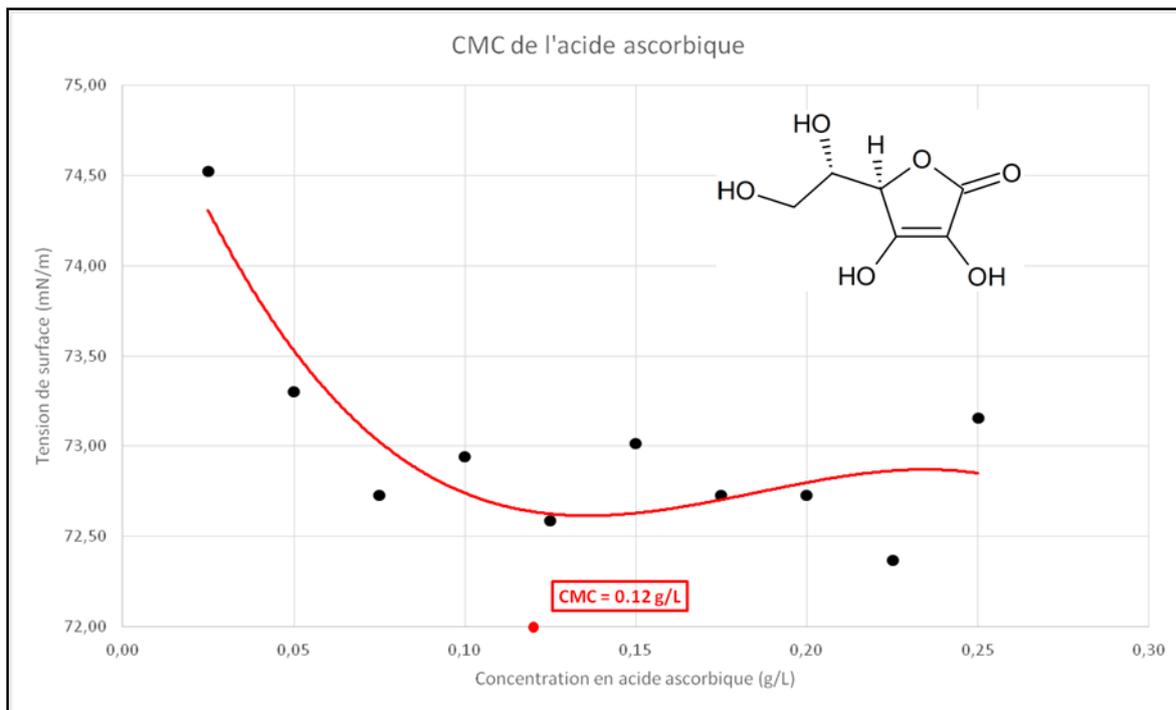


Figure 58 : Mesure de la CMC de l'acide ascorbique

Pour explorer plus en détail l'action de l'acide ascorbique, nous avons également mesuré son effet sur le coefficient de partage de la glycyrrhizine (concentration fixée à 2.00 g/L) (Figure 59).

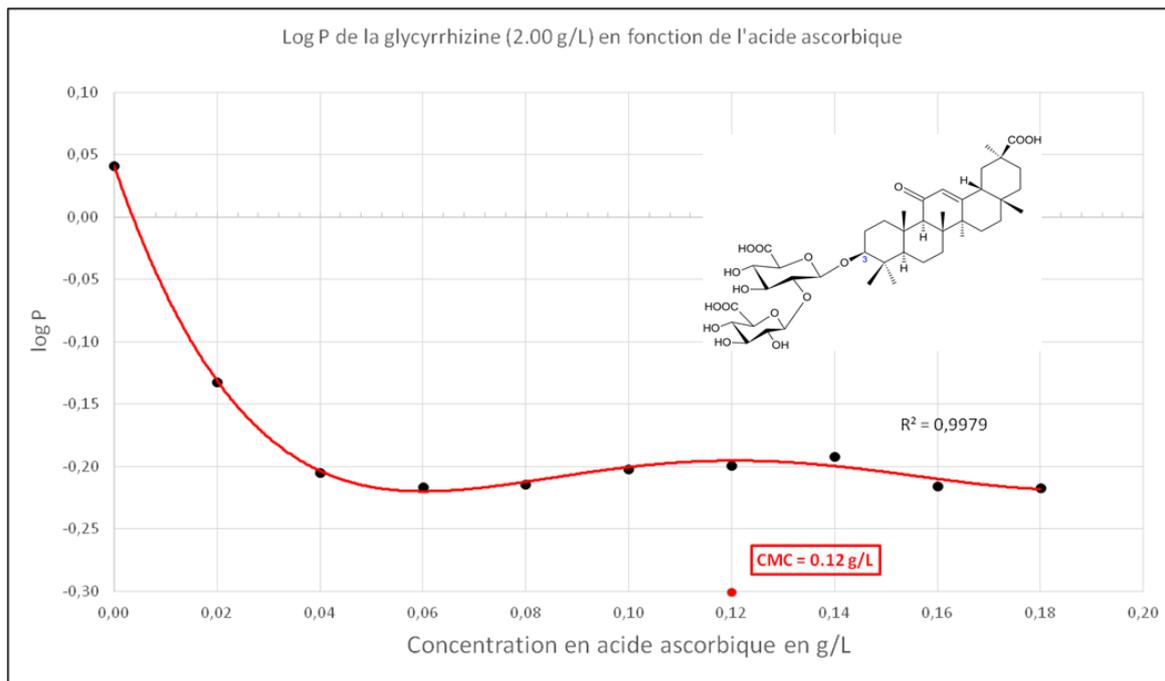


Figure 59 : Evolution du coefficient de partage de la glycyrrhizine au contact de l'acide ascorbique

Si on se reporte aux observations précédentes, la glycyrrhizine se comporte comme les molécules du groupe B au contact de l'acide ascorbique comme tensioactif.

Dans un second temps, nous avons mesuré de nouveau l'évolution du coefficient de partage de l'acide ascorbique mais en fixant sa concentration à 0.05 g/L, soit une valeur nettement inférieure à sa CMC pour permettre d'observer uniquement les effets de la glycyrrhizine (Figure 60).

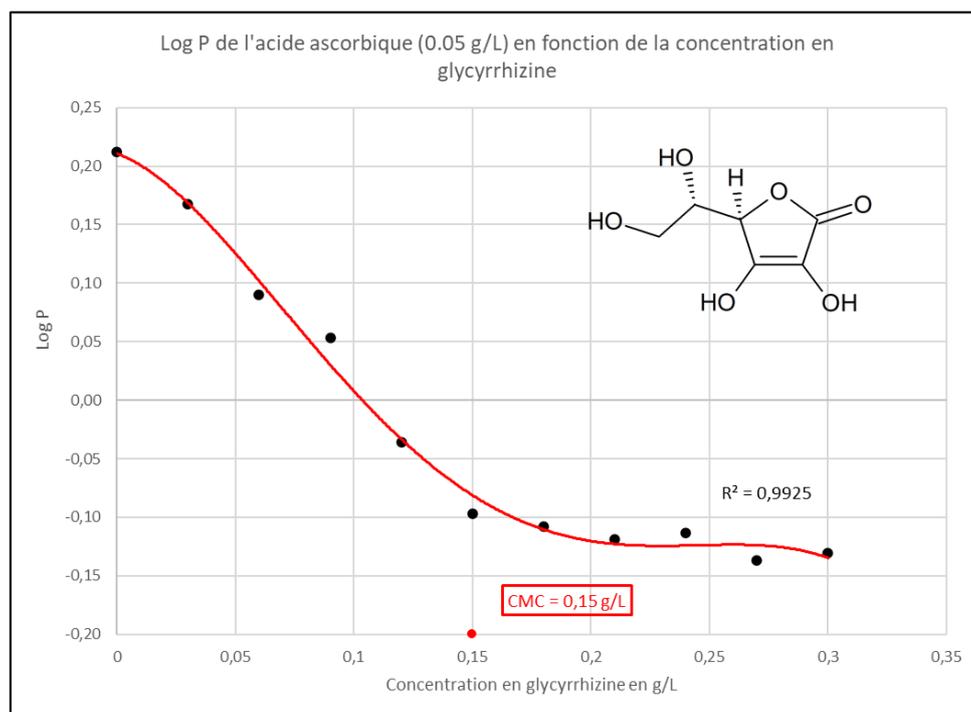


Figure 60 : Evolution du coefficient de partage de l'acide ascorbique (0.05 g/L) au contact de la glycyrrhizine

Dans ces conditions expérimentales, il est possible de classer l'acide ascorbique dans le groupe B décrit précédemment.

4.6 Molécules non classées

D'autres molécules comme le β -sitostérol, le β -carotène, l'acide 18 β -glycyrrhétinique, l'amygdaline, la curcumine, la daidzéine, la digitoxine, le docétaxel, l'émodol, l'esculétine, l'ergotamine, l'hespéridine, le myrcène, la podophyllotoxine et le thymol sont trop hydrophobes pour pouvoir étudier leur variation de coefficient de partage par notre méthode d'analyse, comme mentionné dans le développement de la méthode de mesure du log P par RMN (*cf.* Chapitre III).

De manière identique, des molécules comme le saccharose possèdent une trop forte affinité pour la phase aqueuse ce qui rend difficile la mesure de leur coefficient de partage ($\log P < -2.00$).

Par conséquent, il n'est pas possible de classer ces deux types de molécules dans les cinq groupes précédemment établis.

5 Vérification et généralisation des résultats

Afin de proposer une généralisation des résultats, les coefficients de partage de molécules représentatives de chaque groupe ont été évalués en présence de quatre autres saponosides de structures différentes : l' α -hédérine, la β -escine, la soyasaponin I et des saponosides extraits de *Quillaja saponaria*.

Cette évaluation suit le même protocole que pour la glycyrrhizine en se situant à des concentrations inférieures et supérieures à leurs CMC respectives (*cf* Tableau 11).

5.1 Groupe A : l'acide salicylique

Nous avons choisi l'acide salicylique pour représenter le groupe A car cet acide phénol se retrouve dans de nombreuses plantes de la Pharmacopée Chinoise comme l'anis étoilé (*Illicium verum* Hook.f.), la pivoine de Chine (*Paeonia lactiflora* Pall.), le pastel des teinturiers (*Isatis tinctoria* L.) ou le lotus sacré (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) (174) (175). En présence de l' α -hédérine, de la soyasaponin I et des saponosides de *Quillaja saponaria*, les profils d'évolution de son coefficient de partage sont similaires à ceux observés avec la glycyrrhizine (Figure 61). Néanmoins, son profil est différent en présence de β -escine où l'acide salicylique se comporte davantage comme une molécule du groupe B avec une stabilisation du coefficient de partage lorsque la concentration en saponoside dépasse la CMC.

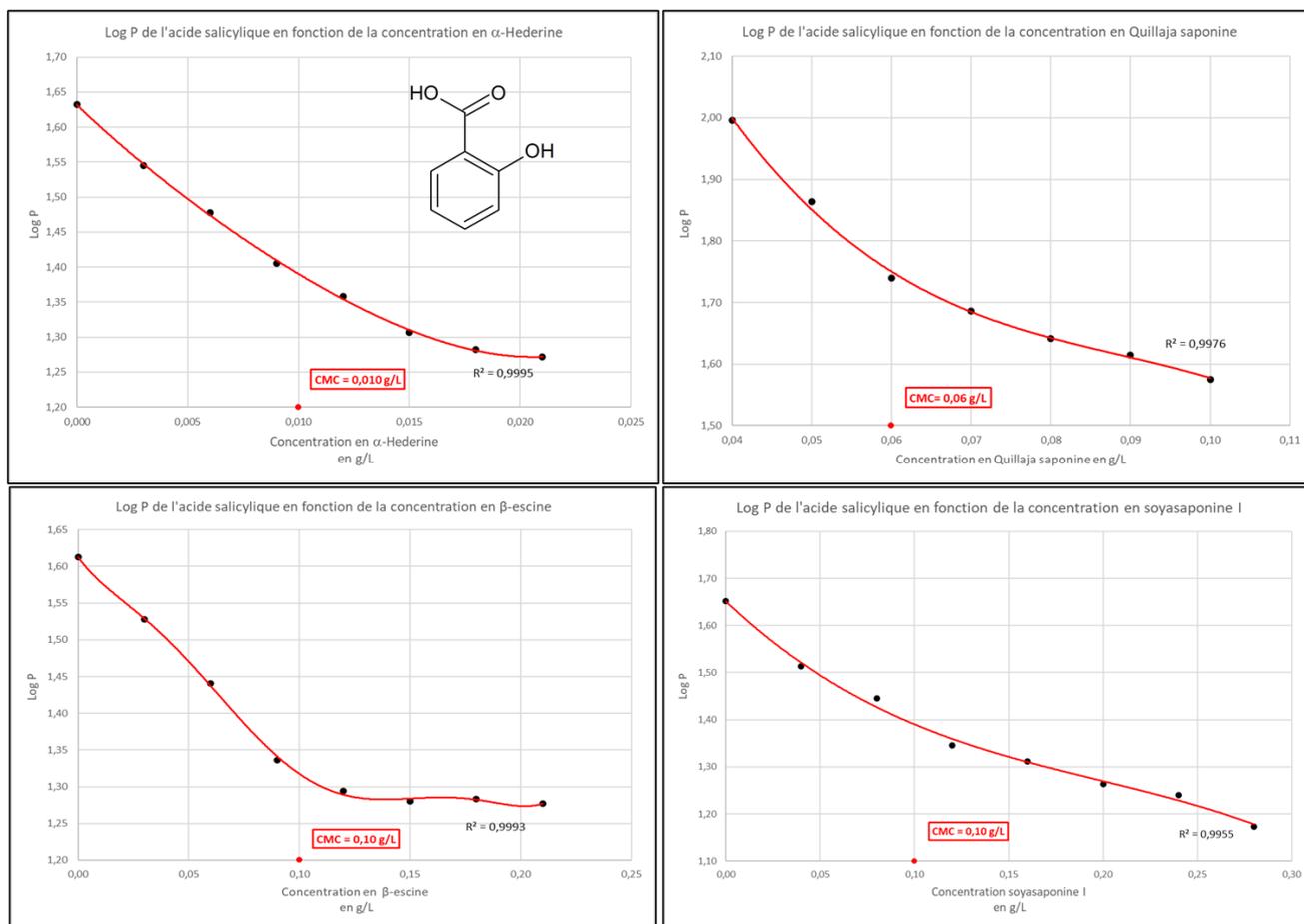


Figure 61 : Profils d'évolution du coefficient de partage de l'acide salicylique en présence de différents saponosides

5.2 Groupe B : la (+)-catéchine

La (+)-catéchine a été notre molécule de référence au cours du développement de notre méthode de mesure par RMN du proton. Ce métabolite naturel appartient au groupe B et se retrouve dans des plantes de MTC comme le thé (*Camellia sinensis* Kuntze), le jujubier (*Ziziphus jujuba* Mill.) ou le cannelier de Ceylan (*Cinnamomum verum* J. Presl.) (174) (175). Les profils d'évolution de son coefficient de partage sont similaires à ceux observés avec la glycyrrhizine (Figure 62)

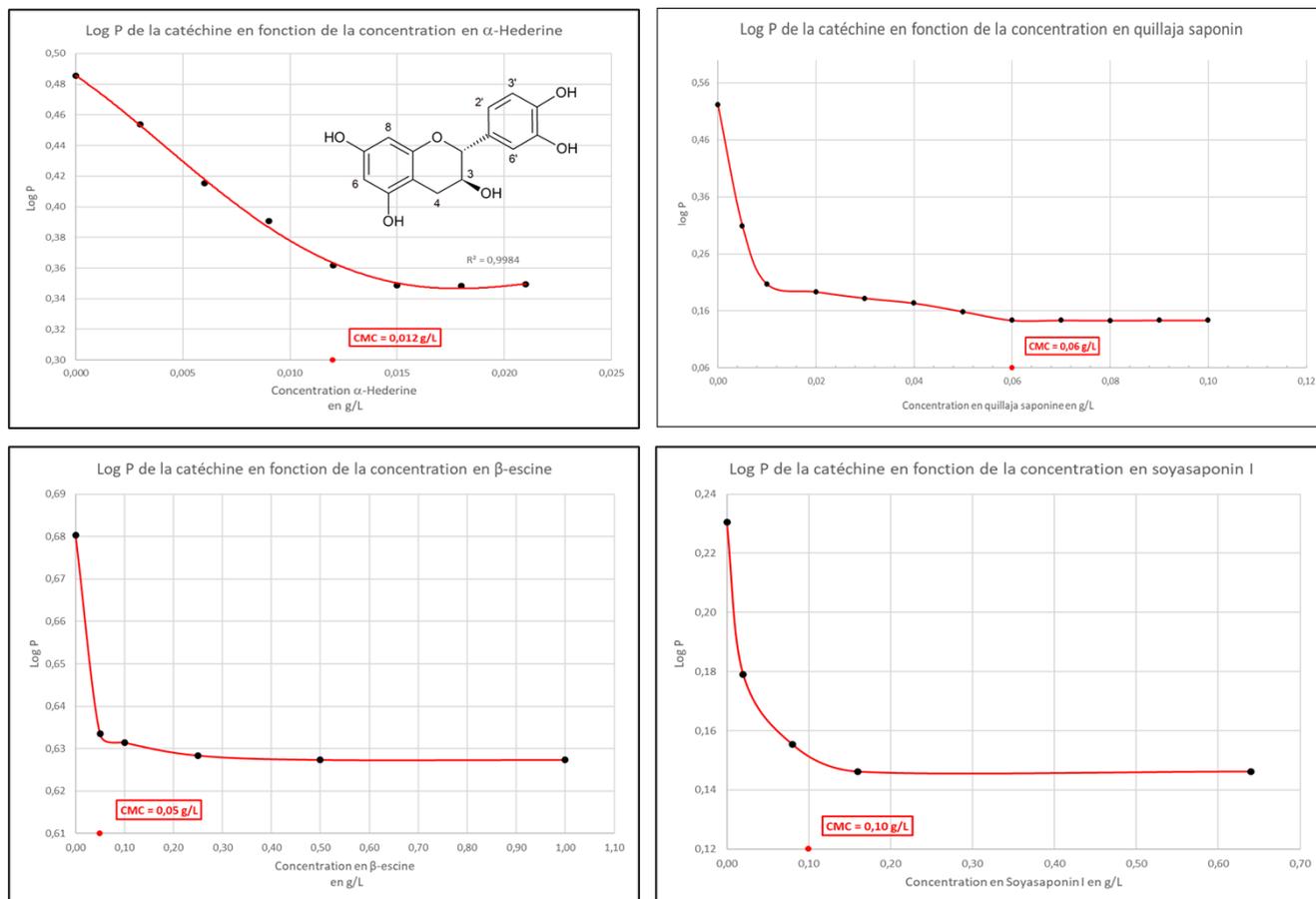


Figure 62 : Profils d'évolution du coefficient de partage de la (+)-catéchine en présence de différents saponosides

5.3 Groupe C : l'acide chlorogénique

L'acide chlorogénique représente les molécules du groupe C. Ce métabolite naturel se retrouve également dans de nombreuses plantes de la Pharmacopée Chinoise comme la « chirette verte » (*Andrographis paniculata* Nees), la sauge chinoise (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) ou le « fil d'or chinois » (*Coptis chinensis* Franch.) (174) (175). Les profils d'évolution de son coefficient de partage sont similaires à ceux observés en présence de glycyrrhizine (Figure 63).

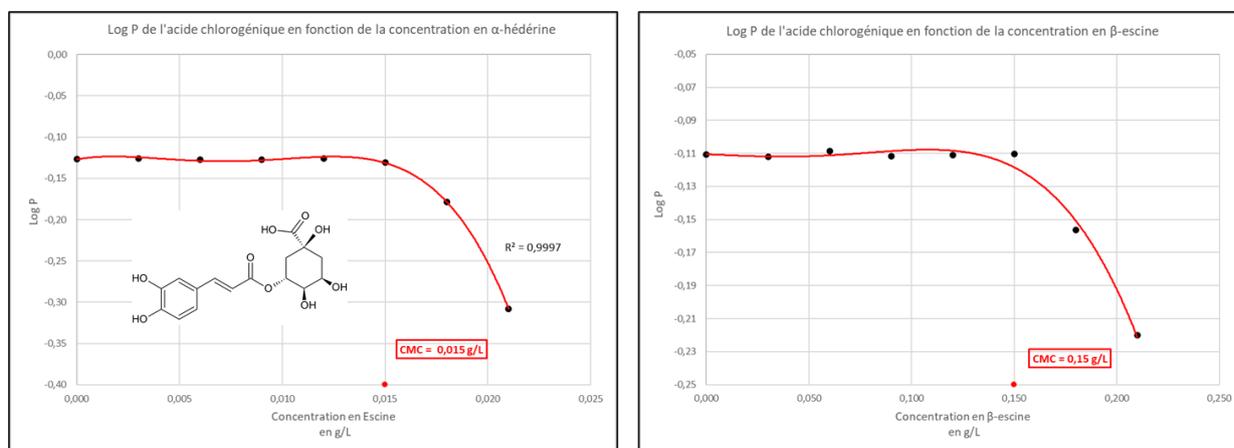


Figure 63 : Profils d'évolution du coefficient de partage de l'acide chlorogénique en présence de différents saponosides

Malheureusement, à cause de la disponibilité limitée en soyasaponin I et en extraits dialysés de *Quillaja saponaria*, des essais complémentaires sur ces saponosides n'ont pas pu être réalisés.

5.4 Groupe D : la caféine

La caféine représente les molécules du groupe D. Ce métabolite naturel se retrouve dans les grains de café mais aussi dans des plantes utilisées en MTC comme le thé (*Camellia sinensis* Kuntze) ou le houx chinois (*Ilex cornuta* Lindl.) (174) (175). Les profils d'évolution de son coefficient de partage sont similaires à ceux observés avec la glycyrrhizine (Figure 64). Pour les mêmes raisons qu'évoquées précédemment, il n'a pas été possible de faire des essais supplémentaires avec la soyasaponin I.

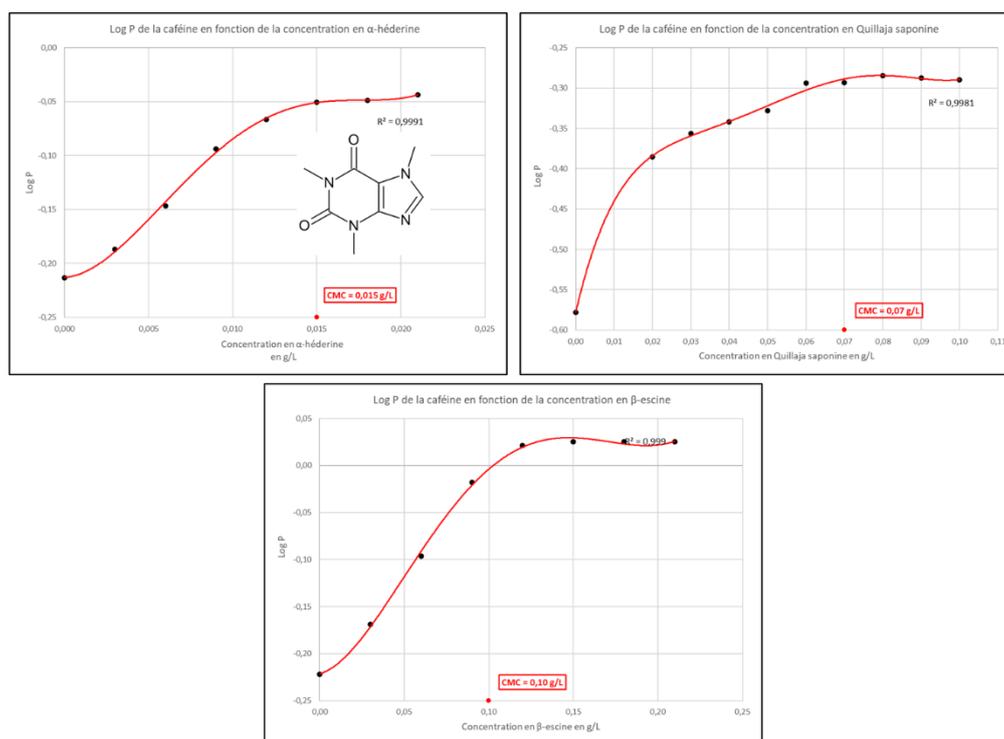


Figure 64 : Profils d'évolution du coefficient de partage de la caféine en présence de différents saponosides

Compte tenu de ces résultats, nous pouvons conclure que notre classification des molécules en groupe s'applique indépendamment de la nature des saponosides en solution.

6 Conclusion

La méthode de mesure du coefficient de partage par RMN du proton que nous avons développée nous a permis de mesurer successivement les coefficients de partage de nombreuses molécules (métabolites naturels ou substances médicamenteuses). Ces travaux nous ont permis d'établir qu'il existe une relation entre la concentration de saponoside en solution et l'évolution du coefficient de partage des molécules en

solution. Cependant cette modification du coefficient de partage n'est pas identique d'une molécule à une autre et dépend de multiples facteurs. En effet, les propriétés tensioactives des saponosides interagissent avec les molécules non seulement par le biais de la formation de complexes micellaires en solution, mais aussi par une action sur l'hydrosolubilité des composés et la dispersion des molécules dans la phase aqueuse du fait de la diminution de la tension superficielle de l'eau. Nous avons ainsi pu constituer cinq groupes de molécules selon le type d'interactions majoritaires et le profil des courbes d'évolution de leurs coefficients de partage.

La prochaine étape de notre travail est de confirmer nos hypothèses sur le comportement des molécules face aux agrégats micellaires par leur observation en microscopie optique.

Chapitre V : Observation par microscopie des amas micellaires

Au cours du Chapitre IV, nous avons établi cinq groupes de métabolites naturels selon leur comportement au contact des saponosides. Nous avons émis l'hypothèse que ces comportements sont liés à la fois à une modification de la tension superficielle de l'eau, aux interactions entre les molécules et à la formation d'agrégats micellaires. Pour élucider ce dernier point, nous avons employé les techniques d'imagerie microscopique afin de visualiser les agrégats micellaires et caractériser leur forme et leur taille.

L'imagerie microscopique peut se classifier en quatre branches selon les technologies employées :

- La microscopie électronique
- La microscopie optique
- La microscopie en champ proche
- La microscopie à rayons X

Pour l'observation des complexes micellaires, les travaux existants portent surtout sur la microscopie électronique et la microscopie optique

- La microscopie électronique utilise un faisceau d'électrons pour étudier les échantillons et agrandir leur image. Leur capacité de grossissement élevée fait de la microscopie électronique un outil de choix pour observer les structures micellaires (176). Par exemple, la microscopie électronique en transmission a été utilisée pour étudier la formation de micelles de caséine dans le lait (177) (178). Ces techniques nécessitent cependant des procédés de préparation des échantillons par cryo-microscopie électronique ou fixation dans l'éthanol. Des techniques plus récentes emploient également la microscopie électronique en phase liquide (*Liquid-Cell Transmission Electron Microscopy* LCTEM) pour observer la dynamique de formation de micelles *in situ* (179).

Bien que la forte résolution en microscopie électronique permette une identification unitaire des micelles, les techniques de préparation des échantillons sont complexes et peuvent dénaturer le mélange micellaire lors de la fixation de l'échantillon. Sans protocoles de préparation minutieux et personnalisés à chaque échantillon étudié, la microscopie électronique se

révèle être trop coûteuse (équipement, produits de contraste et de fixation) et chronophage pour l'étude de nos échantillons.

- La microscopie optique utilise des lentilles optiques pour former l'image en contrôlant la nature et l'intensité du faisceau lumineux. Bien que son grossissement optique soit limité à x2000, son fonctionnement simple et son prix abordable permettent d'étudier rapidement les structures micellaires sans dénaturer leur milieu. Par ailleurs, la microscopie optique est souvent le premier outil d'imagerie utilisé lors d'études sur les tensioactifs micellaires à des résolutions de x20 (180) et de x50 (181).

La plateforme en Imagerie Cellulaire et Tissulaire (PICT) de l'Université de Reims Champagne Ardenne réunit des instruments d'imagerie multi-modalités (microscopies photoniques et électroniques) et multi-échelles (moléculaire, cellulaire et tissulaire).

L'observation de nos structures micellaires est réalisée sur un microscope à statif inversé *Olympus® IX70* avec un objectif à immersion x100 (Figure 65)



Figure 65 : Microscope à statif inversé *Olympus® IX70* (182)

1 Micelles de glycyrrhizine

Nous avons travaillé sur les agrégats micellaires de glycyrrhizine à 1.00 g/L (>CMC) (Figure 66) et les images ont été traitées et mesurées par le logiciel open source ImageJ (*cf* Matériels et Méthodes) (183).

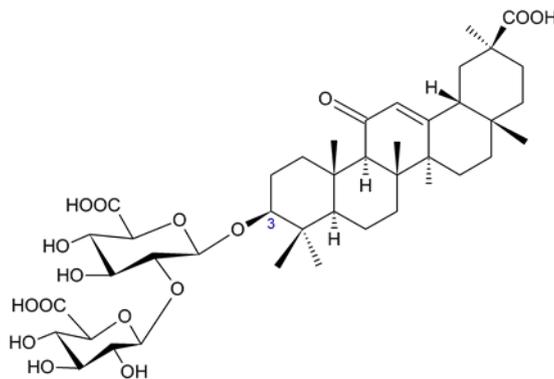
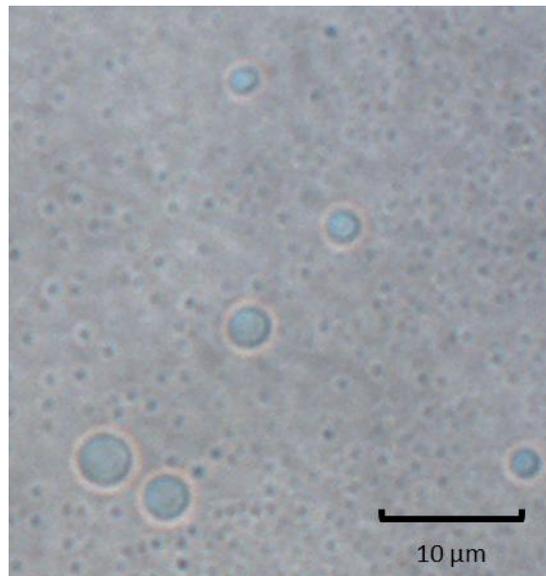


Figure 66 : Agrégats micellaires de glycyrrhizine (1.00 g/L) observés par microscopie optique (x100)

Les agrégats micellaires prennent une forme circulaire de taille variable ayant une aire moyenne de $6.19 \mu\text{m}^2$.

2 Agrégats micellaires de glycyrrhizine en présence d'acide salicylique (groupe A)

Une solution d'acide salicylique à 1.00 g/L a été préparée dans une solution aqueuse contenant une concentration croissante de glycyrrhizine :

- **En absence et à faible concentration de glycyrrhizine (<CMC)**, on n'observe ni micelles ni amas solides d'acide salicylique en solution. L'acide salicylique est donc solubilisé dans l'eau.
- Plusieurs micelles ainsi que quelques amas d'acide salicylique apparaissent **en présence de 0,40 g/L de glycyrrhizine (4xCMC)** (Figure 67).

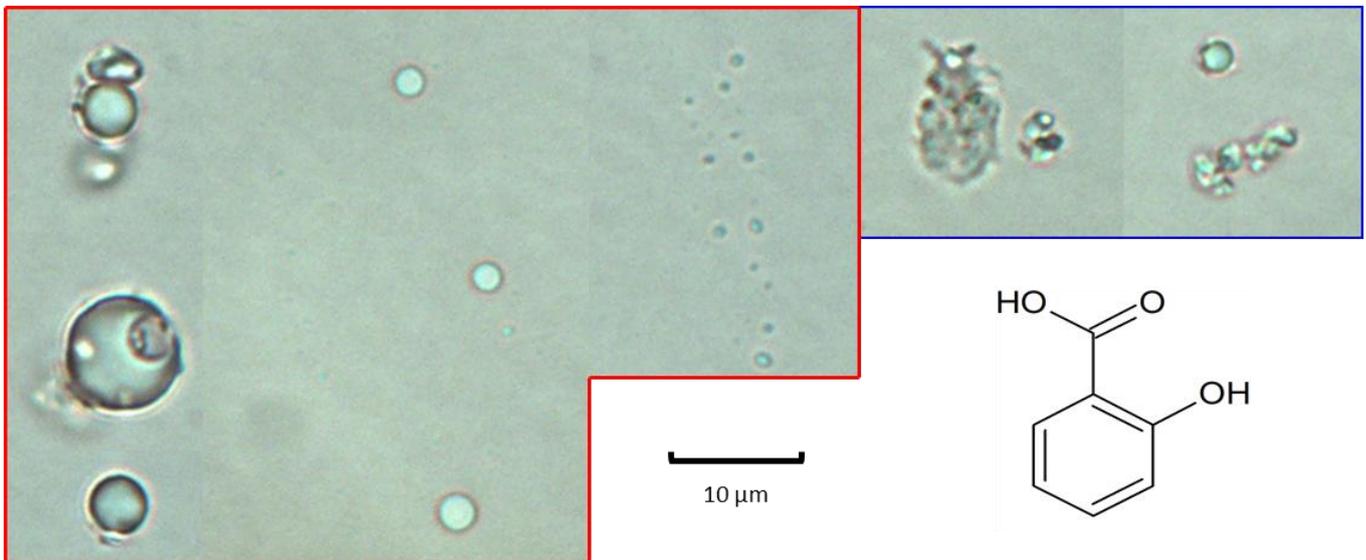


Figure 67 : Agrégats micellaires de glycyrrhizine (0.40 g/L) (>CMC) (cadre rouge) et amas d'acide salicylique (cadre bleu) observés par microscopie optique (x100)

Ces agrégats micellaires prennent une forme sphérique en solution et sont de taille variable avec une aire moyenne de $3.89 \mu\text{m}^2$, soit une aire inférieure à l'aire des micelles de glycyrrhizine seule. Les micelles représentent environ 82% des structures détectées, tandis que les amas d'acide salicylique ne représentent qu'environ 18% des éléments observés.

Si on se reporte aux résultats obtenus dans le Chapitre IV, la solubilité aqueuse de l'acide salicylique augmente avec la concentration de glycyrrhizine en solution. Le fait que les amas insolubles d'acide salicylique n'apparaissent qu'à de très fortes concentrations de glycyrrhizine pourrait s'expliquer par des effets de saturation du milieu aqueux ou par une erreur de manipulation lors de la conception de l'échantillon pour l'analyse par microscopie. N'ayant pu réaliser qu'une seule série d'images, sur un seul composé du groupe A, il nous est difficile de conclure.

3 Agrégats micellaires de glycyrrhizine en présence de catéchine (groupe B)

Une solution à 1.00 g/L de catéchine a été préparée dans une solution aqueuse contenant une concentration croissante de glycyrrhizine.

- La catéchine **en absence de glycyrrhizine** forme de gros agrégats amorphes qui sont sûrement de la catéchine non solubilisée dans l'eau (Figure 68).

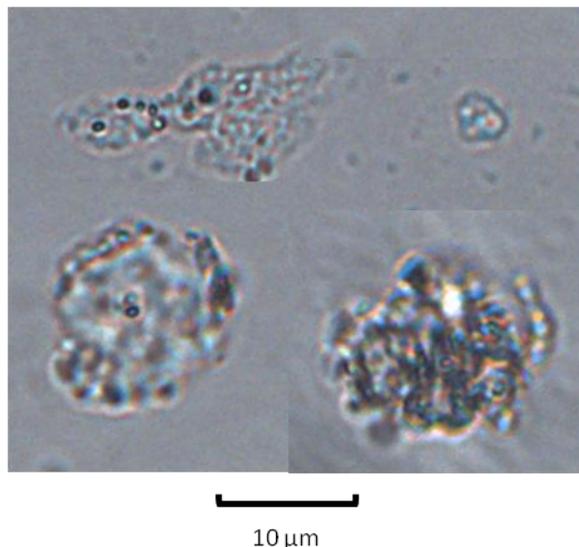


Figure 68 : Particules de catéchine à 1.00 g/L observés par microscopie optique en absence de glycyrrhizine (x100)

- **En présence d'une faible concentration de glycyrrhizine (0.05 g/L) (<CMC)**, nous observons l'apparition de structures sphériques isolées possédant une aire moyenne de $4.31 \mu\text{m}^2$ ainsi que la disparition des amas amorphes précédemment décrits, confirmant l'effet solubilisant de la glycyrrhizine à une concentration inférieure à la CMC dû à la diminution de la tension superficielle de l'eau (Figure 69).

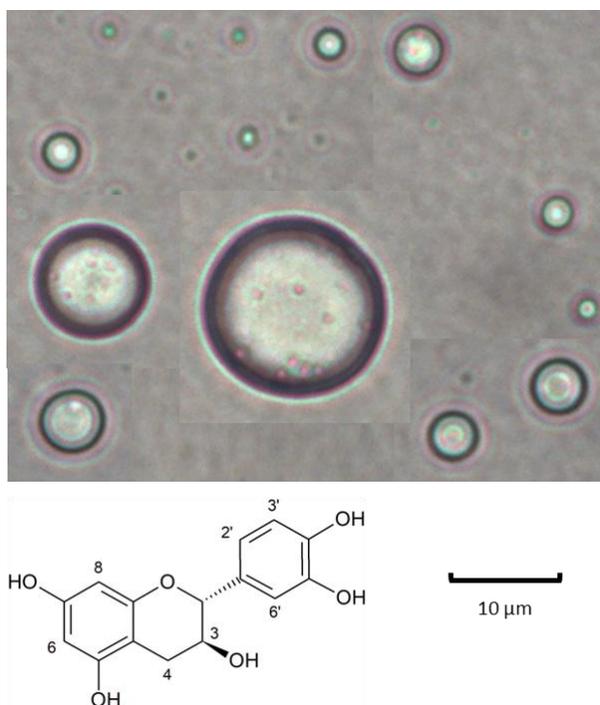


Figure 69 : Agrégats de glycyrrhizine (0.05 g/L) (<CMC) en présence de catéchine (1.00 g/L) observés par microscopie optique (x100)

- **En augmentant la concentration de glycyrrhizine à 0.10 g/L (<CMC)**, le nombre d'amas micellaire augmente et leur aire moyenne augmente à 8.58

μm^2 , soit une aire similaire aux micelles de glycyrrhizine seule. De plus, ces amas se retrouvent le plus souvent sous forme de grappes (Figure 70).

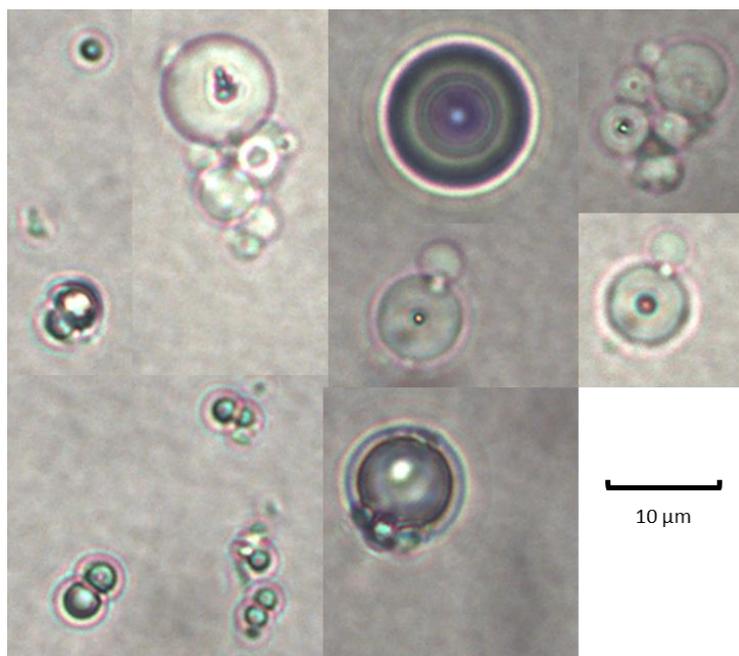


Figure 70 : Agrégats de glycyrrhizine (0.10 g/L) (=CMC) en présence de catéchine (1.00 g/L) observés par microscopie optique ($\times 100$)

La disparition totale des agrégats de catéchine non solubilisée indique que la catéchine a atteint son taux de solubilisation maximum.

- **En augmentant davantage la concentration de glycyrrhizine à 0.30 g/L (>CMC)**, le nombre de micelles ainsi que leur taille augmentent pour atteindre une aire moyenne de $12.31 \mu\text{m}^2$ et se rassemblent en grappes (Figure 71).

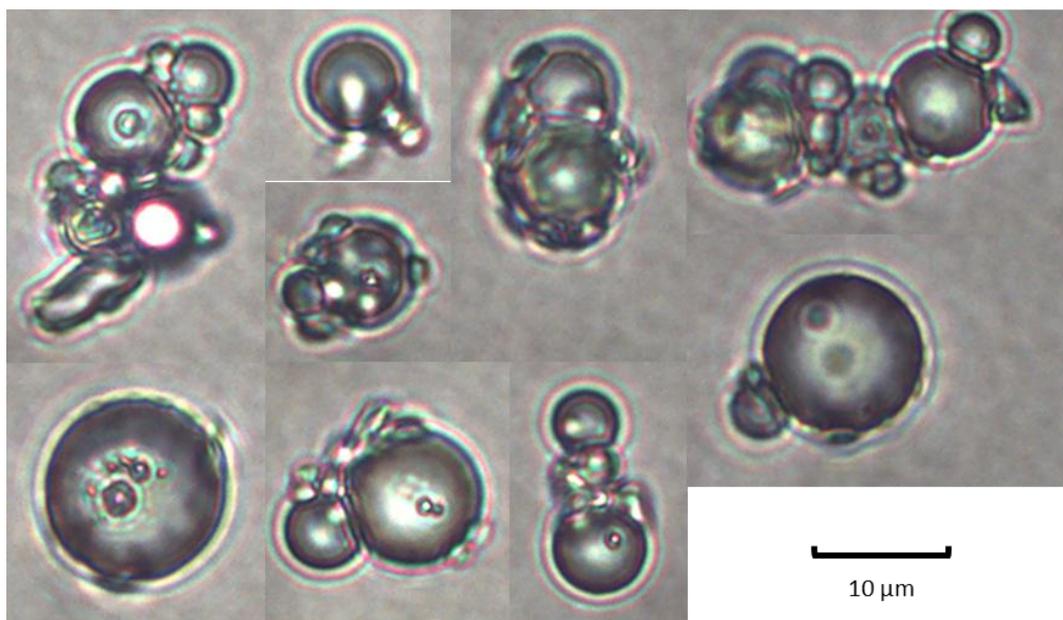


Figure 71 : Agrégats micellaires de glycyrrhizine (0.30 g/L) (>CMC) en présence de catéchine (1.00 g/L) observés par microscopie optique ($\times 100$)

Une fois de plus, l'absence d'agrégats de catéchine confirme que celle-ci est soit entièrement solubilisée dans la phase aqueuse ou que la catéchine se retrouve piégée au sein des micelles formées, ce qui contredirait les résultats obtenus sur l'évolution du coefficient de partage.

Les différences de réfringence entre les micelles des Figures 69 et 70 peuvent aussi s'expliquer par une plus grande densité de saponosides dans les complexes micellaires de la Figure 70 due à la concentration plus élevée en glycyrrhizine (3 fois supérieure à la concentration de la Figure 69).

4 Agrégats micellaires de glycyrrhizine en présence d'acide chlorogénique (Groupe C)

Une solution à 1.00 g/L d'acide chlorogénique a été préparée dans une solution aqueuse contenant une concentration croissante de glycyrrhizine.

- **En absence de glycyrrhizine**, quelques structures éparses d'acide chlorogénique (d'une aire moyenne $7.07 \mu\text{m}^2$) sont visibles. Celles-ci ont une forme caractéristique de systèmes cristallins (Figure 72).

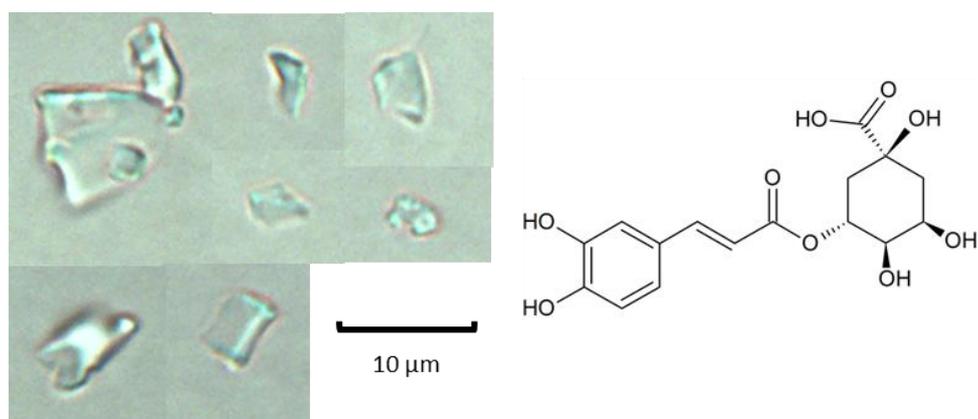


Figure 72 : Agrégats d'acide chlorogénique (1.00 g/L) en absence de glycyrrhizine observés par microscopie optique (x100)

- **En augmentant la concentration de glycyrrhizine à 0.05 g/L (<CMC)**, le nombre et la taille des amas d'acide chlorogénique restent inchangés et aucun phénomène de solubilisation de ces structures n'est observé, ce qui confirme que la diminution de la tension de surface par la glycyrrhizine n'a pas d'influence sur l'hydrosolubilité de l'acide chlorogénique (Figure 73).

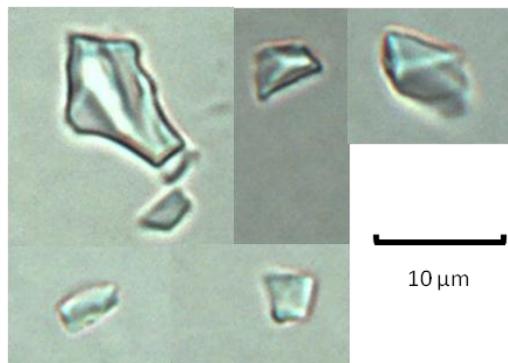


Figure 73 : Agrégats d'acide chlorogénique (1.00 g/L) observés par microscopie optique en présence de 0.05 g/L de glycyrrhizine (<math>< CMC</math>)(x100)

- Cependant, **en augmentant la concentration de glycyrrhizine à 0.40 g/L (>CMC)**, les agrégats d'acide chlorogénique disparaissent et des structures micellaires sphériques d'aire moyenne $3.98 \mu\text{m}^2$ apparaissent (Figure 74). Ce comportement confirme que l'acide chlorogénique est solubilisé dans l'eau par son incorporation dans des micelles de glycyrrhizine.

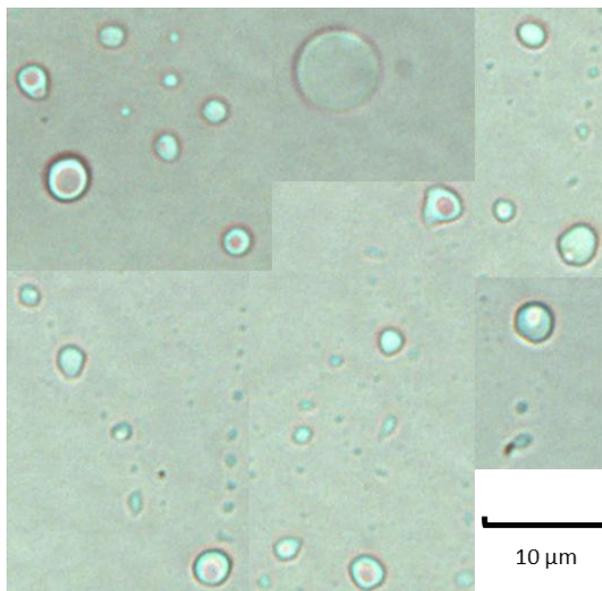


Figure 74 : Agrégats micellaires de glycyrrhizine (0.40 g/L) (>CMC) en présence d'acide chlorogénique (1.00 g/L) observés par microscopie optique (x100)

5 Agrégats micellaires de glycyrrhizine en présence de caféine (groupe D)

Une solution à 1.00 g/L de caféine a été préparée dans une solution aqueuse contenant une concentration croissante de glycyrrhizine.

- **En absence de glycyrrhizine**, on observe de petites structures de caféine. Ces amas sont peu nombreux, de petite taille (aire moyenne de $4.38 \mu\text{m}^2$) et d'aspect cristallin (Figure 75).

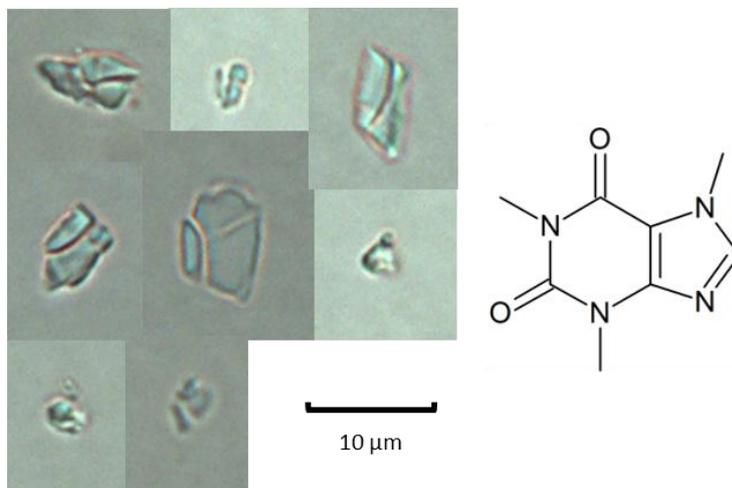


Figure 75 : Agrégats de caféine (1.00 g/L) en absence de glycyrrhizine observés par microscopie optique (x100)

- **L'augmentation de la concentration de glycyrrhizine** ne provoque aucune modification notable lorsqu'elle est inférieure à sa CMC.
- **A partir de 0.50 g/L de glycyrrhizine (=CMC)**, quelques structures micellaires sphériques apparaissent en plus des agrégats précédemment décrits. Ces micelles représentent environ 30 % des éléments observés avec une aire moyenne de 7.38 μm^2 , soit environ la même taille que les micelles de glycyrrhizine seule (Figure 76).

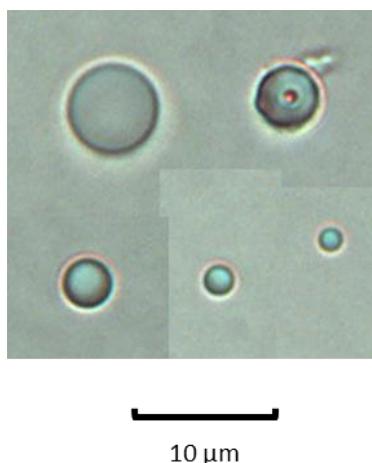


Figure 76 : Agrégats micellaires de glycyrrhizine (0.50 g/L) en présence de caféine (1.00 g/L) observés par microscopie optique (x100)

La persistance des amas insolubles de caféine confirme les résultats obtenus sur l'évolution du coefficient de partage : les molécules de caféine ne sont pas solubilisées dans l'eau sous l'action de la glycyrrhizine. Néanmoins l'examen microscopique ne permet pas nécessairement de confirmer une interaction majorée avec la phase octanolique.

6 Conclusion

L'examen microscopique a permis de confirmer le comportement solubilisant des saponosides comme la glycyrrhizine sur les molécules du groupe A et B. Comme mentionné dans le Chapitre IV, ce comportement se traduit dans ces groupes par une disparition progressive des agrégats insolubles en phase aqueuse avec l'augmentation de la concentration en saponoside. Dans le cas des molécules du groupe A, les micelles n'incorporent pas toutes les molécules insolubles et leur nombre devrait diminuer davantage lorsque la concentration en glycyrrhizine augmente au-delà de sa CMC. Pour les molécules du groupe B, à partir de la CMC, tous les agrégats ont été solubilisés mais il n'est pas possible à l'heure actuelle de savoir s'il y a eu une encapsulation de ces molécules dans les complexes micellaires.

Nous avons aussi confirmé que l'effet de solubilisation par diminution de la tension de surface était absent pour les molécules du groupe C. La diminution du coefficient de partage n'a lieu que lorsque les agrégats insolubles sont incorporés dans les micelles.

Pour les molécules du groupe D, nous avons confirmé que ni la diminution de la tension de surface de l'eau, ni la formation de micelles n'influencent la solubilité de ces molécules. Néanmoins, l'examen microscopique ne peut pas entièrement confirmer l'augmentation du coefficient de partage puisque nous travaillons sans phase lipidique.

La prochaine étape de notre travail consiste désormais à mesurer l'intérêt de l'ajout de saponosides dans les formulations de MTC, notamment en ce qui concerne l'extraction de métabolites naturels en phase aqueuse à destination de la prise orale.

Chapitre VI : Etude sur des modèles expérimentaux de formulations traditionnelles

Dans le Chapitre IV, nous avons confirmé que les saponosides ont une activité significative sur le coefficient de partage et l'hydrosolubilité de molécules naturelles. Cette modification du coefficient de partage devrait par la suite produire un effet mesurable sur la concentration de métabolites lors de leur extraction en phase aqueuse. Afin de valider les résultats précédemment obtenus par RMN, des modèles expérimentaux de formulations traditionnelles simples ont donc été préparés afin de mesurer les différences de concentrations des divers métabolites naturels en phase aqueuse en présence de saponosides par CLHP.

Les échantillons sont préparés par une extraction aqueuse sur des parties de plante riches en métabolites en suivant les recommandations de la Pharmacopée Française (184) (pour les infusions en tisane) ou de la MTC (pour les décoctions et macérations). En effet, ces modes d'extraction en phase aqueuse sont les plus utilisés dans les formulations de MTC (185). Les extraits sont ensuite filtrés puis lyophilisés pour obtenir des extraits secs qui seront analysés par chromatographie en phase inverse.

1 Cas de la (+)-catéchine (groupe B)

L'extraction de la (+)-catéchine se réalise à partir de feuilles de thé vert (*Camellia sinensis* Kuntze). En effet, les différentes méthodes de production du thé vert permettent de stopper rapidement l'oxydation des feuilles peu de temps après leur cueillette (186). Le thé qui en résulte contient alors une plus grande concentration de flavonoïdes (de type catéchine) que les autres variétés de thé. Notons que le thé vert contient également une certaine concentration de caféine mais cette molécule sera étudiée plus en détail lors d'une analyse spécifique.

Le thé est la boisson la plus consommée après l'eau compte tenu de ses nombreuses propriétés thérapeutiques et de son influence culturelle (186). De nos jours, le thé vert représente un marché lucratif bénéficiant de nombreuses variétés et marques. D'un point de vue analytique, cela se traduit par de nombreuses variations en termes de concentration en métabolites secondaires, notamment en flavonoïdes et en caféine. Rien que pour le thé vert chinois, il est possible de retrouver plusieurs centaines de variétés différentes. Des études ont également démontré que la période de récolte et la température d'infusion influencent grandement les concentrations en métabolites secondaires (187). Le lot étudié correspond à des feuilles de thé vert en

vrac de qualité pharmaceutique commercialisé par l'herboristerie Cailleau®. Les infusions à base de feuille de thé vert ont été préparées selon les recommandations de la pharmacopée française (188) : 10.00 g/L, infusées pendant 15 minutes.

Pour notre modèle expérimental, nous nous sommes appuyés sur la monographie de la Pharmacopée Européenne pour le dosage chromatographique des catéchines dans les feuilles de thé vert (189). La phase stationnaire est une colonne de chromatographie en gel de silice octadécylsilylée postgreffée (C18) et la phase mobile est un système d'éluant composé de 3 solutions A, B et C (Tableau 13).

Tableau 13 : Système d'éluant pour la détection de la catéchine dans le thé vert

Intervalles (en minutes)	Phase mobile A (HCOOH anhydre 0.05 % dans H ₂ O V/V)	Phase mobile B (HCOOH anhydre 0.05% dans CH ₃ OH)	Phase mobile C (CH ₃ CN)
0-5	97	0	3
5-23	97 → 67	0 → 30	3
23-29	67	30	3
29-30	67 → 30	30 → 67	3
30-31	30	67	3

La détection se fait par spectrophotométrie UV à une longueur d'onde de 210 nm. Cette longueur d'onde correspond au maximum d'absorption de la (+)-catéchine dans la littérature (190) (Figure 77).

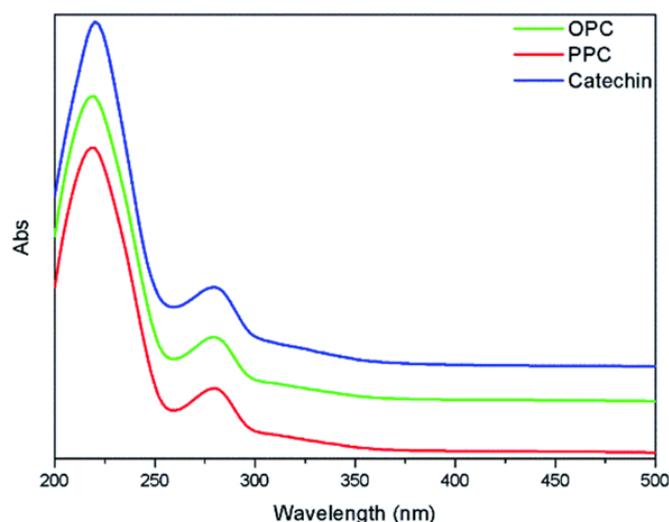


Figure 77 : Maximum d'absorption de la (+)-catéchine (en bleu) (190)

Cependant, la monographie de la Pharmacopée Européenne ne précise pas la température du système et nous l'avons donc fixée à 30°C. La monographie fournit également un chromatogramme de référence du dosage des catéchines par ce système de solvant (Figure 78). La (+)-catéchine que nous recherchons possède un temps de rétention qui devrait se situer à 19 minutes.

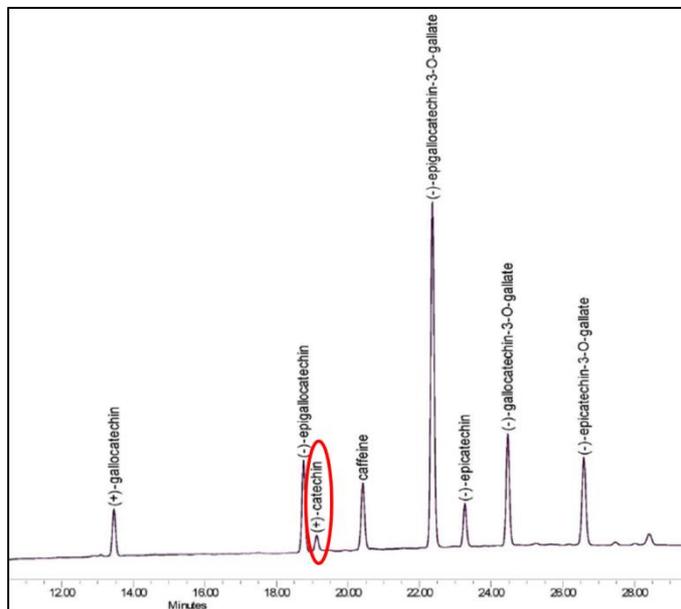


Figure 78 : Chromatogramme de référence de la monographie du thé vert de la Pharmacopée Européenne (189)

Dans la mise en pratique de ce modèle expérimental, nous avons testé un échantillon de (+)-catéchine (1.0 g/L) pure et avons trouvé un temps de rétention de 15 minutes (Figure 79)

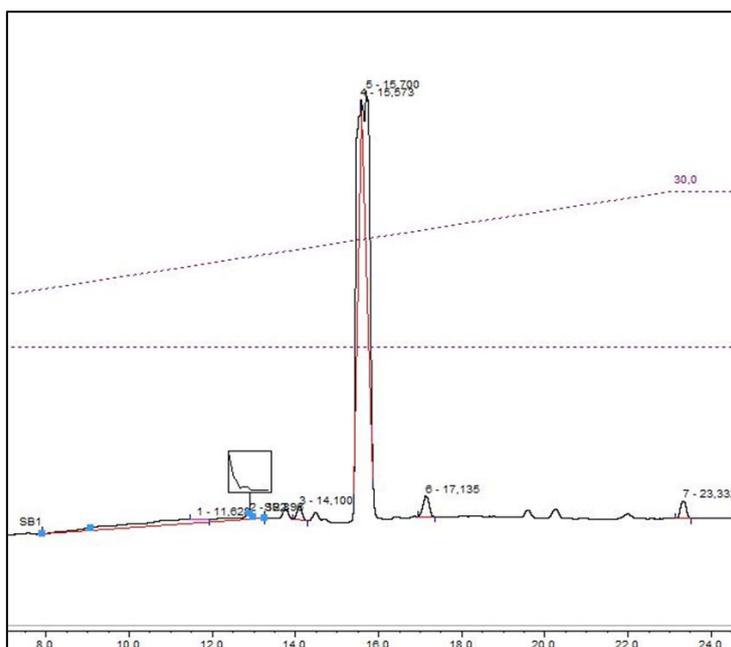


Figure 79 : Chromatogramme de la (+)-catéchine dans les conditions expérimentales

Par la suite, nous avons préparé trois infusions successives de thé vert selon les recommandations mentionnées plus haut.

- L'infusion A₁ a été préparée en absence de glycyrrhizine. La méthode chromatographique de dosage de la (+)-catéchine détecte la molécule à un temps de rétention de 15.42 minutes pour une aire sous la courbe de 142 mAU.min (Figure 80)
- L'infusion B₁ a été préparée en ajoutant 0.05 g/L de glycyrrhizine (<CMC) dans le mélange au début de l'infusion. La (+)-catéchine est détectée à un temps de rétention de 15.53 minutes pour une aire sous la courbe de 167 mAU.min (Figure 80)
- L'infusion C₁ a été préparée en ajoutant 0.30 g/L de glycyrrhizine (>CMC) dans le mélange au début de l'infusion. La (+)-catéchine est détectée à un temps de rétention de 15.41 minutes pour une aire sous la courbe de 195 mAU.min (Figure 80)

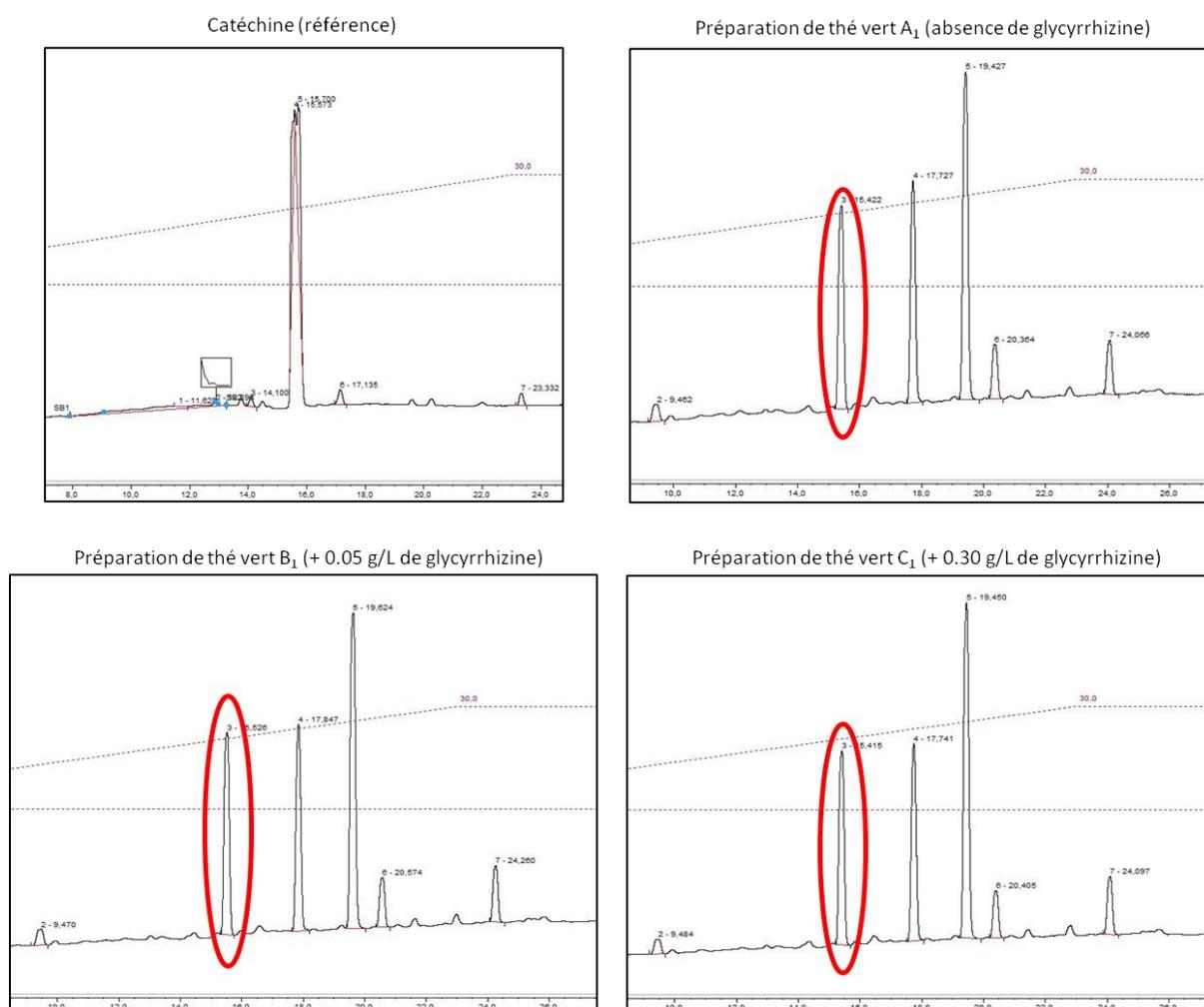


Figure 80 : Chromatogrammes de la (+)-catéchine (entourée en rouge) dans les infusions A₁, B₁ et C₁

Ce jeu de trois infusions a été réalisé en trois exemplaires. Nous avons rassemblé l'ensemble des résultats dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Tableau récapitulatif de l'évolution de l'aire sous la courbe de la (+)-catéchine lors de l'ajout de glycyrrhizine (CMC=0.20 g/L)

Nom de l'infusion	Concentration de glycyrrhizine (en g/L)	Aire sous la courbe (en mAU.min)	Moyenne (en mAU.min)
Infusion A ₁ /A ₂ /A ₃	0	142/194/162	166
Infusion B ₁ /B ₂ /B ₃	0.05	167/179/214	187
Infusion C ₁ /C ₂ /C ₃	0.30 (>CMC)	195/232/245	224

Les résultats de l'infusion A₂ ou de l'infusion B₂ ne sont pas cohérents par rapport aux résultats des autres infusions et leurs valeurs d'aire sous la courbe ne seront donc pas prises en compte dans notre conclusion. Pour les autres infusions, nous observons une augmentation progressive de l'aire sous la courbe du pic de la (+)-catéchine suivant l'augmentation de la concentration en glycyrrhizine. Lorsque l'on compare les aires sous la courbe, on obtient les gains suivants (Tableau 15)

Tableau 15 : Comparaison des aires sous la courbe

Infusion 1	Infusion 2	Infusion3	Moyenne
B ₁ /A ₁ = +18%	B ₂ /A ₂ = -8%	B ₃ /A ₃ = +32%	B/A = +14%
C ₁ /B ₁ = +17%	C ₂ /B ₂ = +30%	C ₃ /B ₃ = +14%	C/B = +20%
C ₁ /A ₁ = +37%	C ₂ /A ₂ = +19%	C ₃ /A ₃ = +51%	C/A = +36%

Ce comportement confirme en partie l'hypothèse formulée dans le Chapitre IV. Lors de l'infusion, les molécules les plus hydrosolubles sont extraites en plus grande quantité mais la présence de tensioactif lors de l'extraction améliore l'hydrosolubilité des molécules du groupe B (comme la catéchine) ce qui augmente sa concentration en phase aqueuse. Compte tenu des résultats obtenus sur l'évolution du coefficient de partage, on devrait s'attendre à un maximum d'extraction à partir de la CMC de la glycyrrhizine (0.20 g/L), ce qui n'a pas pu être vérifié faute d'expériences réalisées à des concentrations en saponoside supérieures à la CMC (par exemple à 0,40 ou

1,00 g/L). L'utilisation de saponosides dans les formulations de MTC permet donc d'améliorer l'extraction des molécules du groupe B en phase aqueuse.

2 Cas de l'aconitine (groupe A)

L'extraction de l'aconitine se réalise traditionnellement à partir des racines d'aconit (*Aconitum napellus* L.). Les plantes du genre *Aconitum* sont couramment utilisées dans les médecines traditionnelles asiatiques pour traiter de nombreuses maladies comme l'arthrose, la goutte, le cancer ou les inflammations (191). Ainsi, de nombreuses formulations de MTC emploient les racines d'aconit comme ingrédient principal. Les différentes techniques analytiques de quantification de ces alcaloïdes reposent essentiellement sur le couplage de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse (191).

Le lot étudié est constitué de racines d'*Aconitum napellus* L. achetées à la Coopération Pharmaceutique Française. Les extractions ont été réalisées par macération à froid pendant 24h afin de limiter les réactions de réduction et d'hydrolyse de l'aconitine qui peuvent avoir lieu dans les préparations à chaud comme les décoctions ou les infusions (192). Ces macérations aqueuses ont été réalisées sur 24h en suivant les quantités décrites dans les formulations de MTC (120), soit environ 60 g/L.

Pour notre modèle expérimental, nous nous sommes appuyés sur un article de 2013 décrivant une méthode de quantification de l'aconitine par chromatographie en phase inverse (193). La phase stationnaire est une colonne en gel de silice octadécylsilylée postgreffée (C18). La phase mobile est un système de solvants $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}+(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$ 0.10% (45/55, v/v). La détection se fait au spectrophotomètre UV à une longueur d'onde de 235 nm. Cette longueur d'onde correspond au maximum d'absorption de l'aconitine dans la littérature (194) (Figure 81).

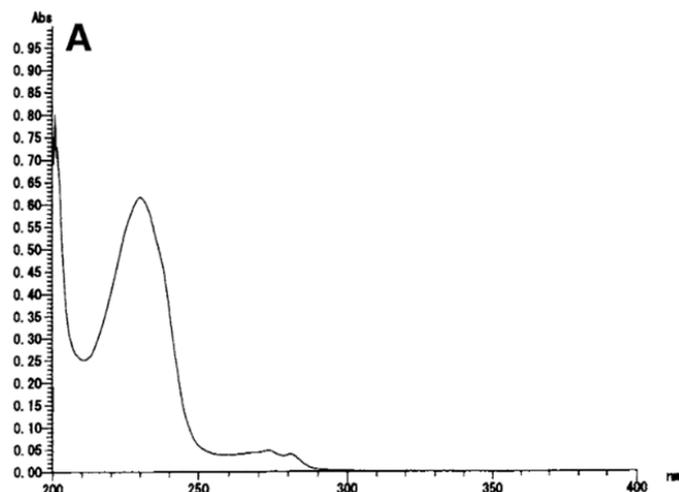


Figure 81 : Maximum d'absorption de l'aconitine (194)

Dans la mise en pratique de ce modèle expérimental, nous avons testé un échantillon d'aconitine pure et avons trouvé un temps de rétention de 27 minutes (Figure 82).

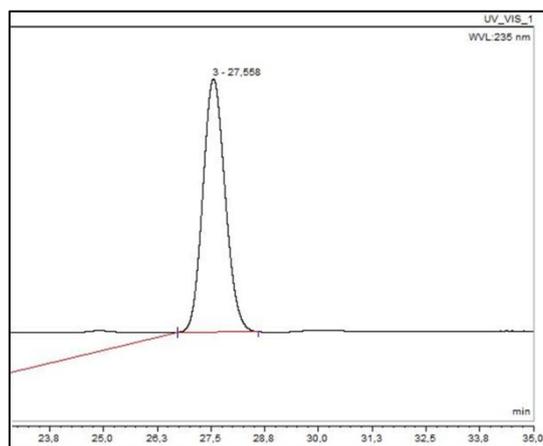


Figure 82 : Chromatogramme de l'aconitine dans les conditions expérimentales

- La macération A a été préparée en absence de glycyrrhizine en solution. La méthode chromatographique de dosage de l'aconitine détecte la molécule à un temps de rétention de 26.27 minutes pour une aire sous la courbe de 8 mAU.min (Figure 83).
- La macération B a été préparée en ajoutant 0.04 g/L de glycyrrhizine (<CMC) dans le mélange au début de la macération. L'aconitine est détectée à un temps de rétention de 24.58 minutes pour une aire sous la courbe de 30 mAU.min (Figure 83).
- La macération C a été préparée en ajoutant 0.10 g/L de glycyrrhizine (<CMC) dans le mélange au début de la macération. L'aconitine se détecte à un temps

de rétention de 24.78 minutes pour une aire sous la courbe de 19 mAU.min (Figure 83).

- La macération D a été préparée en ajoutant 0.20 g/L de glycyrrhizine (>CMC) dans le mélange au début de la macération. Dans ce cas, l'aconitine est détectée à un temps de rétention de 26.25 minutes pour une aire sous la courbe de 8 mAU.min (Figure 83).

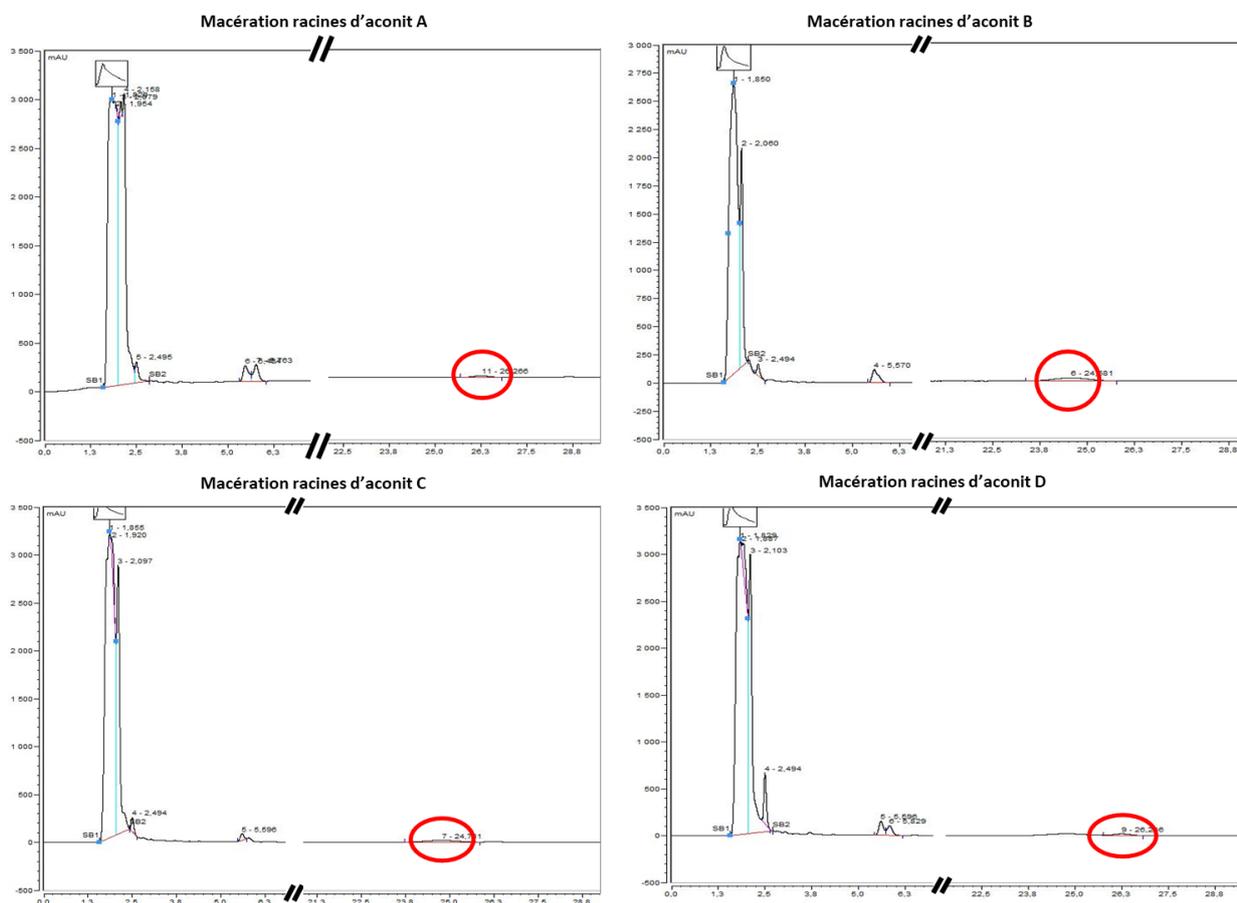


Figure 83 : Chromatogrammes de l'aconitine (entourée en rouge) dans les macérations A, B, C et D

Nous avons rassemblé ces résultats dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Tableau récapitulatif de l'évolution de l'aire sous la courbe de l'aconitine lors de l'ajout de glycyrrhizine (CMC=0.10 g/L)

Nom de la macération	Concentration de glycyrrhizine (en g/L)	Aire sous la courbe (en mAU.min)	Gain par rapport à A
Macération A	0	8	-
Macération B	0.04 (<CMC)	30	+275%
Macération C	0.10 (=CMC)	19	+137%
Macération D	0.20 (>CMC)	8	0%

L'évolution de l'aire sous la courbe de l'aconitine ne permet pas de corroborer entièrement l'hypothèse formulée dans le Chapitre IV sur le comportement du coefficient de partage. Dans un premier temps, nous observons une augmentation de l'aire sous la courbe entre les macérations A et B, avec un gain de +275%. Mais à partir de la CMC, l'augmentation de l'aire sous la courbe est moindre, seulement +137% entre les macérations C et A, voire nulle entre les macérations D et A. Il est possible que le mode d'extraction de l'aconitine ne soit pas adapté. En effet, comme mentionné précédemment, l'aconitine est sensible aux réactions de réduction et d'hydrolyse lors de la macération et de la décoction (192) en phase aqueuse. La quantité d'aconitine passant en phase aqueuse est donc susceptible à de grandes variations selon la méthode d'extraction. Il est possible que le mode de préparation des racines d'aconit fasse également partie des moyens visant à diminuer la toxicité de la formulation. De plus, par manque de temps, nous n'avons pu réaliser cette extraction qu'une seule fois.

3 Cas de l'artémisinine (groupe A)

Le cas de l'artémisinine constitue un sujet d'étude intéressant. Lors de nos essais en RMN du proton, le coefficient de partage élevé de l'artémisinine diminue significativement lors de l'ajout de saponoside en solution. En chromatographie liquide, ce phénomène devrait se traduire par l'apparition progressive d'un pic au temps de rétention de l'artémisinine corrélé à l'ajout de saponoside : l'extraction aqueuse de l'artémisinine devrait s'améliorer avec la diminution de son coefficient de partage.

L'artémisinine est couramment utilisée en MTC pour traiter la fièvre et les accès palustres et sa structure moléculaire sert de matière première dans les réactions d'hémisynthèse de l'artesunate et de l'artemether, deux substances médicamenteuses antipaludéennes (195). Le lot étudié est constitué de feuilles d'armoise annuelle (*Artemisia annua* L.) fournies par les laboratoires Pierre Fabre. Les extractions ont été réalisées par décoction aqueuse à ébullition sur des quantités recommandées en MTC (120) soit 20 g/L décoctées pendant 15 minutes.

Pour notre modèle expérimental, nous nous sommes appuyés sur un article de 2010 décrivant une méthode de quantification de l'artémisinine par chromatographie en phase inverse (195). La phase stationnaire est une colonne en gel de silice octadécylsilylée postgreffée (C18). La phase mobile est un système de solvant CH₃CN/H₂O (70/30, v/v) + CH₃COOH 0.10%. La détection se fait au

spectrophotomètre UV à une longueur d'onde de 254 nm. Cette longueur d'onde correspond au maximum d'absorption de l'aconitine dans la littérature (196) (Figure 84).

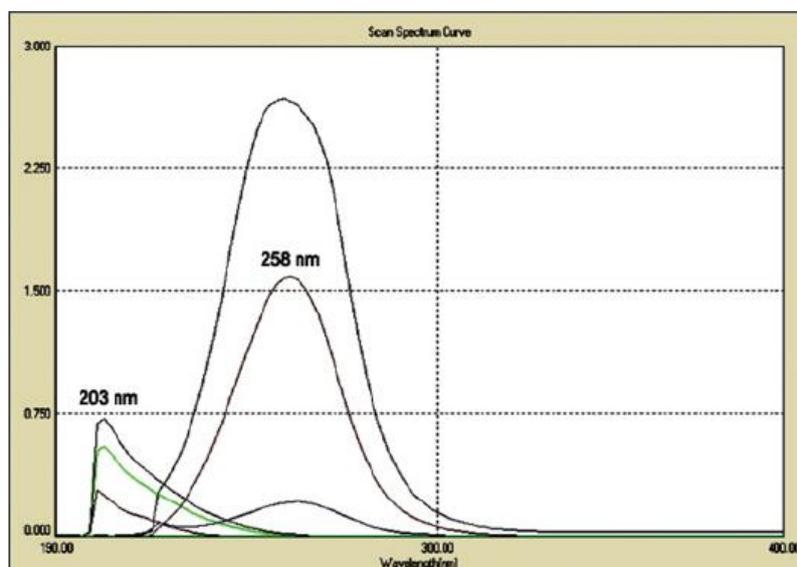


Figure 84 : Maximum d'absorption de l'artémisinine (196)

Dans la mise en pratique de ce modèle expérimental, nous avons testé un échantillon d'artémisinine pure et avons déterminé un temps de rétention de 6 minutes (Figure 85).

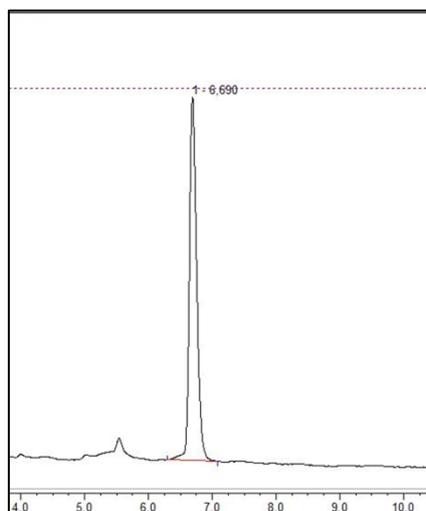


Figure 85 : Chromatogramme de l'artémisinine dans les conditions expérimentales

- La décoction A a été préparée en absence de glycyrrhizine en solution. La méthode chromatographique de dosage ne détecte pas l'artémisinine car dans ces conditions d'extraction, la molécule est trop hydrophobe pour être extraite en phase aqueuse (Figure 86)

- La décoction B a été préparée en ajoutant 0.04 g/L de glycyrrhizine (<CMC) dans le mélange au début de la décoction. La méthode chromatographique ne détecte toujours pas l'artémisinine (Figure 86)
- La décoction C a été préparée en ajoutant 0.08 g/L de glycyrrhizine (<CMC). L'artémisinine est détectée à un temps de rétention de 6.55 minutes pour une aire sous la courbe de 3 mAU.min (Figure 86)
- La décoction D a été préparée en ajoutant 0.16 g/L de glycyrrhizine (>CMC). La méthode chromatographique détecte l'artémisinine à un temps de rétention de 6.35 minutes pour une aire sous la courbe de 5 mAU.min (Figure 86)

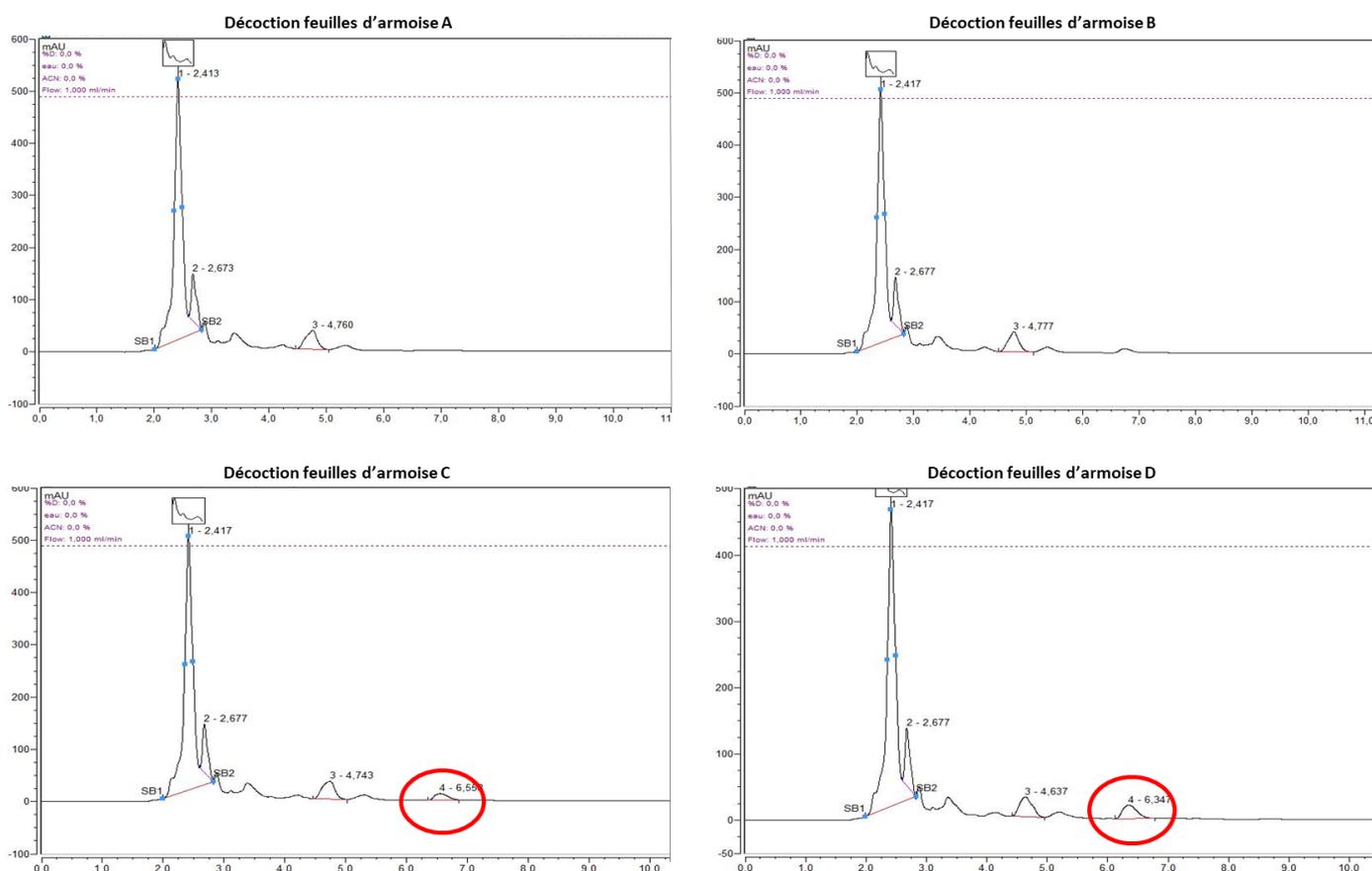


Figure 86 : Chromatogrammes de l'artémisinine (entourée en rouge) dans les décoctions A, B, C et D

- La décoction E a été préparée en ajoutant 0.32 g/L de glycyrrhizine (>CMC).et l'artémisinine est ici détectée à un temps de rétention de 6.16 minutes pour une aire sous la courbe de 9 mAU.min (Figure 87)
- La décoction F a été préparée en ajoutant 0.64 g/L de glycyrrhizine (>CMC). La méthode chromatographique de dosage de l'artémisinine détecte la molécule à un temps de rétention de 6.00 minutes pour une aire sous la courbe de 19 mAU.min (Figure 87)

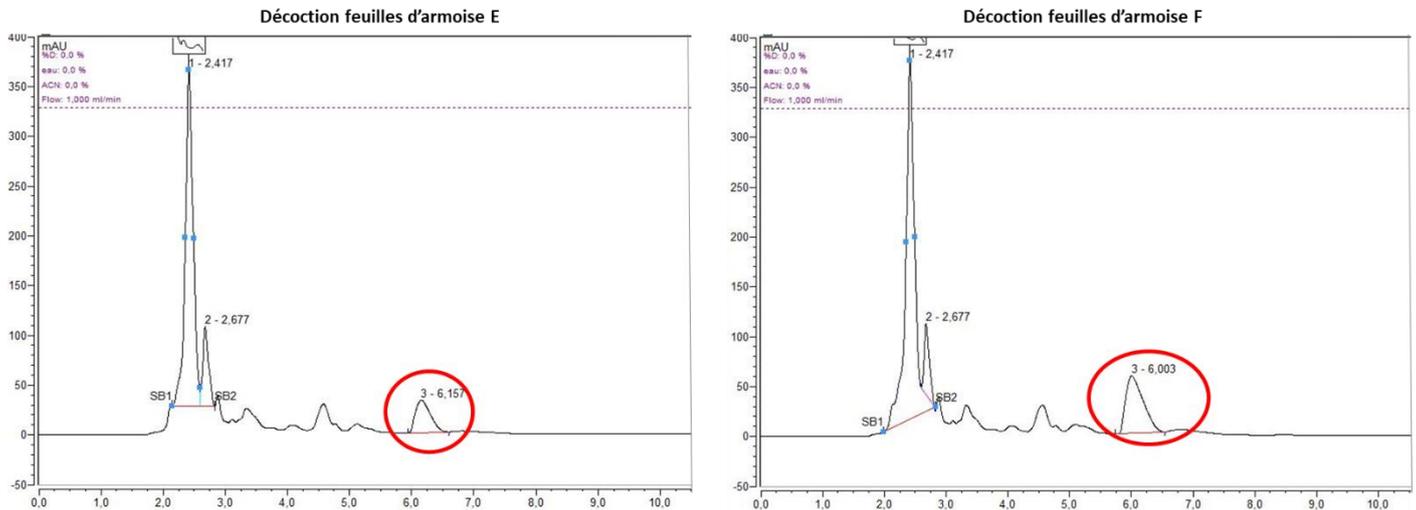


Figure 87 : Chromatogrammes de l'artémisinine (entourée en rouge) dans les décoctions E et F

Nous avons rassemblé ces résultats dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Tableau récapitulatif de l'évolution de l'aire sous la courbe de l'artémisinine lors de l'ajout de glycyrrhizine (CMC=0.15 g/L)

Nom de la décoction	Concentration de glycyrrhizine (en g/L)	Aire sous la courbe (en mAU.min)	Gain par rapport à C
Décoction A	0	-	-
Décoction B	0.04 (<CMC)	-	-
Décoction C	0.08 (<CMC)	3	-
Décoction D	0.16 (>CMC)	9	+200%
Décoction E	0.32 (>CMC)	19	+530%

Notre hypothèse développée dans le Chapitre IV concernant le comportement de l'artémisinine en présence de saponosides est confirmée. En absence de glycyrrhizine, l'artémisinine est trop hydrophobe pour être extraite en phase aqueuse. Néanmoins, au fur et à mesure que la concentration en glycyrrhizine augmente, le coefficient de partage de l'artémisinine diminue et la molécule passe progressivement vers la phase aqueuse. Dans la décoction C, à partir de 0.08 g/L de glycyrrhizine, l'artémisinine dépasse le seuil de détection du système chromatographique et son pic peut être quantifié. Dans les décoctions qui suivent, l'aire sous la courbe de l'artémisinine augmente avec un gain de +200% entre les décoctions C et D puis d'environ 530% entre les décoctions C et E.

Au cours de l'extraction, l'augmentation de l'hydrosolubilité de l'artémisinine favorise donc son passage en phase aqueuse et augmente considérablement sa

concentration dans la décoction. La présence des racines de réglisse dans les formulations de MTC contenant l'armoise annuelle optimise l'extraction de la principale substance active de la plante.

4 Cas de l'acide chlorogénique et de la caféine (groupes C et D)

L'extraction de l'acide chlorogénique et de la caféine se réalise à partir du « grain » de café vert (*Coffea arabica* L.). Les graines de café vert sont naturellement riches à la fois en caféine et en acide chlorogénique. En effet, elles n'ont pas subi de torréfaction, ce qui permet de préserver les dérivés phénoliques comme l'acide chlorogénique (197). Les extractions ont été réalisées à partir de graines de café vert commercialisées par Café Michel® qui ont ensuite été broyées afin de préparer des décoctions. Les quantités utilisées correspondent à celles généralement utilisées en MTC (120) soit environ 10 g/L, décoctées pendant 15 minutes.

Pour notre modèle expérimental, nous nous sommes appuyés sur un article de 2018 décrivant une méthode de quantification simultanée de l'acide chlorogénique et de la caféine par chromatographie en phase inverse (197). La phase stationnaire est une colonne en gel de silice octadécylsilylée postgreffée (C18) et la phase mobile est un système de solvants composé de 2 solutions A et B (Tableau 18).

Tableau 18 : Système de solvant pour la détection de l'acide chlorogénique et de la caféine dans les graines de café vert

Intervalles (en minutes)	Phase mobile A (H ₂ O+TFA 0.1 % v/v)	Phase mobile B (CH ₃ CN)
0	95	5
0-35	95 → 80	5 → 20
35-45	80	20
45-50	80 → 95	20 → 5

La détection de la caféine se fait au spectrophotomètre UV à une longueur d'onde de 272 nm tandis que l'acide chlorogénique est détecté à une longueur d'onde de 326 nm. Ces deux longueurs d'onde représentent les maxima d'absorption de ces deux molécules : l'acide chlorogénique absorbe peu à 272 nm, tandis que la caféine n'absorbe pas du tout à 326 nm (Figure 88).

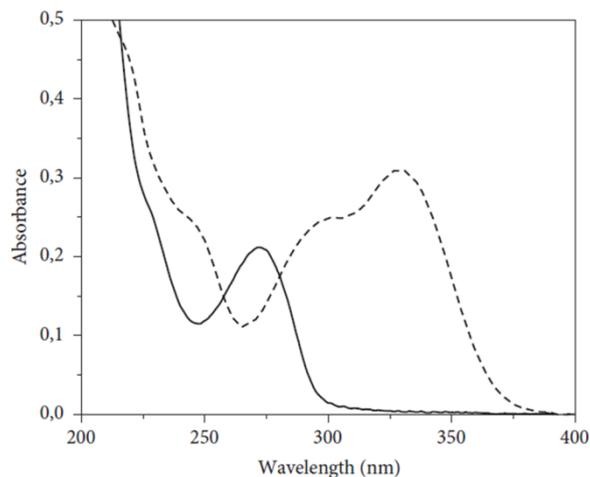


Figure 88 : Spectres d'absorption UV/Visible de la caféine (ligne continue) et de l'acide chlorogénique (ligne hachurée) à 25 °C (197)

Dans la mise en pratique de ce modèle expérimental, nous avons co-injecté de la caféine et de l'acide chlorogénique dans ce système de solvant et avons détecté les temps de rétention suivants : 19.30 minutes pour la caféine et 20.40 minutes pour l'acide chlorogénique (Figure 89).

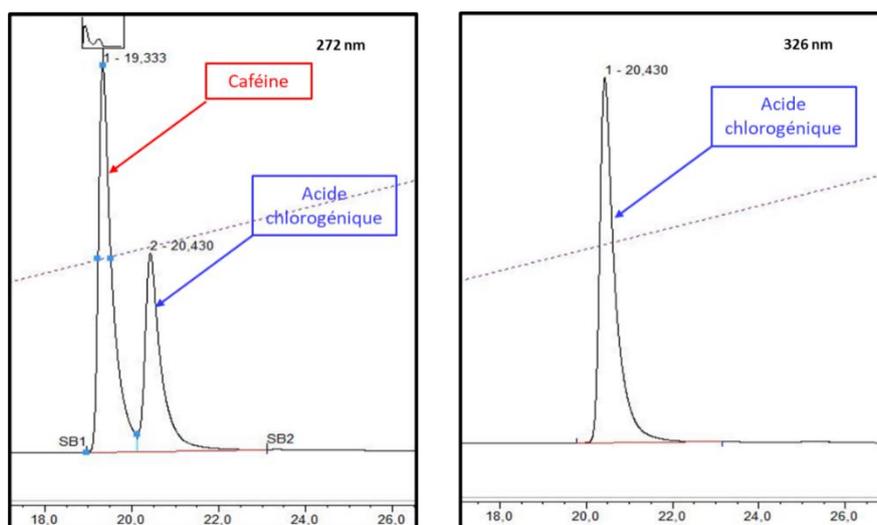


Figure 89 : Chromatogrammes de la caféine et de l'acide chlorogénique dans les conditions expérimentales (détection à 272 nm à gauche et à 326 nm à droite)

- La décoction A a été préparée en absence de glycyrrhizine en solution. La méthode chromatographique détecte ces molécules aux temps de rétention de 19.33 minutes avec une aire sous la courbe de 17 mAU.min pour la caféine à 272 nm, et de 20.47 minutes avec une aire sous la courbe de 50 mAU.min pour l'acide chlorogénique à 326 nm (Figure 90)
- La décoction B a été préparée en ajoutant 0.02 g/L de glycyrrhizine (<CMC) dans le mélange au début de la décoction. La méthode chromatographique détecte ces molécules aux temps de rétention 19.33 minutes avec une aire

sous la courbe de 21 mAU.min pour la caféine à 272 nm et 20.47 minutes avec une aire sous la courbe de 77 mAU.min pour l'acide chlorogénique à 326 nm (Figure 90)

- La décoction C a été préparée en ajoutant 0.04 g/L de glycyrrhizine (<CMC). La caféine est détectée à un temps de rétention de 19.34 minutes avec une aire sous la courbe de 15 mAU.min à 272 nm, et l'acide chlorogénique est détecté à 20.50 minutes avec une aire sous la courbe de 53 mAU.min à 326 nm (Figure 90)
- La décoction D a été préparée en ajoutant 0.08 g/L de glycyrrhizine (<CMC). Dans cette décoction, on détecte ces molécules aux temps de rétention 19.34 minutes avec une aire sous la courbe de 14 mAU.min pour la caféine à 272 nm et 20.51 minutes avec une aire sous la courbe de 49 mAU.min pour l'acide chlorogénique à 326 nm (Figure 90).

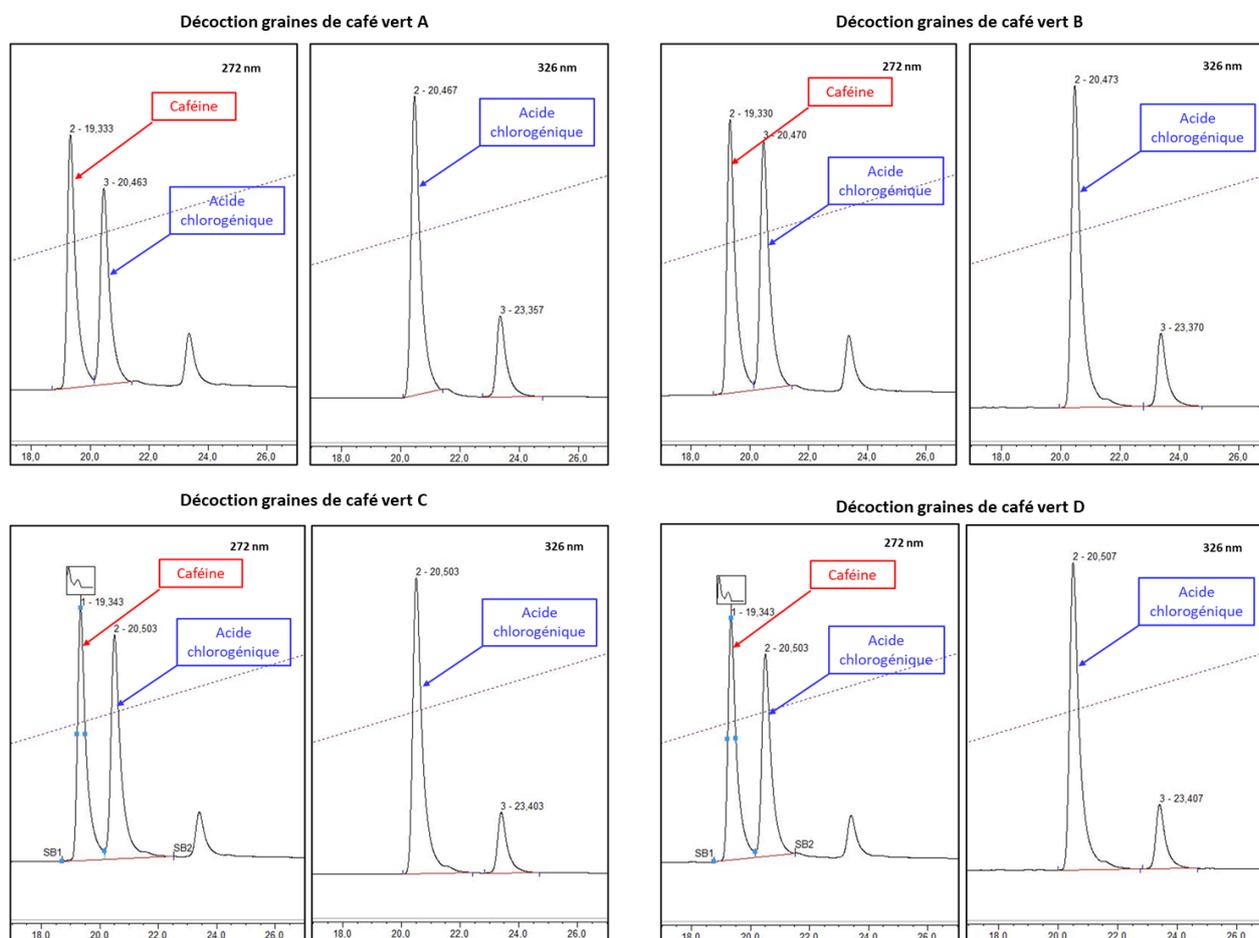


Figure 90 : Chromatogrammes la caféine et de l'acide chlorogénique dans les décoctions A, B, C et D (détectés à 272 nm et à 326 nm)

- La décoction E a été préparée en ajoutant 0.20 g/L de glycyrrhizine (=CMC) dans le mélange au début de la décoction. La méthode chromatographique détecte ces molécules aux temps de rétention de 19.32 minutes avec une aire

sous la courbe de 18 mAU.min à 272 nm pour la caféine, et de 20.48 minutes avec une aire sous la courbe de 65 mAU.min à 326 nm pour l'acide chlorogénique (Figure 91)

- La décoction F a été préparée en ajoutant 0.50 g/L de glycyrrhizine (>CMC) dans le mélange au début de la décoction. Pour cette dernière décoction, on détecte ces molécules aux temps de rétention de 19.30 minutes avec une aire sous la courbe de 17 mAU.min pour la caféine à 272 nm, et de 20.47 minutes avec une aire sous la courbe de 60 mAU.min pour l'acide chlorogénique à 326 nm (Figure 91)

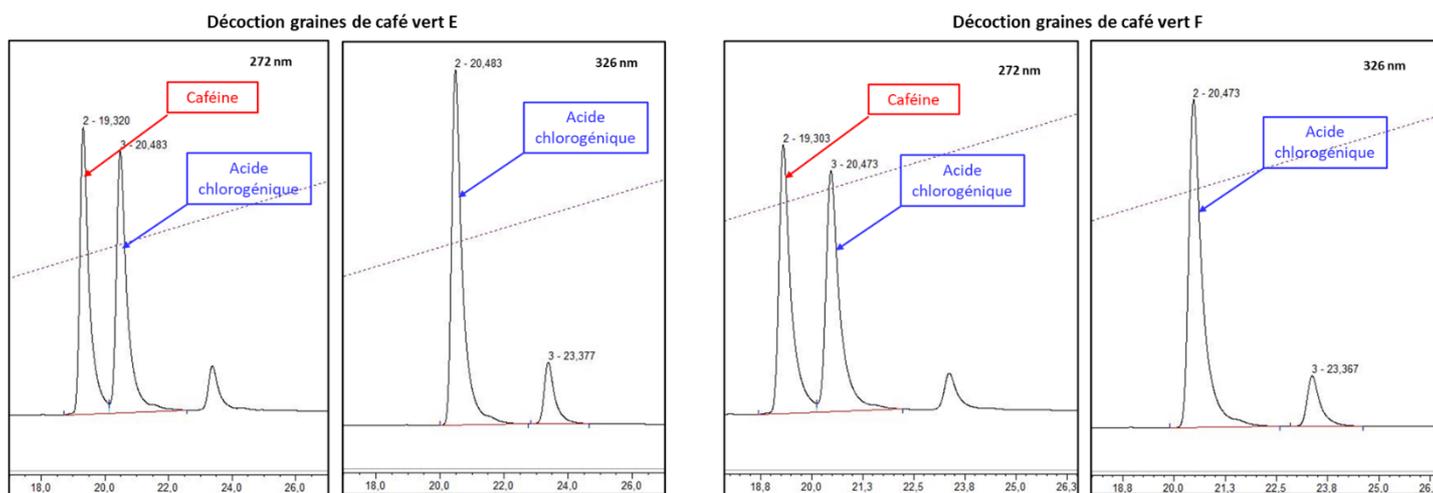


Figure 91 : Chromatogrammes la caféine et de l'acide chlorogénique dans les décoctions E et F détectés 272 nm et à 326 nm

Nous avons rassemblé ces résultats dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Tableau récapitulatif de l'évolution de l'aire sous la courbe de la caféine et de l'acide chlorogénique lors de l'ajout de glycyrrhizine (CMC = 0.20 g/L)

Nom de la décoction	Concentration de glycyrrhizine (en g/L)	Aire sous la courbe (en mAU.min) de la caféine à 272 nm	Aire sous la courbe (en mAU.min) de l'acide chlorogénique à 326 nm
Décoction A	0	17	50
Décoction B	0.02 (<CMC)	21	77
Décoction C	0.04 (<CMC)	15	53
Décoction D	0.08 (<CMC)	14	49
Décoction E	0.20 (=CMC)	18	65
Décoction F	0.50 (>CMC)	17	60

Les résultats de la décoction B ne semblent pas cohérents vis-à-vis des autres résultats observés et ne seront donc pas pris en compte dans notre conclusion

concernant les gains des aires sous la courbe par rapport à la décoction A (Tableau 20). Nous aurions dû refaire cette analyse, et procéder à des essais en triplicat.

Tableau 20 : Comparaison des aires sous la courbe par rapport à la décoction A

Nom de la décoction	Gain de la caféine à 272 nm par rapport à A	Gain de l'acide chlorogénique à 326 nm par rapport à A
Décoction C	-12%	+6%
Décoction D	-18%	-2%
Décoction E	+2%	+30%
Décoction F	+0%	+20%

Concernant l'acide chlorogénique, nous observons une aire sous la courbe à 326 nm relativement stable lorsque la concentration de glycyrrhizine est inférieure à sa CMC (0.15 g/L). Le gain entre les décoctions C et A est de seulement +6% tandis qu'entre D et A, la diminution n'est que de -2%. Néanmoins, lorsque la concentration de glycyrrhizine dépasse sa CMC, le gain entre les décoctions E et A devient plus significatif et augmente à +30%. Entre F et A, ce gain est toujours présent à +20%. Cette évolution permet de confirmer les résultats développés dans le Chapitre IV. En effet, en absence de micelles en solution, le coefficient de partage des molécules du groupe C reste stable et leur extraction aqueuse subit peu de modification. La formation de micelles permet d'encapsuler ou de complexer les molécules d'acide chlorogénique et leur affinité pour la phase aqueuse augmente, améliorant ainsi leur extraction dans la décoction.

Concernant la caféine, l'interprétation des résultats est plus délicate puisqu'il faut également prendre en compte l'évolution de l'acide chlorogénique qui est également détecté à 272 nm (absorbance réduite à 0.1 - Figure 88). Dans un premier temps, à une concentration en glycyrrhizine inférieure à sa CMC, on observe une légère diminution de l'aire sous la courbe avec une diminution de -12% entre C et A et d'environ -18% entre D et A. Comme mentionné plus haut, l'aire sous la courbe de l'acide chlorogénique à ces concentrations reste stable donc cette diminution est entièrement dépendante des concentrations en caféine. Au-delà de la CMC de la

glycyrrhizine, le coefficient de partage de la caféine se stabilise mais puisqu'une partie de l'acide chlorogénique est également détectée à cette longueur d'onde et que son extraction augmente à ces concentrations, on observe également une faible augmentation de l'aire sous la courbe de la caféine avec un gain faible de +2% entre E et A et une absence de gain entre F et A. Ces résultats confirment les hypothèses développées dans le Chapitre IV : à une concentration de saponoside inférieure à la CMC, il y a une augmentation du coefficient de partage se traduisant par une diminution de la concentration de caféine extraite en phase aqueuse. A partir de la CMC, l'augmentation du coefficient de partage de la caféine se stabilise puisque la formation de micelles cesse d'interagir sur la tension de surface de l'eau. La quantité de caféine extraite en phase aqueuse ne diminue donc plus et se stabilise à une valeur maximale.

5 Conclusion

Ces essais sur des extractions aqueuses de plantes de la MTC nous a permis de confirmer les résultats développés dans les chapitres précédents. Les profils d'évolution du coefficient de partage des métabolites naturels se retrouvent lors de l'extraction de ces molécules en phase aqueuse. Lorsque les formulations traditionnelles de MTC emploient des plantes riches en saponosides, celles-ci influencent par la suite significativement l'extraction aqueuse de nombreuses molécules.

L'extraction aqueuse des molécules du groupe A est significativement augmentée en présence de saponoside. L'extraction de certaines molécules hydrophobes comme l'artémisinine devient par exemple possible en présence de glycyrrhizine, alors qu'elle était inexistante en son absence. Tandis que pour des molécules toxiques comme l'aconitine, la présence de glycyrrhizine permettrait de mieux contrôler leur toxicité et leur marge thérapeutique.

Pour les molécules du groupe B, la présence de saponoside augmente également leur extraction en phase aqueuse. Mais à l'heure actuelle et faute d'expériences au-delà de la CMC, nous ne pouvons pas conclure sur l'effet de la formation de micelles sur le processus d'extraction en lui-même.

Concernant les molécules du groupe C, nous avons pu confirmer que seule la formation de micelles avait une influence significative sur leur coefficient de partage et leur extraction aqueuse. Lors de la conception de formulations traditionnelles, les

concentrations en saponoside doivent donc être suffisamment élevées pour interagir avec l'extraction de ces molécules.

Enfin, les molécules du groupe D sont aussi influencées par la présence de glycyrrhizine en solution qui provoque une diminution de leur extraction en phase aqueuse.

Conclusion et perspectives

Au cours de ce projet de thèse, nous avons exploré le rôle et l'influence qu'ont les plantes riches en saponosides sur la biodisponibilité des autres métabolites naturels au sein de formulations de médecine traditionnelle et sur leur extraction en milieu aqueux.

Les saponosides bénéficient d'une large distribution dans le règne du vivant ainsi que d'une grande diversité structurale. En plus de posséder de nombreuses propriétés biologiques et thérapeutiques remarquables, les saponosides sont aussi des tensioactifs naturels jouant un rôle clé dans les pharmacopées traditionnelles. En effet, les médecines traditionnelles sont encore au cœur des stratégies thérapeutiques de millions d'habitants. Dans le cas de la MTC, on retrouve dans les formulations traditionnelles des éléments familiers comme des ingrédients principaux porteurs de l'effet thérapeutique ou des ingrédients adjuvants pour diminuer les effets secondaires du remède. Néanmoins, la MTC introduit également le concept singulier d'ingrédients messagers permettant « d'harmoniser » les autres plantes entre elles. C'est dans ce rôle de « messagères » que des plantes riches en saponosides, comme la réglisse, sont le plus communément utilisées en MTC. Les résultats développés dans cette thèse permettent de mieux comprendre la place et la pertinence de ces plantes au cœur des formulations traditionnelles : les saponosides ont un impact direct sur les propriétés physico-chimiques des autres métabolites et leur tensioactivité provoque la modification de l'hydrosolubilité et du coefficient de partage de molécules lipophiles ou moyennement polaires.

Dans un premier temps, afin de suivre l'évolution du coefficient de partage, nous avons mis au point une méthode de mesure innovante par RMN du proton. Cette nouvelle méthode simple à mettre en œuvre permet de mesurer rapidement le coefficient de partage d'un grand nombre de métabolites naturels en seulement deux prises de mesure par molécule. Par ailleurs, cette nouvelle méthode de mesure fonctionne sur de faibles quantités de produit (2 mg ou moins) et de solvant deutéré (seulement 10% de D₂O) et ne nécessite aucun étalon interne grâce à l'utilisation de l'outil ERETIC2. Enfin le temps d'analyse par échantillon est relativement court (5 minutes pour 8 scans), ce qui permet d'effectuer de nombreuses mesures en série.

Dans un deuxième temps, nous avons employé cette nouvelle méthode pour évaluer l'effet des saponosides et de leur concentration sur le coefficient de partage des métabolites naturels. On a ainsi pu mettre en évidence que les saponosides ne

provoquent pas seulement une diminution du coefficient de partage. En effet, selon les molécules étudiées, la diminution de la tension de surface et le pouvoir solubilisant des saponosides joueront un rôle majeur, tandis que pour d'autres, c'est la formation de complexes micellaires qui impacteront le plus le coefficient de partage. Nous avons ainsi pu constituer cinq groupes de molécules aux comportements différents au contact des saponosides.

- Le coefficient de partage des molécules du groupe A diminue à la fois en fonction de la tension de surface et de la formation de micelles en solution.
- Le coefficient de partage des molécules du groupe B atteint un plateau lors de la formation de micelles en solution. Ces molécules ne sont influencées que par la diminution de la tension de surface du solvant.
- Les molécules du groupe C n'interagissent qu'avec les micelles et leur coefficient de partage ne diminue qu'une fois la CMC atteinte.
- Le coefficient de partage des molécules du groupe D augmente avec la diminution de la tension de surface et se stabilise lors de la formation de micelles.
- A l'heure actuelle, le groupe E ne réunit que les molécules ayant un comportement plus complexe en présence de saponosides.

Des essais supplémentaires seraient nécessaires pour formuler une hypothèse plus précise sur les mécanismes physico-chimiques conduisant à ces différents groupes et permettraient de prédire le groupe d'appartenance d'une molécule par rapport à sa structure chimique. Par ailleurs, compte tenu du temps limité qu'il nous restait, nous n'avons pas pu compléter notre modèle en prenant en compte les variations de pH qui est un paramètre clé pour évaluer le coefficient de partage des molécules ionisées comme les sels d'alcaloïdes.

Par la suite, pour vérifier la cohérence de nos résultats et leur application en thérapeutique traditionnelle, nous avons d'une part observé le pouvoir solubilisant des saponosides et la formation de leurs micelles par microscopie optique, et d'autre part, nous avons quantifié par CLHP l'extraction de métabolites naturels en phase aqueuse en présence de saponoside, ce qui a permis de confirmer que les modifications des coefficients de partage ont un impact direct dans le processus d'extraction des métabolites naturels. Des expériences supplémentaires sur des formulations plus complexes employant plusieurs parties de plante nous permettront de reproduire plus précisément les conditions expérimentales des formulations de

médecine traditionnelle. De plus, nous aurions souhaité pouvoir faire plus d'observations en microscopie pour pouvoir relier davantage nos résultats avec le comportement des complexes micellaires et des éléments/amas insolubles en phase aqueuse. Malheureusement, le temps et la disponibilité limitée du matériel ne nous a pas permis d'effectuer toutes les mesures souhaitées.

Compte tenu des résultats obtenus, nous disposons désormais d'une meilleure compréhension des mécanismes physico-chimiques qui ont lieu dans les formulations traditionnelles. Par le biais des saponosides, les plantes « messagères » permettent un meilleur contrôle des quantités de métabolites naturels extraits en phase aqueuse. Lors de la prise orale de ces formulations, la modification du coefficient de partage influencera également l'absorption des molécules, leur effet thérapeutique et leur potentielle toxicité. Il serait également intéressant de pouvoir compléter cette étude physico-chimique des formulations traditionnelles avec des évaluations biologiques *in vitro* sur des cultures cellulaires ou *in vivo* sur un modèle animal pour quantifier leurs effets thérapeutiques en fonction de la concentration en saponosides.

A plus long terme, on peut imaginer pouvoir utiliser les saponosides comme vecteurs naturels pour le transport de substances médicamenteuses. En effet, le contrôle du coefficient de partage et de la solubilité des molécules constituent un atout majeur lors de la conception de nouveaux médicaments. En étudiant davantage l'impact des saponosides sur la biodisponibilité et le passage des membranes cellulaires, il deviendrait alors possible d'incorporer des éléments de médecine traditionnelle dans l'arsenal thérapeutique moderne.

Matériels et Méthodes

1 RMN

- Matériel :

Tous les produits testés proviennent de sources commerciales de Sigma-Aldrich, Alfa-Aesar ou Extrasynthèse. L'eau employée est une eau milli-Q purifiée par un système de filtre et de membrane dont la résistivité est de 18.2 MΩ.cm et l'octanol (purifié >99%) a été acheté à ProLabo. Le spectromètre RMN est un Bruker® Avance III 600 MHz équipé d'une cryosonde TCI (Triple-resonance Inverse with Carbon observe). Les tubes RMN à paroi fine mesurent 5 mm de diamètre pour 178 mm de long. L'identification et l'intégration des pics pour la RMN quantitative ont été réalisées sur le logiciel TopSpin® de Bruker® (version 4.0.9). La température des échantillons a été réglée à 298 K.

- Acquisition des spectres RMN ^1H :

La suppression de solvant est réalisée dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90/10) et la suppression de solvant par excitation sculptée est réalisée par la séquence de pulse zgesgp sur 8 scans par FID avec un temps de relaxation de 12s par scan. L'écho de spin est exécuté avec des taux de gradient G1 à 31 % et G2 à 11%. L'impulsion de 180° est fixée à $p12=2$ ms et à une puissance SPW (-db) = 33. Le temps d'acquisition est de 4 minutes et 55 secondes par spectre. Les FID (64k points) ont une largeur spectrale de 12 000 Hz et ont été traitées par élargissement de ligne (Line Broadening ou LB) de 0.3 Hz. La concentration des produits est mesurée par l'outil ERETIC2 intégré dans le logiciel d'acquisition de Bruker®.

- Préparation des échantillons par la méthode de l'agitation en flacon :

Afin de réaliser la gamme de concentration en saponoside, une solution mère de saponoside est préparée dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90/10). Les 2 mg de la molécule à évaluer sont placés dans un pilulier en verre de 5 mL puis solubilisés dans un volume précis de la solution mère de saponoside qui sera complété à 1.50 mL avec un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90/10) pour réaliser les différents points de la gamme de concentration. On adaptera la concentration de la solution mère et les volumes utilisés en fonction du nombre de points et de la nature des saponosides en solution. Par exemple, pour la glycyrrhizine, cette gamme de concentration doit pouvoir couvrir des concentrations en glycyrrhizine allant de 0,02 à environ 1,00 g/L

et la solution mère est donc préparée à une concentration de 2.00 g/L (cf Tableau 12 dans le Chapitre IV).

Pour l' α -hédérine qui a une CMC autour de 0.010 g/L, la solution mère est réalisée à une concentration de 0.03 g/L afin de préparer la gamme de concentrations suivante :

Concentration en α -hédérine (en g/L)	Volume de solution mère d' α -hédérine à 0.03 g/L (en mL)	Volume du mélange H ₂ O/D ₂ O (90/10) (en mL)
0	0	1.50
0.002	0.10	1.40
0.004	0.20	1.30
0.010 (=CMC)	0.50	1.00
0.016 (>CMC)	0.80	0.70
0.020	1.00	0.50
0.030	1.50	0

Pour la β -escine (CMC=0.10 g/L), la soyasaponin I (CMC= 0.16 g/L) et les extraits de *Quillaja saponaria* (CMC= 0.05 g/L), les solutions mères sont réalisées à une concentration de 0.30 g/L afin de préparer la gamme de concentrations suivante :

Concentration en saponoside (en g/L)	Volume de solution mère à 0.30 g/L (en mL)	Volume du mélange H ₂ O/D ₂ O (90/10) (en mL)
0	0	1.50
0.02	0.10	1.40
0.04	0.20	1.30
0.10	0.50	1.00
0.16	0.80	0.70
0.20	1.00	0.50
0.30	1.50	0

La solution d'échantillon ainsi préparée est ensuite placée dans un bain à ultrasons pendant 5 à 10 minutes pour optimiser la solubilisation puis filtrée sur un filtre seringue pour HPLC de la marque Machery-Nagel® (pores de 0.45 µm de diamètre). Une partie de cette solution (550µL) est placée dans un tube RMN (tube A) pour mesurer C_w , tandis que 700 µL sont placés dans un microtube Eppendorf® à fond conique pour le partage contre 700 µL d'octanol. Le microtube est renversé au moins quarante fois puis centrifugé à 2 000 tours par minutes pendant 10 minutes et laissé au repos pendant 24 heures. Une portion de la phase aqueuse est prélevée en seringue puis placée dans un tube RMN (tube B) pour mesurer C_{wo} et calculer le coefficient de partage à l'aide du tableur Excel® du pack Microsoft Office®

- Utilisation de l'outil ERETIC2 (Supplementary Data de la publication)

La partie suivante correspond aux annexes fournies avec la publication du Chapitre III. On y a décrit la méthode de préparation des tubes RMN (identique à celle présentée plus haut) ainsi qu'un tutoriel d'utilisation de l'outil ERETIC2. Cette partie s'achève sur les exemples de calcul du coefficient de partage de la catéchine, de la caféine, de l'acide chlorogénique, de la L-phénylalanine et de l'acide salicylique par la méthode décrite dans l'article.

Supplementary Data

This material contains a tutorial on the use of the proposed method and a few selected examples.

1.1 General:

Tested compounds were commercial samples from Sigma-Aldrich or Alfa-Aesar. Water was Millipore water and purified 1-octanol was purchased from ProLabo. The NMR spectrometer was a Bruker Avance III 600 MHz spectrometer using thin-wall NMR tube of size 5 mm x 178 mm and equipped with a TCI (Triple-resonance Inverse with Carbon observe) cryoprobe. Peak picking, integration and quantitative NMR were realized on the Topspin software (version 4.0.9) from Bruker. Temperature of the samples was regulated at 298 K.

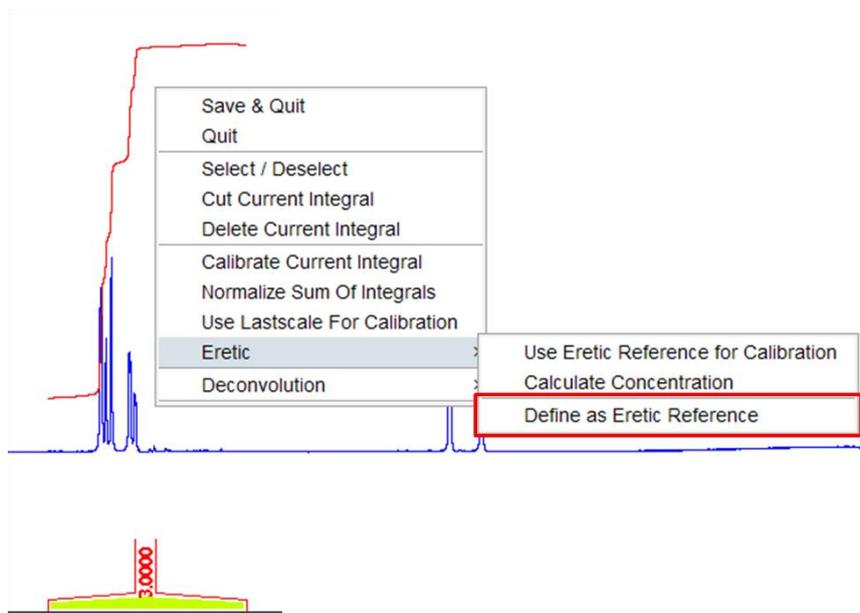
About 2 mg (or 0.5 mg) of analyte was solubilized in a 5 mL vial with 1.5 mL of a H₂O/D₂O (90/10) mixture. The mixture was placed in an ultrasonic bath for 5 to 10 minutes to optimize solubilization. The resulting solution was then filtered on a HPLC disposable syringe filter from Macherey-Nagel (pore size 0.45 µm). An aliquot (550 µL) of the filtered solution was placed in NMR tube A for analysis while 700 µL was

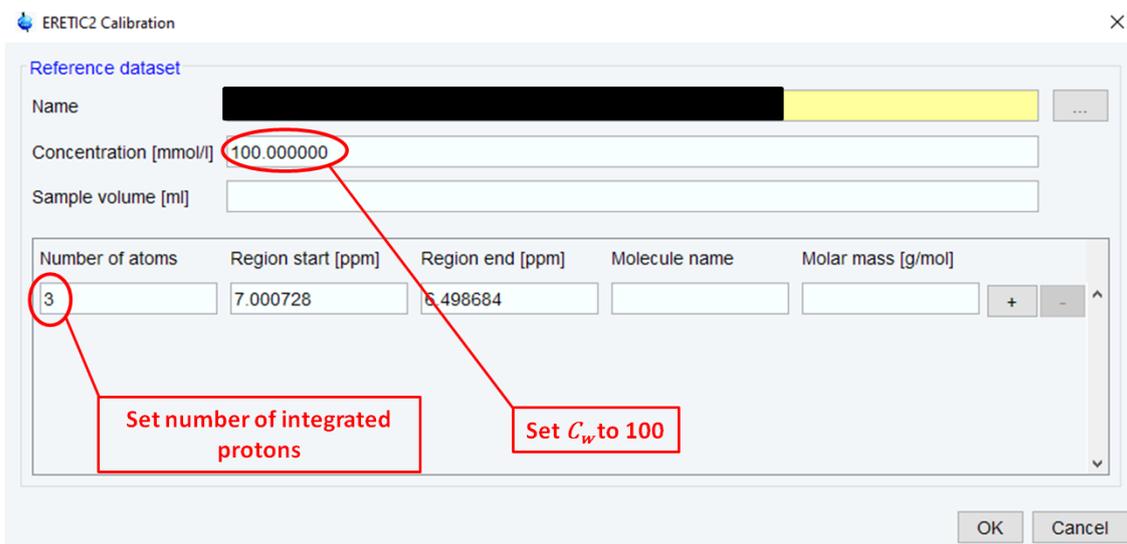
placed in an Eppendorf tube for partition against 700 μL of 1-octanol. The Eppendorf tube was inverted at least 40 times, centrifuged at around 2 000 rpm for 10 minutes and left to rest for 24 hours to reach equilibrium. A portion (550 μL) from the aqueous phase was sampled and placed into NMR tube B for comparative analysis.

Solvent suppression: the spectrometer frequency was locked onto D_2O and ^1H spectra were acquired by means of the zgesgp pulse sequence with 8 scans per FID and a 12s relaxation delay, resulting in a 4min55s recording time. The transmitter frequency offset (O1) was settled to water frequency (around 2818 Hz) and Gradient ratios (SMSQ10.100) were fixed to $G1 = 31\%$ and $G2 = 11\%$. A 180° degree shaped pulse (Squa100.1000) was fixed at $p12 = 2$ ms and power at SPW (-dB) = 33. The FIDs (64k points, spectral width = 12 000 Hz) were processed with $\text{LB} = 0.3$ Hz.

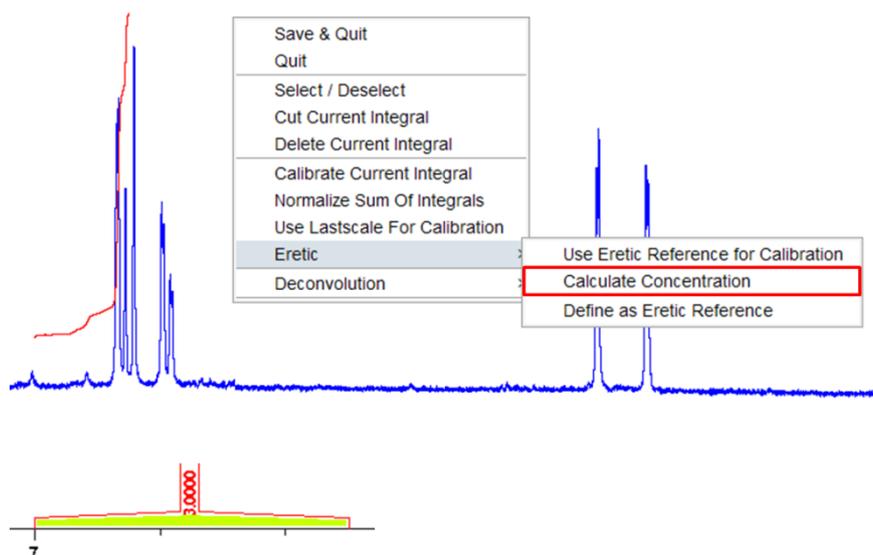
1.2 Tutorial for ERETIC2 (on a catechin sample)

Once the spectrum of tube A is recorded, transformed and phased, go to the “Integrate mode” and select a region of interest. Do a right-click on this region and choose “Define as Eretic Reference”. A concentration value of 100 must be entered as well as the number of integrated protons.





On the spectrum of tube B, select the same region of interest in “Integrate Mode”, do a right-click and choose “calculate concentration”.



The next step consists in matching the reference dataset with the previous spectrum (tube A) and input the number of integrated protons. After that, ERETIC2 calculates C_{unk} , which appears on the plot, above the integral.

ERETIC2 Quantification

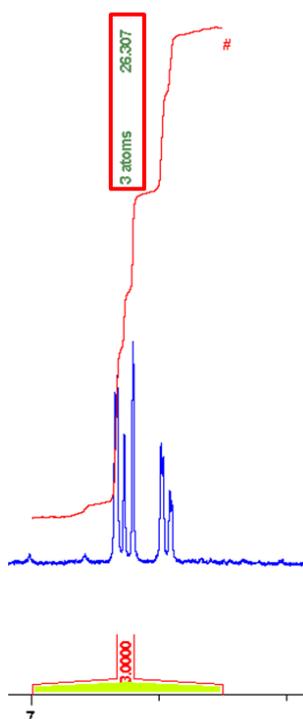
Reference dataset
 Name [redacted] ...
 Concentration 100 mmol/l

Quantified dataset
 Name [redacted] ...
 Sample volume [ml] []

Number of atoms	Region start [ppm]	Region end [ppm]	Molecule name	Molar mass [g/mol]
3	7.000995	6.499217		

Set number of integrated protons

OK Cancel



The final step is to apply Equation 5 to obtain logP.

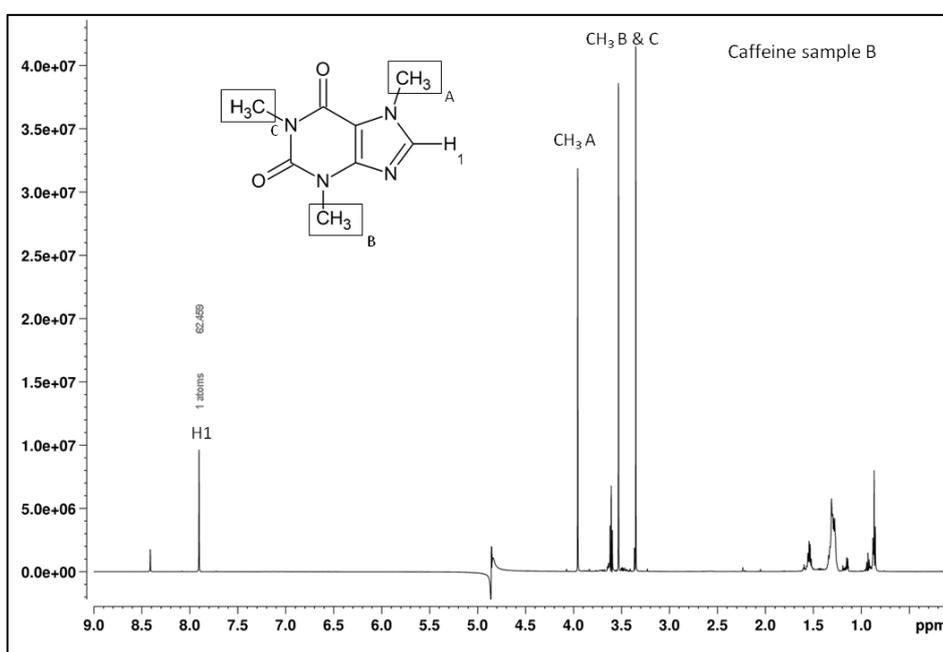
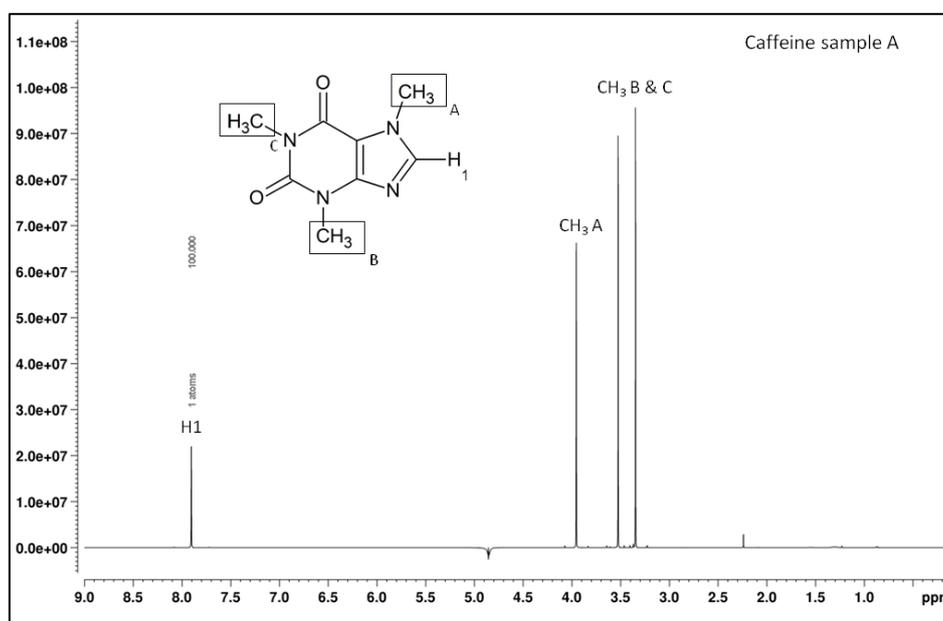
$$\log P = \log \frac{C(\text{octanol})}{C(\text{water})} = \log \frac{C_w - C_{wo}}{C_{wo}} = \log \frac{100 - 26.307}{26.307} = 0.45$$

1.3 Selected examples:

Caffeine

The spectrum on top corresponds to tube A, i.e. 2 mg of caffeine in water (D₂O/H₂O, 10/90) with Water Suppression by Excitation Sculpting. The selected proton for integration is the singlet at 7.9 ppm (selected region of interest: 7.6 to 8.2 ppm).

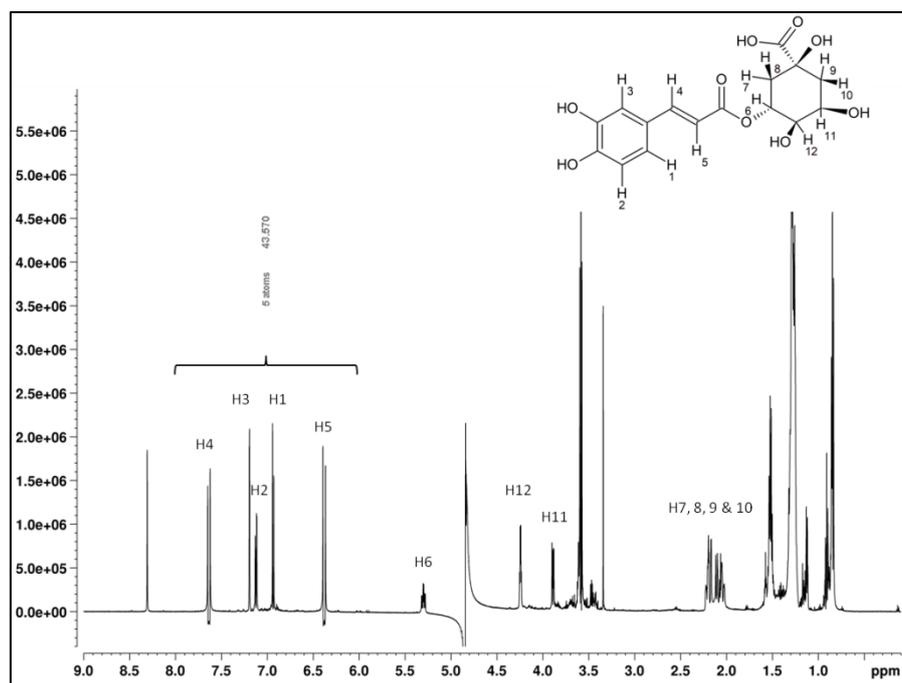
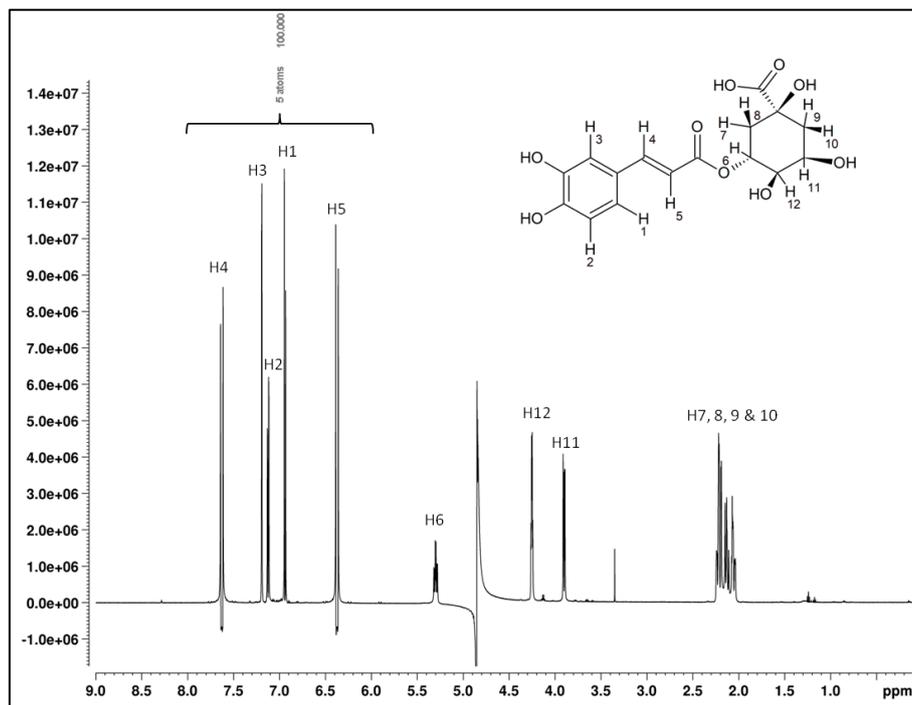
Proton H1 is set at concentration $C_{ref} = 100$. The second spectrum corresponds to tube B: the recovered aqueous phase after partition against 1-octanol. The presence of extra peaks corresponds to the remaining 1-octanol in water. The calculated ERETIC value for the region of interest is 62.459 and therefore $\log P$ is

$$\log \frac{100 - 62.459}{62.459} = -0.22$$


Chlorogenic acid

The spectrum on top corresponds to tube A, i.e. 2 mg of chlorogenic acid in water (D_2O/H_2O , 10/90) with Water Suppression by Excitation Sculpting. The selected region of interest goes from 6.0 to 8.0 ppm. Protons H1 to H5 are set at concentration $C_{ref} = 100$. The second spectrum corresponds to tube B: the recovered

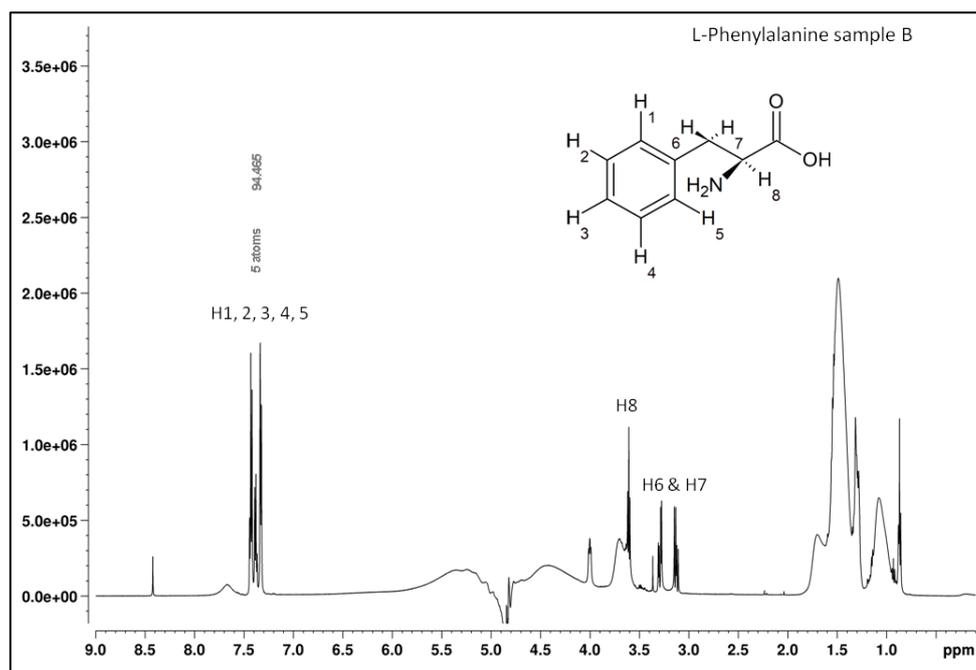
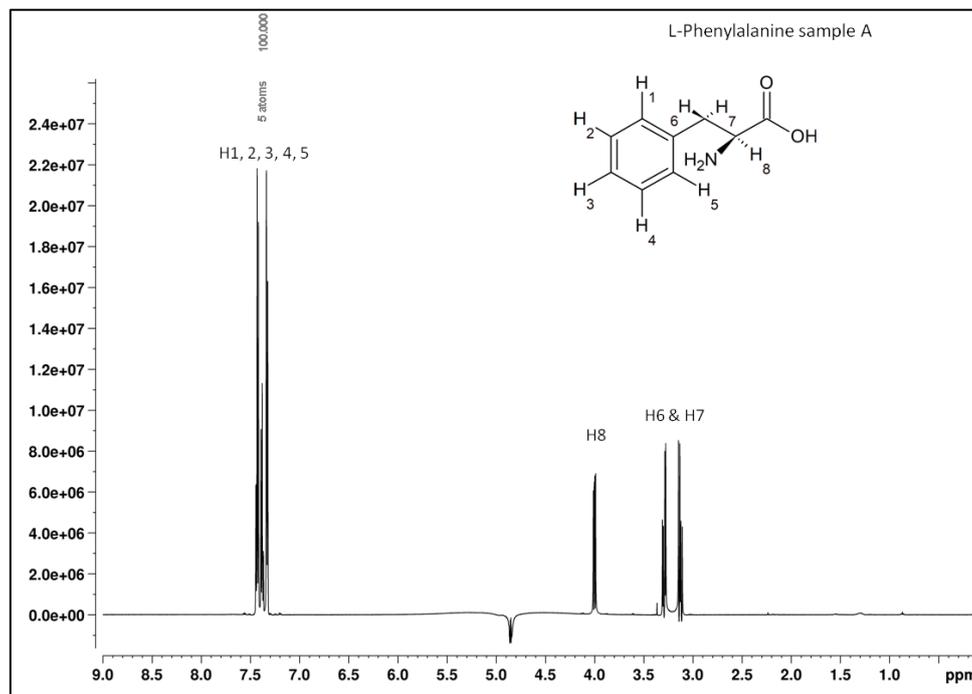
aqueous phase after partition against 1-octanol. The presence of extra peaks corresponds to the remaining 1-octanol in water. The calculated ERETIC value for the region of interest is 43.570 and therefore $\log P$ is $\log \frac{100-43.570}{43.570} = 0.11$



L-Phenylalanine samples

The spectrum on top corresponds to tube A, i.e. 2 mg of L-Phenylalanine in water (D_2O/H_2O , 10/90) with Water Suppression by Excitation Sculpting. The selected region of interest goes from 7.2 to 7.6 ppm. Protons H1 to H5 are set at concentration $C_{ref} = 100$. The second spectrum corresponds to tube B: the recovered

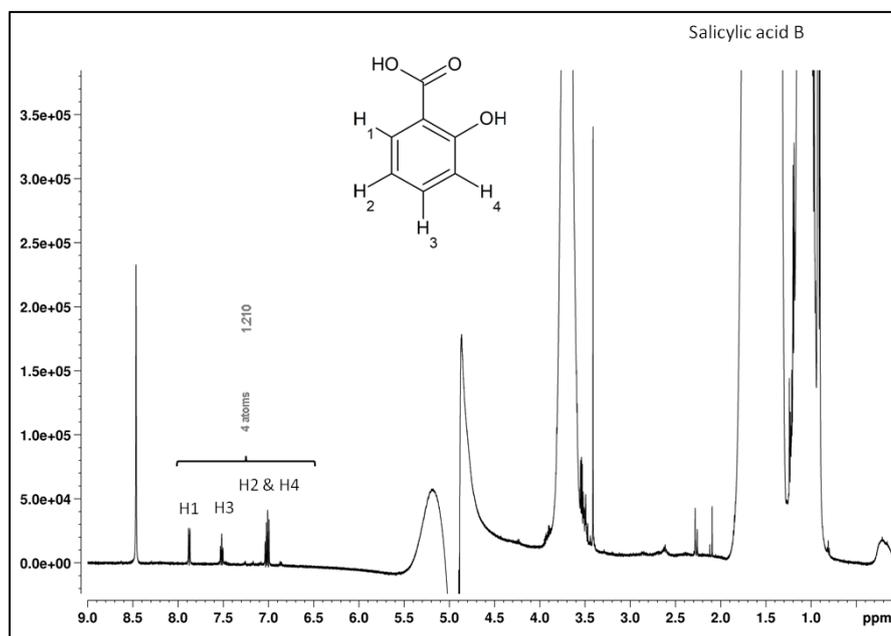
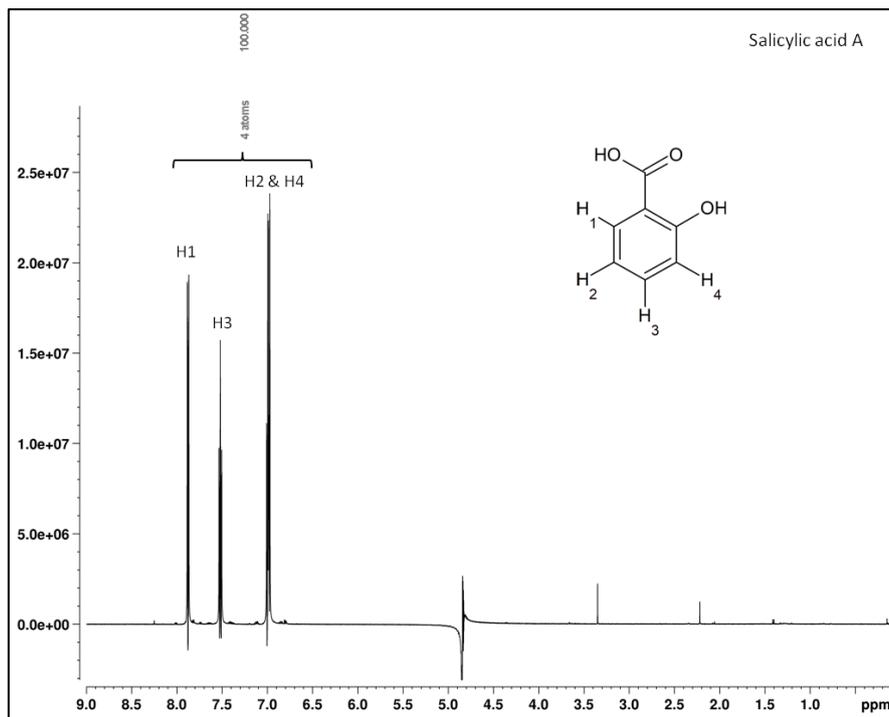
aqueous phase after partition against 1-octanol. The presence of extra peaks corresponds to the remaining 1-octanol in water. The calculated ERETIC value for the region of interest is 94.465 and therefore $\log P$ is $\log \frac{100-94.465}{94.465} = -1.23$



Salicylic acid samples

The spectrum on top corresponds to tube A, i.e. 0.5 mg of salicylic acid in water (D_2O/H_2O , 10/90) with Water Suppression by Excitation Sculpting. The selected region of interest goes from 7.2 to 7.6 ppm. Protons H1 to H4 are set at concentration $C_{ref} = 100$. The second spectrum corresponds to tube B: the recovered

aqueous phase after partition against 1-octanol. The presence of extra peaks corresponds to the remaining 1-octanol in water. The calculated ERETIC value for the region of interest is 1.210 and therefore log P is $\log \frac{100-1.210}{1.210} = 1.91$



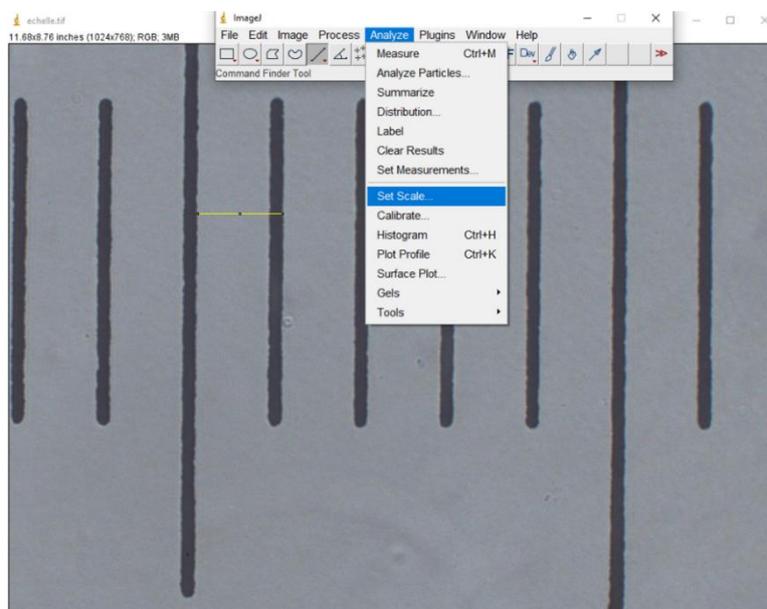
2 Microscopie optique et mesure de micelles

Les échantillons sont préparés en phase aqueuse dans des piluliers en verre à une concentration à 1.00 g/L de la molécule à tester (soit 2 mg d'analyte pour un volume de 2.00 mL d'eau) puis passés au bain à ultrasons pendant 5 à 10 minutes. Pour les échantillons contenant de la glycyrrhizine, celle-ci est ajoutée à l'analyte à étudier avant l'ajout de l'eau. L'observation des structures micellaires est réalisée sur un microscope à statif inversé Olympus® IX70 avec un objectif à immersion x100. Une goutte de la solution à étudier est prélevée par micropipette et déposée sur une lame en verre pour microscope. Les images de microscopie optique sont traitées par le logiciel ImageJ®.

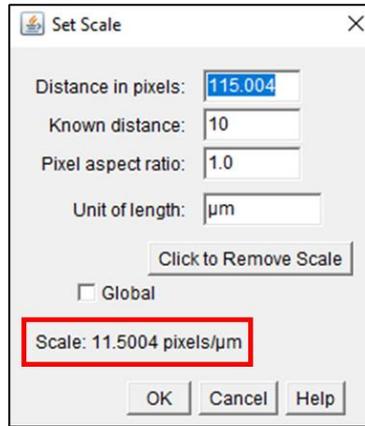
Mesure d'aire

Pour mesurer l'aire d'une particule ou d'une micelle, il faut au préalable calibrer l'échelle de mesure à partir d'une lame graduée (une graduation = 10 μm).

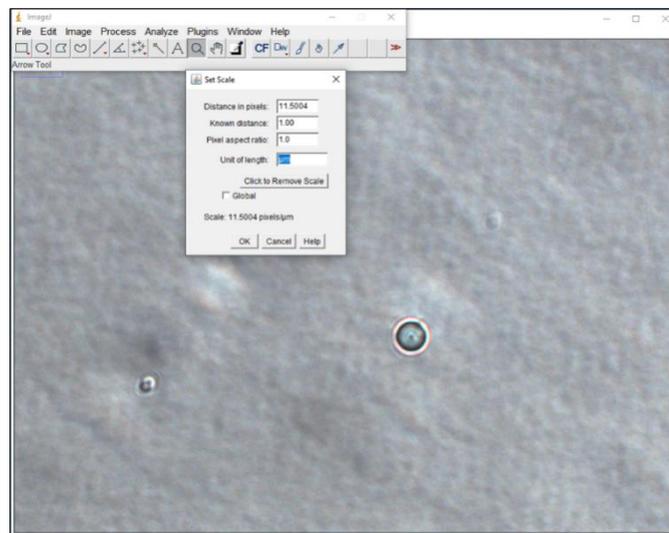
Dans le logiciel ImageJ®, on sélectionne l'image de l'échelle puis on trace une droite dans la graduation. Dans l'onglet « Analyze », on sélectionne « Set Scale » pour définir l'échelle de mesure :



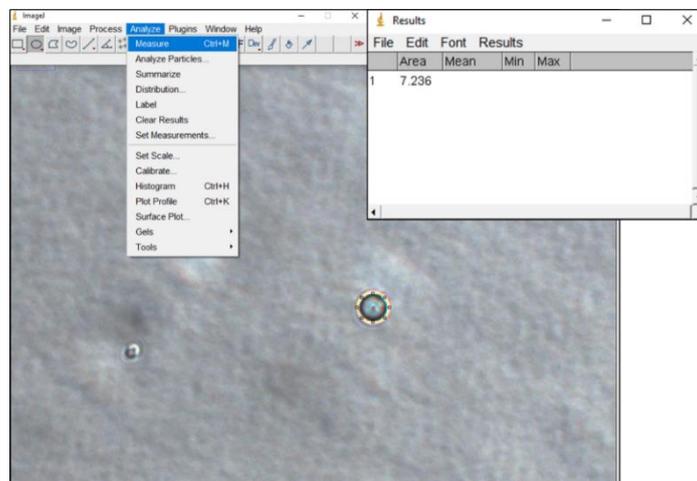
Dans le menu suivant, la ligne « Distance in pixels » se remplit automatiquement selon la longueur de la droite tracée précédemment. On complète les lignes « Known distance » et « Unit of length » pour définir le ratio pixels/ μm .



Lorsque l'on ouvre une nouvelle image, on sélectionne de nouveau « Set scale » dans le menu « Analyze » pour cette fois-ci renseigner l'échelle obtenue précédemment.



Désormais, lorsque l'on trace le contour d'une micelle, on peut sélectionner la fonction « Measure » dans le menu « Analyze » pour calculer l'aire de la zone sélectionnée (en μm^2) qui apparaît dans une fenêtre « Results ».



Lorsque l'on ouvre les images suivantes, les prochaines aires mesurées s'ajoutent dans la fenêtre « Results ». Une fois les mesures terminées, on enregistre les données de la fenêtre « Results » (File-> Save as...) sous le format .xls pour permettre le traitement des données (moyennes, dénombrement, etc.) dans le tableur Excel® du pack Microsoft Office®.

3 Chromatographie Liquide Haute Performance

3.1 Préparation des solutions extractives aqueuses

Les extractions aqueuses sont réalisées dans 200 mL d'eau osmosée puis filtrées sous vide sur un entonnoir Büchner recouvert d'un papier filtre. Selon les plantes étudiées, les masses de matière première utilisée dépendront de la concentration finale de l'extrait étudié.

	Feuilles de Thé vert (10 g/L)	Racines d'<i>Aconitum napellus</i> (60 g/L)	Feuilles d'<i>Artemisia annua</i> (20 g/L)	Graines de café vert (10 g/L)
Masse de matière première utilisée	2 g	12 g	4 g	2 g

- Les feuilles de thé vert proviennent de l'herboristerie Cailleau®
- Les feuilles d'*Artemisia annua* proviennent de Pierre Fabre®
- Les racines d'*Aconitum napellus* proviennent de la Coopération Pharmaceutique Française® et ont été coupées au sécateur pour réduire leur volume et optimiser l'extraction
- Les graines de café vert proviennent de Café Michel® et ont été broyées avant utilisation

Pour les échantillons contenant de la glycyrrhizine, celle-ci est ajoutée aux plantes étudiées avant l'ajout de l'eau.

L'extrait est ensuite lyophilisé pour obtenir des extraits secs (lyophilisateur Hetosic, Heto Lab Equipment® couplé à une pompe hybride RC 6 Vacuubrand®). Pour effectuer le dosage par CLHP, environ 5 mg de lyophilisats sont resolubilisés dans 2 mL de la phase mobile utilisée pour les mesures puis filtrés sur un filtre seringue pour HPLC de la marque Machery-Nagel® (pores de 0.45 µm). Cette solution sera analysée par chromatographie en phase inverse sur un système UltiMate 3000 de Thermo Scientific®. Le logiciel de traitement des chromatogrammes est Chromeleon® de Thermo Scientific®.

3.2 Analyse de la (+)-catéchine

La phase stationnaire est une colonne en gel de silice octadécylsilylée postgreffée pour chromatographie de 150 mm de long et 4.6 mm de diamètre avec des particules de silice de 3 μm commercialisée par Interchim[®]. Les solvants de la phase mobile sont de qualité CLHP et proviennent de Sigma Aldrich[®] ou de Prolabo[®]. La phase mobile est un système d'éluant composé de 3 solutions A, B et C. L'élution se réalise à l'aide du gradient suivant :

Intervalles (en minutes)	Phase mobile A (HCOOH anhydre 0.05 % dans H ₂ O V/V)	Phase mobile B (HCOOH anhydre 0.05% dans CH ₃ OH)	Phase mobile C (CH ₃ CN)
0-5	97	0	3
5-23	97 → 67	0 → 30	3
23-29	67	30	3
29-30	67 → 30	30 → 67	3
30-31	30	67	3

Le débit de la phase mobile est fixé à 1 mL/min, le volume d'injection est de 10 μL et la détection se fait au détecteur UV à barrette de diodes à une longueur d'onde de 210 nm.

3.3 Analyse de l'aconitine

La phase stationnaire est une colonne en gel de silice octadécylsilylée postgreffée (C18) pour chromatographie de 250 mm de long et 4.6 mm de diamètre avec des particules de silice de 5 μm commercialisée par Interchim[®]. Les solvants (qualité CLHP) de la phase mobile proviennent de Sigma Aldrich[®] ou de Prolabo[®]. La phase mobile est un système de solvants CH₃CN/H₂O+(C₂H₅)₃N 0.10% (45/55, v/v) en élution isocratique pendant 35 minutes. Le débit de la phase mobile est fixé à 1 mL/min, le volume d'injection est de 20 μL , la température est fixée à 30°C et la détection se fait au détecteur UV à barrette de diodes à une longueur d'onde de 235 nm.

3.4 Analyse de l'artémisinine

La phase stationnaire est une colonne en gel de silice octadécylsilylée postgreffée (C18) pour chromatographie de 250 mm de long et 4.6 mm de diamètre avec des particules de silice de 5 μm commercialisée par Interchim[®]. Les solvants de la phase

mobile (qualité CLHP) proviennent de Sigma Aldrich[®] ou de Prolabo[®]. La phase mobile est un système de solvant CH₃CN/H₂O (70/30, v/v) + CH₃COOH 0.10% en élution isocratique pendant 20 minutes. Le débit de la phase mobile est fixé à 1 mL/min, le volume d'injection est de 10 µL et la température est fixée à 30°C. La détection se fait au détecteur UV à barrette de diodes à une longueur d'onde de 254 nm.

3.5 Analyse de l'acide chlorogénique et de la caféine

La phase stationnaire est une colonne en gel de silice octadécylsilylée postgreffée (C18) pour chromatographie de 250 mm de long et 4.6 mm de diamètre avec des particules de silice de 5 µm. Les solvants de la phase mobile (qualité CLHP) proviennent de Sigma Aldrich[®] ou de Prolabo[®]. La phase mobile est un système de solvants composé de 2 solutions A et B éluées en mode gradient :

Intervalles (en minutes)	Phase mobile A (H ₂ O+TFA 0.1 % v/v)	Phase mobile B (CH ₃ CN)
0	95	5
0-35	95 → 80	5 → 20
35-45	80	20
45-50	80 → 95	20 → 5

Le débit de la phase mobile est fixé à 1.5 mL/min, le volume d'injection est de 20 µL et la température est fixée à 25°C. La détection de la caféine se fait au détecteur UV à barrette de diodes à une longueur d'onde de 272 nm tandis que l'acide chlorogénique est détecté à une longueur d'onde de 326 nm.

Bibliographie

1. Wawrezynieck A, Péan J-M, Wüthrich P, Benoit J-P. Biodisponibilité et vecteurs particuliers pour la voie orale. *médecine/sciences*. juin 2008;24(6-7):659-64.
2. Guo J, Shang E, Zhao J, Fan X, Duan J, Qian D, et al. Data mining and frequency analysis for licorice as a « Two-Face » herb in Chinese Formulae based on Chinese Formulae Database. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm*. sept 2014;21(11):1281-6.
3. Kimata H, Sumida N, Matsufuji N, Morita T, Ito K, Yata N, et al. Interaction of saponin of bupleuri radix with ginseng saponin: solubilization of saikosaponin-a with chikusetsusaponin V (= ginsenoside-Ro). *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. juill 1985;33(7):2849-53.
4. Yang Y, McClements DJ. Vitamin E bioaccessibility: influence of carrier oil type on digestion and release of emulsified α -tocopherol acetate. *Food Chem*. nov 2013;141(1):473-81.
5. Vincken J-P, Heng L, Groot A, Gruppen H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*. févr 2007;68(3):275-97.
6. Bruneton J, Poupon E. *Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales*. Cachan, France: Tec & Doc Lavoisier; 2016. 1487 p.
7. Hostettmann K, Marston A. *Saponins*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1995. 548 p. (Chemistry and pharmacology of natural products).
8. Bahrami Y, Zhang W, Franco C. Distribution of Saponins in the Sea Cucumber *Holothuria lessona*; the Body Wall Versus the Viscera, and Their Biological Activities. *Mar Drugs*. nov 2018;16(11):423-53.
9. Bouvier F, Rahier A, Camara B. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog Lipid Res*. nov 2005;44(6):357-429.
10. Kregiel D, Berłowska J, Witonska I, Antolak H, Proestos C, Babić M, et al. Saponin-Based, Biological-Active Surfactants from Plants. In: Najjar R, éditeur. *Application and Characterization of Surfactants*. Londres, UK: IntechOpen; 2017. p. 183-205.
11. Grenby TH (Trevor H). *Progress in sweeteners*. New York (NY), USA: Elsevier Science Pub; 1989. 394 p.
12. Grenby TH (Trevor H). Intense sweeteners for the food industry: an overview. *Trends Food Sci Technol*. janv 1991;2:2-6.
13. Çiçek SS. Structure-Dependent Activity of Plant-Derived Sweeteners. *Molecules*. avr 2020;25(8):1946-69.
14. Voutquenne L, Lavaud C, Massiot G, Men-Olivier LL. Structure-Activity Relationships of Haemolytic Saponins. *Pharm Biol*. janv 2002;40(4):253-62.
15. Oda K, Matsuda H, Murakami T, Katayama S, Ohgitani T, Yoshikawa M. Relationship between adjuvant activity and amphipathic structure of soyasaponins. *Vaccine*. mai 2003;21(17-18):2145-51.

16. Foca G, Ulrici A, Cocchi M, Durante C, Vigni ML, Marchetti A, et al. Chapter 76 - Seeds of Horse Chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) and Their Possible Utilization for Human Consumption. In: Preedy VR, Watson RR, Patel VB, éditeurs. *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*. San Diego (CA), USA: Academic Press; 2011. p. 653-61.
17. Sindambiwe JB, Calomme M, Geerts S, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe DA. Evaluation of biological activities of triterpenoid saponins from *Maesa lanceolata*. *J Nat Prod*. mai 1998;61(5):585-90.
18. Ma WG, Mizutani M, Malterud KE, Lu SL, Ducrey B, Tahara S. Saponins from the roots of *Panax notoginseng*. *Phytochemistry*. nov 1999;52(6):1133-9.
19. Li XC, ElSohly HN, Nimrod AC, Clark AM. Antifungal jujubogenin saponins from *Colubrina retusa*. *J Nat Prod*. mai 1999;62(5):674-7.
20. Killeen GF, Madigan CA, Connolly CR, Walsh GA, Clark C, Hynes MJ, et al. Antimicrobial Saponins of *Yucca schidigera* and the Implications of Their in Vitro Properties for Their in Vivo Impact. *J Agric Food Chem*. août 1998;46(8):3178-86.
21. Konishi M, Hano Y, Takayama M, Nomura T, Hamzah AS, Ahmad R, et al. Triterpenoid saponins from *Hedyotis nudicaulis*. *Phytochemistry*. juin 1998;48(3):525-8.
22. ElSohly HN, Danner S, Li XC, Nimrod AC, Clark AM. New antimycobacterial saponin from *Colubrina retusa*. *J Nat Prod*. sept 1999;62(9):1341-2.
23. Simões CMO, Amoros M, Girre L. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. *Phytother Res*. juin 1999;13(4):323-8.
24. Gosse B, Gnabre J, Bates RB, Dicus CW, Nakkiew P, Huang RCC. Antiviral saponins from *Tieghemella heckelii*. *J Nat Prod*. déc 2002;65(12):1942-4.
25. Yang X-W, Zhao J, Cui Y-X, Liu X-H, Ma C-M, Hattori M, et al. Anti-HIV-1 Protease Triterpenoid Saponins from the Seeds of *Aesculus chinensis*. *J Nat Prod*. nov 1999;62(11):1510-3.
26. Bailly C, Vergoten G. Glycyrrhizin: An alternative drug for the treatment of COVID-19 infection and the associated respiratory syndrome? *Pharmacol Ther*. oct 2020;214:107618.
27. Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, Chandra P, Rabenau H, Doerr H. Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. *The Lancet*. 14 juin 2003;361(9374):2045-6.
28. Chen L, Hu C, Hood M, Zhang X, Zhang L, Kan J, et al. A Novel Combination of Vitamin C, Curcumin and Glycyrrhizic Acid Potentially Regulates Immune and Inflammatory Response Associated with Coronavirus Infections: A Perspective from System Biology Analysis. *Nutrients* [Internet]. avr 2020 [cité 29 sept 2020];12(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7230237/>

29. Luo P, Liu D, Li J. Pharmacological perspective: glycyrrhizin may be an efficacious therapeutic agent for COVID-19. *Int J Antimicrob Agents*. juin 2020;55(6):105995.
30. Zhao X, Jiang Y, Zhao Y, Xi H, Liu C, Qu F, et al. Analysis of the susceptibility to COVID-19 in pregnancy and recommendations on potential drug screening. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. juill 2020;39(7):1209-20.
31. Gomaa AA, Abdel-Wadood YA. The potential of glycyrrhizin and licorice extract in combating COVID-19 and associated conditions. *Phytomedicine Plus*. août 2021;1(3):100043.
32. Li DW, Lee EB, Kang SS, Hyun JE, Whang WK. Activity-guided isolation of saponins from *Kalopanax pictus* with anti-inflammatory activity. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. juill 2002;50(7):900-3.
33. Da Silva BP, Sousa AC, Silva GM, Mendes TP, Parente JP. A new bioactive steroidal saponin from *Agave attenuata*. *Z Naturforschung C J Biosci*. juin 2002;57(5-6):423-8.
34. Kwak WJ, Han CK, Chang HW, Kim HP, Kang SS, Son KH. Loniceroside C, an antiinflammatory saponin from *Lonicera japonica*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. mars 2003;51(3):333-5.
35. Sirtori CR. Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. *Pharmacol Res*. sept 2001;44(3):183-93.
36. Just MJ, Recio MC, Giner RM, Cuéllar MJ, Máñez S, Bilia AR, et al. Anti-inflammatory activity of unusual lupane saponins from *Bupleurum fruticosens*. *Planta Med*. juin 1998;64(5):404-7.
37. Navarro P, Giner RM, Recio MC, Máñez S, Cerdá-Nicolás M, Ríos JL. In vivo anti-inflammatory activity of saponins from *Bupleurum rotundifolium*. *Life Sci*. janv 2001;68(10):1199-206.
38. Mimaki Y, Kuroda M, Ide A, Kameyama A, Yokosuka A, Sashida Y. Steroidal saponins from the aerial parts of *Dracaena draco* and their cytostatic activity on HL-60 cells. *Phytochemistry*. mars 1999;50(5):805-13.
39. Mimaki Y, Kuroda M, Kameyama A, Yokosuka A, Sashida Y. Steroidal saponins from the underground parts of *Ruscus aculeatus* and their cytostatic activity on HL-60 cells. *Phytochemistry*. juin 1998;48(3):485-93.
40. Mimaki Y, Yokosuka A, Kuroda M, Sashida Y. Cytotoxic activities and structure-cytotoxic relationships of steroidal saponins. *Biol Pharm Bull*. nov 2001;24(11):1286-9.
41. Mimaki Y, Kuroda M, Kameyama A, Yokosuka A, Sashida Y. Steroidal saponins from the rhizomes of *Hosta sieboldii* and their cytostatic activity on HL-60 cells. *Phytochemistry*. août 1998;48(8):1361-9.
42. Mimaki Y, Watanabe K, Ando Y, Sakuma C, Sashida Y, Furuya S, et al. Flavonol Glycosides and Steroidal Saponins from the Leaves of *Cestrum nocturnum* and Their Cytotoxicity. *J Nat Prod*. janv 2001;64(1):17-22.

43. Itabashi M, Segawa K, Ikeda Y, Kondo S, Naganawa H, Koyano T, et al. A new bioactive steroidal saponin, furcreastatin, from the plant *Furcraea foetida*. *Carbohydr Res.* janv 2000;323(1-4):57-62.
44. Tran QL, Tezuka Y, Banskota AH, Tran QK, Saiki I, Kadota S. New spirostanol steroids and steroidal saponins from roots and rhizomes of *Dracaena angustifolia* and their antiproliferative activity. *J Nat Prod.* sept 2001;64(9):1127-32.
45. González AG, Hernández JC, León F, Padrón JI, Estévez F, Quintana J, et al. Steroidal saponins from the bark of *Dracaena draco* and their cytotoxic activities. *J Nat Prod.* juin 2003;66(6):793-8.
46. Xiao K, Yi YH, Wang ZZ, Tang HF, Li YQ, Lin HW. A cytotoxic triterpene saponin from the root bark of *Aralia dasycarpa*. *J Nat Prod.* juill 1999;62(7):1030-2.
47. Liu WK, Xu SX, Che CT. Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line. *Life Sci.* août 2000;67(11):1297-306.
48. Sindambiwe JB, Calomme M, Geerts S, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe DA. Evaluation of biological activities of triterpenoid saponins from *Maesa lanceolata*. *J Nat Prod.* mai 1998;61(5):585-90.
49. Abdel-Gawad MM, El-Sayed MM, Abdel-Hameed ES. Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of *Agave decipiens*. *Fitoterapia.* août 1999;70(4):371-81.
50. Treyvaud V, Marston A, Dyatmiko W, Hostettmann K. Molluscicidal saponins from *Phytolacca icosandra*. *Phytochemistry.* nov 2000;55(6):603-9.
51. Mølgaard P, Chihaka A, Lemmich E, Furu P, Windberg C, Ingerslev F, et al. Biodegradability of the Molluscicidal Saponins of *Phytolacca dodecandra*. *Regul Toxicol Pharmacol.* déc 2000;32(3):248-55.
52. Huang H-C, Liao S-C, Chang F-R, Kuo Y-H, Wu Y-C. Molluscicidal saponins from *Sapindus mukorossi*, inhibitory agents of golden apple snails, *Pomacea canaliculata*. *J Agric Food Chem.* août 2003;51(17):4916-9.
53. Brekhman II, Dardymov IV. New Substances of Plant Origin which Increase Nonspecific Resistance. *Annu Rev Pharmacol.* 1969;9(1):419-30.
54. Hiai S, Yokoyama H, Oura H, Yano S. Stimulation of Pituitary-Adrenocortical System by Ginseng Saponin. *Endocrinol Jpn.* déc 1979;26(6):661-5.
55. Gillis CN. *Panax ginseng* pharmacology: A nitric oxide link? *Biochem Pharmacol.* juill 1997;54(1):1-8.
56. Choi HK, Seong DH, Rha KH. Clinical efficacy of Korean red ginseng for erectile dysfunction. *Int J Impot Res.* sept 1995;7(3):181-6.
57. Chen X. Cardiovascular protection by ginsenosides and their nitric oxide releasing action. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* août 1996;23(8):728-32.
58. Li GD, Lu ZQ. [Effect of ginseng saponins on insulin release from isolated pancreatic islets in the rat]. *Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* juin 1987;7(6):357-9, 326.

59. Seo Y-J, Kwon M-S, Choi H-W, Jang J-E, Lee J-K, Sun Y, et al. Intracerebroventricular ginsenosides are antinociceptive in proinflammatory cytokine-induced pain behaviors of mice. *Arch Pharm Res.* mars 2008;31(3):364-9.
60. Nakagawa S, Yoshida S, Hirao Y, Kasuga S, Fuwa T. Cytoprotective activity of components of garlic, ginseng and ciuwjia on hepatocyte injury induced by carbon tetrachloride in vitro. *Hiroshima J Med Sci.* sept 1985;34(3):303-9.
61. Kanzaki T, Morisaki N, Shiina R, Saito Y. Role of transforming growth factor-beta pathway in the mechanism of wound healing by saponin from Ginseng Radix rubra. *Br J Pharmacol.* sept 1998;125(2):255-62.
62. Huong NT, Matsumoto K, Kasai R, Yamasaki K, Watanabe H. In vitro antioxidant activity of Vietnamese ginseng saponin and its components. *Biol Pharm Bull.* sept 1998;21(9):978-81.
63. Yeşilada E, Takaishi Y. A saponin with anti-ulcerogenic effect from the flowers of *Spartium junceum*. *Phytochemistry.* août 1999;51(7):903-8.
64. Estrada A, Katselis GS, Laarveld B, Barl B. Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* janv 2000;23(1):27-43.
65. Sjölander A, Cox JC. Uptake and adjuvant activity of orally delivered saponin and ISCOMTM vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.* déc 1998;34(2):321-38.
66. Cui C, Yang Y, Zhao T, Zou K, Peng C, Cai H, et al. Insecticidal Activity and Insecticidal Mechanism of Total Saponins from *Camellia oleifera*. *Molecules.* déc 2019;24(24).
67. Gao G, Lu Z, Tao S, Zhang S, Wang F. Triterpenoid saponins with antifeedant activities from stem bark of *Catunaregam spinosa* (Rubiaceae) against *Plutella xylostella* (Plutellidae). *Carbohydr Res.* oct 2011;346(14):2200-5.
68. Kunjappu JT, Rosen MJ. *Surfactants and interfacial phenomena.* Hoboken (NJ), USA: Wiley; 2013. 616 p.
69. Cserháti T, Forgács E, Oros G. Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environ Int.* nov 2002;28(5):337-48.
70. Han Z, Yang X, Liu Y. Micellar and Interfacial Behavior of Mixed Systems Containing Glycoside-Based Surfactant and Cationic Didecyldimethylammonium Chloride. *J Surfactants Deterg.* 2015;18(5):873-80.
71. Iwasaki Toshihiko, Ogawa Masataka, Esumi Kunio, Meguro Kenjiro. Interactions between betaine-type zwitterionic and anionic surfactants in mixed micelles. *Langmuir.* janv 1991;7(1):30-5.
72. Uchegbu IF, Vyas SP. Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery. *Int J Pharm.* oct 1998;172(1):33-70.
73. Carnero Ruiz C. *SUGAR-BASED SURFACTANTS: fundamentals and applications.* Boca Raton (FL), USA: CRC Press; 2019. 660 p.

74. Krüss. Critical micelle concentration (CMC) and surfactant concentration [Internet]. Image 1. Surface tension of a surfactant solution with increasing concentration, formation of micelles. [cité 17 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.kruss-scientific.com/services/education-theory/glossary/critical-micelle-concentration-cmc-and-surfactant-concentration/>
75. Manojlovic J. The Krafft temperature of surfactant solutions. *Therm Sci.* janv 2012;16(Suppl. 2):631-40.
76. Iwata T. Lamellar Gel Network. In: Sakamoto K, Lochhead RY, Maibach HI, Yamashita Y, éditeurs. *Cosmetic Science and Technology*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier; 2017. p. 415-447 Fig. 25.14. Schematic phase diagram of surfactant. Usual surfactant solutions are above the critical micelle concentration (CMC) line and above Krafft temperature. However, L β phase is an exception. It is below Krafft temperature and above the hypothetical CMC line (dotted).
77. Mukherjee P, Padhan SK, Dash S, Patel S, Mishra BK. Clouding behaviour in surfactant systems. *Adv Colloid Interface Sci.* 17 févr 2011;162(1):59-79.
78. Israelachvili JN, Mitchell DJ, Ninham BW. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J Chem Soc Faraday Trans 2 Mol Chem Phys.* janv 1976;72:1525-68.
79. Kunitake T, Okahata Y, Shimomura M, Yasunami S, Takarabe K. Formation of stable bilayer assemblies in water from single-chain amphiphiles. Relationship between the amphiphile structure and the aggregate morphology. *J Am Chem Soc.* sept 1981;103(18):5401-13.
80. Kitamoto D, Morita T, Fukuoka T, Konishi M, Imura T. Self-assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* oct 2009;14(5):315-28.
81. Ananthapadmanabhan KP, Goddard ED, Chandar P. A study of the solution, interfacial and wetting properties of silicone surfactants. *Colloids Surf.* janv 1990;44:281-97.
82. Williams JM. High internal phase water-in-oil emulsions: influence of surfactants and cosurfactants on emulsion stability and foam quality. *Langmuir.* juill 1991;7(7):1370-7.
83. Singh A, Van Hamme JD, Ward OP. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnol Adv.* janv 2007;25(1):99-121.
84. Takagi T, Ramachandran C, Bermejo M, Yamashita S, Yu LX, Amidon GL. A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. *Mol Pharm.* déc 2006;3(6):631-43.
85. Torchilin VP. Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. *Pharm Res.* janv 2007;24(1):1-16.

86. Ménard N, Tsapis N, Poirier C, Arnould T, Moine L, Gignoux C, et al. Novel surfactants with diglutamic acid polar head group: drug solubilization and toxicity studies. *Pharm Res.* juill 2012;29(7):1882-96.
87. Zhang N, Wardwell PR, Bader RA. Polysaccharide-Based Micelles for Drug Delivery. *Pharmaceutics.* mai 2013;5(2):329-52.
88. Henni-Silhadi W, Deyme M, Boissonnade M-M, Appel M, Le Cerf D, Picton L, et al. Enhancement of the Solubility and Efficacy of Poorly Water-Soluble Drugs by Hydrophobically-Modified Polysaccharide Derivatives. *Pharm Res.* déc 2007;24(12):2317-26.
89. Oleszek W, Hamed A. Saponin-Based Surfactants. In: Kjellin M, Johansson I, éditeurs. *Surfactants from Renewable Resources.* Hoboken (NJ), USA: John Wiley & Sons, Ltd; 2010. p. 239-49.
90. Böttcher S, Drusch S. Saponins — Self-assembly and behavior at aqueous interfaces. *Adv Colloid Interface Sci.* mai 2017;243:105-13.
91. Tippel J, Lehmann M, von Klitzing R, Drusch S. Interfacial properties of Quillaja saponins and its use for micellisation of lutein esters. *Food Chem.* déc 2016;212:35-42 Fig. 1. Micelles allongées de Quillaja saponaria observée par Cryo-TEM.
92. Golemanov K, Tcholakova S, Denkov N, Pelan E, Stoyanov SD. Remarkably high surface visco-elasticity of adsorption layers of triterpenoid saponins. *Soft Matter.* mai 2013;9(24):5738-5752 Fig. 2. Schematic presentation of the possible structure of the adsorption layers for: (A) monodesmosidic triterpenoid saponins, such as Escin; (B) bidesmosidic triterpenoid saponins in a side-on configuration, such as GS; (C) bidesmosidic triterpenoid saponins in a lay-on configuration, such as QD. The side-on configurations (A) and (B) correspond to an area per molecule of 0.4 to 0.5 nm², as determined from surface tension isotherms, and extremely high surface elasticity and viscosity, whereas the lay-on configuration in (C) is characterized with an area per molecule larger than 1 nm² and lower (but still very high) surface elasticity and viscosity. The high elastic and viscous moduli are probably caused by strong hydrogen bonds between the oligosaccharide chains (shown in dark blue) in the neighboring adsorbed molecules. The brown blobs represent the hydrophobic scaffolds of the saponin molecules.
93. Dai X, Shi X, Yin Q, Ding H, Qiao Y. Multiscale study on the interaction mechanism between ginsenoside biosurfactant and saikosaponin a. *J Colloid Interface Sci.* avr 2013;396:165-72.
94. Dai X, Shi X, Yin Q, Ding H, Qiao Y. Multiscale study on the interaction mechanism between ginsenoside biosurfactant and saikosaponin a. *J Colloid Interface Sci.* avr 2013;396:165-172 Fig. 1. (b) photos of ginsenoside/SSa interaction systems in aqueous medium.
95. Dai X, Shi X, Yin Q, Ding H, Qiao Y. Multiscale study on the interaction mechanism between ginsenoside biosurfactant and saikosaponin a. *J Colloid Interface Sci.* avr 2013;396:165-172 Fig. 2. TEM images of 1.0 mmol/L ginsenoside solution and saturated solution of SSa: (a) Ro vesicles; (b) Rb1 micelles; (c) Rg1 micelles; and (d) SSa micelles.

96. Kondo M, Minamino H, Okuyama G, Honda K, Nagasawa H, Otani Y. Physicochemical properties and application of α - and β -glycyrrhizins, natural surface active agents in licorice root extract. *J Soc Cosmet Chem Jpn.* 1983;17(1):14-8.
97. Wu Y, Wang Y, Lei T, Xia Y. The Solubilization Capability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Enhanced by Biosurfactant Saponin Mixed With Conventional Chemical Surfactants. *Pet Sci Technol.* janv 2014;32(1):108-15.
98. Zhou W, Yang J, Lou L, Zhu L. Solubilization properties of polycyclic aromatic hydrocarbons by saponin, a plant-derived biosurfactant. *Environ Pollut.* mai 2011;159(5):1198-204.
99. Song S, Zhu L, Zhou W. Simultaneous removal of phenanthrene and cadmium from contaminated soils by saponin, a plant-derived biosurfactant. *Environ Pollut.* déc 2008;156(3):1368-70.
100. Liu Z, Li Z, Zhong H, Zeng G, Liang Y, Chen M, et al. Recent advances in the environmental applications of biosurfactant saponins: A review. *J Environ Chem Eng.* déc 2017;5(6):6030-8.
101. Ozturk B, Argin S, Ozilgen M, McClements DJ. Nanoemulsion delivery systems for oil-soluble vitamins: Influence of carrier oil type on lipid digestion and vitamin D3 bioaccessibility. *Food Chem.* nov 2015;187:499-506.
102. Vinarov Z, Radeva D, Katev V, Tcholakova S, Denkov N. Solubilisation of Hydrophobic Drugs by Saponins. *Indian J Pharm Sci.* juin 2018;80(4):709-18.
103. Kumar A, Bansal M, Kumar Singh A, Prasad A. Saponin as Absorption Enhancer. *World J Pharm Res.* août 2014;3(6):2099-110.
104. Grassauer A, Prieschl-Grassauer E, Bodenteich A, Morokutti-Kurz M, Nakowitsch S, KAINZ C. Method for improving aqueous solubility of water-insoluble or slightly water-soluble drugs [Internet]. WO2017009480A1, 2017 [cité 10 sept 2020]. Disponible sur: <https://patents.google.com/patent/WO2017009480A1>
105. Walthelm U, Dittrich K, Gelbrich G, Schöpke T. Effects of saponins on the water solubility of different model compounds. *Planta Med.* févr 2001;67(1):49-54.
106. Kumar A, Bansal M. Formulation and Evaluation of Antidiabetic Tablets : Effects of Absorption Enhancers. *World J Pharm Res.* nov 2014;3(10):1426-45.
107. Cho SY, Sim J-S, Kang SS, Jeong C-S, Linhardt RJ, Kim YS. Enhancement of heparin and heparin disaccharide absorption by the *Phytolacca americana* saponins. *Arch Pharm Res.* déc 2003;26(12):1102.
108. Organisation mondiale de la santé. Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2014-2023. Genève, Suisse: Organisation mondiale de la Santé; 2013. 72 p.
109. Xu J, Xia Z. Traditional Chinese Medicine (TCM) – Does its contemporary business booming and globalization really reconfirm its medical efficacy & safety? *Med Drug Discov.* mars 2019;1:100003.

110. Abdullahi AA. Trends and Challenges of Traditional Medicine in Africa. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* juill 2011;8(5 Suppl):115-123 Table 2. Sample ratio of THPs compared with the ratio of medical doctors to the population.
111. Hoizey D, Hoizey M-J. *Histoire de la médecine chinoise : des origines à nos jours.* Paris, France: Payot; 1988. 293 p.
112. Shizhen L. *Ben Cao Gang Mu.* Zhang Dingsi. Jiangxi, China; 1603. 380 p.
113. Lozano F. Basic Theories of Traditional Chinese Medicine. In: Lin YC, Hsu EZ, éditeurs. *Acupuncture for Pain Management [Internet].* New York (NY), USA: Springer; 2014 [cité 23 avr 2018]. p. 13-43. Disponible sur: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-5275-1_2
114. Maciocia G. *Les Principes fondamentaux de la médecine chinoise: manuel à l'usage des acupuncteurs et des phytothérapeutes.* Bruxelles, Belgique: Satas; 1992. 740 p.
115. Lu G-D, Needham J. *Celestial Lancets: A History and Rationale of Acupuncture and Moxa.* Londres, UK: Routledge; 2002. 484 p.
116. Wu Q, Liang X. Food therapy and medical diet therapy of Traditional Chinese Medicine. *Clin Nutr Exp.* avr 2018;18:1-5.
117. Wu L, Wang Y, Li Z, Zhang B, Cheng Y, Fan X. Identifying roles of « Jun-Chen-Zuo-Shi » component herbs of QiShenYiQi formula in treating acute myocardial ischemia by network pharmacology. *Chin Med.* sept 2014;9:24.
118. Moore JM. *Shang Han Lun and Other Traditional Formulas: A Clinical Reference.* Irvine (CA), USA: Oriental Healing Arts Institute; 1995. 276 p.
119. Zhang M, Schiffers P, Janssen G, Vrolijk M, Vangrieken P, Haenen GRMM. The cardiovascular side effects of Ma Huang due to its use in isolation in the Western world. *Eur J Integr Med.* févr 2018;18:18-22.
120. TCM Wiki. *Traditional Chinese Medicine Theory [Internet].* [cité 1 mai 2020]. Disponible sur: <https://tcmwiki.com/>
121. Conseil de l'Europe. *Réglisse (Racine de).* In: Conseil de l'Europe, éditeur. *European Pharmacopoeia 10-2.* Strasbourg, France: Conseil de l'Europe; 2020. p. 1732-4.
122. Thomé OW. *Glycyrrhiza glabra - Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz [Internet].* [cité 31 janv 2020]. Disponible sur: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Illustration_Glycyrrhiza_glabra0.jpg?uselang=fr
123. Jiang M, Zhao S, Yang S, Lin X, He X, Wei X, et al. An “essential herbal medicine”—licorice: A review of phytochemicals and its effects in combination preparations. *J Ethnopharmacol.* mars 2020;249:112439. Fig 1. Aerial part of *G. glabra* L, root of *G. glabra* L.
124. Lee MR. Licorice (*Glycyrrhiza glabra*): the journey of the sweet root from Mesopotamia to England. *J R Coll Physicians Edinb.* déc 2018;48(4):378-82.

125. Nazari S, Rameshrad M, Hosseinzadeh H. Toxicological Effects of Glycyrrhiza glabra (Licorice): A Review. *Phytother Res.* 2017;31(11):1635-50.
126. Jiang M, Zhao S, Yang S, Lin X, He X, Wei X, et al. An “essential herbal medicine”—licorice: A review of phytochemicals and its effects in combination preparations. *J Ethnopharmacol.* mars 2020;249:112439.
127. Hymowitz T, Newell CA. Taxonomy of the genus *Glycine*, domestication and uses of soybeans. *Econ Bot.* 1 juill 1981;35(3):272-88.
128. Silva LR, Pereira MJ, Azevedo J, Gonçalves RF, Valentão P, de Pinho PG, et al. *Glycine max* (L.) Merr., *Vigna radiata* L. and *Medicago sativa* L. sprouts: A natural source of bioactive compounds. *Food Res Int.* janv 2013;50(1):167-75.
129. Kooti W, Hasanzadeh-Noohi Z, Sharafi-Ahvazi N, Asadi-Samani M, Ashtary-Larky D. Phytochemistry, pharmacology, and therapeutic uses of black seed (*Nigella sativa*). *Chin J Nat Med.* oct 2016;14(10):732-45.
130. Pittler MH, Ernst E. Horse chestnut seed extract for chronic venous insufficiency. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. nov 2012 [cité 12 oct 2020];2012(11). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7144685/>
131. Nord LI, Kenne L. Separation and structural analysis of saponins in a bark extract from *Quillaja saponaria* Molina. *Carbohydr Res.* juill 1999;320(1):70-81.
132. Rolan P, Molnár V. Clinical Pharmacokinetics. In: Griffin JP, Posner J, Barker GR, éditeurs. *The Textbook of Pharmaceutical Medicine*. Hoboken (NJ), USA: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. p. 113-31.
133. Avdeef A. Absorption and drug development: solubility, permeability, and charge state. Hoboken (NJ), USA: Wiley-Interscience; 2003. 287 p.
134. Belpaire FM, Bogaert MG. The Fate of Xenobiotics in Living Organisms. In: Wermuth CG, éditeur. *The Practice of Medicinal Chemistry (Second Edition)*. Londres, UK: Academic Press; 2003. p. 501-15.
135. Ruiz M. Scheme facilitated diffusion in cell membrane [Internet]. [cité 25 août 2020]. Disponible sur: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Scheme_facilitated_diffusion_in_cell_mbrane-fr.svg?uselang=fr
136. FH J. Pinocytosis types [Internet]. [cité 25 août 2020]. Disponible sur: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pinocytosis.svg>
137. Zhang H, Zhang J, Streisand JB. Oral mucosal drug delivery: clinical pharmacokinetics and therapeutic applications. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(9):661-80.
138. Kiela PR, Ghishan FK. Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* avr 2016;30(2):145-59.
139. Rekdal VM, Bess EN, Bisanz JE, Turnbaugh PJ, Balskus EP. Discovery and inhibition of an interspecies gut bacterial pathway for Levodopa metabolism. *Science.* juin 2019;364(6445).

140. Wawrezynieck A, Péan J-M, Wüthrich P, Benoit J-P. Biodisponibilité et vecteurs particuliers pour la voie orale. médecine/sciences. juin 2008;24(6-7):659-664 Fig. 2. Le passage des systèmes particuliers à travers l'épithélium intestinal.
141. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* janv 1997;23(1):3-25.
142. Kwon Y. *Handbook of Essential Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Metabolism for Industrial Scientists.* Berlin, Allemagne: Springer Science & Business Media; 2007. 302 p.
143. D. Cronin MT. The Role of Hydrophobicity in Toxicity Prediction. *Curr Comput - Aided Drug Des.* déc 2006;2(4):405-13.
144. Noble A. Partition coefficients (n-octanol—water) for pesticides. *J Chromatogr A.* juill 1993;642(1):3-14.
145. Smallman RE, Ngan AHW. *Modern physical metallurgy.* 8th edition. Oxford, UK: Elsevier/Butterworth-Heinemann; 2014. 697 p.
146. OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method. Paris, France: OECD Publishing; 1995. 4 p.
147. OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method. Paris, France: OECD Publishing; 2004. 11 p.
148. OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). Partition coefficient (1-octanol/water): slow-stirring method. Paris, France: OECD Publishing; 2006. 16 p.
149. Comer J, Tam K. Lipophilicity Profiles: Theory and Measurement. In: Testa B, Van de Waterbeemd H, Folkers G, Guy R, éditeurs. *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research.* Hoboken (NJ), USA: John Wiley & Sons, Ltd; 2007. p. 275-304.
150. Reymond F, Steyaert G, Carrupt P-A, Testa B, Girault H. Ionic Partition Diagrams: A Potential-pH Representation. *J Am Chem Soc.* janv 1996;118(47):11951-7.
151. El Tayar N, Tsai R-S, Vallat P, Altomare C, Testa B. Measurement of partition coefficients by various centrifugal partition chromatographic techniques: A comparative evaluation. *J Chromatogr A.* sept 1991;556(1-2):181-94.
152. Tetko IV, Tanchuk VYu. Application of Associative Neural Networks for Prediction of Lipophilicity in ALOGPS 2.1 Program. *J Chem Inf Comput Sci.* sept 2002;42(5):1136-45.
153. Dearden JC, Bresnen GM. The Measurement of Partition Coefficients. *Quant Struct-Act Relatsh.* mars 1988;7(3):133-44.

154. Cumming H, Rücker C. Octanol–Water Partition Coefficient Measurement by a Simple ¹H NMR Method. ACS Omega. sept 2017;2(9):6244-9.
155. Cumming H, Rücker C. Octanol–Water Partition Coefficient Measurement by a Simple ¹H NMR Method. ACS Omega. sept 2017;2(9):6244-6249 Fig. 1 Schematic diagram of the analyte partition between the water and 1-octanol layers upon equilibration.
156. Jordheim M, Fossen T, Songstad J, Andersen ØM. Reactivity of Anthocyanins and Pyranoanthocyanins. Studies on Aromatic Hydrogen–Deuterium Exchange Reactions in Methanol. J Agric Food Chem. oct 2007;55(20):8261-8.
157. Akoka S, Barantin L, Trierweiler M. Concentration Measurement by Proton NMR Using the ERETIC Method. Anal Chem. juill 1999;71(13):2554-7.
158. Noüy D, Lecomte P. AN INTERFACIAL TENSIO METER FOR UNIVERSAL USE. J Gen Physiol. mai 1925;7(5):625-31.
159. Krüss. Force Tensiometer - K6 [Internet]. Image 1. Force Tensiometer - K6. [cité 14 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.kruss-scientific.com/products/tensiometers/force-tensiometer-k6/>
160. National Institutes of Health (NIH). ChemIDplus Lite - Chemical information with searchable synonyms, structures, and formulas [Internet]. 2020 [cité 16 juill 2020]. Disponible sur: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidlite.jsp>
161. Virtual Computational Chemistry Laboratory. On-line Lipophilicity/Aqueous Solubility Calculation Software [Internet]. 2020 [cité 16 juill 2020]. Disponible sur: <http://www.vcclab.org/lab/alogps/>
162. Schöpke T, Bartlakowski J, Hiller K. Critical Micellar Concentrations of a Number of Triterpenoid Saponins of Different Structure Types. Pharm. juin 1995;50(11):771.
163. Böttger S, Hofmann K, Melzig MF. Saponins can perturb biologic membranes and reduce the surface tension of aqueous solutions: A correlation? Bioorg Med Chem. mai 2012;20(9):2822-8.
164. Decroos K, Vincken J-P, van Koningsveld GA, Gruppen H, Verstraete W. Preparative chromatographic purification and surfactant properties of individual soyasaponins from soy hypocotyls. Food Chem. janv 2007;101(1):324-33.
165. Reichert CL, Salminen H, Weiss J. Quillaja Saponin Characteristics and Functional Properties. Annu Rev Food Sci Technol. mars 2019;10(1):43-73.
166. Chan TYK. Aconite poisoning. Clin Toxicol Phila Pa. avr 2009;47(4):279-85.
167. Singhuber J, Zhu M, Prinz S, Kopp B. Aconitum in Traditional Chinese Medicine—A valuable drug or an unpredictable risk? J Ethnopharmacol. oct 2009;126(1):18-30.
168. Ma L, Gu R, Tang L, Chen Z-E, Di R, Long C. Important Poisonous Plants in Tibetan Ethnomedicine. Toxins. janv 2015;7(1):138-55.

169. Nobel Media AB. Tu Youyou - The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2015 - Facts [Internet]. NobelPrize.org. [cité 19 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2015/tu/facts/>
170. Tu Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nat Med.* oct 2011;17(10):1217-20.
171. Organisation mondiale de la santé. Utilisation des formes non pharmaceutiques d'Artemisia [Internet]. Genève, Suisse: Organisation mondiale de la Santé; 2019 [cité 26 janv 2021]. 21 p. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/publications-detail/the-use-of-non-pharmaceutical-forms-of-artemisia>
172. Harutyunyan LR, Lachinyan ML, Harutyunyan RS. Effect of Ascorbic Acid on the Colloidal and Micellar Properties of Anionic, Cationic, and Nonionic Surfactants: Conductivity, Volumetric, Viscometric, and Fluorescence Study. *J Chem Eng Data.* nov 2013;58(11):2998-3008.
173. Alam MdS, Siddiq AM, Mandal AB. Thermodynamic and micellization studies of a cationic gemini surfactant 16-6-16: Influence of ascorbic acid and temperature. *Colloid J.* janv 2016;78(1):9-14.
174. Lab of Systems Pharmacology. TCMSP - Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform [Internet]. [cité 24 déc 2020]. Disponible sur: <https://tcmospw.com/tcmosp.php>
175. Ru J, Li P, Wang J, Zhou W, Li B, Huang C, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines. *J Cheminformatics.* déc 2014;6(1):13.
176. Zhang Z, Li K, Tian R, Lu C. Substrate-Assisted Visualization of Surfactant Micelles via Transmission Electron Microscopy. *Front Chem.* avr 2019;7.
177. McMahon DJ, McManus WR. Rethinking Casein Micelle Structure Using Electron Microscopy. *J Dairy Sci.* nov 1998;81(11):2985-93.
178. Karlsson AO, Ipsen R, Ardö Y. Observations of casein micelles in skim milk concentrate by transmission electron microscopy. *LWT - Food Sci Technol.* août 2007;40(6):1102-7.
179. Parent LR, Bakalis E, Ramírez-Hernández A, Kammeyer JK, Park C, de Pablo J, et al. Directly Observing Micelle Fusion and Growth in Solution by Liquid-Cell Transmission Electron Microscopy. *J Am Chem Soc.* nov 2017;139(47):17140-51.
180. Samal K, Das C, Mohanty K. Eco-friendly biosurfactant saponin for the solubilization of cationic and anionic dyes in aqueous system. *Dyes Pigments.* mai 2017;140:100-8.
181. Taokaew S, Ofuchi M, Kobayashi T. Size Distribution and Characteristics of Chitin Microgels Prepared via Emulsified Reverse-Micelles. *Materials.* avr 2019;12(7).

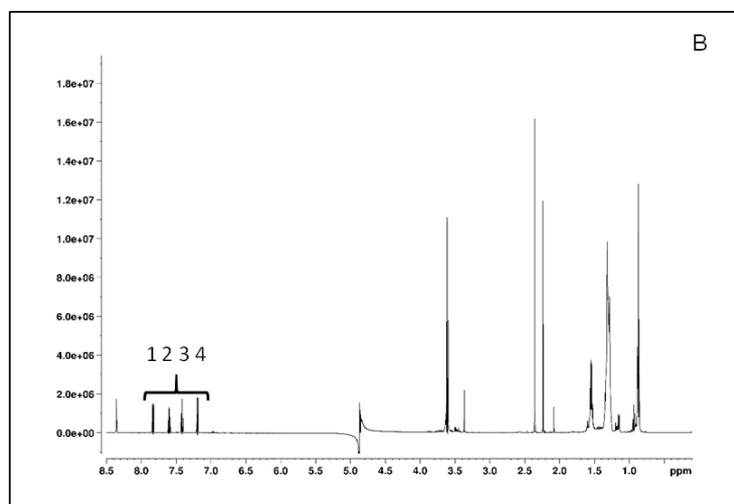
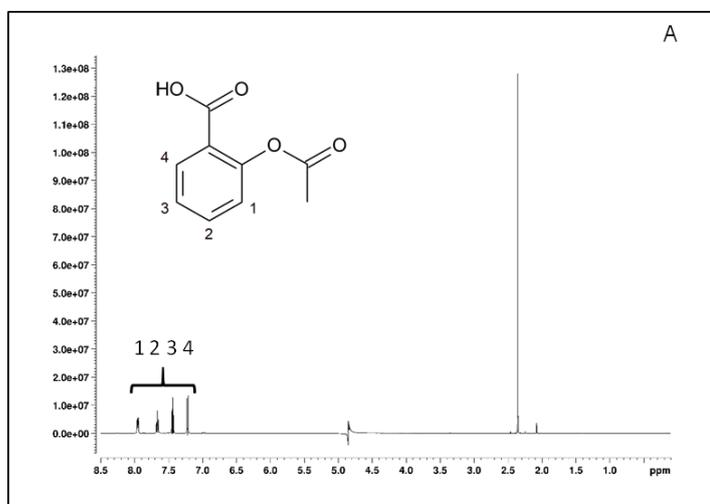
182. Spach Optics. Olympus IX70 inverted tissue culture microscope [Internet]. Spach Optics. [cité 7 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.spachoptics.com/product-p/olympus-ix70.htm>
183. ImageJ. Image Processing and Analysis in Java [Internet]. [cité 7 déc 2020]. Disponible sur: <https://imagej.nih.gov/ij/>
184. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM). Pharmacopée française [Internet]. [cité 8 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.ansm.sante.fr/Mediatheque/Publications/Pharmacopee-francaise-Plan-Preambule-index>
185. Wang J, Sasse A, Sheridan H. Traditional Chinese Medicine: From Aqueous Extracts to Therapeutic Formulae. In: Dekebo A, éditeur. Plant Extracts. Londres, UK: IntechOpen; 2019. p. 11-39.
186. Khan N, Mukhtar H. Tea and Health: Studies in Humans. *Curr Pharm Des.* juin 2014;19(34):6141-7.
187. Wakamatsu M, Yamanouchi H, Sahara H, Iwanaga T, Kuroda R, Yamamoto A, et al. Catechin and caffeine contents in green tea at different harvest periods and their metabolism in miniature swine. *Food Sci Nutr.* août 2019;7(8):2769-78.
188. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM). Pharmacopée française [Internet]. 2020 [cité 8 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.ansm.sante.fr/Mediatheque/Publications/Pharmacopee-francaise-Plan-Preambule-index>
189. Conseil de l'Europe. Thé vert. In: Conseil de l'Europe, éditeur. *European Pharmacopoeia 10-2*. Strasbourg, France: Conseil de l'Europe; 2020. p. 5610-1.
190. Zhu H, Ni L, Ren S, Fang G, Li S. A composite carbon-based solid acid-supported palladium catalyst (Pd/C-SO₃H) for hydrogenolysis of plant-derived polymeric proanthocyanidins. *RSC Adv.* 2020;10(35):20665-20675 Fig. 6 UV absorption spectra of PPC, OPC and catechin standard.
191. El-Shazly M, Tai C-J, Wu T-Y, Csupor D, Hohmann J, Chang F-R, et al. Use, history, and liquid chromatography/mass spectrometry chemical analysis of *Aconitum*. *J Food Drug Anal.* janv 2016;24(1):29-45.
192. Liu M, Cao Y, Lv D, Zhang W, Zhu Z, Zhang H, et al. Effect of processing on the alkaloids in *Aconitum* tubers by HPLC-TOF/MS. *J Pharm Anal.* juin 2017;7(3):170-5.
193. Tong P, Wu C, Wang X, Hu H, Jin H, Li C, et al. Development and assessment of a complete-detoxication strategy for Fuzi (lateral root of *Aconitum carmichaeli*) and its application in rheumatoid arthritis therapy. *J Ethnopharmacol.* mars 2013;146(2):562-71.
194. Nakamura Y, Yomura K, Kammoto T, Ishimatsu M, Kikuchi Y, Niitsu K, et al. Physicochemical quality evaluation of natural compounds isolated from crude drugs. *J Nat Med.* oct 2006;60(4):285-294 Fig. 3UV spectra of diesteralkaloids for identification (A : Aconitine).

195. Amos Abolaji O, Ubana Eteng M, Patrick Ebong E, Brisibe A, Shakil A, Shaista E, et al. Standardisation of *Artemisia annua* using Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC). *Pharmacogn J.* mars 2010;2(7):142-7.
196. Ghafoori H, Sariri R, Naghavi MR, Aryakia E, Dolatyari A, shahzadeh fazeli seyed abolhassan, et al. Analysis of artemisinin isolated from *Artemisia Annua* L. by TLC and HPLC. *J Liq Chromatogr Relat Technol - J LIQ CHROMATOGR RELAT TECHNO.* janv 2012;36.
197. Navarra G, Moschetti M, Guarrasi V, Mangione MR, Militello V, Leone M. Simultaneous Determination of Caffeine and Chlorogenic Acids in Green Coffee by UV/Vis Spectroscopy. *Oliveira MBPP, éditeur. J Chem.* 26 oct 2017;2017:6435086.

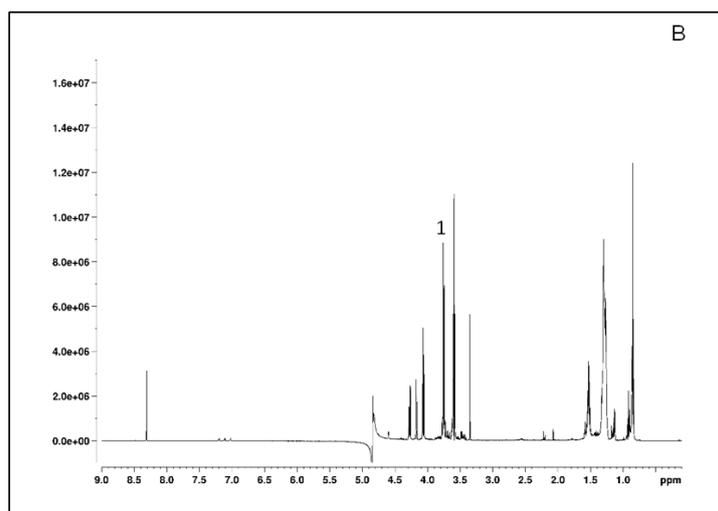
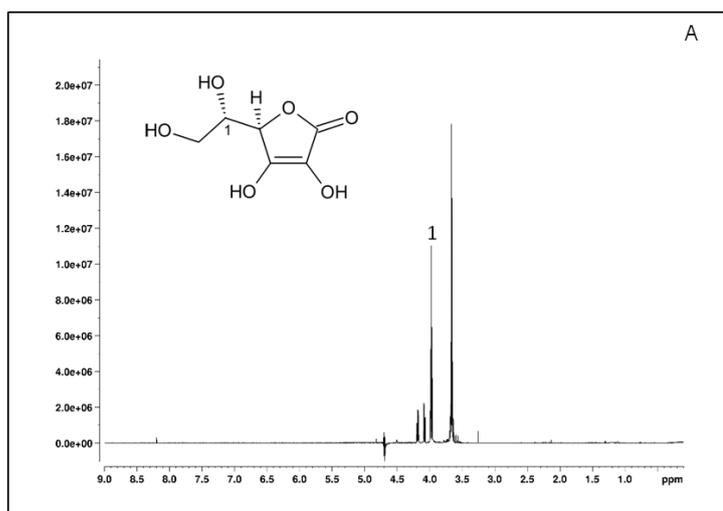
Annexes

1 Spectres des molécules étudiées par RMN ^1H ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 90/10) (A : avant partage contre l'octanol, B : après partage)

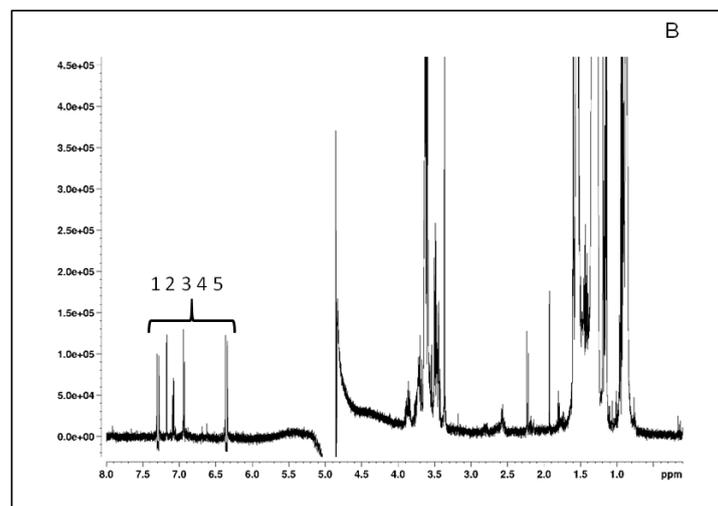
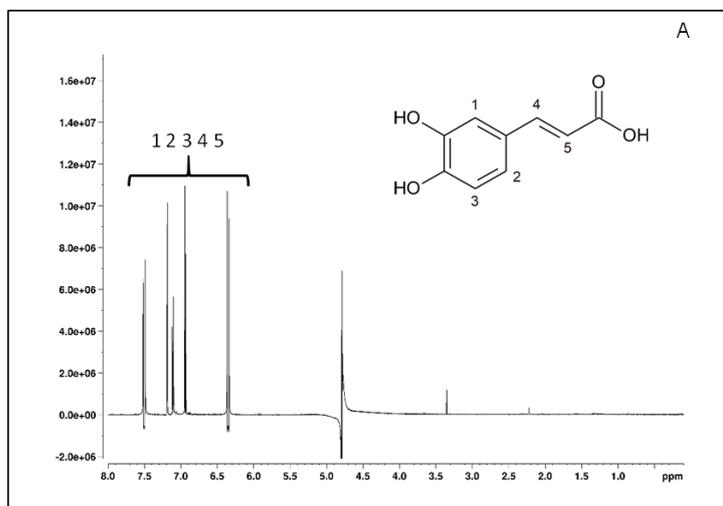
1.1 Acide acétylsalicylique



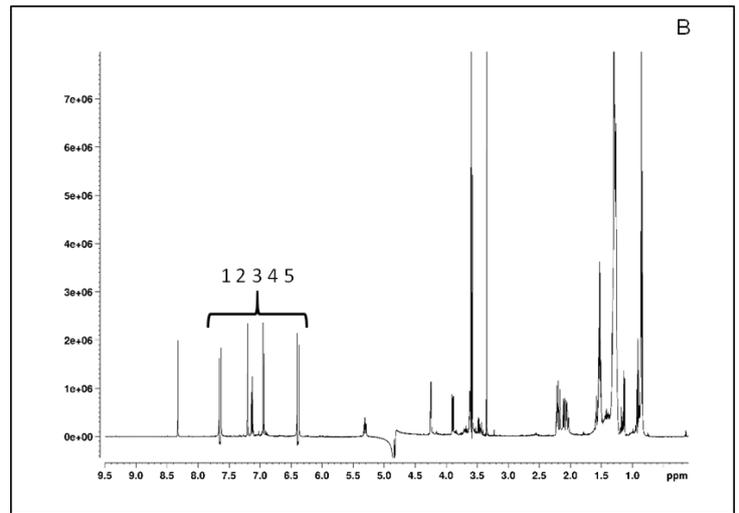
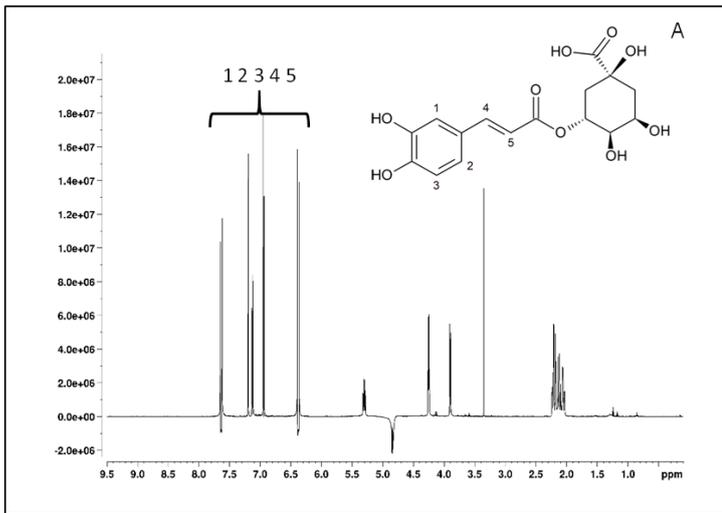
1.2 Acide ascorbique



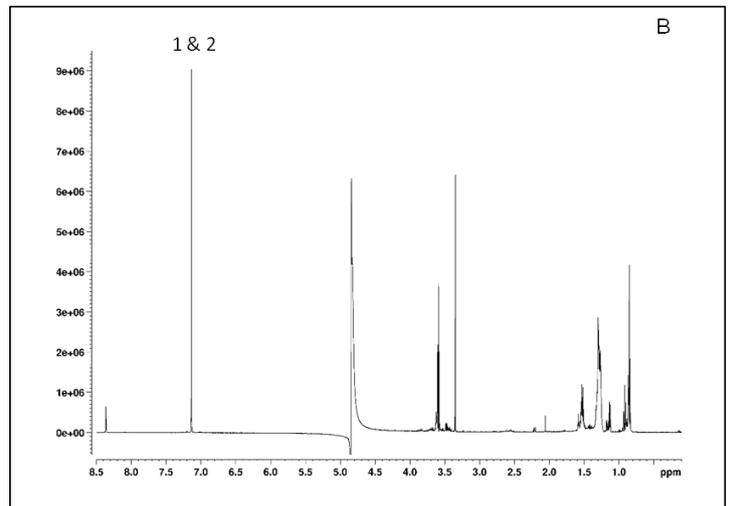
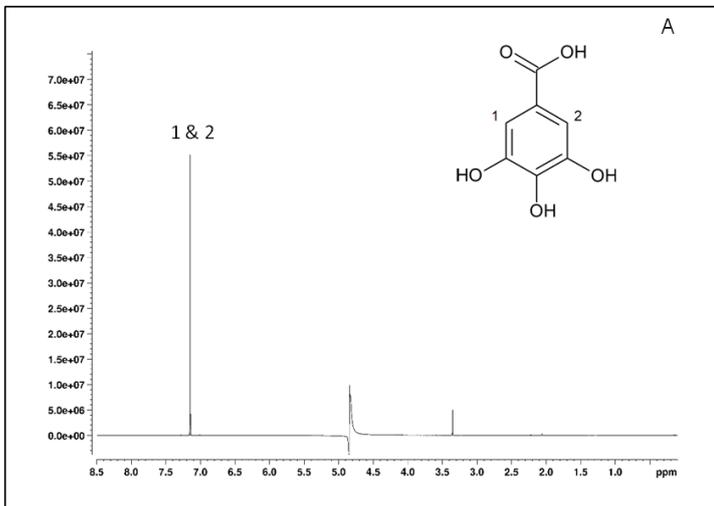
1.3 Acide caféique



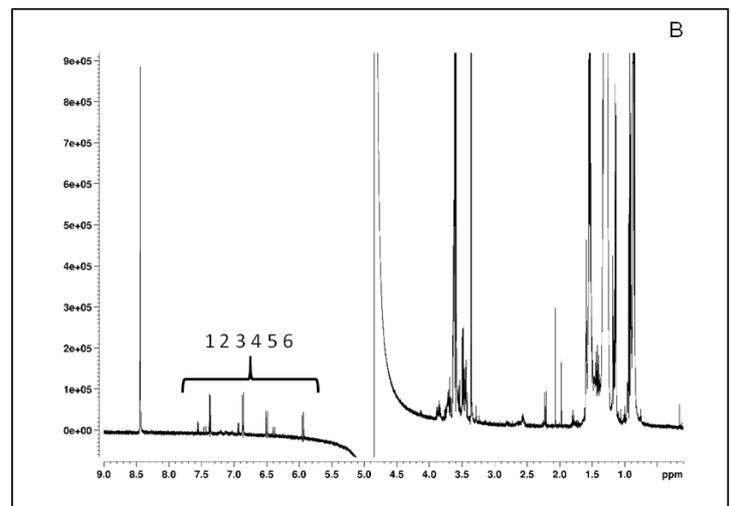
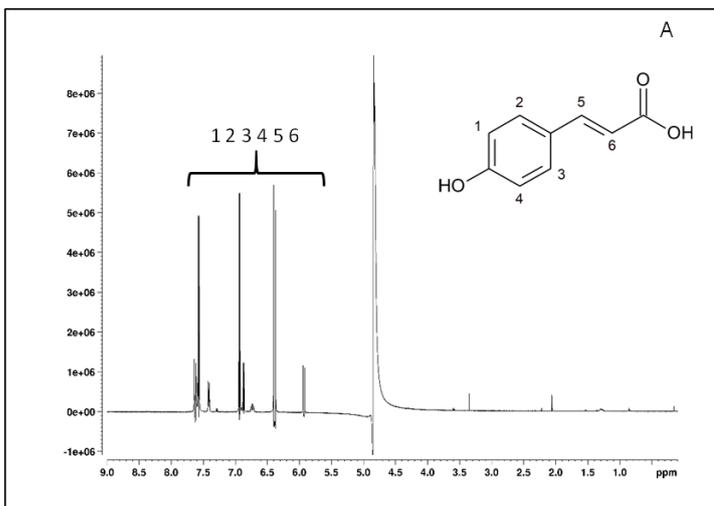
1.4 Acide chlorogénique



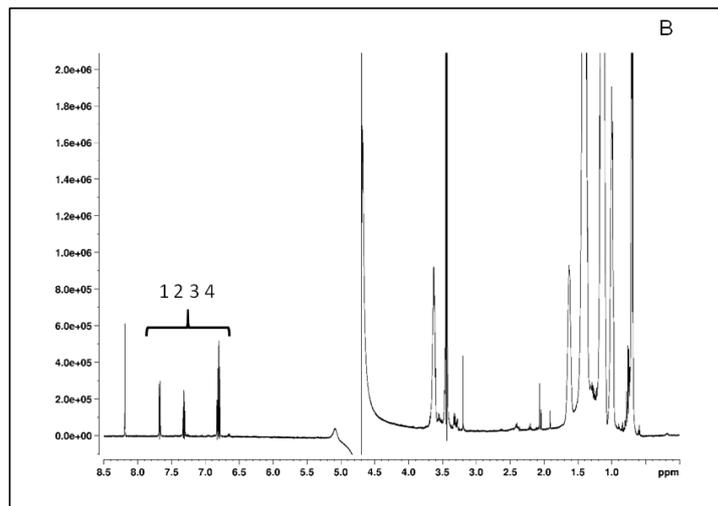
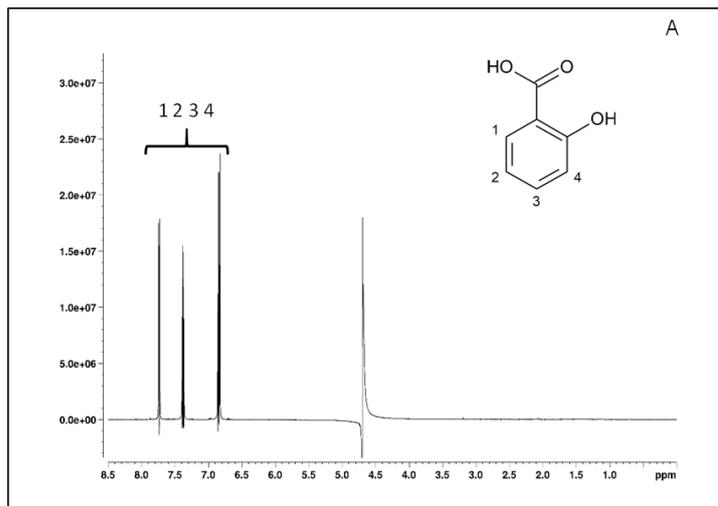
1.5 Acide gallique



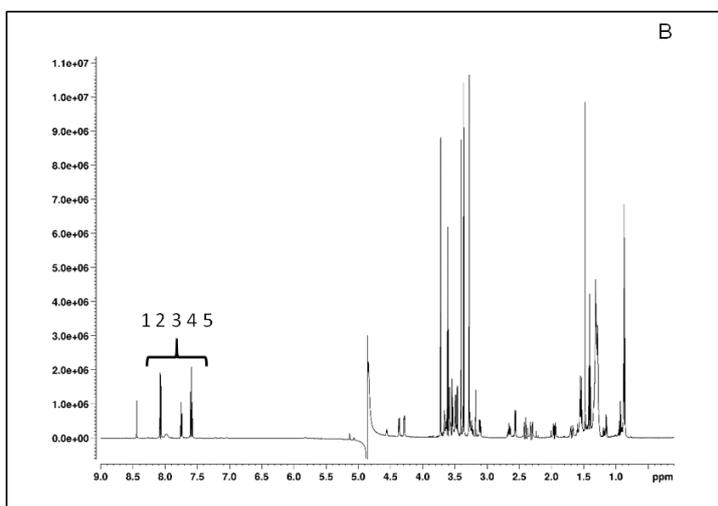
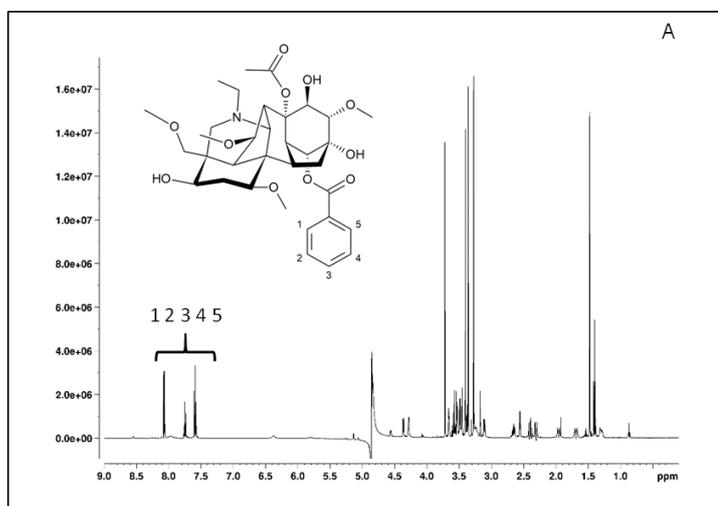
1.6 Acide p-coumarique



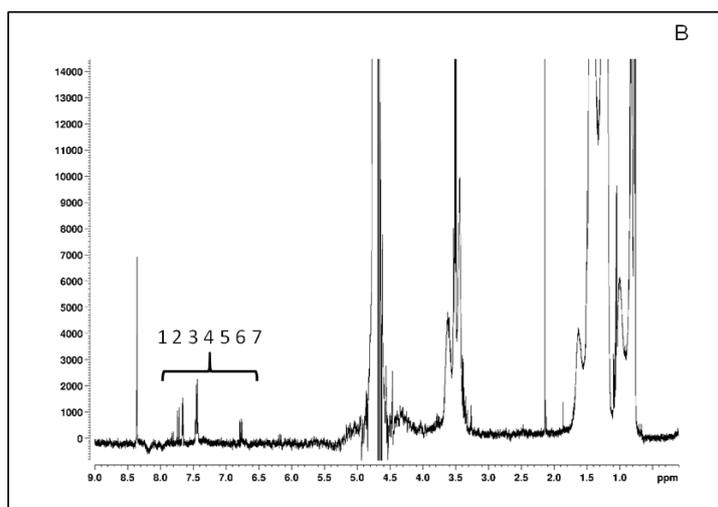
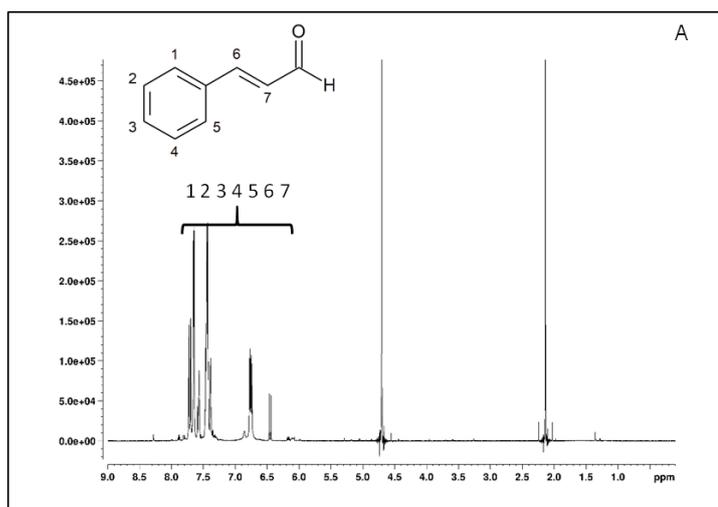
1.7 Acide salicylique



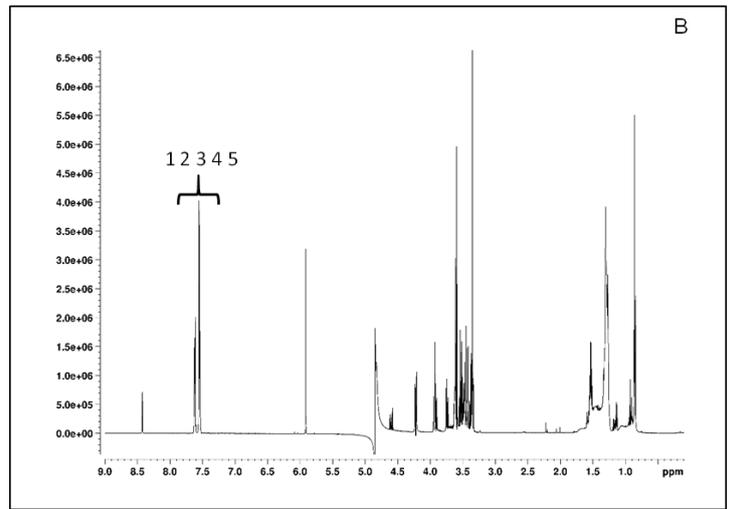
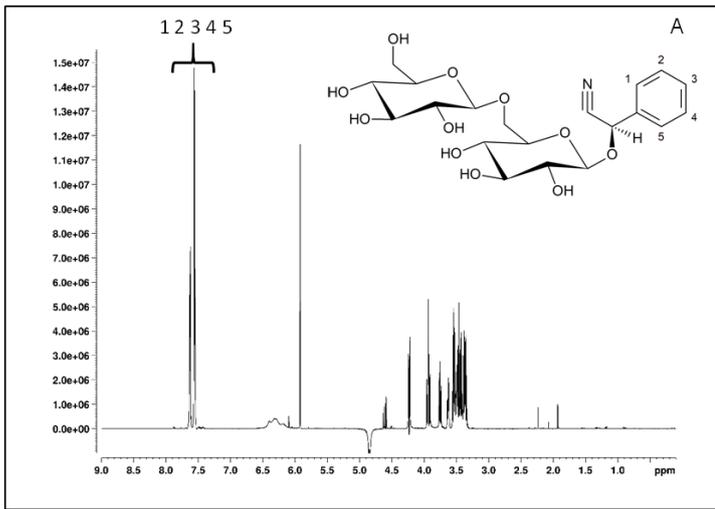
1.8 Aconitine



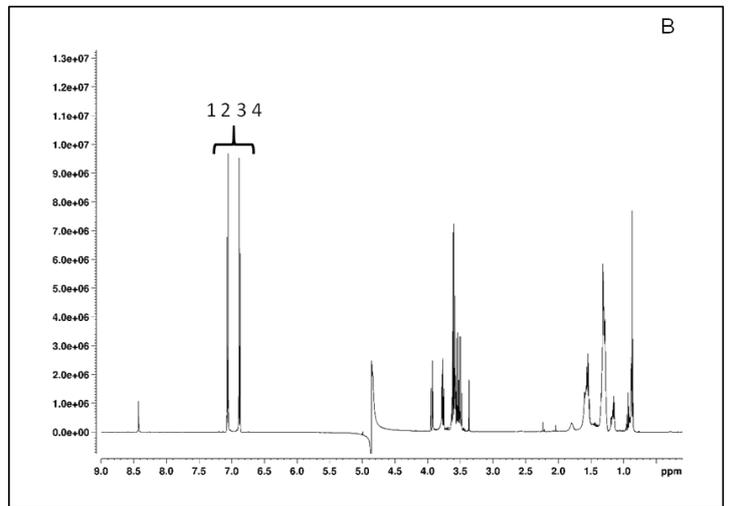
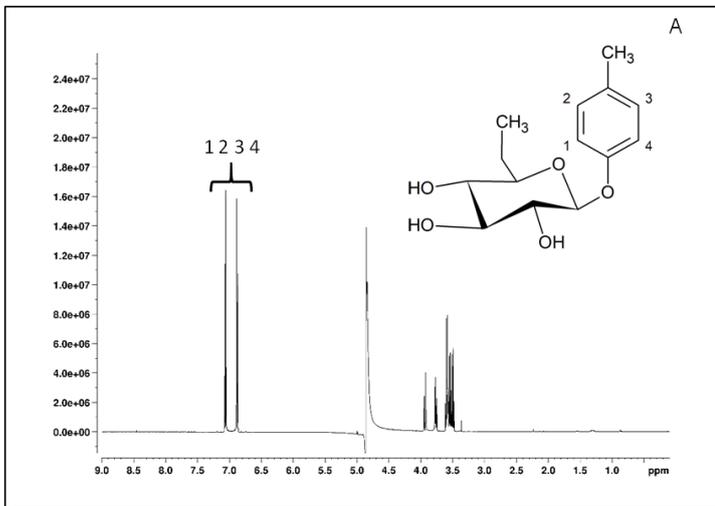
1.9 Aldéhyde cinnamique



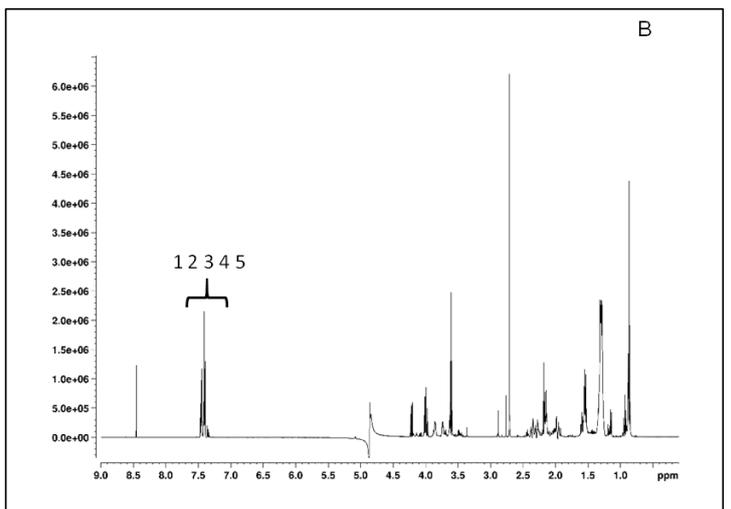
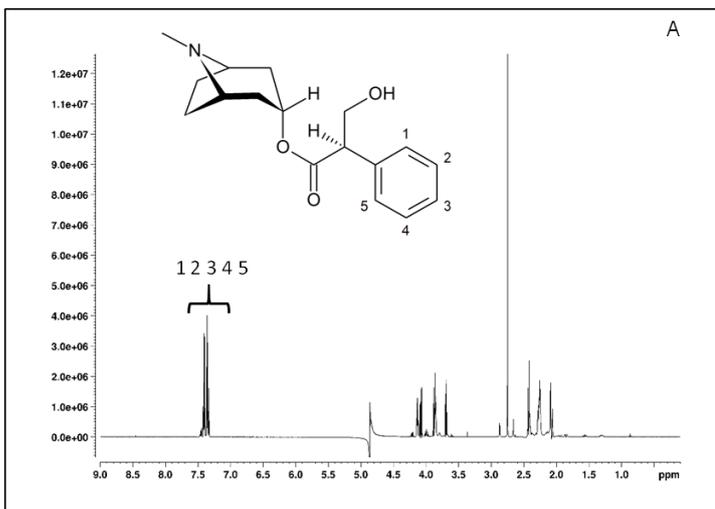
1.10 Amygdaline



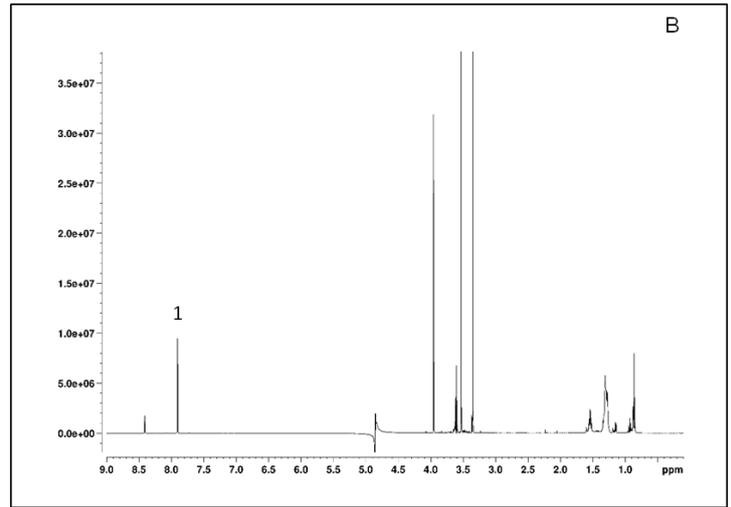
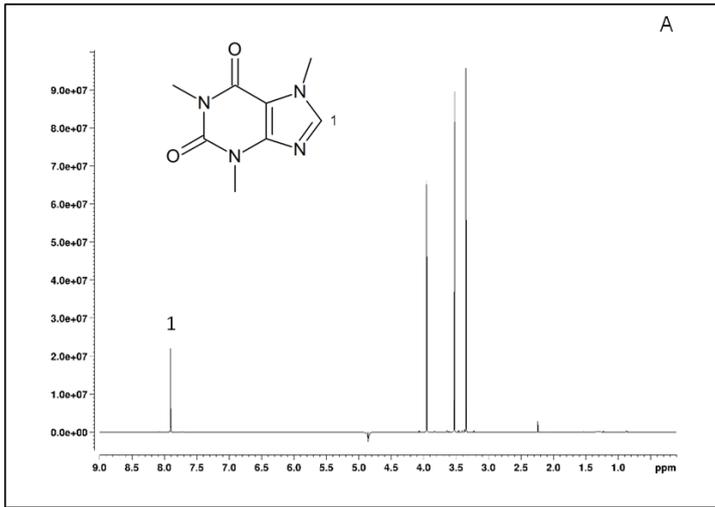
1.11 Arbutine



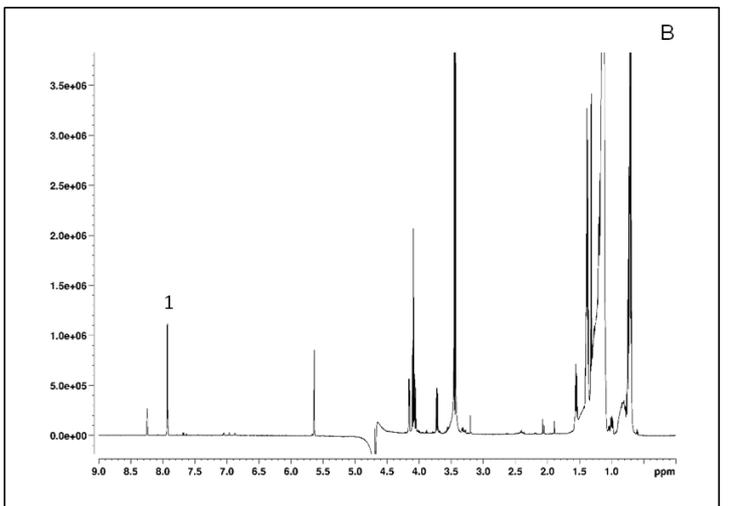
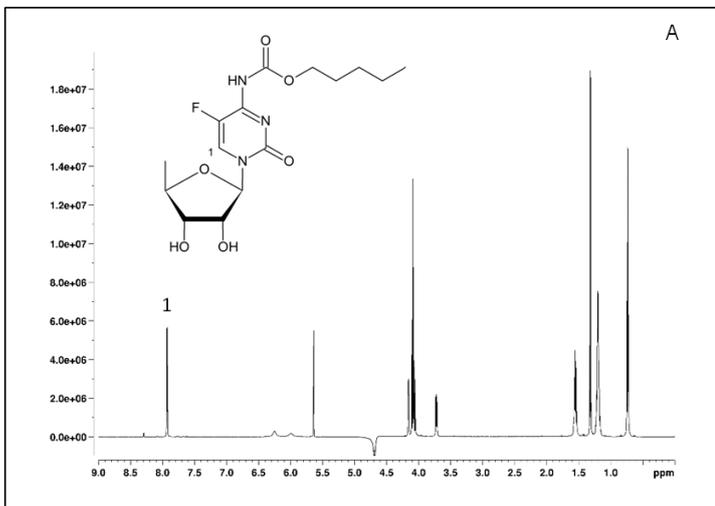
1.12 Atropine



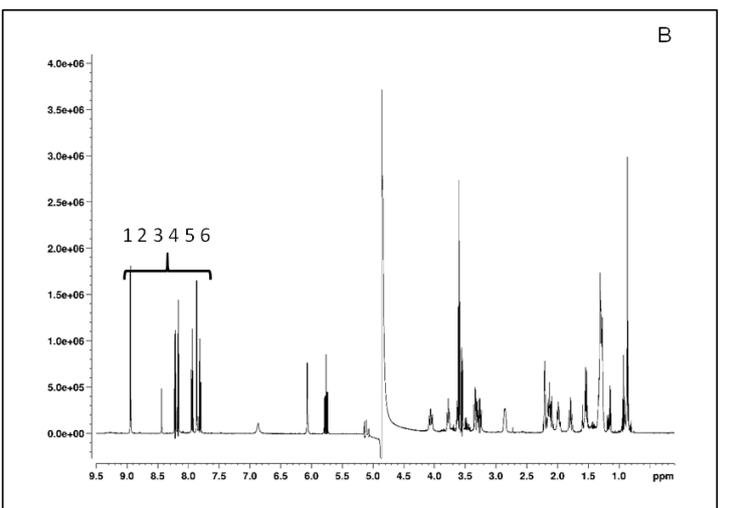
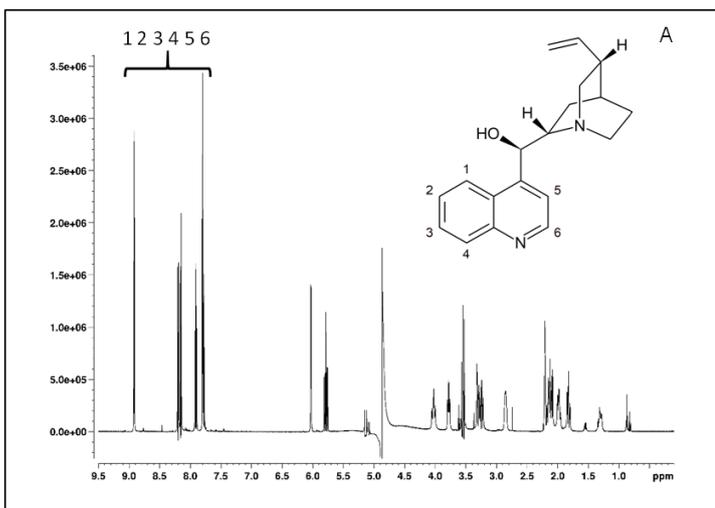
1.13 Caféine



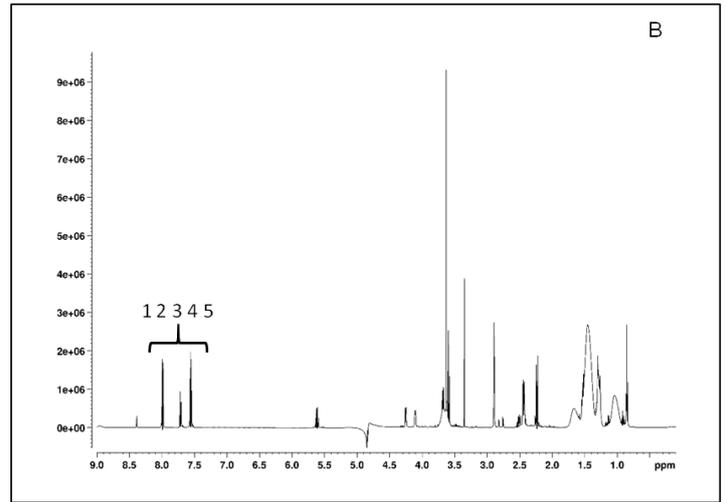
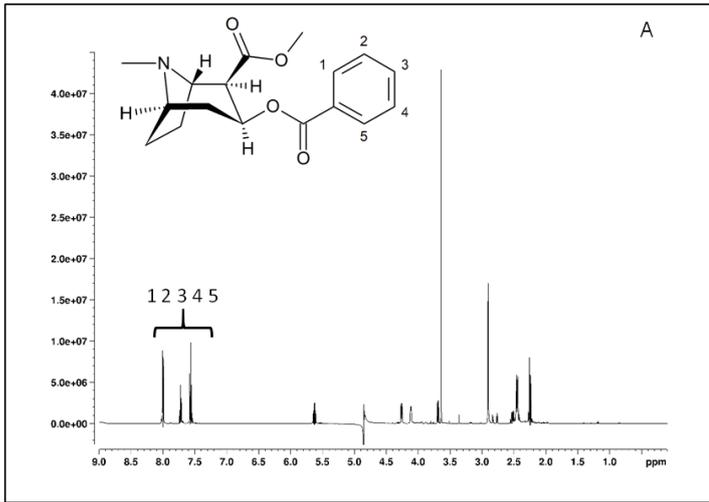
1.14 Capécitabine



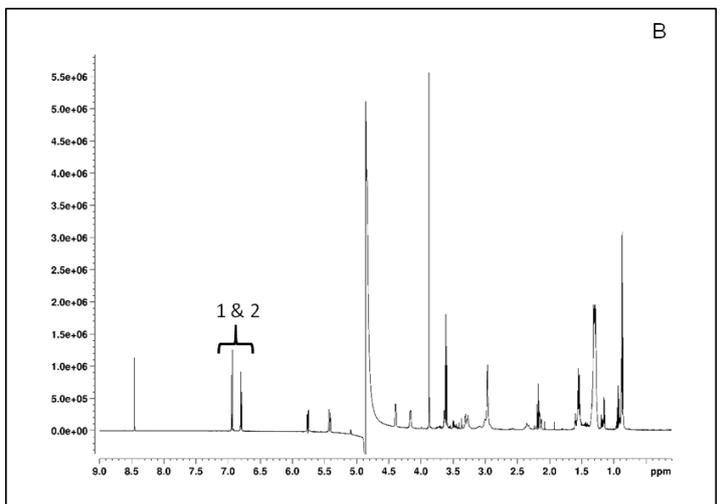
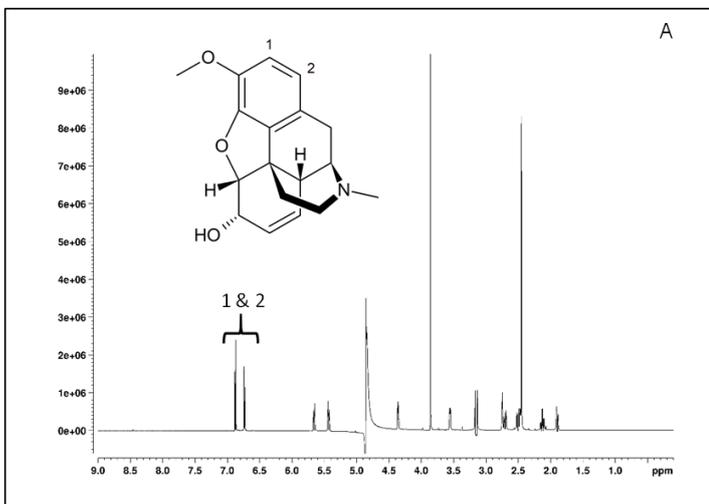
1.15 Cinchonidine



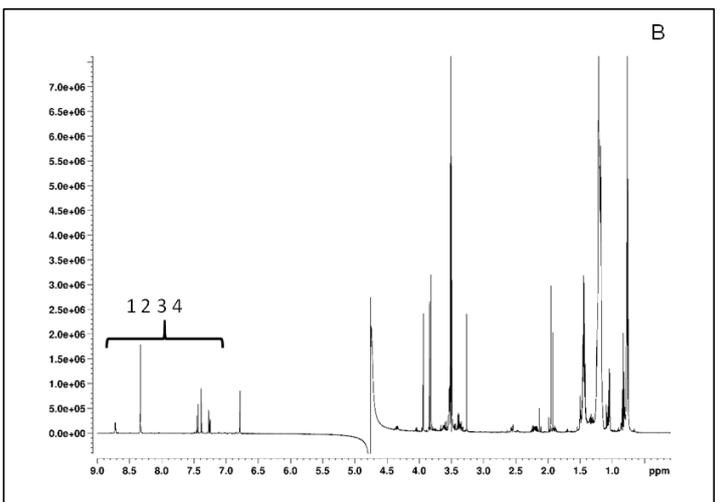
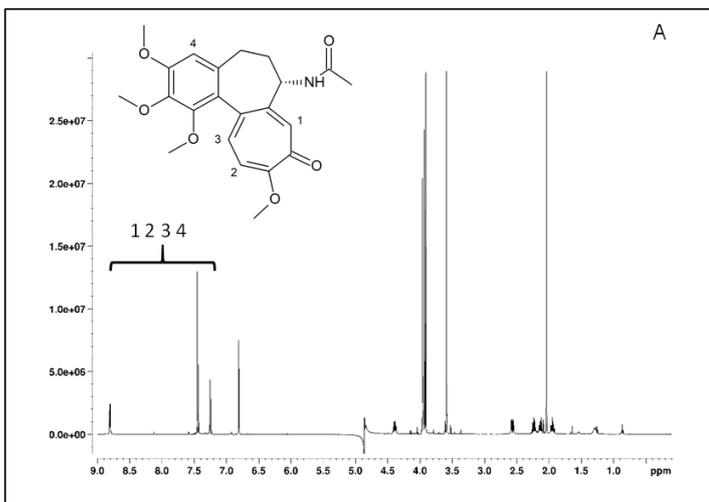
1.16 Cocaïne



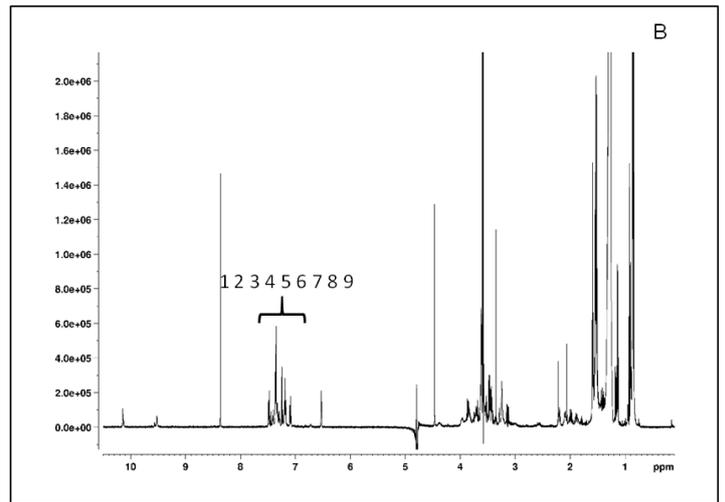
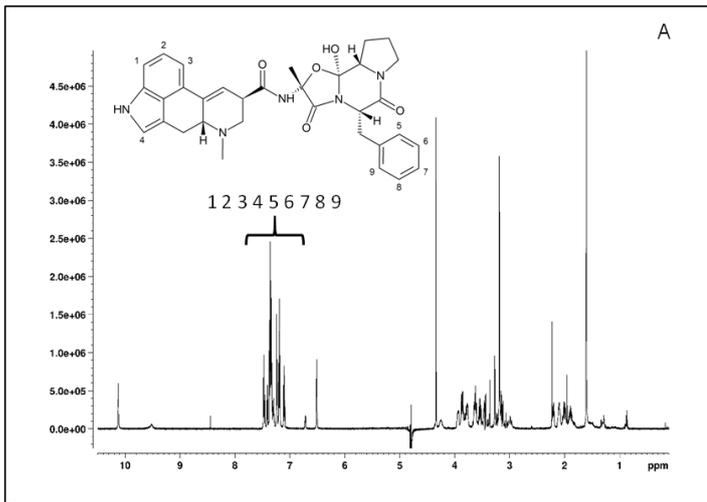
1.17 Codéine



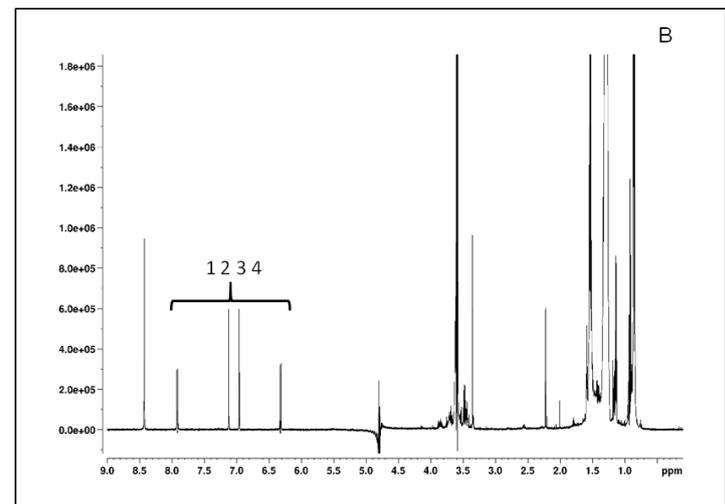
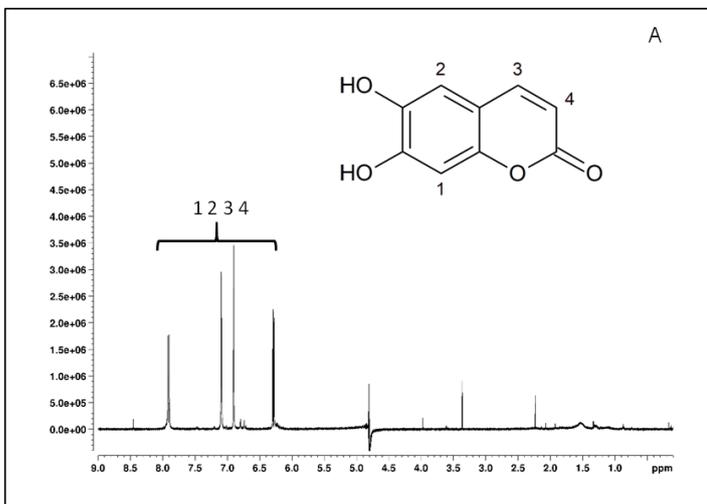
1.18 Colchicine



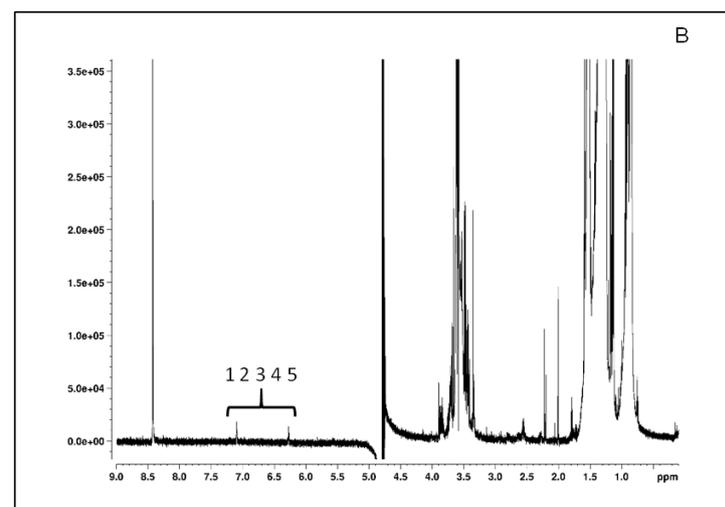
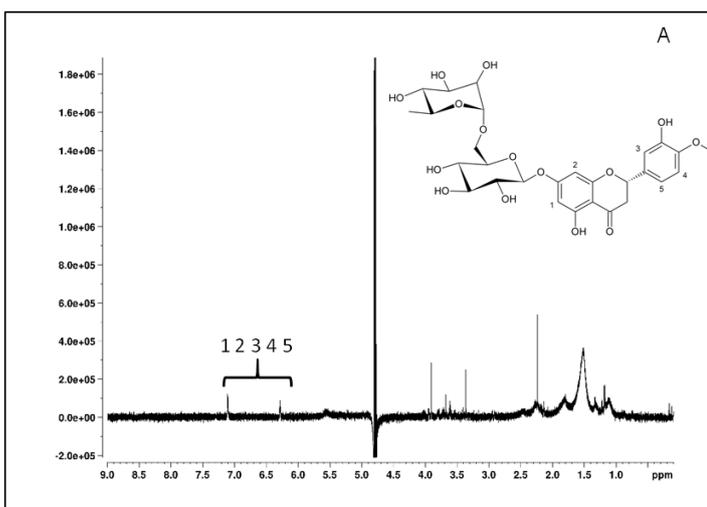
1.19 Ergotamine



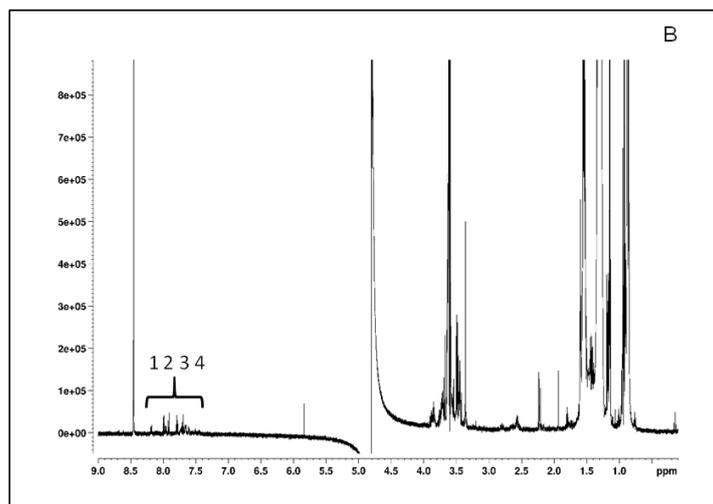
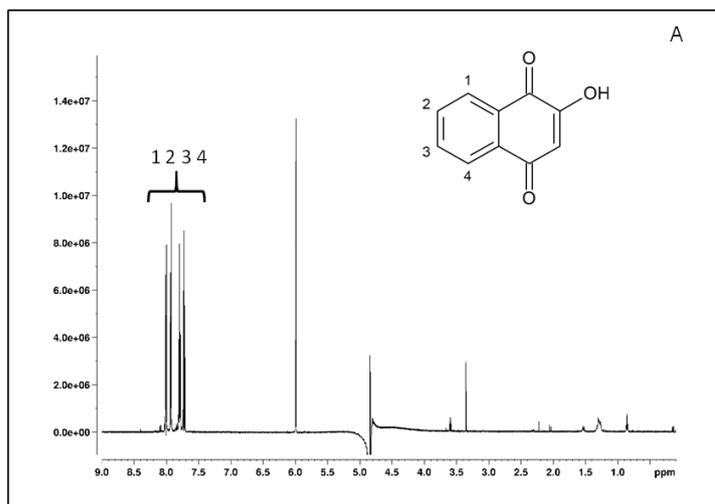
1.20 Esculétine



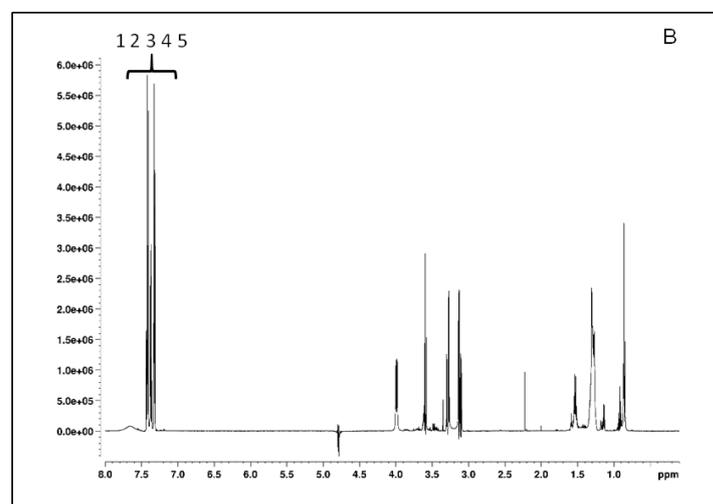
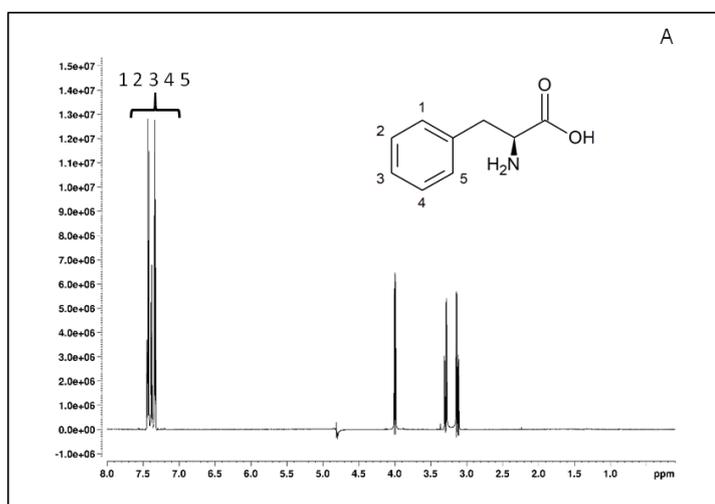
1.21 Hespéridine



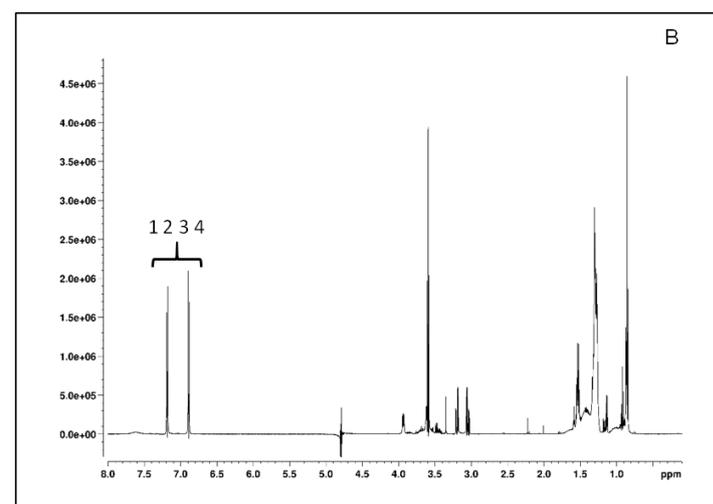
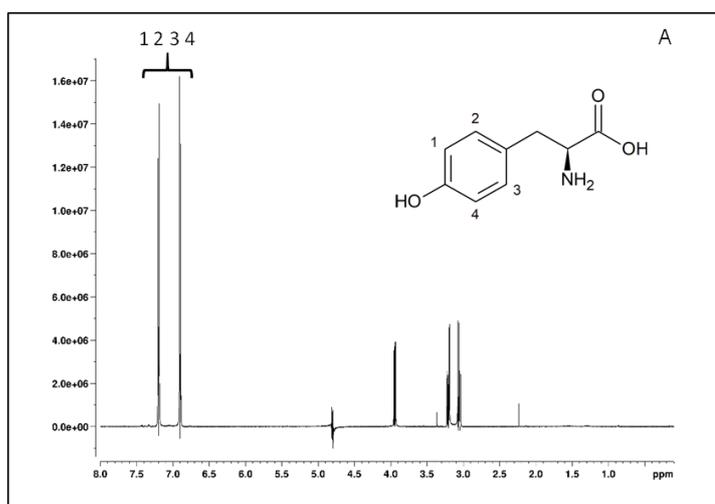
1.22 Lawsone



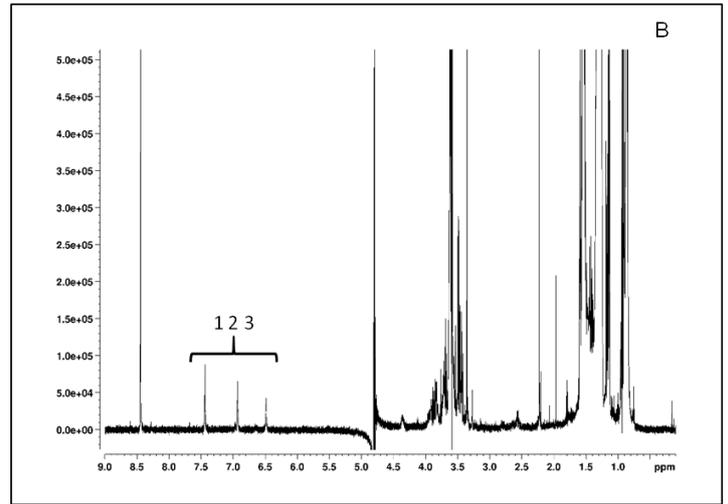
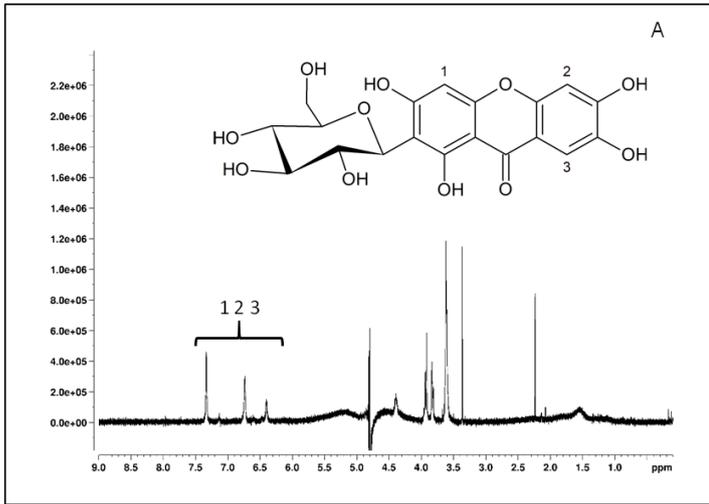
1.23 L-phénylalanine



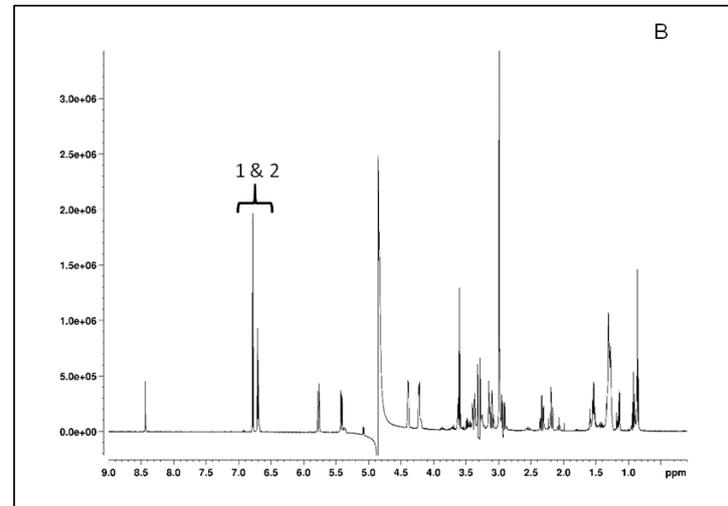
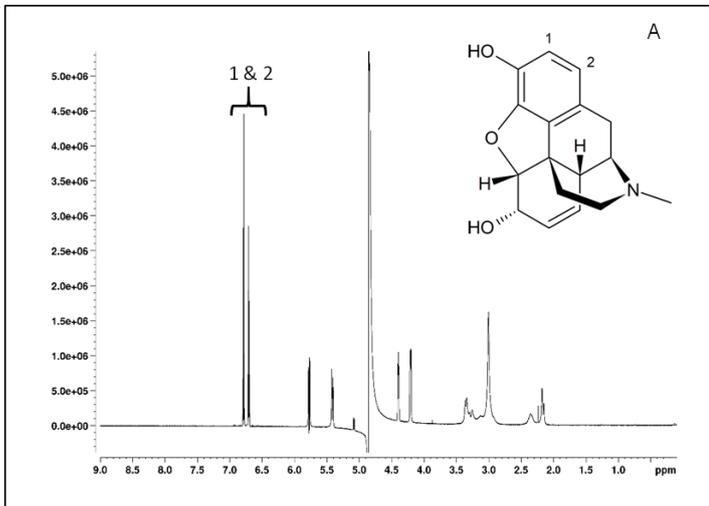
1.24 L-tyrosine



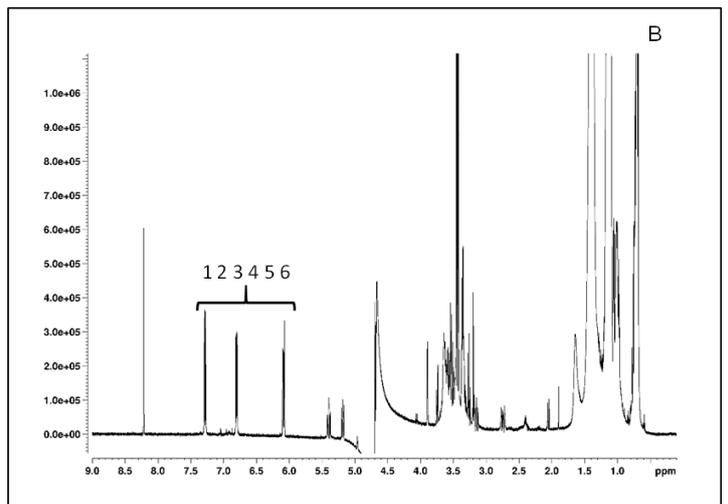
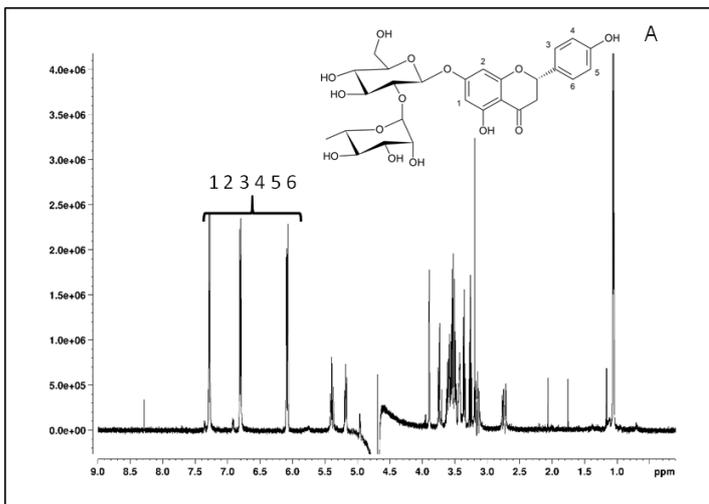
1.25 Mangiférine



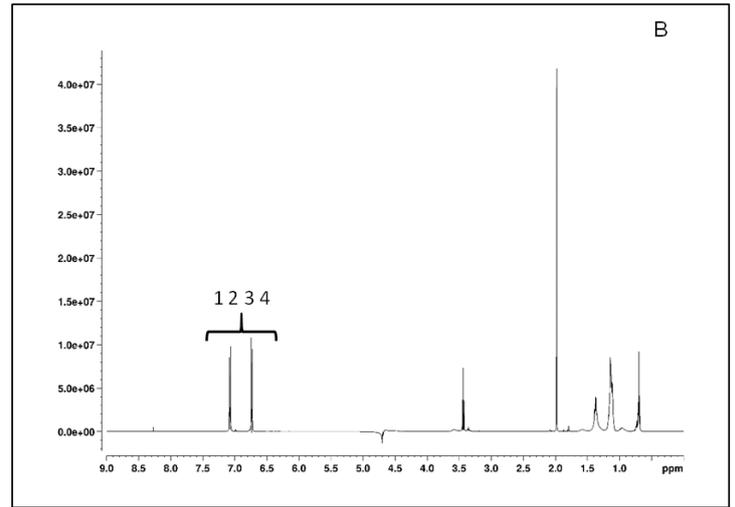
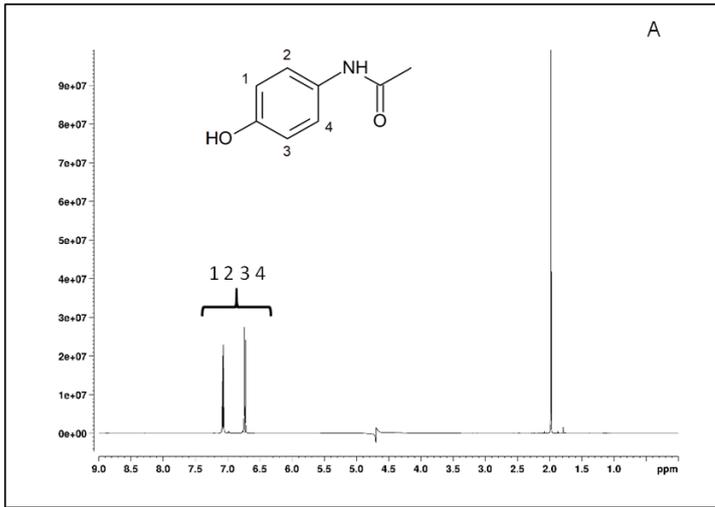
1.26 Morphine



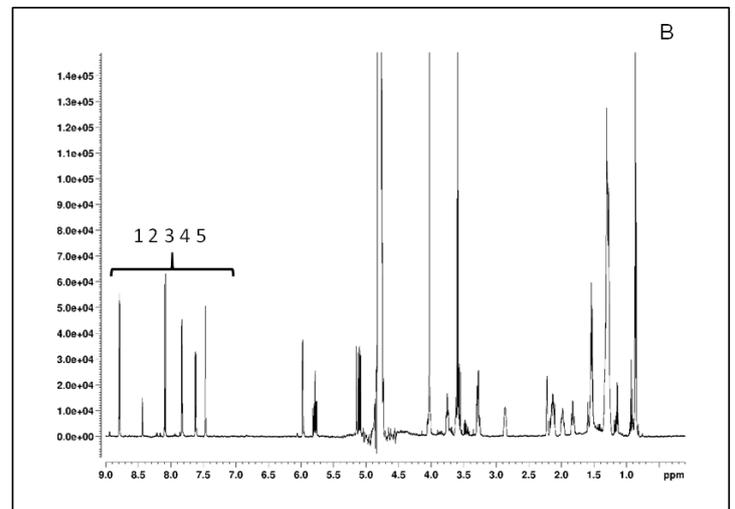
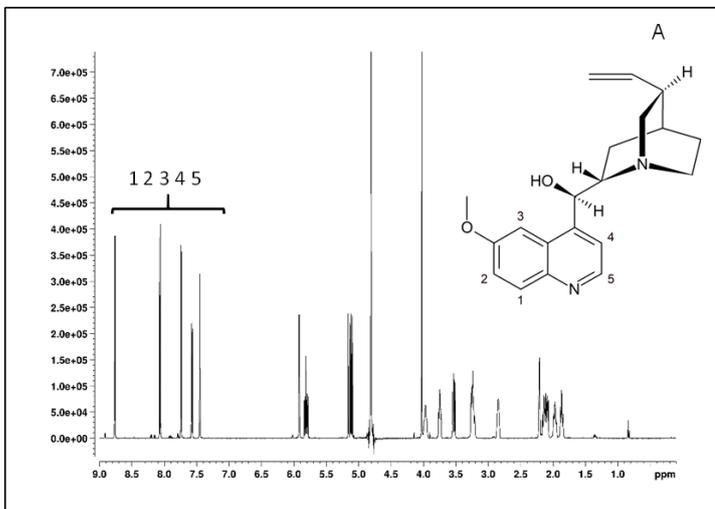
1.27 Naringine



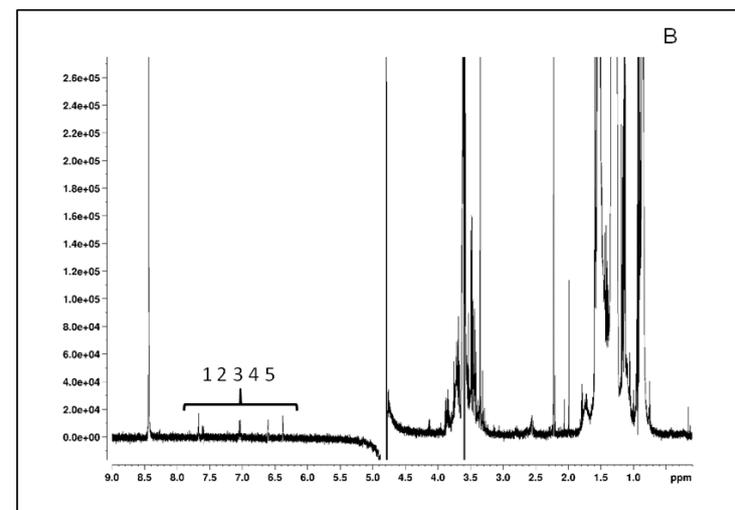
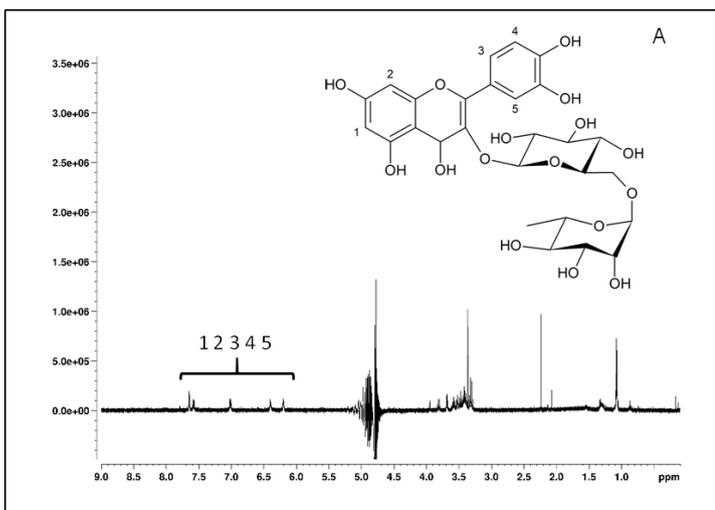
1.28 Paracetamol (ou acétaminophène)



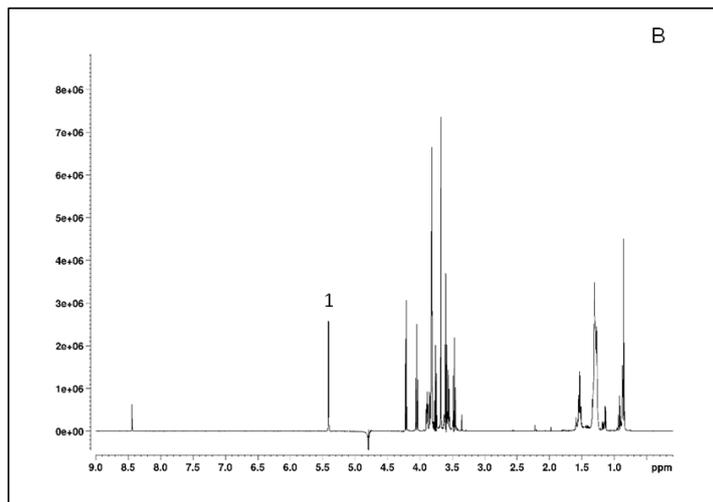
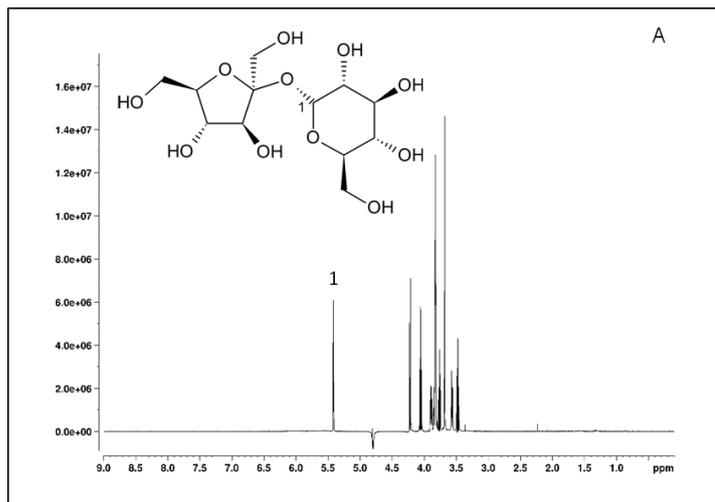
1.29 Quinine



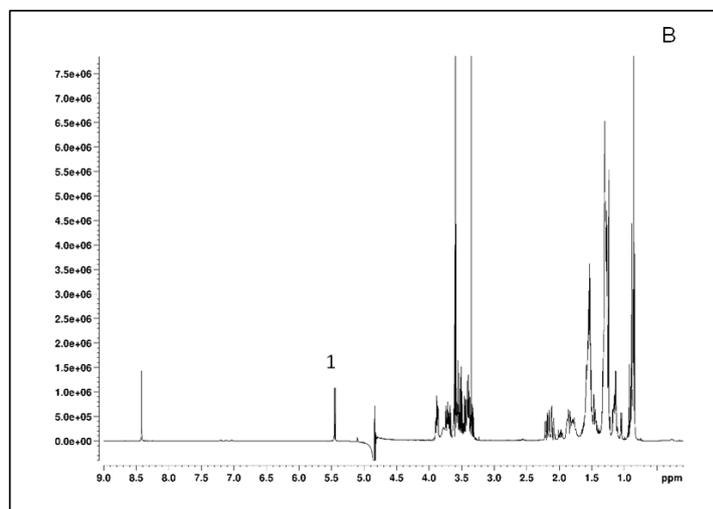
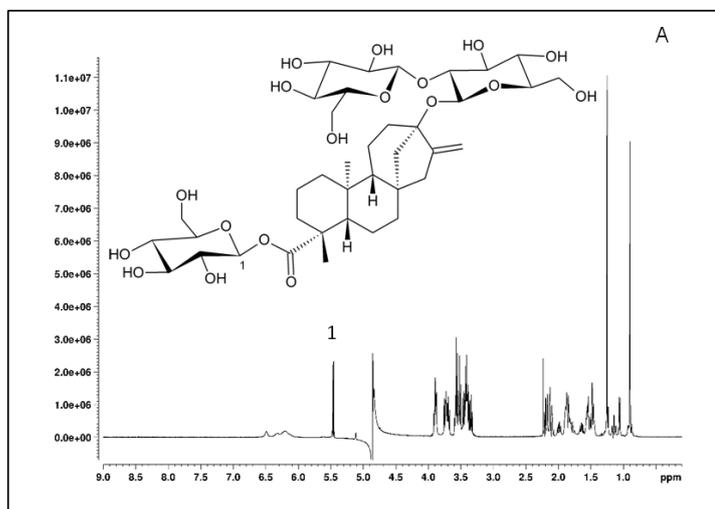
1.30 Rutinoside



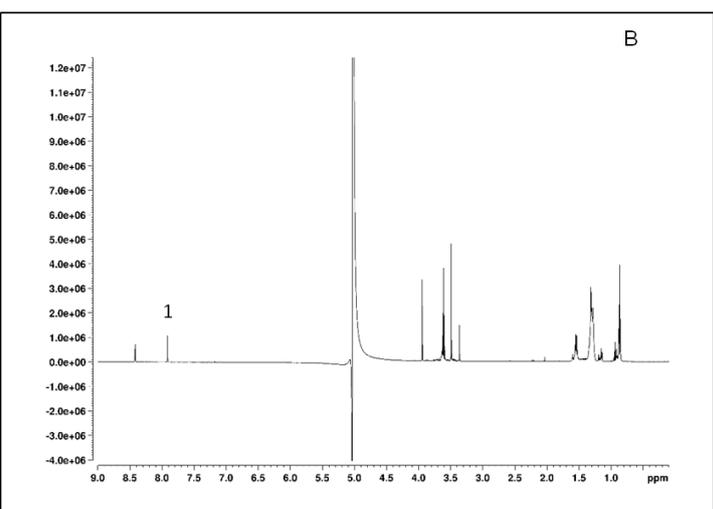
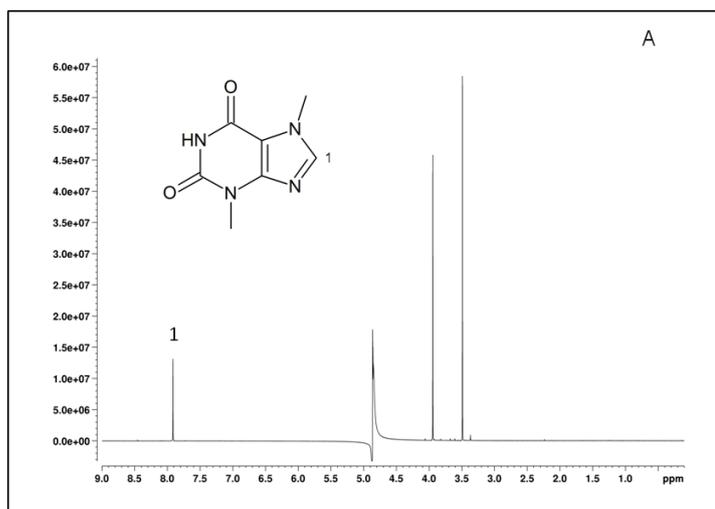
1.31 Saccharose



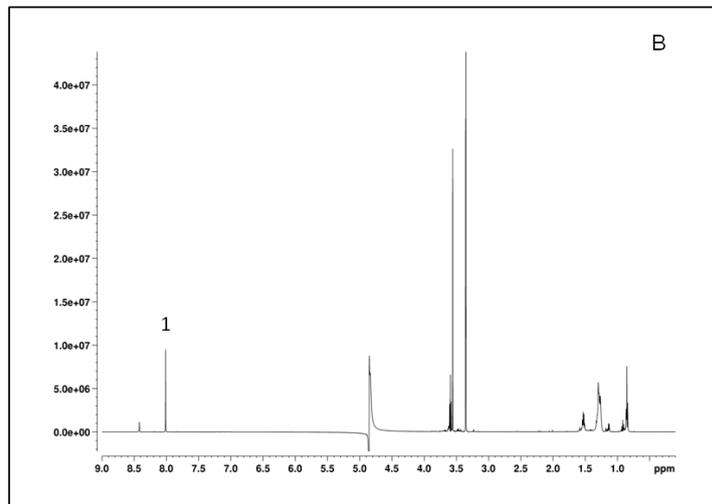
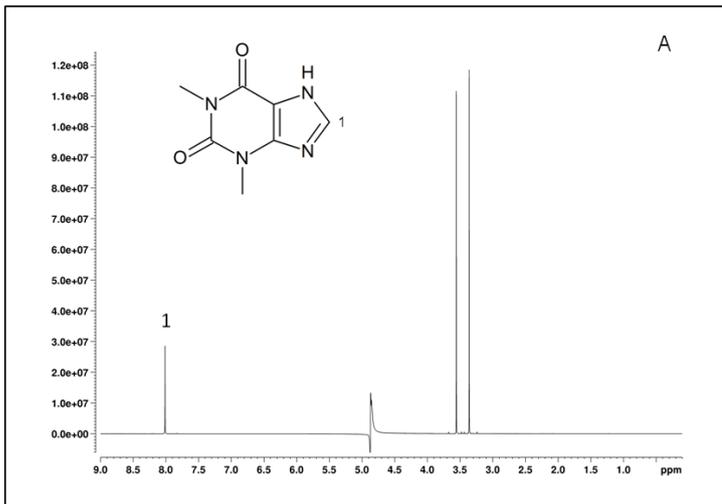
1.32 Stéviolide



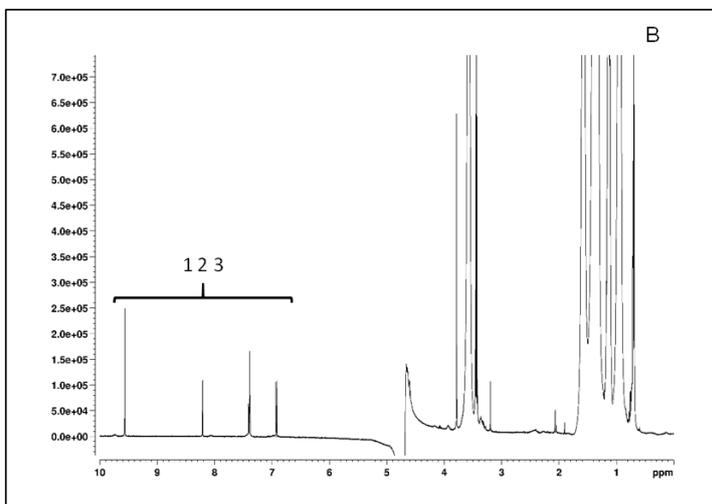
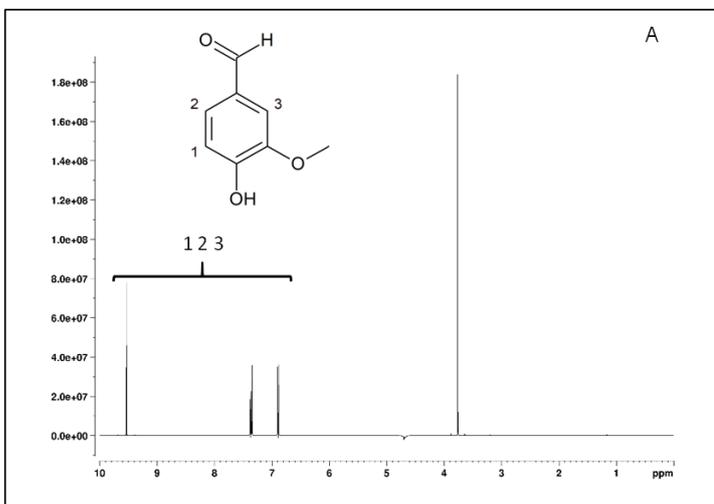
1.33 Théobromine



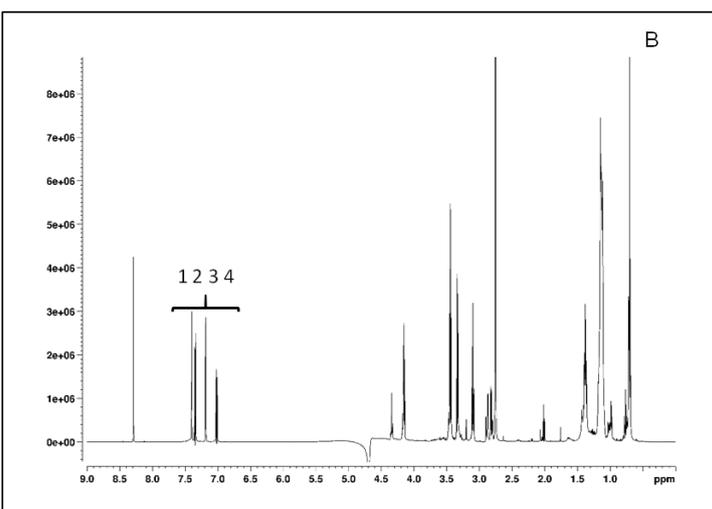
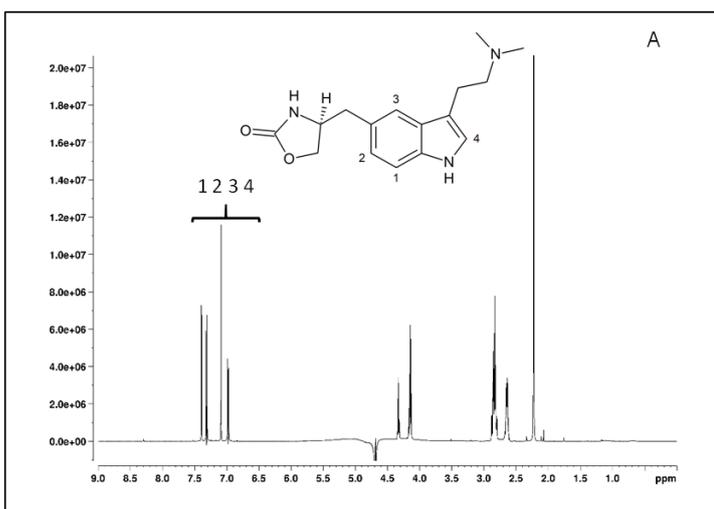
1.34 Théophylline



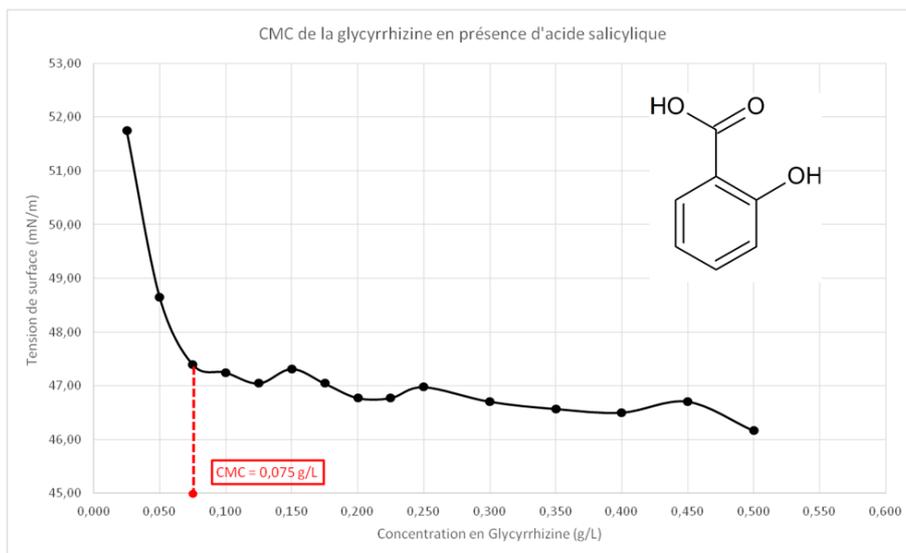
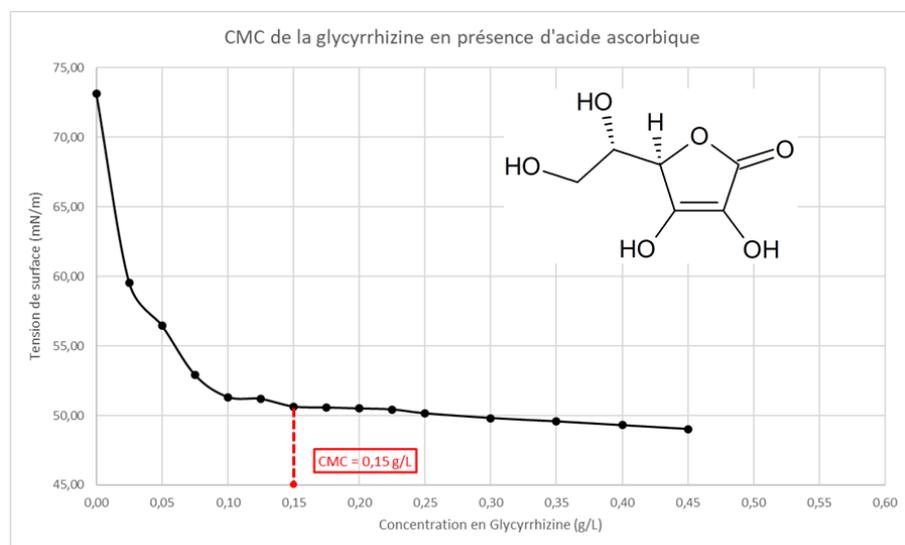
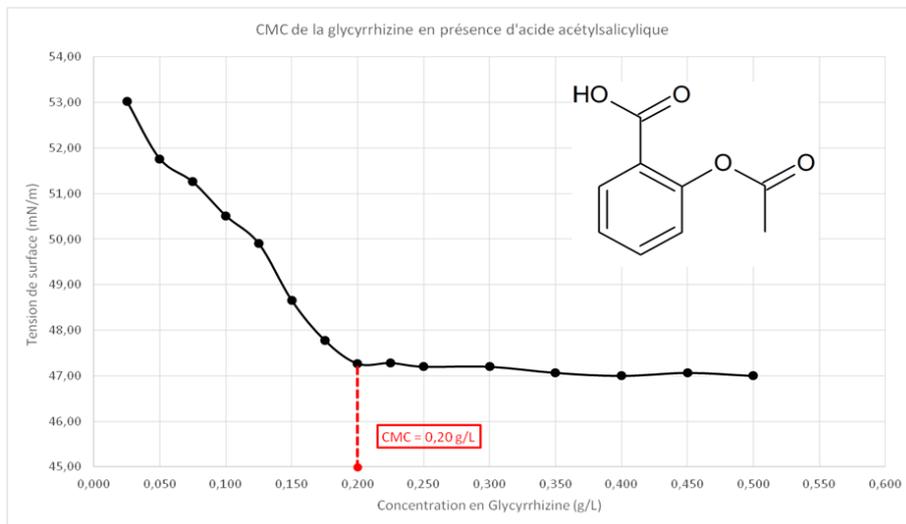
1.35 Vanilline

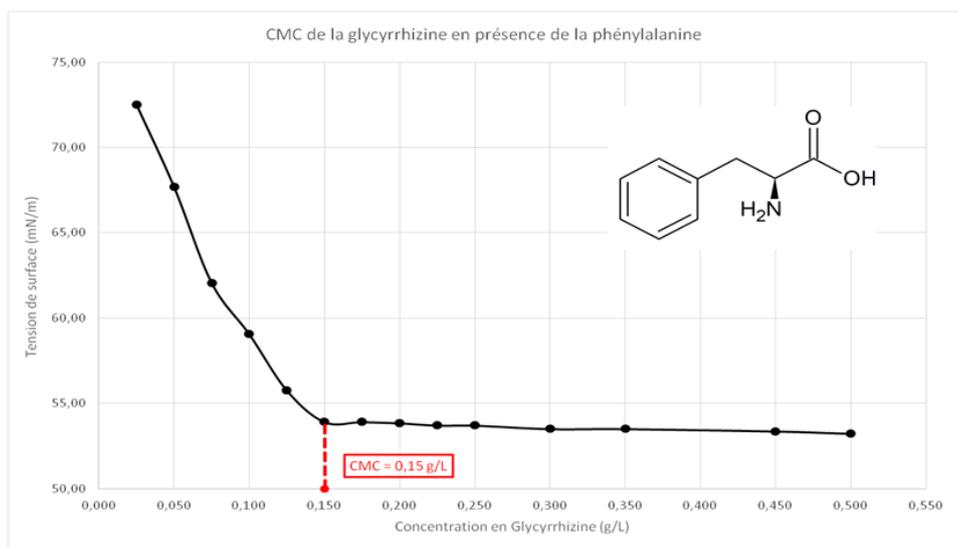
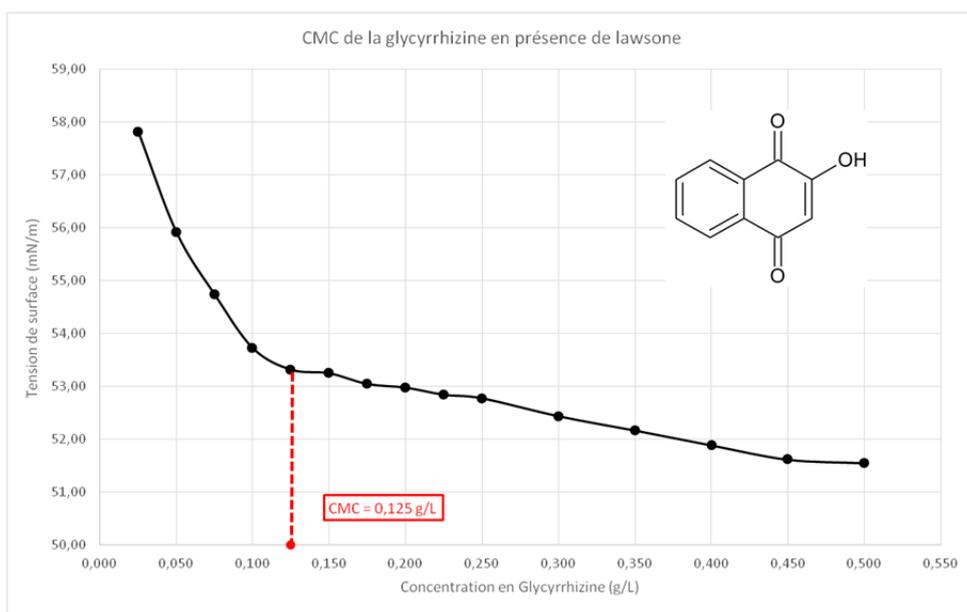
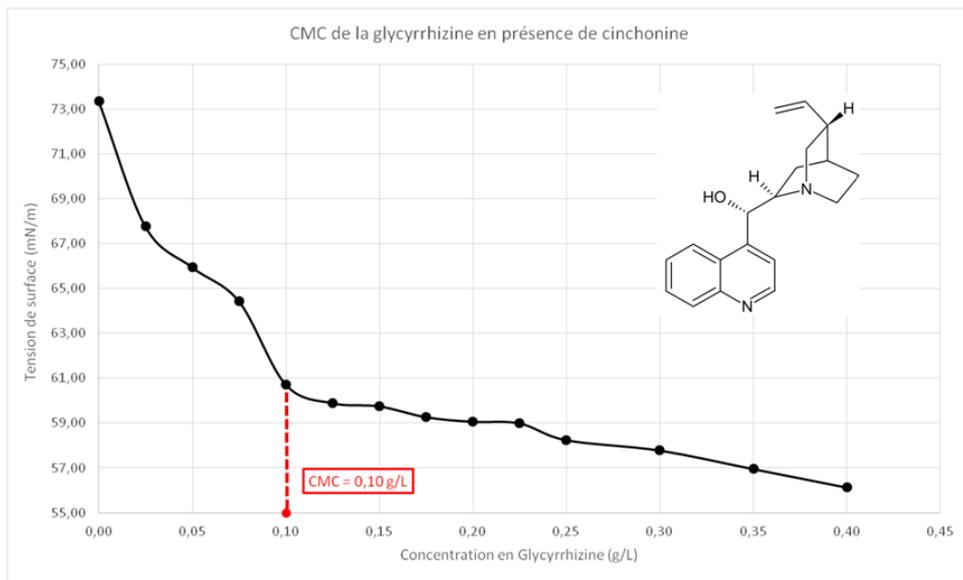


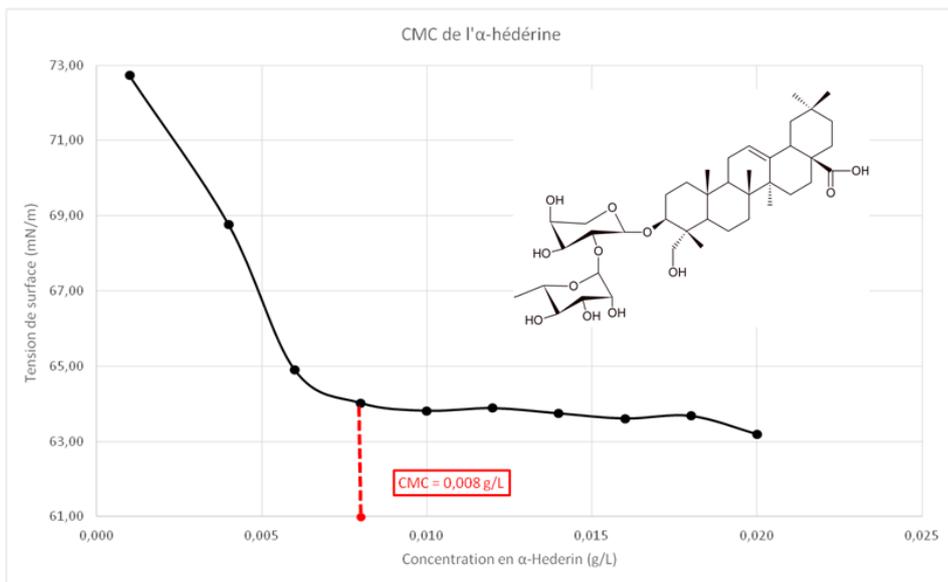
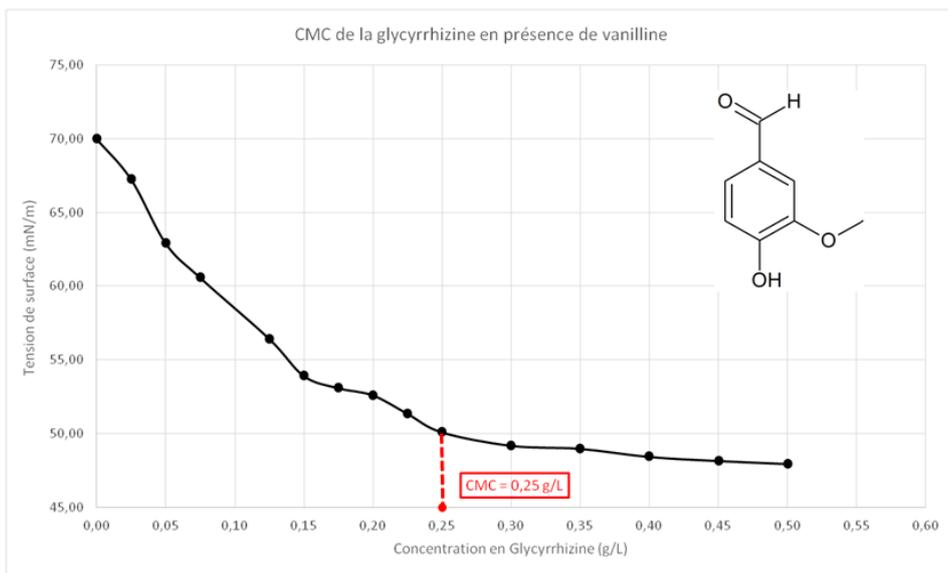
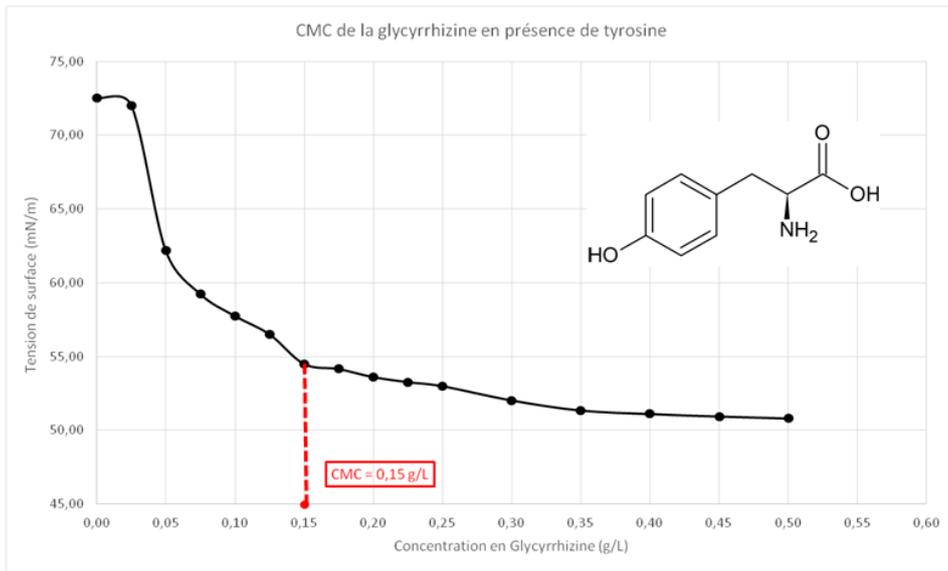
1.36 Zolmitriptan

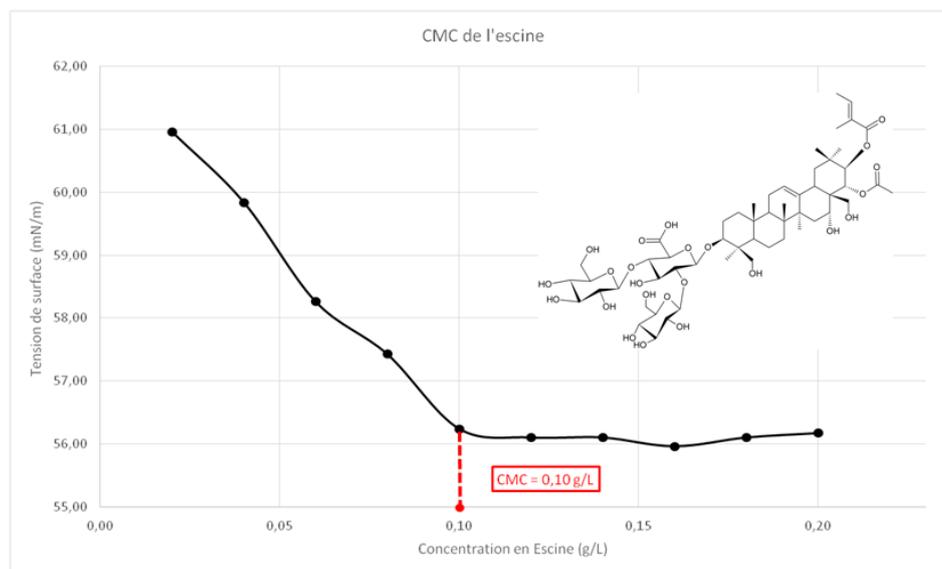
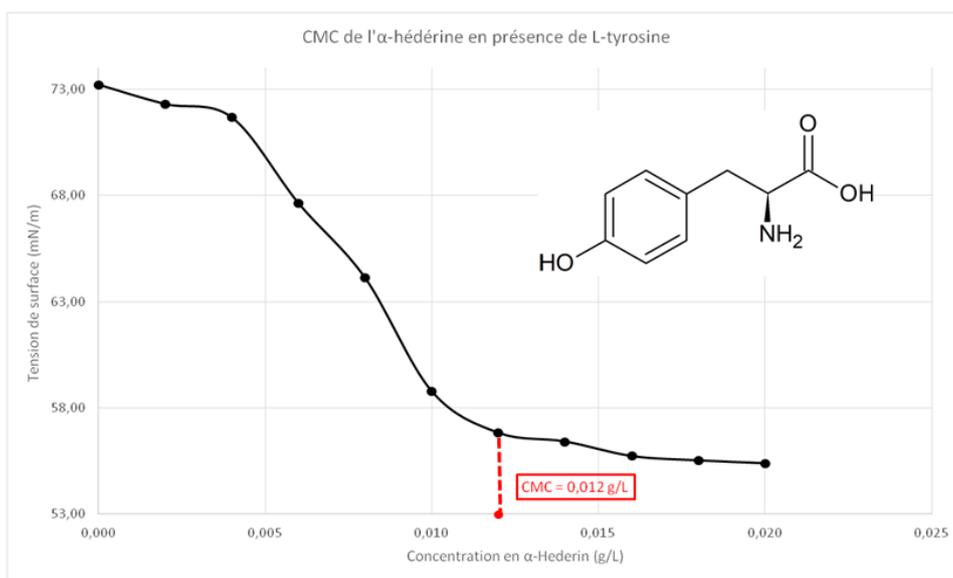
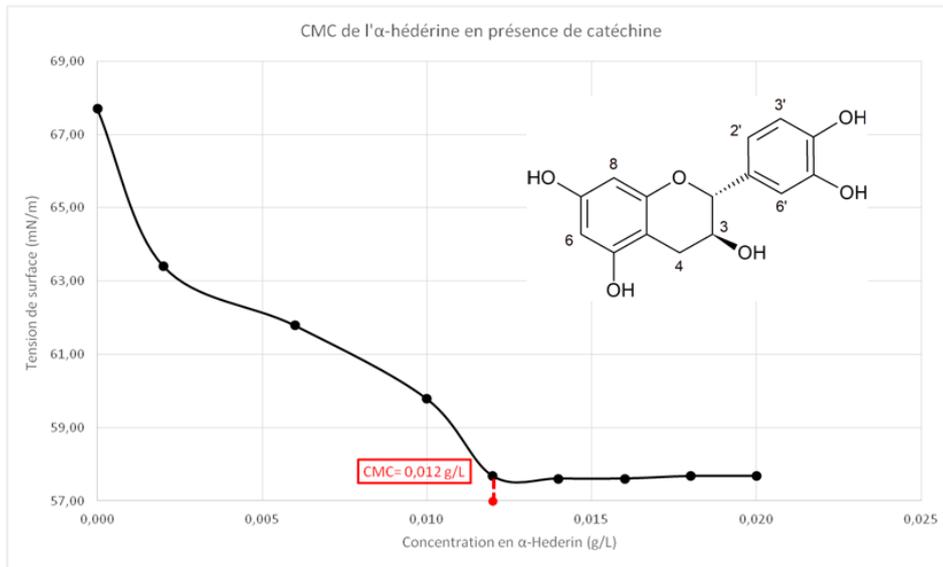


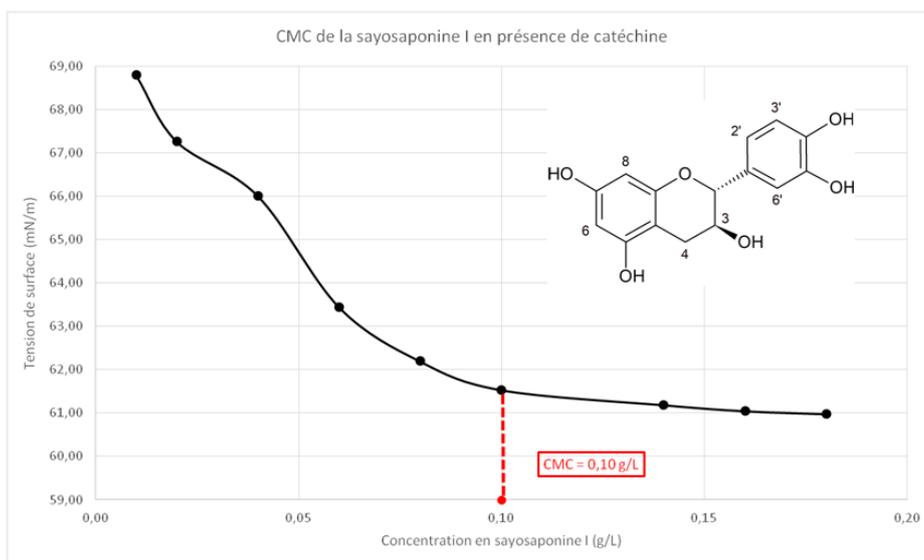
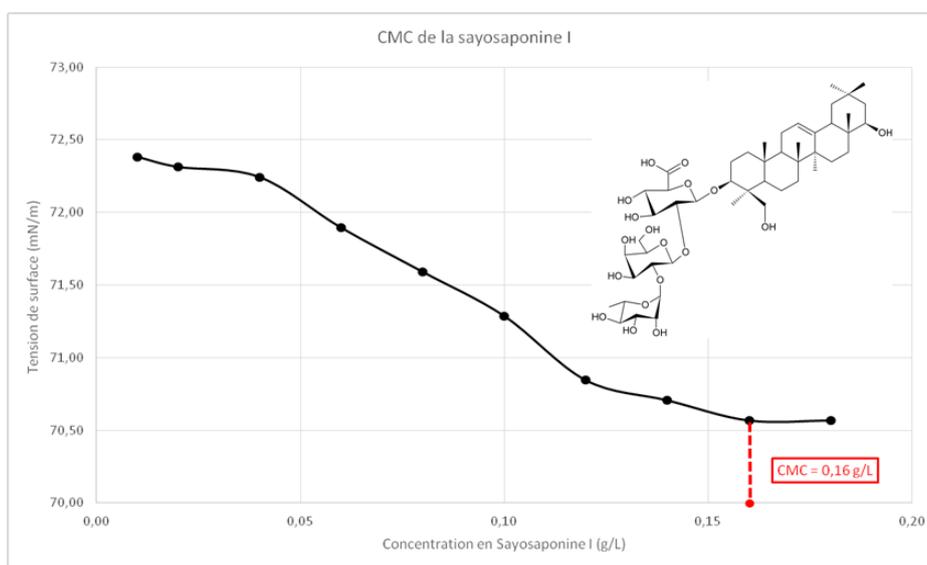
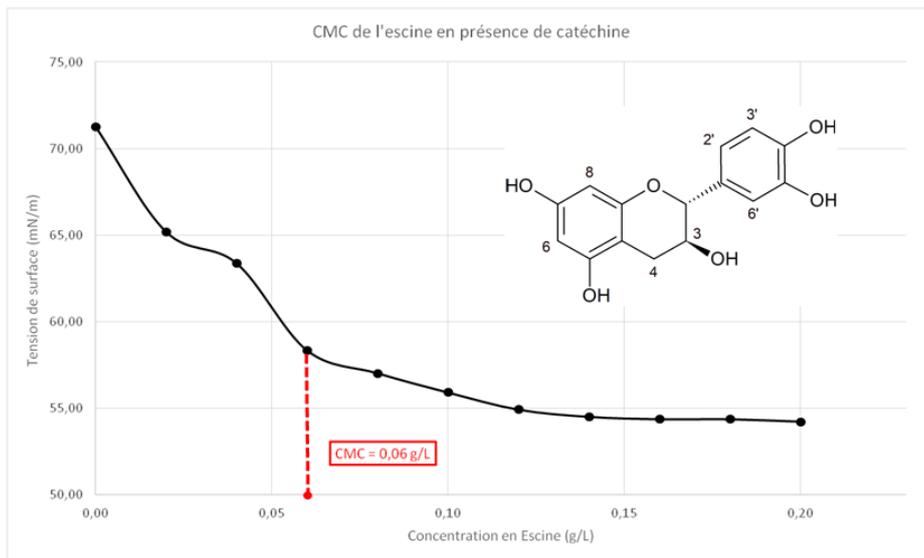
2 Courbes de CMC des saponosides en présence de métabolites secondaires

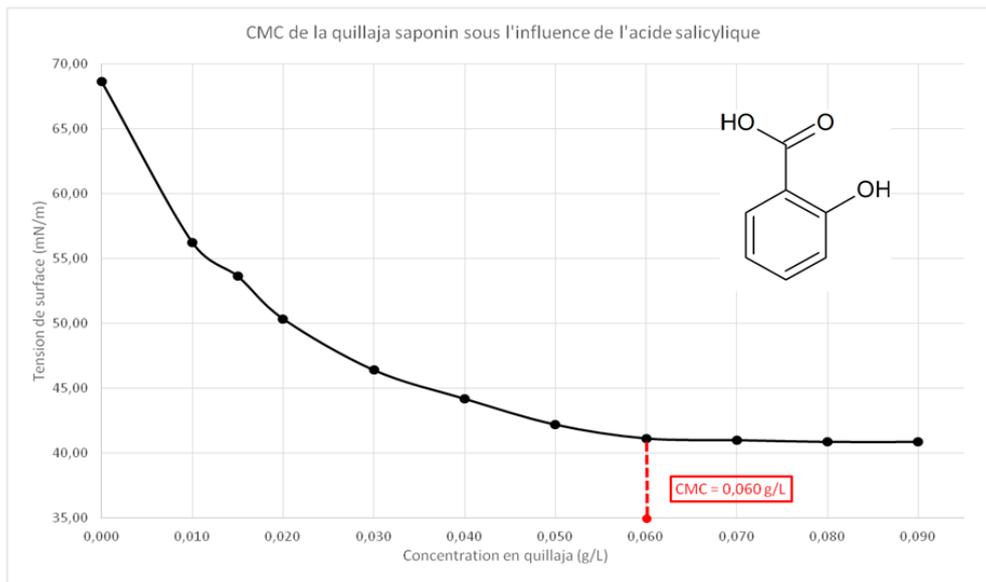
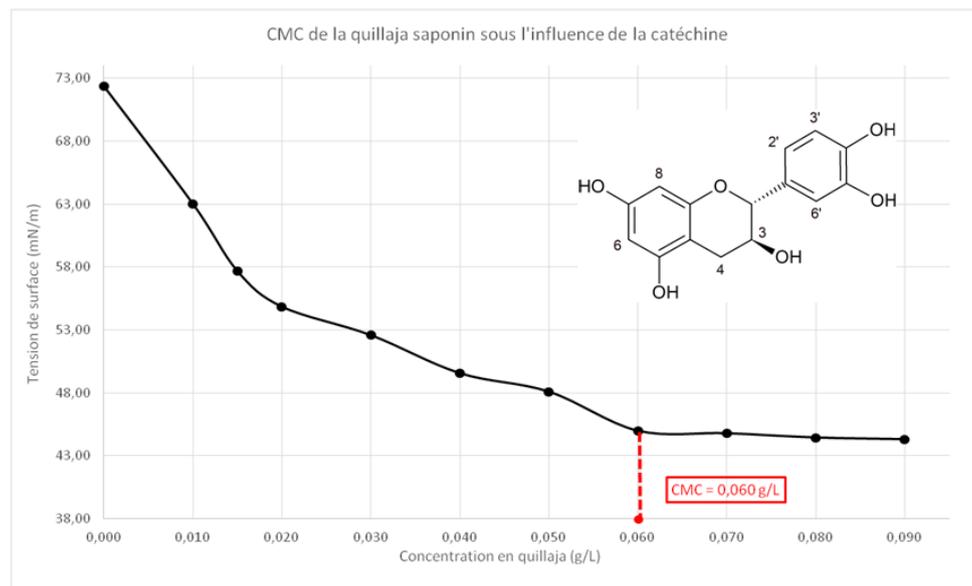
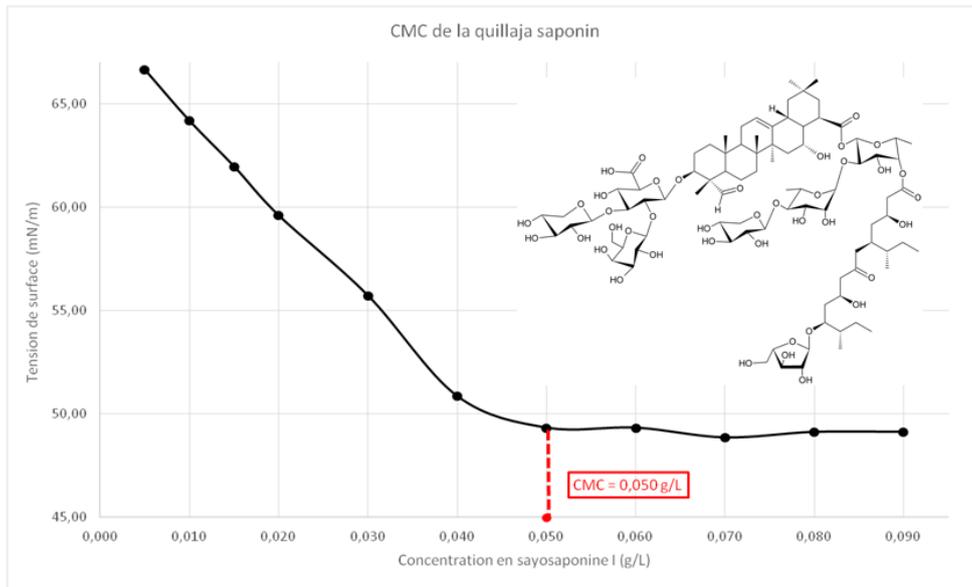


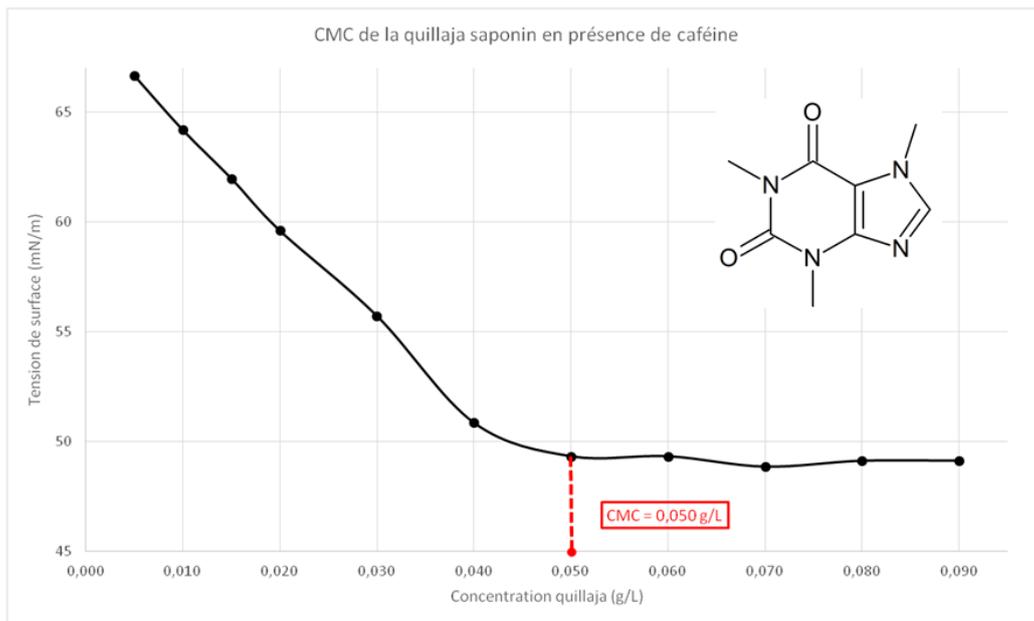












Contribution à la connaissance des pharmacopées traditionnelles : biodisponibilité des substances naturelles et influence des saponosides

Les plantes renferment des substances pharmacologiques actives qui ont abouti à la découverte de médicaments « leader » dans de nombreux domaines thérapeutiques. Ces molécules actives présentent généralement une faible solubilité dans les milieux aqueux et biologiques qui contribue à une faible biodisponibilité ralentissant leur absorption *per os*. Si la phytothérapie occidentale mise sur un ingrédient actif unique pour soigner, l'herboristerie de la Médecine Traditionnelle Chinoise (MTC) mise sur l'effet conjugué des composants d'une plante ou d'un mélange de plantes pour créer des « formulations traditionnelles » dans lesquelles on retrouve des plantes à saponosides dans le rôle de plante « harmonisante ». Ces saponosides constituent un vaste groupe d'hétérosides connus pour leurs propriétés solubilisantes et tensioactivité naturelle. Nous nous proposons d'étudier cet effet solubilisant vis à vis d'autres métabolites naturels et d'élargir cette étude à des extraits complexes issus de plantes utilisées en MTC. Nous avons ainsi mis au point une méthode de mesure innovante du coefficient de partage par Résonance Magnétique Nucléaire pour mettre en évidence l'impact des saponosides sur le coefficient de partage des métabolites naturels. Selon les molécules étudiées, ces modifications du coefficient de partage dépendent du pouvoir hydrosolubilisant des saponosides et/ou de la formation de complexes micellaires. La cohérence de ces résultats et leur application en thérapeutique traditionnelle a été confirmée par l'observation des micelles en microscopie optique et par quantification en Chromatographie Liquide Haute Performance de l'extraction aqueuse de métabolites naturels.

Biodisponibilité, Médecine Traditionnelle, Substances Naturelles, Saponoside, Coefficient de partage, RMN, Microscopie, Tensioactivité, Hydrosolubilité

Contribution to the knowledge of traditional pharmacopoeia: bioavailability of natural products and influence of saponins

Plants possess many active substances on a pharmacological level that lead to the discovery of major medicines in numerous therapeutic fields. Many of these active molecules present a low aqueous solubility that translates into a low bioavailability, slowing oral absorption. While western phytotherapy cures diseases through a single active ingredient, traditional herbology from Traditional Chinese Medicine (TCM) uses the combined effects of every constituent of a plant or even a mix of multiple plants to build a "traditional formula" in which Saponin-rich plants are well represented as balancing/harmonizing agents. Saponins compose a vast natural heterosidic group known to possess solubilizing abilities linked to their natural tensioactivity. In this thesis, we wish to measure the solubilizing and complexation properties of saponins on bioactive natural metabolites and extend those measurements to complex mixture of medicinal plants used in TCM. For this purpose, we have created a novel method to measure partition coefficients using Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy to evaluate the impact of saponins on the partition coefficient of natural metabolites. Depending on the studied molecules, these changes in the partition coefficient depend on the water-solubilizing power of saponins and/or the formation of micellar complexes in solution. Those results and their therapeutic application were confirmed by the direct observation of micelles in optical microscopy and quantification of extracted natural metabolites through High Performance Liquid Chromatography.

Bioavailability, Traditional Medicine, Natural Product, Saponin, Partition Coefficient, NMR, Microscopy, Tensioactivity, Hydrosolubility

Discipline : CHIMIE

Spécialité : Chimie des substances naturelles

Université de Reims Champagne-Ardenne

ICMR - UMR CNRS 7312

Campus Sciences, Moulin de la Housse, Case postale 44, 51687 Reims Cedex 2

